

УДК 57.016

## ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ КАЛЬЦИЙ-МАГНИЕВОЙ СИЛИКАТНОЙ КЕРАМИКИ ДИОПСИДА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ВМР-2 И ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА В КАЧЕСТВЕ КАРКАСА: ДИНАМИКА РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА НА МОДЕЛИ КРАНИОТОМИИ У МЫШЕЙ

© 2022 А.С. Карягина<sup>1,2,3\*</sup>, П.А. Орлова<sup>1</sup>, М.С. Попонова<sup>1</sup>, И.Н. Бульгина<sup>1,4</sup>, Р. Чоудхари<sup>5,6</sup>, А.В. Жулина<sup>1</sup>, Т.М. Грунина<sup>1,3</sup>, К.Е. Никитин<sup>1</sup>, Н.В. Струкова<sup>1</sup>, М.С. Генералова<sup>1</sup>, А.В. Рязанова<sup>1</sup>, П.А. Ковалёва<sup>4</sup>, А.И. Зими́на<sup>4</sup>, Е.М. Лукинова<sup>4</sup>, Е.Д. Плахотнюк<sup>4</sup>, М.А. Кирсанова<sup>7</sup>, Е.А. Колесников<sup>4</sup>, Е.В. Захарова<sup>4</sup>, В.Н. Манских<sup>2</sup>, Ф.С. Сенатов<sup>1,4</sup>, А.В. Громов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия; электронная почта: akaryagina@gmail.com, alexander.v.gromov@gmail.com

<sup>2</sup> НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

<sup>3</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 Москва, Россия

<sup>4</sup> Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», 119049 Москва, Россия

<sup>5</sup> Рижский технический университет, LV-1007 Рига, Латвия

<sup>6</sup> Балтийский центр передового опыта в области биоматериалов, штаб-квартира в Рижском техническом университете, LV-1048 Рига, Латвия

<sup>7</sup> Сколковский институт науки и технологий, 121205 Москва, Россия

Поступила в редакцию 05.07.2022

После доработки 30.08.2022

Принята к публикации 09.09.2022

Кальций-магниева силикатная керамика диопсид является перспективным материалом для использования в костной пластике, однако до сих пор возможность его применения в качестве носителя рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 (ВМР-2) не была исследована, как и особенности репаративного остеогенеза с использованием материалов на основе диопсида с ВМР-2. Порошок кальций-магниево-силикатной керамики был получен твердофазным методом с использованием в качестве исходных компонентов биоотходов – рисовой шелухи и яичной скорлупы. Основная фаза полученной керамики представляла собой диопсид. Частицы имели неправильную форму со средним размером около 2,3 мкм и ~20% объёмной пористостью со средним размером пор около 24 нм, что позволяет классифицировать материал как мезопористый. 1 мг частиц диопсида сорбирует более 150 мкг рекомбинантного ВМР-2, что превышает сорбционную ёмкость гидроксилалюмината, кальций-фосфатной керамики, часто используемой в составе гибридных имплантатов, более чем в 3 раза. Кинетика выхода ВМР-2 *in vitro* характеризуется взрывным выходом в первые 2 суток и постепенным выходом примерно по 0,4–0,5% от нанесённого белка в последующие 7 суток. Эксперименты *in vivo* проводили на мышинной модели краниальных дефектов критического размера с имплантацией суспензии порошка диопсида с/без ВМР-2 в гиалуроновой кислоте, введённой в диски из деминерализованного костного матрикса (ДКМ), обладающего 73–90% объёмной пористостью с размером макропор от 50 до 650 мкм. Гистологически исследована динамика процессов неоостеогенеза и ремоделирования костной ткани на сроках 12, 21, 48 и 63 дня. Частицы диопсида равномерно распределяются в матрице и вызывают минимальную реакцию на введение инородного тела. При наличии ВМР-2 к 63 суткам в порах имплантата образуются значительные фокусы новообразованной костной ткани с очагами костного мозга и вовлечением в ремоделирование областей ДКМ в центре имплантата и материнской кости по краям. Диопсид может рассматриваться как перспективный материал для введения в гибридные имплантаты в качестве эффективного носителя ВМР-2.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** диопсид, кальций-магниева силикатная керамика, имплантат, ВМР-2, деминерализованный костный матрикс, краниальные дефекты, регенерация костной ткани.

DOI: 10.31857/S0320972522110136, EDN: LWWPOZ

\* Адресат для корреспонденции.

## ВВЕДЕНИЕ

Дефекты костной ткани, зачастую очень обширные, могут образовываться как следствие травм или операций, связанных с удалением злокачественных новообразований или участков кости, поражённых остеомиелитом [1]. Для восстановления функциональности костной ткани требуется заполнение дефектов остеопластическими материалами, выполняющими, с одной стороны, каркасную функцию, а с другой – обладающими остеоиндуктивными свойствами. Золотым стандартом материалов для заполнения дефектов костной ткани до сих пор считается аутогенная костная ткань. Однако объем аутогенной кости ограничен, а забор костного материала связан с дополнительным травмированием пациента [2]. Хорошей альтернативой аутогенной трансплантации может быть ксеногенный деминерализованный костный матрикс (ДКМ), получаемый из костей крупного рогатого скота [3], а также гибридные имплантаты на его основе [4, 5]. Этот материал обладает высокой остеокондуктивностью, может быть наработан в значительных количествах, ему легко придать требуемую форму, он может выполнять каркасную функцию и использоваться для замещения дефектов несущих нагрузку костей; возможно получение низкоиммуногенного ДКМ со сниженным содержанием неколлагеновых белков с целью минимизировать нежелательные эффекты при имплантации [6, 7]. При этом недостатком высокоочищенного ДКМ является его ограниченная остеоиндуктивность, которая может быть преодолена за счёт совместного применения ДКМ с рекомбинантным костным морфогенетическим белком 2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) [6, 8], который может быть введён как непосредственно в ДКМ, так и с помощью других компонентов гибридных имплантатов.

BMP-2 – основной фактор роста и регенерации костной ткани, введение которого в область дефекта кости способно индуцировать неоостеогенез [9]. Для успешного использования BMP-2 в качестве остеоиндуктора крайне важным является выбор носителя, обеспечивающего постепенное высвобождение белка. В США и Европе для спондилодеза при травмах позвоночника, хирургического лечения травм большеберцовой кости и реконструктивной хирургии верхнечелюстной пазухи одобрено применение препарата INFUSE Bone

Graft Kit («Medtronic», США), продаваемого в Европе под названием InductOS Kit («Wyeth», США), в котором в качестве носителя используется коллагеновая губка [10, 11]. Использование значительных количеств рекомбинантного BMP-2, в тысячи раз превышающих физиологические концентрации (в зависимости от размера дефекта имплантат содержит от 1 до 12 мг белка), в ряде случаев может приводить к тяжёлым последствиям для пациентов, выражающихся в эктопическом остеогенезе, резорбции кости в месте имплантации и др. [12, 13]. Кроме того, следует отметить очень высокую стоимость INFUSE Bone Graft Kit и InductOS Kit, ограничивающую возможность их применения в Российской Федерации. Она, в свою очередь, определяется высокой стоимостью входящего в состав препаратов рекомбинантного BMP-2, нарабатываемого в эукариотических клетках. В настоящее время разработана технология получения рекомбинантного BMP-2 с помощью микробиологического синтеза в клетках *Escherichia coli*, обеспечивающего значительно больший выход белка по сравнению с эукариотическими продуцентами, что приводит к существенному снижению стоимости препаратов белка. При этом активность *in vitro* препаратов BMP-2, получаемых на основе *E. coli*, и эффективность их применения *in vivo* в сочетании с различными носителями для репарации дефектов костной ткани не уступают таковым для препаратов эукариотического BMP-2 [14–29]. В Республике Корея для применения в ортопедии и стоматологии компаниями «Cowellmedi Co.» (Пусан, Корея) и «CGBIO Inc.» (Соннам, Корея) производятся препараты на основе рекомбинантного BMP-2 прокариотического происхождения, в которых в качестве носителя белка используются β-трикальций фосфат/гидроксилапатит (β-ТКФ/ГАП) и гидроксилапатит соответственно [28, 29]. При этом следует отметить, что гидроксилапатит характеризуется наименьшей растворимостью, коррелирующей со скоростью резорбции в организме и кинетикой выхода иммобилизованного BMP-2, среди используемых для регенерации костной ткани кальций-фосфатных керамик [30]. Использование бифазной β-ТКФ/ГАП кальций-фосфатной керамики должно способствовать улучшению характеристик носителя [31]. Однако, несмотря на широкое применение, оба носителя имеют ряд ограничений, в частности, с точки зрения биомиметических свойств и ёмкости в отношении

Принятые сокращения: ГАП – гидроксилапатит; ГК – гиалуроновая кислота; ДКМ – деминерализованный костный матрикс; ДТТ – дитиотрейтол; BMP-2 – bone morphogenetic protein-2 (костный морфогенетический белок-2).

белка [32], и поиск новых эффективных носителей рекомбинантного BMP-2 по-прежнему является одной из ключевых задач современной регенеративной медицины.

Относительно новым материалом, с точки зрения использования в регенеративной медицине, является кальций-магниево-силикатная керамика диопсид ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ), характеризующаяся хорошей биоактивностью, биосовместимостью и лучшими механическими свойствами, чем ГАП [33]. Исследование биоминерализации показало, что при инкубации диопсида в SBF (simulated body fluid, раствор, имитирующий внеклеточную жидкость организма) и при имплантации биоминерализация протекает достаточно быстро: за несколько часов поверхность диопсида покрывается слоем апатита [34], основного минерального компонента кости, что и является причиной высокой биосовместимости. Кроме того, при введении в организм диопсид может высвобождать ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  и  $\text{SiO}_3^{2-}$ , которые усиливают пролиферацию остеобластов [35–37], таким образом обеспечивая определённый уровень остеоиндуктивности самого носителя. Это делает диопсид потенциально перспективным в качестве замены кальций-фосфатной керамики, такой как ГАП или ТКФ, часто используемой для восстановления костных дефектов. Однако до сих пор способность диопсида выступать в качестве носителя BMP-2 и его остеоиндуктивность в такой комбинации не исследовались.

Целью данной работы была характеристика фазового состава, морфологии и пористости порошка силикатной керамики, синтезированной твердофазным методом из материалов природного происхождения, оценка пористости ксеногенного ДКМ, используемого в качестве материала, обеспечивающего каркасную функцию и одновременно способного участвовать в ремоделировании костной ткани при имплантации, исследование способности частиц диопсида выступать в качестве носителя фактора роста костной ткани BMP-2, изучение кинетики выхода BMP-2 из порошка диопсида, исследование динамики репаративного остеогенеза при имплантации в краниальные дефекты мышей гибридных имплантатов, включающих диопсид в качестве носителя BMP-2 и ДКМ в качестве каркаса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Твердофазный синтез диопсида.** Диопсид ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ) был синтезирован твердофазным методом при использовании ранее опублико-

ванного протокола [38] с некоторыми модификациями, основная из которых заключалась в использовании шаровой мельницы для смешивания прекурсора. В качестве источников кальция и кремния использовали, соответственно, яичную скорлупу и рисовую шелуху. Кратко, бытовую яичную скорлупу промывали под проточной водой, а затем кипятили при  $100^\circ\text{C}$  в течение 3 ч при постоянном перемешивании. Очищенную яичную скорлупу сушили в течение 24 ч в сушильном шкафу при температуре  $150^\circ\text{C}$ , а затем измельчали вручную до образования тонкодисперсного порошка. Рисовую шелуху, предоставленную местным поставщиком («BeerMachines», Россия), промывали дистиллированной водой. Органические компоненты удаляли погружением в серную кислоту различных концентраций. Обработанную кислотой рисовую шелуху промывали, сушили при  $110^\circ\text{C}$  и нагревали до  $730^\circ\text{C}$ , при этой температуре выдерживали 25 мин до образования белого порошка. Измельчённую яичную скорлупу, порошок диоксида кремния, извлечённый из рисовой шелухи, и синтетический оксид магния («Русхим», Россия) брали в соотношении 1 : 2 : 1 и смешивали в планетарной шаровой мельнице Fritsch Pulverisette 5 («Fritsch GmbH», Германия). Полученную смесь выдерживали при температуре  $1100^\circ\text{C}$  в течение 6 ч для получения диопсида. Рентгенофазный анализ образцов полученной керамики проводили на дифрактометре Дифрей-401 («Научные приборы», Россия) ( $\text{CrK}\alpha$ -излучение,  $\lambda = 2,29106 \text{ \AA}$ ). Изображения тёмного поля в режиме сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (СПЭМ) получали на просвечивающем электронном микроскопе Titan Themis Z («Thermo Fisher Scientific», США) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Оценку размера, морфологии и пористости частиц диопсида проводили с использованием программного обеспечения ImageJ.

**Получение ДКМ.** ДКМ получали из диафиза бедренной кости крупного рогатого скота, как описано ранее [5], с некоторыми модификациями для удаления неколлагеновых белков [4]. Для оценки объёмной пористости изготавливали образцы ДКМ размером примерно  $6 \times 6 \times 6 \text{ мм}$ , для оценки эффективности связывания BMP-2 использовали крошку размером 1–2 мм, которую получали фракционированием с помощью грохота Retsch SM-200 («Retsch GmbH», Германия), для имплантации в краниальные дефекты использовали диски толщиной  $1,0 \pm 0,1 \text{ мм}$  и диаметром  $4,0 \pm 0,1 \text{ мм}$ , которые вырезали из костных пластин с помощью пробойника собственного изготовления.

Оценку размера пор образцов ДКМ проводили с помощью анализа изображений, полученных с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Tescan Vega 3 («TESCAN», Чехия), в программе ImageJ. Оценку объёмной пористости образцов ДКМ проводили тремя различными способами: при оценке по микрофотографиям, полученным методом СЭМ, и двумя способами с помощью гидростатического взвешивания (детальные протоколы приводятся в Приложении).

**Оценка эффективности связывания BMP-2 с диопсидом, ГАП и ДКМ.** Рекомбинантный BMP-2 нарабатывали в клетках *E. coli* и очищали, как описано ранее [18]. Удельная активность белка составляла  $0,1$  Ед./мкг. Для иммобилизации BMP-2  $10$  мг порошка диопсида, наноразмерного ГАП (85-УД, «Полистом», Россия) или крошки ДКМ ( $0,5$ – $1$  мм) инкубировали в  $200$  мкл раствора, содержащего  $10$  мМ натрий-фосфатный буфер (рН  $5,5$ ) с  $50$  мМ NaCl, при встряхивании на орбитальном шейкере S-3 («Elmi Ltd.», Латвия) при  $10$  об./мин и угле платформы  $5^\circ$  в течение  $30$  мин, далее проводили центрифугирование в течение  $10$  мин при  $9000$  g. Затем раствор удаляли, добавляли  $100$  мкл того же раствора с различными концентрациями BMP-2 и инкубацию в тех же условиях продолжали в течение  $2$  ч. После центрифугирования надосадочную жидкость, содержащую несвязавшийся белок, отбирали, а оставшийся осадок трижды промывали  $1$  мл того же буфера в течение  $20$  мин. К промытому порошку диопсида добавляли  $100$  мкл того же раствора и осторожно перемешивали.  $10$  мкл суспензии порошка диопсида и  $10$  мкл раствора с несвязавшимся белком переносили в пробирки Эппендорф объёмом  $1,5$  мл и добавляли по  $50$  мкл буфера для образцов с дитиотрейтолом (ДТТ) для электрофореза по Лэммли. Пробирки инкубировали при  $95^\circ\text{C}$  в течение  $15$  мин, центрифугировали  $5$  мин при  $9000$  g, после чего по  $10$  мкл супернатанта вносили в лунки геля и проводили электрофорез с последующей окраской бромфеноловым синим.

**Исследование кинетики выхода BMP-2 из диопсида, ГАП и ДКМ *in vitro*.** В три пробирки Эппендорф объёмом  $1,5$  мл с крышками помещали по  $3$  мг порошка диопсида или ГАП с нанесёнными на них  $30$  мкг BMP-2. В пробирки добавляли по  $1$  мл фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего  $1\%$  (*m/v*) БСА и  $0,02\%$  (*m/v*) азида натрия. Пробы инкубировали при комнатной температуре на круговой качалке при  $300$  об./мин. Через  $1$ ,  $5$ ,  $24$ ,  $48$ ,  $72$ ,  $168$  и  $220$  ч пробирки центрифугировали при  $1900$  g, надосадочную жидкость отбирали, добавляли  $1$  мл

свежего буфера того же состава и продолжали инкубирование. Отобранные пробы замораживали и хранили на  $-80^\circ\text{C}$  до измерения концентрации белка с помощью ИФА по разработанному ранее протоколу [26]. Аналогичным образом исследовали кинетику выхода BMP-2 из ДКМ, используя в качестве носителя диски диаметром  $4,0 \pm 0,1$  мм, толщиной  $1,0 \pm 0,1$  мм, масса диска  $1,5 \pm 0,5$  мг. На каждый из трёх дисков наносили по  $15$  мкг BMP-2 по методу, описанному в работе Bartov et al. [4].

**Подготовка имплантатов, содержащих и не содержащих BMP-2, для введения в краниальные дефекты мышей.** Для приготовления  $2\%$ -ного (*m/v*) раствора сухой порошок стерильной гиалуроновой кислоты (ГК,  $\sim 100$  кДа, «Shanghai Macklin Biochemical Industry Co., Ltd.», Шанхай, Китай) добавляли в стерильный физиологический раствор до конечной концентрации  $2\%$ , осторожно перемешивали и оставляли для растворения на ночь в орбитальном шейкере («Elmi Ltd.») при  $10$  об./мин. Затем  $50$  мг порошка диопсида (с  $10$  мкг/мг BMP-2 или без него) в  $250$  мкл стерильного физиологического раствора добавляли к  $750$  мкл  $2\%$ -ной ГК в физиологическом растворе и тщательно перемешивали до получения однородной массы с помощью стерильного шприца. Диски ДКМ (диаметр  $4,0 \pm 0,1$  мм, толщина  $1,0 \pm 0,1$  мм) выдерживали в  $96\%$ -ном спирте  $1$  ч, отмывали стерильным PBS и высушивали в ламинарном шкафу с ультрафиолетом в течение ночи. Непосредственно перед имплантацией диски погружали в предварительно ещё раз перемешанную  $5\%$ -ную (*m/v*) суспензию порошка диопсида в ГК. Один диск (объёмом около  $12,5$  мм<sup>3</sup>) впитывал около  $7$  мкл суспензии и, таким образом, содержал около  $0,35$  мг диопсида и  $3,5$  мкг BMP-2.

**Имплантация в краниальные дефекты критического размера у мышей дисков из ДКМ с суспензией порошка диопсида, содержащего или не содержащего BMP-2, и дисков из ДКМ с/без BMP-2, нанесённым из раствора.** Эксперимент проводили на  $60$  самцах аутбредных мышей линии ICR (CD-1) возраста  $38$ – $47$  дней. Животных случайным образом делили на  $2$  группы по  $30$  мышей в каждой. В группе  $1$  в дефект имплантировали диски из ДКМ с суспензией порошка диопсида, не содержащего BMP-2, в группе  $2$  – диски с суспензией порошка, содержащего BMP-2, около  $3,5$  мкг на диск. На  $12$ ,  $21$ ,  $42$  и  $63$  сутки животным проводили эвтаназию углекислым газом, по  $6$  голов из каждой группы. Также провели имплантацию двум контрольным группам мышей, в каждой по  $6$  животных. Одной группе вводили диски из

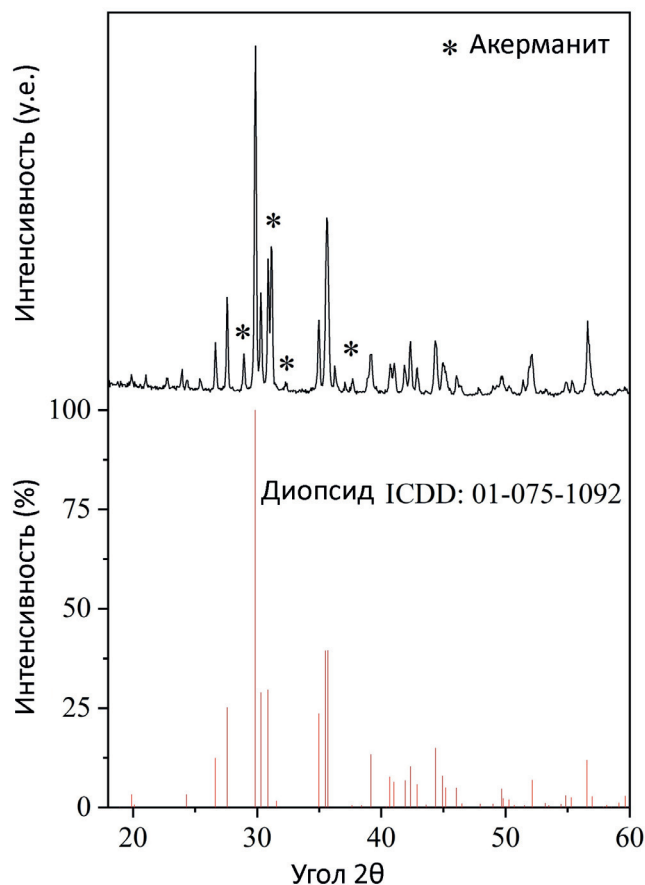
ДКМ, другой – диски из ДКМ с нанесённым на них ВМР-2 в количестве 3,5 мкг на диск по методике, описанной выше. Животным этих двух групп проводили эвтаназию на 42 сутки. Образцы тканей, включающие область имплантации и окружающие кости черепа, фиксировали формалином, декальцинировали, проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин, затем готовили срезы толщиной 3 мкм во фронтальной плоскости и окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы толщиной 6 мкм, полученные от животных двух опытных групп, окрашивали пикро-полихромом по Хировичи [39] для выявления степени созревания коллагена в регенерате. Гистоморфометрию проводили с использованием Adobe Photoshop по методу Egan et al. [40] с модификациями с определением доли новообразованной и ремоделированной костной ткани, доли костного мозга, доли соединительной ткани и доли носителя (ДКМ) по отношению к общей площади тканей в образце.

**Статистические расчёты** проводились с использованием пакета программ Statistica 12.0 («Statsoft», США). Для количественных оценок данные были представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение (SD). В случае гистоморфометрии данные представляли в виде среднего, рассчитывалась стандартная ошибка среднего и стандартное отклонение. Проверку на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Для оценки достоверности отличий проводили дисперсионный анализ с последующей пост-обработкой с применением критерия Ньюмена–Кейлса. Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Характеристика порошка диопсида.** Наличие фазы диопсида было подтверждено рентгенофазовым анализом (рис. 1). Рентгенограмма демонстрирует наличие характерных пиков диопсида, являющегося основной фазой, в то время как акерманит ( $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$ ) наблюдался в качестве вторичной фазы. Появление акерманита, обычно наблюдающееся при синтезе диопсида, связано с наличием нестехиометрических участков, богатых кальцием, в образце после кальцинации, что и приводит к образованию вторичной фазы [35]. Рентгенограмма полученного диопсида соответствовала стандартной карточке ICDD № 01-075-1092.

Изображения СПЭМ на рис. 2 дают представление о морфологии частиц полученного порошка, средний размер которых соста-



**Рис. 1.** Рентгенограмма порошка диопсида. Звёздочками обозначены пики, соответствующие вторичной фазе — акерманиту

вил 2,3 мкм с минимальным и максимальным значениями 0,11 мкм и 8,66 мкм соответственно. Объёмная пористость образца составляла примерно 20% со средним размером пор около 24 нм. Соответственно, материал можно классифицировать как мезопористый, то есть имеющий размер пор от 2 до 50 нм [41].

**Характеристика образцов ДКМ.** Оценка размера пор в образцах проводилась по микрофотографиям, полученным методом СЭМ. Размер пор в образцах ДКМ имеет разброс по среднему от 300 до 450 мкм с максимальным разбросом от 50 до 650 мкм (Таблица S1 в Приложении). Пористость, измеренная по микрофотографиям, имеет разброс от 50 до 70%, а измеренная двумя способами на основе гидростатического взвешивания очень близка по значениям для каждого из образцов и имеет разброс от 73 до 90% (Таблица S1 в Приложении). Поскольку поры ДКМ во много раз превышают размер частиц диопсида, и ДКМ является очень высокопористым материалом, он представляет собой хороший каркас для имплантации суспензии порошка диопсида. Фотография диска ДКМ, аналогичного используемому в экспериментах

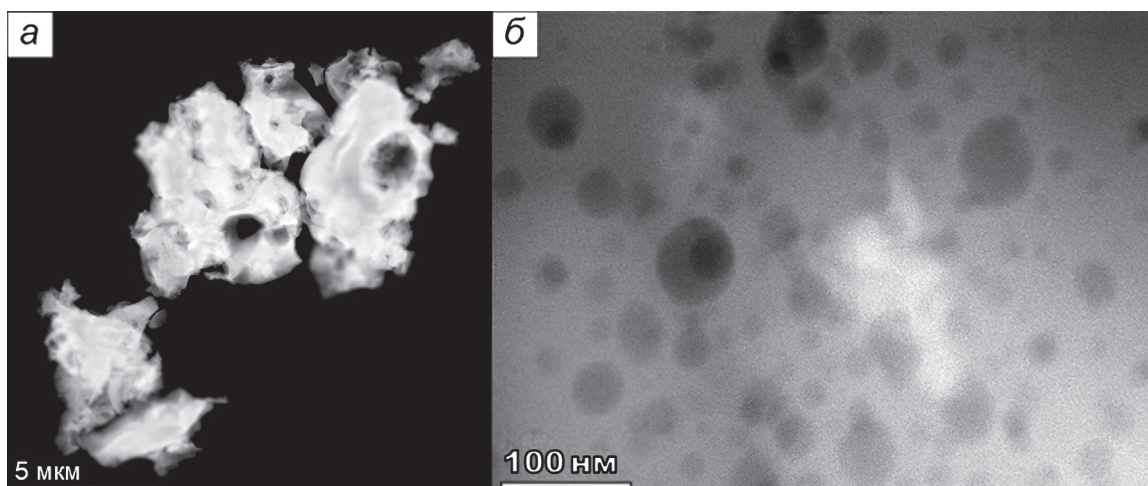


Рис. 2. Темнопольные СПЭМ-изображения порошка диопсида. Слева – обзорное изображение отдельных частиц (а), справа – изображение пор на поверхности частицы (б)

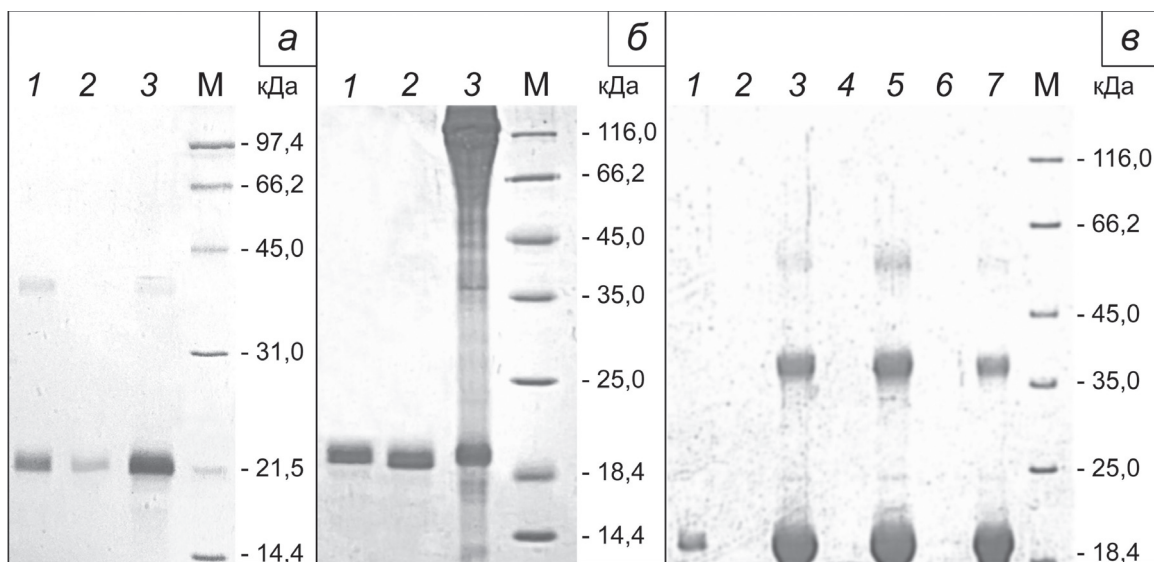


Рис. 3. Электрофореграммы разделения в ПААГ проб, полученных при оценке эффективности связывания ВМР-2 с ГАП (а), ДКМ (б) и диопсидом (в). а – Связывание 500 мкг ВМР-2 с 10 мг ГАП. 1 – ВМР-2, используемый для связывания; 2 – несвязавшийся белок; 3 – связавшийся белок, снятый прогреванием в буфере для электрофореза с ДТТ; М – маркер молекулярной массы 14–97 кДа («Bio-Rad», США). б – Связывание 500 мкг ВМР-2 с 10 мг ДКМ. 1 – ВМР-2, используемый для связывания; 2 – несвязавшийся белок; 3 – связавшийся белок, снятый прогреванием в буфере для электрофореза с ДТТ; М – маркер молекулярной массы 14–116 кДа («Bio-Rad»). в – Связывание 500, 1000 и 1500 мкг ВМР-2 (треки 2–3, 4–5 и 6–7 соответственно) с 10 мг диопсида. 1 – ВМР-2, используемый для связывания; 2, 4, 6 – несвязавшийся белок; 3, 5, 7 – связавшийся белок, снятый прогреванием в буфере для электрофореза с ДТТ; М – маркер молекулярной массы 14–116 кДа («Bio-Rad»)

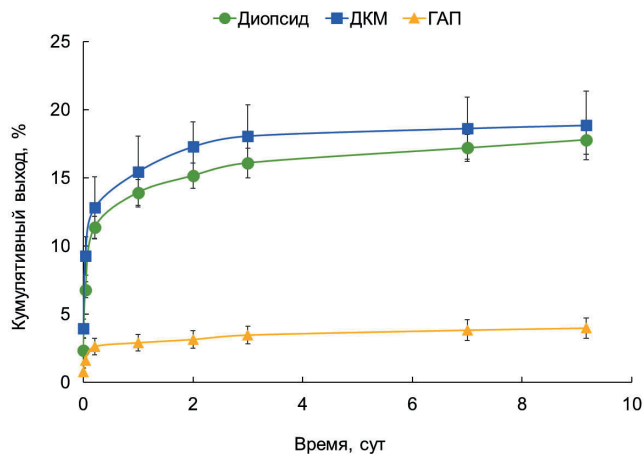
по кинетике выхода ВМР-2 и в экспериментах *in vivo*, приведена на рис. S1 Приложения.

**Эффективность связывания ВМР-2 диопсидом, ГАП и ДКМ.** Для оценки эффективности связывания навески порошка диопсида по 10 мг инкубировали с 500, 1000 и 1500 мкг ВМР-2, отмывали и анализировали пробы с несвязавшимся и связавшимся белком электрофорезом по Лэмбли. Для сравнения оценили также способность 10 мг наноразмерного ГАП и 10 мг частиц ДКМ размером 1–2 мкм связать 500 мкг ВМР-2 в тех же условиях. Резуль-

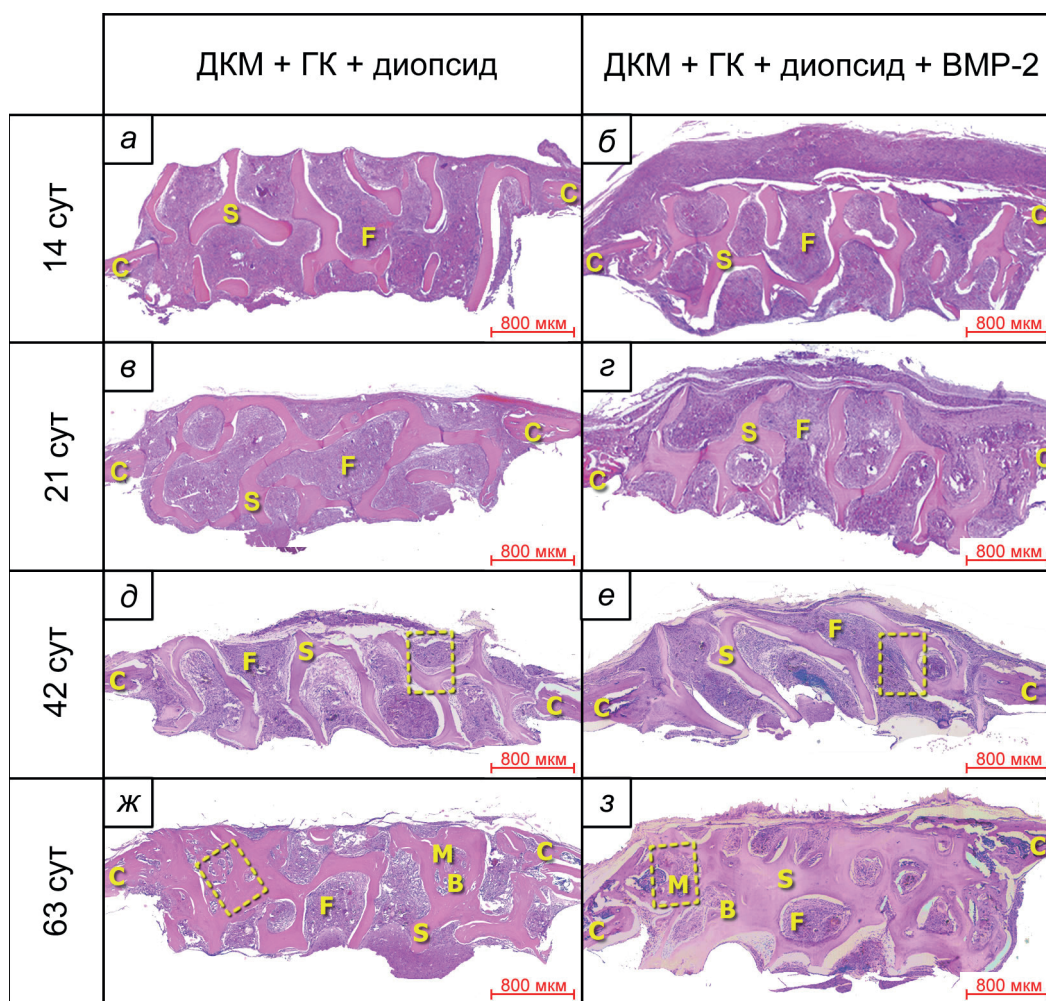
таты, представленные на рис. 3, показывают, что ГАП и ДКМ в используемых условиях связывают ВМР-2 в количестве менее 50 мкг/мг, а диопсид – в количестве более 150 мкг/мг носителя, причём минимальной ёмкостью обладает крошка из ДКМ. Связанный с носителями ВМР-2 снимали прогреванием при 95 °С в буфере для нанесения на ПААГ с ДТТ. При этом из частиц ДКМ, помимо ВМР-2, частично выходил коллаген, что приводило к появлению массивной размазанной по треку полосы в области высоких молекулярных масс. Полу-

ченные данные свидетельствуют о высокой сорбционной ёмкости диопсида, синтезированного твердофазным методом, по отношению к BMP-2.

**Кинетика выхода BMP-2 из диопсида, ГАП и ДКМ *in vitro*.** Кинетику выхода из порошка диопсида оценивали также в сравнении с выходом из ГАП и ДКМ. При исследовании кинетики выхода *in vitro* носители содержали BMP-2 в количестве 10 мкг/мг. Сравнение кривых кумулятивного выхода (рис. 4) показывает, что для всех трёх носителей за первые 9 суток в используемых условиях выходит от 12 (в случае ГАП) до 19 (в случае ДКМ) % от нанесённого белка с первоначальным бурным выходом в течение 1–2 суток. При этом в случае диопсида, начиная со вторых суток, отмечается постоянный выход белка примерно по 0,4–0,5% в сутки. В случае ГАП и ДКМ кривые существенно более пологие, что говорит о меньшем выходе



**Рис. 4.** Кумулятивный выход BMP-2 из ДКМ, ГАП и диопсида. Точки на кривых и верхняя и нижняя планки погрешностей соответствуют среднему значению и стандартному отклонению соответственно. Все измерения проводились в трёх повторностях. Средние значения для ДКМ обозначены квадратами, для ГАП — треугольниками, для диопсида — окружностями

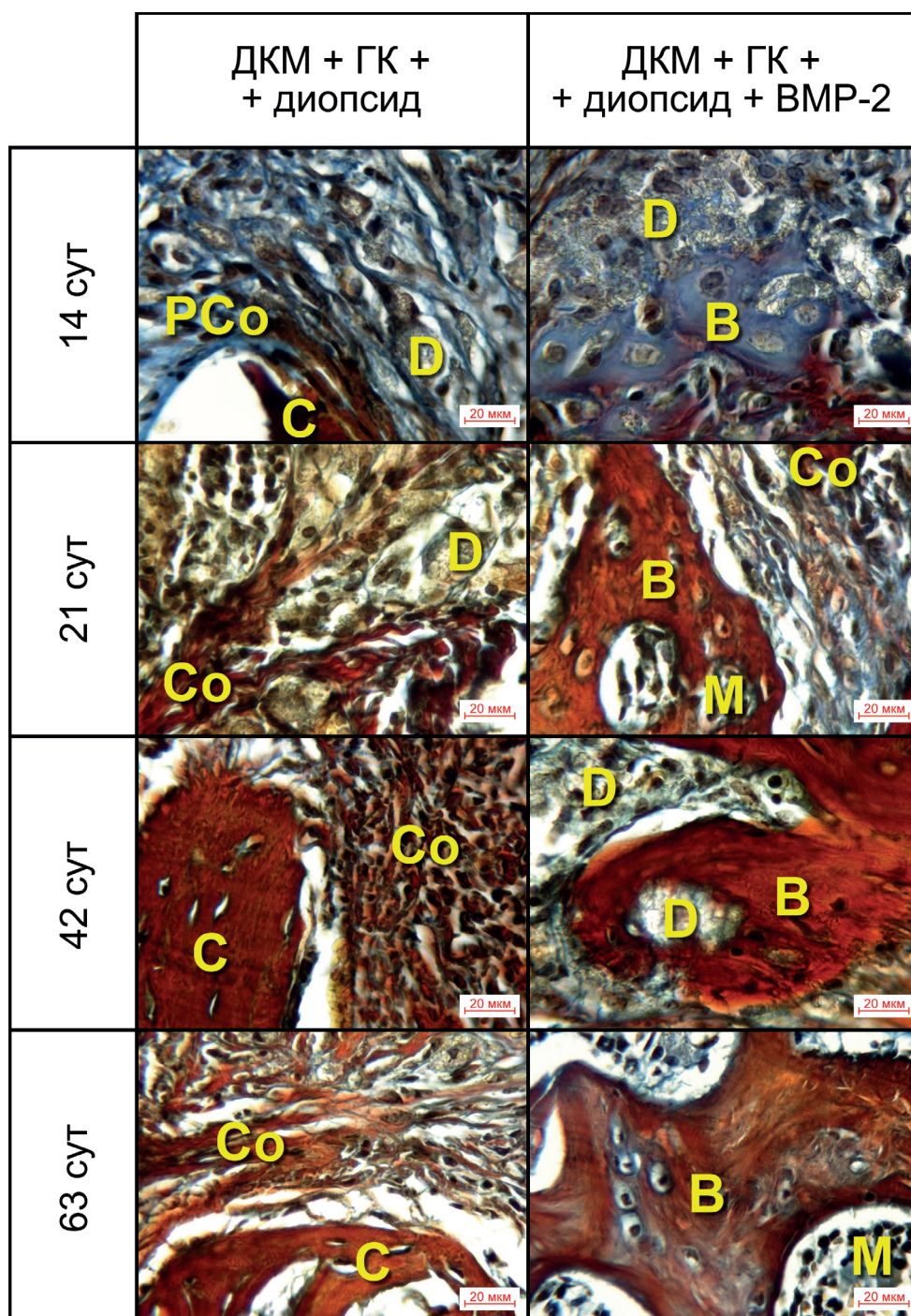


**Рис. 5.** Результаты гистологического анализа на сроках 12, 21, 42 и 63 суток на модели краниальных дефектов критического размера у мышей после имплантации дисков ДКМ с диопсидом и ГК с/без добавления рекомбинантного BMP-2 (3,5 мкг/имплантат). С — кость черепа, В — новообразованная костная ткань, М — костный мозг, F — фиброзная ткань, S — каркас (скаффолд). Жёлтыми пунктирными линиями выделены области, представленные в увеличенном виде на рис. 8. Подробные гистологические описания приведены в тексте Приложения

белка, начиная со вторых суток, по сравнению с диопсидом. Из ДКМ в течение первых 2 суток выходит такой же процент белка, как из диопсида за 9 суток.

**Имплантация в краниальные дефекты критического размера у мышей дисков из ДКМ с суспензией порошка диопсида в ГК, содержащего или не содержащего ВМР-2.** Динамику репаративных процессов, наблюдающихся после

имплантации в краниальные дефекты мышей дисков из ДКМ с суспензией порошка диопсида, содержащего или не содержащего ВМР-2, на сроках 14, 21, 42 и 63 суток оценивали гистологически, используя окраску гематоксилином и эозином с последующей гистоморфометрией, а также окраску пикро-полихромом для выявления степени созревания коллагена в регенерате.



**Рис. 6.** Результаты гистологического анализа на сроках 12, 21, 42 и 63 суток на модели краниальных дефектов критического размера у мышей после имплантации дисков ДКМ с диопсидом и ГК с/без ВМР-2 (3,5 мкг/имплантат). Увеличение 400×, окраска пикро-полихромом. С – кость черепа, В – новообразованная костная ткань, М – костный мозг, Со – зрелый коллаген, Pco – преколлаген, D – диопсид



Гистологический анализ латеральных срезов области имплантации с использованием окраски гематоксилином и эозином (рис. 5), а также пикро-полихромом по Хировичи (рис. 6), полученных на разных сроках после имплантации, позволяет проанализировать динамику репаративного процесса для двух опытных групп – группы 1, где в дефект имплантировали диски из ДКМ с суспензией порошка диопсида без ВМР-2 в ГК, и группы 2, где имплантат был таким же, но порошок диопсида содержал ВМР-2.

На сроке 12 суток в группе 1 в области дефекта имплантат был окружён молодой волокнистой соединительной тканью, состоящей из тяжёлой молодой коллагена, фибробластоподобных клеток и умеренного количества иммунных клеток (рис. 5). У краёв дефекта следов перестройки костной ткани не наблюдалось. В группе 2 на сроке 12 дней в области имплантации наблюдались признаки остеогенеза с образованием костных трабекул в направлении от краёв дефекта к диску ДКМ. Края костей черепа вблизи дефекта значительно утолщались за счёт перестройки костной ткани.

На 21 сутки в группе 1 диск ДКМ был окружён рыхлой грануляционной клеточно-волокнистой соединительной тканью, местами уплотняющейся, состоящей из пучков коллагена, фибробластоподобных клеток и умеренного количества клеток-эффекторов воспаления – лимфоцитов, нейтрофилов и плазмоцитов, формирующих диффузный инфильтрат. Вокруг свободных частиц диопсида (рис. 6) локализовались эпителиоидные клетки и нейтрофилы, формирующие гранулёмы. Следов резорбции ДКМ и неоостеогенеза не наблюдалось. В группе 2 на 21 сутки наблюдались признаки репаративного остеогенеза с образованием молодой костной ткани на периферии дефекта, где шло объединение диска ДКМ с краями костей черепа, а также образование костных островков с запаянными в них частицами диопсида.

Через 42 суток в группе 1 в зоне дефекта определялся имплантат, окружённый молодой волокнистой соединительной тканью с образованием зрелых коллагеновых волокон у краёв дефекта (рис. 6). Наблюдалась слабовыраженная перестройка материнской костной ткани. В группе 2 на 42 сутки после имплантации в зоне дефекта определялась сеть тонких костных балок, сросшихся с ДКМ. В пространстве между балками наблюдались тяжёлые фиброзной ткани, а также структуры, имеющие строение нормального костного мозга.

На 63 сутки в группе 1 имплантат был окружён и заполнен грубоволокнистой (фи-

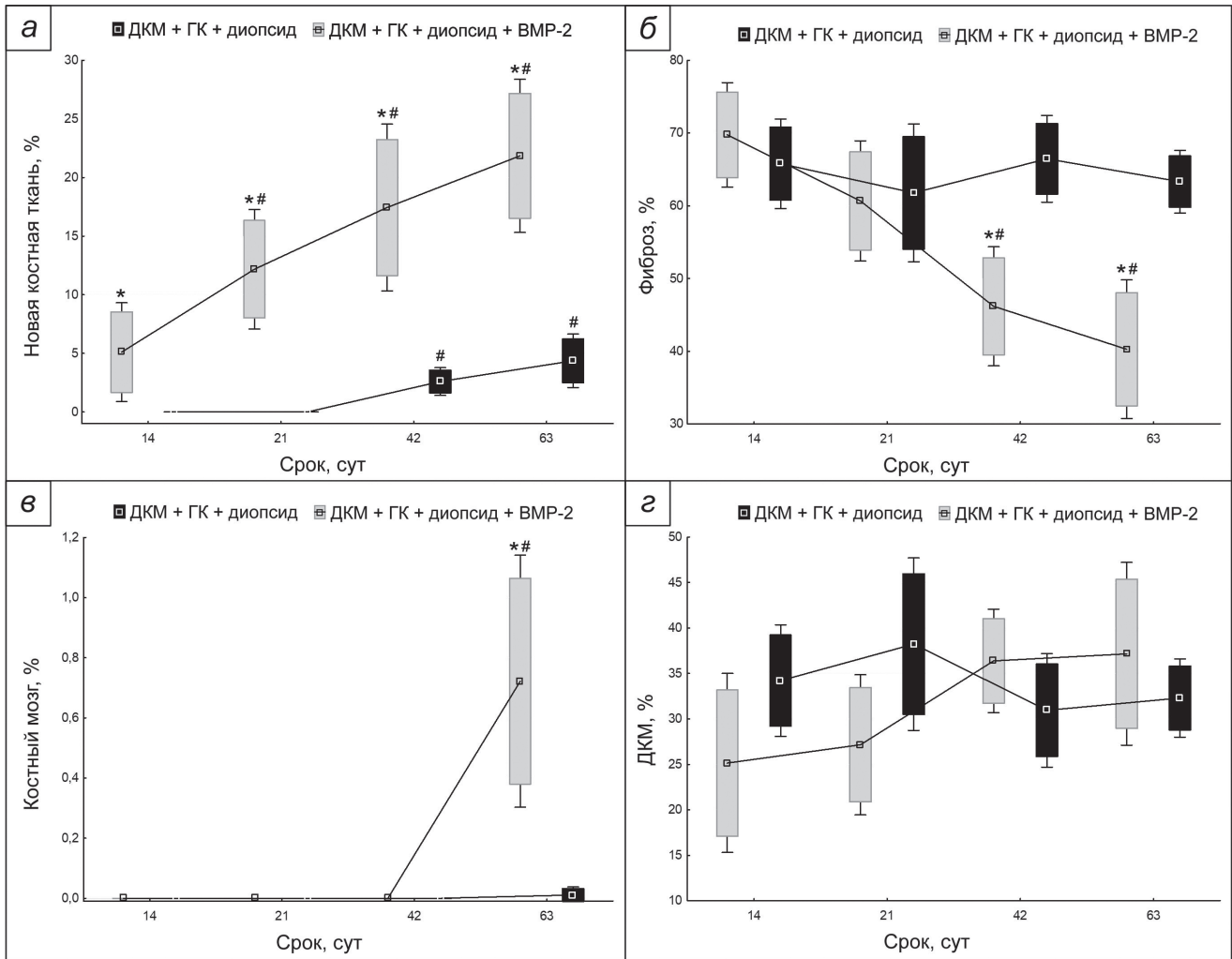
брозной) тканью, состоящей из пучков зрелого коллагена, фибробластоподобных клеток и иммунных клеток. Наблюдалась частицы диопсида в окружении эпителиоидных клеток, формирующих узелки, в области краёв дефекта видны следы перестройки костной ткани (рис. 6). В группе 2 на 63 сутки на месте дефекта имелась хорошо выраженная костная ткань, состоящая из сети трабекул (утолщённых костных балок), которая объединяла края дефекта с диском ДКМ. В межтрабекулярном пространстве наблюдались участки, заполненные костным мозгом, и тяжёлой зрелой фиброзной ткани (рис. 5, 6).

Таким образом, в группе без ВМР-2 репарация дефекта происходила с заполнением пор имплантата фиброзной тканью, и только на последнем сроке были заметны начальные этапы ремоделирования/перестройки костной ткани. В группе с ВМР-2 уже с самых ранних сроков микроскопически определялся активный репаративный остеогенез.

Диопсид во всех случаях вызывал умеренное гранулематозное воспаление с агрегацией макрофагов или эпителиоидных клеток и гигантских многоядерных клеток инородных тел, что является нормальной реакцией на имплантируемый материал. На поздних сроках в группе с ВМР-2 большинство частиц диопсида оказывалось полностью окружённым новообразованной костной тканью, что может свидетельствовать о роли диопсида – носителя ВМР-2 – в остеогенезе.

Окрашивание пикро-полихромом [39] позволило оценить динамику созревания коллагена в регенерате. В обеих группах созревание коллагена шло от периферии регенерата к центру. По наличию красной окраски видно, что в группе с ВМР-2 зрелый коллаген присутствовал в зоне у краёв дефекта уже на 12 день, тогда как в группе без ВМР-2 пучки зрелого коллагена определялись у краёв дефекта только на 21 день (и на 63 день внутри пор имплантата) (рис. 6).

Данные гистоморфометрии позволили провести оценку достоверности отличий в группах с и без ВМР-2, а также результатов на трёх последних сроках после имплантации с результатами на первом сроке (14 суток) по четырём измеряемым параметрам – отношению площади новообразованной костной ткани и остеоида, площади костного мозга, площади соединительной ткани и площади ДКМ к общей площади тканей в образце (рис. 7). Доля новообразованной костной ткани и остеоида в образцах группы с ВМР-2 неизменно растёт, достоверно отличаясь на каждом последующем



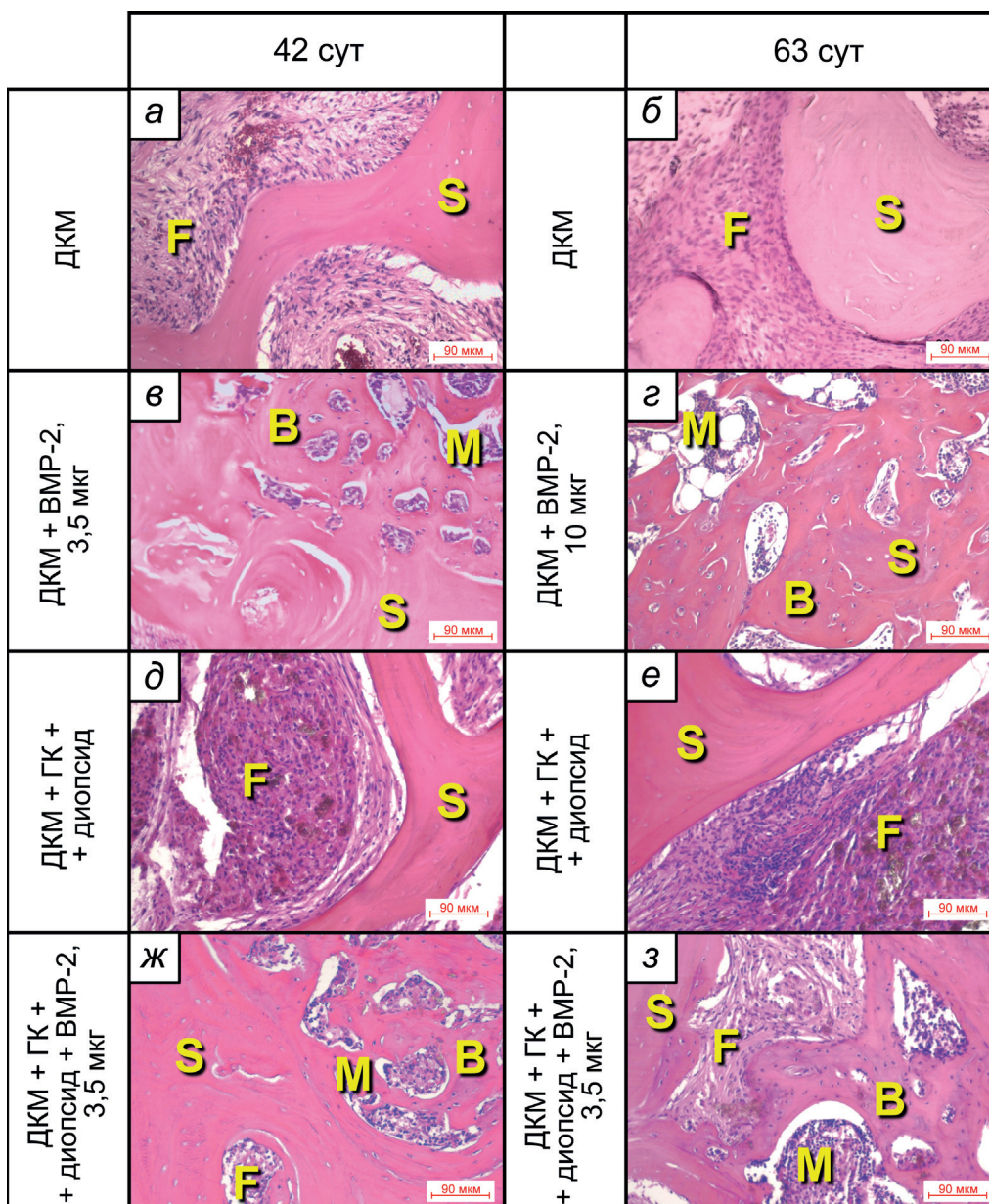
**Рис. 7.** Результаты гистоморфометрического исследования с оценкой относительной площади новой костной ткани (а), фиброза (б), костного мозга (в) и ДКМ (z) на разных сроках после имплантации дисков из ДКМ, заполненных суспензией порошка диопсида в ГК, насыщенного (серые ящики) и не насыщенного (чёрные ящики) BMP-2. Квадраты – среднее; «ящики» – стандартная ошибка среднего; «усы» – стандартное отклонение. \*  $p < 0,05$  по сравнению с группой без BMP-2; #  $p < 0,05$  по сравнению с группой со сроком 14 суток

сроке от первого срока, а также от соответствующей доли в группе без BMP-2. В группе без BMP-2 доля новообразованной костной ткани начинает достоверно отличаться от первого срока лишь на 42 и 63 сутки после имплантации. Костный мозг появляется в значительных количествах лишь в группе с BMP-2 на 63 сутки. Достоверных отличий по доле ДКМ не наблюдается ни между группами, ни по срокам после имплантации. В группе с BMP-2 достоверно снижается доля, занятая фиброзом (соединительной тканью), замещаясь новообразованной костной тканью. Данные результаты хорошо соответствуют картине выраженного репаративного остеогенеза в группе с диопсидом, насыщенным BMP-2, и свидетельствуют лишь о начальных стадиях перестройки костной ткани в группе с диопсидом без BMP-2.

**Имплантация в краниальные дефекты критического размера у мышей дисков из ДКМ, содержащих и не содержащих BMP-2.** Для сравнения процессов репаративного остеогенеза в случае внесения BMP-2 в составе порошка диопсида и в составе собственно ДКМ провели эксперимент по имплантации в краниальные дефекты мышей дисков ДКМ без BMP-2, а также дисков, в которые BMP-2 вводили с помощью инкубации дисков ДКМ в растворе BMP-2. Доза BMP-2 – 3,5 мкг на диск – соответствовала расчётной дозе BMP-2, внесённой на порошок диопсида, в опытной группе 2. Длительность этого эксперимента составила 42 дня для того, чтобы была возможность провести сравнение разных способов введения BMP-2 в имплантат на стадии самого активного этапа ремоделирования костной ткани. Гистологический анализ

показал, что в случае обоих экспериментов в присутствии ВМР-2 на сроке 42 дня наблюдается картина активного ремоделирования костной ткани в имплантате (рис. 8, в, ж). На этой стадии новообразованная кость, которую можно отличить от остатков ДКМ по непараллельности тяжей коллагена, более тёмной окраске гематоксилином и присутствию остеоцитов с синими ядрами в лакунах кости, срастается как с материнской костью черепа по краям дефекта, так и с трабекулами ДКМ. При введении

ВМР-2 в составе порошка диопсида наблюдается несколько более активное формирование новообразованной костной ткани в порах имплантата с заключением частиц диопсида внутрь костных структур. В образцах ДКМ с присутствием диопсида и отсутствием ВМР-2 в несколько большем количестве обнаруживаются гигантские клетки инородных тел, при этом сильной воспалительной реакции не выявлено. В присутствии ВМР-2 количество гигантских клеток инородных тел снижено.



**Рис. 8.** Результаты гистологического анализа на сроках 42 и 63 суток на модели краниальных дефектов критического размера у мышей после имплантации дисков из ДКМ без/с ВМР-2 на сроке 42 суток (3,5 мкг/имплантат, а, в), дисков из ДКМ без/с ВМР-2 на сроке 63 суток (10 мкг/имплантат, б, з), а также дисков из ДКМ с диопсидом и ГК без/с ВМР-2 (3,5 мкг/имплантат, д, е, ж, з). В – новообразованная костная ткань, М – костный мозг, F – фиброзная ткань, S – каркас (скаффолд). Окраска гематоксилином и эозином. Полноразмерные фотографии образцов а–з представлены на рис. S2 Приложения, образцов д–з – на соответствующих панелях рис. 5. Подробные гистологические описания приведены в тексте Приложения

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Диопсид, используемый в работе (рис. 1, 2), получен твердофазным синтезом из биоотходов, что соответствует современным тенденциям получения веществ, применяемых в биотехнологии, на основе использования пищевых отходов или отходов пищевых производств [38]. Основной модификацией разработанной ранее методики является использование шаровой мельницы, которое в последние годы стало распространено в качестве дополнительной стадии синтеза биокерамики [42, 43]. Механоактивация способствует уменьшению размера частиц прекурсора и увеличению площади поверхности, а также усиливает межфазные взаимодействия между реагентами. Это обеспечивает гомогенность смеси, а также улучшает кинетику реакции в процессе кальцинации [43]. Такой подход облегчает синтез диопсида в качестве основной фазы при низкой температуре (1100 °С).

Для экспериментов *in vivo* по исследованию способности чистого диопсида и диопсида с BMP-2 индуцировать репаративный остеогенез было решено использовать классическую модель имплантации остеопластических материалов в краниальные дефекты критического размера у мыши. В качестве материала, обеспечивающего каркасную функцию, мы использовали диски из ДКМ, полученные по ранее разработанной технологии [4, 5]. Была проведена оценка размера пор и объёмной пористости полученных образцов ДКМ. Размер пор составлял от 50 до 650 мкм с разбросом по средним значениям от 300 до 450 мкм (таблица S1 в Приложении). Интересно отметить, что объёмная пористость ДКМ, измеренная с помощью двух различных подходов – по микрофотографиям и методом гидростатического взвешивания – существенным образом различалась (в файле с дополнительными материалами приведены подробные описания с формулами расчётов для понимания особенностей методик). По микрофотографиям получился разброс от 50 до 70%, в то время как по измерению двумя способами с помощью гидростатического взвешивания – от 73 до 90%. Мы предполагаем, что эта разница – почти в 20% – соответствует объёму микропор, которые пронизывают костный матрикс. В них проникает смачивающая диск жидкость, и её масса учитывается при взвешивании, однако на микрофотографиях при используемом увеличении микропор не видно, стенки трабекул ДКМ воспринимаются как гладкие, и микропоры не учитываются при расчётах. По данным других авторов [44],

средний размер пор в ДКМ составляет 119 мкм, что попадает в интервал определённых нами величин; средняя пористость, определённая по микрофотографиям, составляет 60%, что полностью соответствует нашим данным по объёмной пористости с учётом только макропористости. В любом случае размер пор ДКМ обеспечивает беспрепятственное проникновение суспензии порошка диопсида размером 2–3 мкм в имплантируемый диск из ДКМ. Нами было показано, что один диск ДКМ объёмом около 12,5 мкл в среднем впитывает около 7 мкл суспензии диопсида в ГК, что составляет 56% от объёма имплантата и хорошо соответствует измеренной объёмной пористости образцов.

Порошок диопсида вводился в пористую матрицу ДКМ (рис. S1 в Приложении) в виде взвеси в высокомолекулярной ГК, которая, обладая достаточно большой вязкостью, должна была препятствовать быстрому оседанию частиц и обеспечивать более равномерное распределение частиц в имплантате. Выбор ГК в качестве связующего агента был обусловлен также тем, что этот природный линейный гликозаминогликан является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса в соединительных тканях млекопитающих и обладает высокой гидрофильностью, нетоксичностью, низкой иммуногенностью и хорошей биосовместимостью [45]. ГК обеспечивает благоприятную среду для инженерии костной ткани [46], поскольку может стимулировать клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток [47] для ускорения заживления дефектов костей черепа [48].

Высокопористые образцы керамики обладают большой площадью поверхности, что может способствовать связыванию большого количества молекул белка. Показано, что мезопористый диоксид кремния со средним размером пор 15,4 нм адсорбировал в 2,5 раза больше БСА и лизоцима, чем образец с размером пор 13,2 нм [49], то есть размер пор может определять адсорбцию биомолекул на поверхности биоматериала. Действительно, полученный вариант диопсида с пористостью около 20% и средним размером пор около 24 нм обладает очень высокой сорбционной ёмкостью по отношению к используемому в нашей работе рекомбинантному BMP-2, полученному микробиологическим синтезом [18]: 1 мг диопсида связывает более 150 мкг BMP-2, что более чем в 3 раза превышает ёмкость наноразмерного ГАП, который мы использовали для сравнения. Кроме того, это значительно превышает ёмкость частиц ДКМ размером 1–2 мм, которую мы

также использовали в экспериментах по оценке эффективности связывания ВМР-2 (рис. 3). ДКМ достаточно широко используется в качестве носителя ВМР-2 в различных экспериментальных исследованиях [6, 8, 14, 50, 51], однако продемонстрированная в наших экспериментах относительно невысокая ёмкость в качестве носителя ВМР-2 (по приблизительным оценкам – около 20 мкг ВМР-2 на 1 мг ДКМ) может приводить к ограничениям для применения комбинации ДКМ с ВМР-2 в качестве остеоиндуктивного материала, особенно при его использовании для репарации костных дефектов у крупных животных или человека, где требуется введение более высоких доз белка, а также при использовании частиц ДКМ с ВМР-2 в качестве остеоиндуктивного компонента в композитах и гибридных имплантатах. Тем не менее высокоочищенный ДКМ обладает хорошими остеокондуктивными свойствами и биосовместимостью, а также природной пористостью, соответствующей пористости костной ткани, что позволило остановить выбор на данном материале в качестве имплантируемого каркаса для исследования особенностей репаративного остеогенеза, вызываемого порошком диопсида, насыщенным и не насыщенным ВМР-2.

При исследовании кинетики выхода ВМР-2 *in vitro* из диопсида, ГАП и ДКМ во всех случаях в первые 2 дня наблюдался бурный выход белка, при этом только в случае диопсида, начиная с 3 дня, наблюдался длительный постоянный выход ВМР-2 приблизительно по 0,5% от нанесённого белка в сутки (рис. 4). В случае ГАП и ДКМ постоянный выход был значительно меньше. Возможно, это связано с разницей в растворимости материалов. Аналогичный результат с длительным очень низким постоянным выходом ВМР-2 из ГАП был также показан другими авторами с помощью ИФА [52]. Следует отметить, что кинетика выхода ВМР-2 *in vivo* может существенно отличаться за счёт отличающихся условий, в которых находится имплантат. Например, для кальций-магниево-силикатной керамики в присутствии биологических жидкостей в организме показано быстрое образование слоя апатита на поверхности частиц, который может создавать барьер для диффузии ВМР-2, тем самым снижая скорость его высвобождения [34]. Поэтому единственным критерием эффективности материала в качестве носителя ВМР-2 является успешность эксперимента *in vivo*.

Для оценки принципиальной возможности использования порошка диопсида в качестве носителя ВМР-2 имплантация в краниальные

дефекты критического размера у мышей дисков из ДКМ с порами, заполненными суспензией порошка диопсида в ГК, проводилась в двух вариантах – в одном случае использовали порошок без ВМР-2, в другом – с ВМР-2. На выбранных сроках наблюдения – 12, 21, 48 и 63 суток – проводили гистологическую оценку стадий репарации и ремоделирования костной ткани в пределах дефекта (рис. 5, 6). В случае отсутствия ВМР-2 на всех четырёх сроках наблюдения в образцах тканей в области имплантации отмечали небольшую воспалительную реакцию с образованием грубоволокнистой соединительной ткани в порах имплантата, на двух последних сроках наблюдался незначительно выраженный репаративный остеогенез, выражающийся в появлении небольших островков незрелой костной ткани и зрелого коллагена в порах имплантата, и незначительная перестройка материнской кости в области, примыкающей к имплантату. В присутствии ВМР-2 с самого первого срока наблюдались признаки репаративного остеогенеза с появлением через 9 недель выраженных очагов новообразованной костной ткани, между трабекулами которой присутствовали участки зрелого костного мозга.

На сроке 6 недель картина репаративного остеогенеза в образцах с диопсидом проявляется максимально разнообразно: видны участки новообразованной костной ткани с непараллельно расположенными волокнами коллагена вокруг частиц диопсида, в лакунах которой находятся остециты, между трабекулами костной ткани находятся участки костного мозга, что очень похоже на картину, наблюдающуюся при введении такой же дозы ВМР-2 непосредственно в ДКМ (рис. 8). Негативных последствий при использовании диопсида для введения ВМР-2 в имплантат не наблюдается.

Оценка сорбционной ёмкости порошка диопсида по отношению к ВМР-2 свидетельствует о том, что в случае их использования в качестве носителя ВМР-2 возможно многократное увеличение дозы рекомбинантного белка, вводимой в дефект. Увеличение дозы до определённого предела имеет смысл, поскольку это может ускорить репарацию дефекта. Так, в полученных в ранее проведённых экспериментах [8] образцах костей черепа мышей с имплантатами из ДКМ, в которые было введено 10 мкг ВМР-2 на диск, на сроке 9 недель наблюдалось практически завершённое ремоделирование костной ткани в области дефекта (рис. 8, з), при котором наблюдалось почти полное замещение ДКМ новообразованной костной тканью, причём эта ткань была пол-

ностью минерализована [8]. Поскольку ёмкость ДКМ по отношению к ВМР-2 ограничена, введение большего количества ВМР-2 на порошке диоксида, возможно, сможет сократить сроки ремоделирования костной ткани. Важным обстоятельством при этом является подбор максимальной дозы ВМР-2, которая при этом обеспечивала бы отсутствие нежелательных последствий, таких как эктопический остеогенез, лизис материнской кости и др.

Результаты гистологического анализа при введении суспензии порошка диоксида в диски из ДКМ демонстрируют равномерное распределение частиц в порах имплантатов. В описанных экспериментах с имплантацией порошка диоксида с ВМР-2 размер групп сравнительно небольшой – по 4 животных на каждом сроке. Однако хотелось бы отметить то обстоятельство, что в случае введения ВМР-2 на диоксиде новая кость стабильно образовывалась у всех животных, и разброс по данным гистоморфометрии был относительно небольшим (рис. 7), при этом в ранее проведённых нами экспериментах с ДКМ и другими материалами, когда ВМР-2 вводился непосредственно в материалы [6, 8, 19, 22–26], помимо примеров хорошего роста, практически во всех группах обнаруживались животные, у которых рост новой кости был минимален или неравномерен в пределах имплантата. То есть описанный способ введения ВМР-2 обеспечивает большую стабильность при репарации дефекта.

Таким образом, в результате проведённых экспериментов *in vitro* и *in vivo* показана принципиальная возможность использования диоксида в качестве носителя ВМР-2. Суспензия порошка диоксида, насыщенного ВМР-2, в ГК потенциально может быть универсальным средством, повышающим регенеративный потенциал широкого спектра пористых остеопластических материалов при костной пластике.

Дальнейшие направления работы могут быть связаны с исследованием особенностей регенерации, опосредуемой порошком диоксида с ВМР-2 на других экспериментальных моделях, в составе гибридных имплантатов с другими материалами (каркасами, гидрогелями), исследованием влияния на регенерацию различных доз ВМР-2, использованием порошка диоксида в качестве носителя других белков или их сочетания с ВМР-2 и т.п.

**Вклад авторов.** А.С. Карягина, Ф.С. Сенатов, А.В. Громов – концепция и руководство работой; А.С. Карягина – написание статьи; П.А. Орлова, А.В. Жулина, М.С. Попонова, И.Н. Булыгина, Р. Чоудхари, П.А. Ковалёва, А.И. Зими́на, Т.М. Грунина, К.Е. Никитин, Н.В. Струкова, М.С. Генералова, А.В. Рязанова, Е.М. Лукинова, Е.Д. Плахотнюк, М.А. Кирсанова, Е.А. Колесников, Е.В. Захарова – проведение экспериментов; П.А. Орлова, М.С. Попонова, И.Н. Булыгина, П.А. Ковалёва, А.И. Зими́на, Т.М. Грунина, К.Е. Никитин, А.В. Громов – написание фрагментов статьи, подготовка иллюстраций; А.С. Карягина, Ф.С. Сенатов, А.В. Громов, В.Н. Манских – обсуждение результатов исследования, редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00216).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ma, J., Both, S. K., Yang, F., Cui, F. Z., Pan, J., et al. (2014) Concise review: cell-based strategies in bone tissue engineering and regenerative medicine, *Stem Cells Translat. Med.*, **3**, 98-107, doi: 10.5966/sctm.2013-0126.
2. Arrington, E. D., Smith, W. J., Chambers, H. G., Bucknell, A. L., and Davino, N. A. (1996) Complications of iliac crest bone graft harvesting, *Clin. Orthopaedics Related Res.*, **329**, 300-309, doi: 10.1097/00003086-199608000-00037.
3. Zhang, H., Yang, L., Yang, X. G., Wang, F., Feng, J. T. et al. (2019) Demineralized bone matrix carriers and their clinical applications: an overview, *Orthopaedic Surg.*, **11**, 725-737, doi: 10.1111/os.12509.
4. Plantz, M. A., Minardi, S., Lyons, J. G., Greene, A. C., Ellenbogen, D. J., et al. (2021) Osteoinductivity and biomechanical assessment of a 3D printed demineralized bone matrix-ceramic composite in a rat spine fusion model, *Acta Biomater.*, **127**, 146-158, doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.060.
5. Driscoll, J. A., Lubbe, R., Jakus, A. E., Chang, K., Haleem, M., et al. (2020) 3D-printed ceramic-demineralized bone matrix hyperelastic bone compos-

- ite scaffolds for spinal fusion, *Tissue Engin. A*, **26**, 157-166, doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0166.
6. Bartov, M. S., Gromov, A. V., Poponova, M. S., Savina, D. M., Nikitin, K. E., et al. (2016) Modern approaches to research of new osteogenic biomaterials on the model of regeneration of cranial critical-sized defects in rats, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **162**, 273-276, doi: 10.1007/s10517-017-3693-2.
  7. Громов А. В., Никитин К. Е., Карпова Т. А., Зайцев В. В., Сидорова Е. И. и др. (2012) Разработка методики получения остеопластического материала на основе деминерализованного костного матрикса с максимальным содержанием нативных факторов роста костной ткани, *Биотехнология*, **5**, 66-75.
  8. Gromov, A. V., Bartov, M. S., Orlova, P. A., Manskikh, V. N., Krivozubov, M. S., et al. (2019) Combined effect of bone morphogenetic protein-2 and erythropoietin on regeneration of cranial bone defects in mice, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 408-412, doi: 10.1007/s10517-019-04538-5.
  9. Gromov, A. V., Poponova, M. S., and Karyagina, A. S. (2020) Recombinant human bone growth factor BMP-2 produced in *Escherichia coli*. Part 1: from protein purification to experimental models for efficacy research, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, **35**, 22-31, doi: 10.3103/S0891416820010036.
  10. Li, R. H., and Wozney, J. M. (2001) Delivering on the promise of bone morphogenetic proteins, *Trends Biotechnol.*, **19**, 255-265, doi: 10.1016/S0167-7799(01)01665-1.
  11. Kirker-Head, C. A. (2000) Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **43**, 65-92, doi: 10.1016/S0169-409X(00)00078-8.
  12. Halloran, D., Durbano, H. W., and Nohe, A. (2020) Bone morphogenetic protein-2 in development and bone homeostasis, *J. Dev. Biol.*, **8**, 19, doi: 10.3390/jdb8030019.
  13. Robinson, Y., Heyde, C. E., Tschöke, S. K., Mont, M. A., Seyler, T. M., et al. (2008) Evidence supporting the use of bone morphogenetic proteins for spinal fusion surgery, *Exp. Rev. Med. Devices*, **5**, 75-84, doi: 10.1586/17434440.5.1.75.
  14. Jin, Y. Z., Zheng, G. B., and Lee, J. H. (2019) *Escherichia coli* BMP-2 showed comparable osteoinductivity with Chinese hamster ovary derived BMP-2 with demineralized bone matrix as carrier, *Growth Factors*, **4**, 1-10, doi: 10.1080/08977194.2019.1596905.
  15. Vallejo, L. F., Brokelmann, M., Marten, S., Trappe, S., Cabrera-Crespo, J., et al. (2002) Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*, *J. Biotechnol.*, **94**, 185-194, doi: 10.1016/S0168-1656(01)00425-4.
  16. Шарапова Н. Е., Котнова А. П., Галушкина З. М., Лаврова Н. В., Полетаева Н. Н. и др. (2010) Получение рекомбинантного костного морфогенетического белка 2 человека в клетках *Escherichia coli* и тестирование его биологической активности *in vitro* и *in vivo*, *Молек. биол.*, **44**, 1036-1044.
  17. Karyagina, A. S., Boksha, I. S., Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Poponova, M. S., et al. (2016) Optimization of rhBMP-2 active-form production in a heterologous expression system using microbiological and molecular genetic approaches, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, **31**, 208-213, doi: 10.3103/S0891416816040030.
  18. Karyagina, A. S., Boksha, I. S., Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Poponova, M. S., et al. (2017) Two variants of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) with additional protein domains: synthesis in an *Escherichia coli* heterologous expression system, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 613-624, doi: 10.1134/S0006297917050091.
  19. Bartov, M. S., Gromov, A. V., Manskih, V. N., Makarova, E. B., Rubshtein, A. P., et al. (2017) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) with additional protein domain synthesized in *E. coli*: *in vivo* osteoinductivity in experimental models on small and large laboratory animals, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **164**, 148-151, doi: 10.1007/s10517-017-3945-1.
  20. Гайфуллин Н. М., Карягина А. С., Громов А. В., Терпиловский А. А., Маланин Д. А. и др. (2016) Морфологические особенности остеоинтеграции при использовании титановых имплантатов с биоактивным покрытием и рекомбинантного костного морфогенетического белка rhBMP-2, *Морфология*, **149**, 7-84.
  21. Karpov, T. E., Peltek, O. O., Muslimov, A. R., Tarakanchikova, Y. V., Grunina, T. M., et al. (2020) Development of optimized strategies for growth factor incorporation onto electrospun fibrous scaffolds to promote prolonged release, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **12**, 5578-5592, doi: 10.1021/acsami.9b20697.
  22. Senatov, F., Amanbek, G., Orlova, P., Bartov, M., Grunina, T., et al. (2020) Biomimetic UHMWPE/HA scaffolds with rhBMP-2 and erythropoietin for reconstructive surgery, *Mater. Sci. Engin. C*, **111**, 110750, doi: 10.1016/j.msec.2020.110750.
  23. Chubrik, A., Senatov, F., Kolesnikov, E., Orlova, P., Poponova, M., et al. (2020) Highly porous PEEK and PEEK/HA scaffolds with *Escherichia coli*-derived recombinant BMP-2 and erythropoietin for enhanced osteogenesis and angiogenesis, *Polymer Testing*, **87**, 106518, doi: 10.1016/j.polymertesting.2020.106518.
  24. Zimina, A., Senatov, F., Choudhary, R., Kolesnikov, E., Anisimova, N., et al. (2020) Biocompatibility and physico-chemical properties of highly porous PLA/HA scaffolds for bone reconstruction, *Polymers*, **12**, 2938, doi: 10.3390/polym12122938.
  25. Senatov, F., Maksimkin, A., Chubrik, A., Orlova, P., Krivozubov, M., et al. (2021) Osseointegration eval-

- uation of UHMWPE and PEEK-based scaffolds with BMP-2 using model of critical-size cranial defect in mice and push-out test, *J. Mech. Behav. Biomed. Materials*, **119**, 104477, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104477.
26. Senatov, F., Zimina, A., Chubrik, A., Kolesnikov, E., Permyakova, E., et al. (2022) Effect of recombinant BMP-2 and erythropoietin on osteogenic properties of biomimetic PLA/PCL/HA and PHB/HA scaffolds in critical-size cranial defects model, *Biomater. Adv.*, **135**, 112680, doi: 10.1016/j.msec.2022.112680.
  27. Gromov, A. V., Poponova, M. S., and Karyagina, A. S. (2020) Recombinant human bone growth factor BMP-2 synthesized in *Escherichia coli* cells. Part 2: from combined use with other protein factors in animal models to application in medicine, *Mol. Genet. Microbiol. Virol.*, **35**, 61-68, doi: 10.3103/S0891416820020056.
  28. Huh, J.-B., Lee, H.-J., Jang, J.-W., Kim, M.-J., Yun, P.-Y., et al. (2011) Randomized clinical trial on the efficacy of *Escherichia coli*-derived rhBMP-2 with  $\beta$ -TCP/HA in extraction socket, *J. Adv. Prosthodont.*, **3**, 161-165, doi: 10.4047/jap.2011.3.3.161.
  29. Kim, H.-S., Park, J.-C., Yun, P.-Y., and Kim, Y.-K. (2017) Evaluation of bone healing using rhBMP-2 soaked hydroxyapatite in ridge augmentation: a prospective observational study, *Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.*, **39**, 40, doi: 10.1186/s40902-017-0138-9.
  30. Klein, C. P., Driessen, A. A., de Groot, K., and van den Hooff, A. (1983) Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue, *J. Biomed. Mater. Res.*, **17**, 769-784, doi: 10.1002/jbm.820170505.
  31. Daculsi, G., LeGeros, R. Z., Nery, E., Lynch, K., and Kerebel, B. (1989) Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics *in vivo*: ultrastructural and physicochemical characterization, *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 883-894, doi: 10.1002/jbm.820230806.
  32. Fernandez-Yague, M. A., Abbah, S. A., McNamara, L., Zeugolis, D. I., Pandit, A., et al. (2015) Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicochemical strategies, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **84**, 1-29, doi: 10.1016/j.addr.2014.09.005.
  33. Fosca, M., Rau, J. V., and Uskoković, V. (2022) Factors influencing the drug release from calcium phosphate cements, *Bioactive Materials*, **7**, 341-363, doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.05.032.
  34. Wu, C., and Chang, J. (2013) A review of bioactive silicate ceramics, *Biomed. Mater.*, **8**, 032001, doi: 10.1088/1748-6041/8/3/032001.
  35. Wu, C., and Chang, J. (2007) Degradation, bioactivity, and cytocompatibility of diopside, akermanite, and bredigite ceramics, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **83**, 153-160, doi: 10.1002/jbm.b.30779.
  36. Wu, C., Ramaswamy, Y., and Zreiqat, H. (2010) Porous diopside ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ) scaffold: a promising bioactive material for bone tissue engineering, *Acta Biomater.*, **6**, 2237-2245, doi: 10.1016/j.actbio.2009.12.022.
  37. Sun, J., Li, J., Liu, X., Wei, L., Wang, G., et al. (2009) Proliferation and gene expression of osteoblasts cultured in DMEM containing the ionic products of dicalcium silicate coating, *Biomed. Pharmacother.*, **63**, 650-657, doi: 10.1016/j.biopha.2009.01.007.
  38. Choudhary, R., Venkatraman, S. K., Bulygina, I., Senatov, F., Kaloshkin, S., et al. (2021) Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk, *Mater. Sci. Engin. C*, **118**, 111456, doi: 10.1016/j.msec.2020.111456.
  39. Friend, W. G. (1963) A polychrome stain for differentiating precollagen from collagen, *Stain Technol.*, **38**, 204-206.
  40. Egan, K. P., Brennan, T. A., and Pignolo, R. J. (2012) Bone histomorphometry using free and commonly available software, *Histopathology*, **61**, 1168-1173, doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04333.x.
  41. Rouquerol, J., Avnir, D., Fairbridge, C. W., Everett, D. H., Haynes, J. H., et al. (1994) Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **66**, 1739-1758, doi: 10.1351/pac199466081739.
  42. Myat-Htun, M., Noor, A.-F. M., Kawashita, M., and Baba Ismail, Y. M. (2022) Tailoring mechanical and *in vitro* biological properties of calcium-silicate based bioceramic through iron doping in developing future material, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **128**, 105-122, doi: 10.2139/ssrn.3962042.
  43. Hafezi, M., Nadernezhad, A., Mohammadi, M., Barzegar, H., and Mohammadi, H. (2014) Effect of ball milling time on the synthesis of nanocrystalline merwinite via mechanical activation, *Int. J. Mater. Res.*, **105**, 469-473, doi: 10.3139/146.111048.
  44. Wang, X., Li, Y., Han, R., He, C., Wang, G., et al. (2014) Demineralized bone matrix combined bone marrow mesenchymal stem cells, bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- $\beta$ 3 gene promoted pig cartilage defect repair, *PLoS One*, **9**, e116061, doi: 10.1371/journal.pone.0116061.
  45. Petta, D., Fussell, G., Hughes, L., Buechter, D. D., Sprecher, C. M., et al. (2016) Calcium phosphate/thermoresponsive hyaluronan hydrogel composite delivering hydrophilic and hydrophobic drugs, *J. Orthop. Translat.*, **5**, 57-68, doi: 10.1016/j.jot.2015.11.001.
  46. Chircov, C., Grumezescu, A. M., and Bejenaru, L. E. (2018) Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering, *Rom. J. Morphol. Embryol.*, **59**, 71-76.
  47. Liu, M., Zeng, X., Ma, C., Yi, H., Ali, Z., et al. (2017) Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering, *Bone Res.*, **5**, 17014, doi: 10.1038/boneres.2017.14.
  48. Sasaki, T., and Watanabe, C. (1995) Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid, *Bone*, **16**, 9-15, doi: 10.1016/s8756-3282(94)00001-8.



49. Diao, X., Wang, Y., Zhao, J., and Zhu, S. (2010) Effect of pore-size of mesoporous SBA-15 (mesoporous silica) on adsorption of bovine serum albumin and lysozyme protein, *Chinese J. Chem. Eng.*, **18**, 493-499, doi: 10.1016/S1004-9541(10)60248-0.
50. Huber, E., Pobloth, A. M., Bormann, N., Kolarczik, N., Schmidt-Bleek, K., et al. (2017) Demineralized bone matrix as a carrier for bone morphogenetic protein-2: burst release combined with long-term binding and osteoinductive activity evaluated *in vitro* and *in vivo*, *Tissue Eng. Part A*, **23**, 1321-1330, doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0005.
51. Jin, Y. Z., Zheng, G. B., Lee, J. H., and Han, S. H. (2021) Comparison of demineralized bone matrix and hydroxyapatite as carriers of *Escherichia coli* recombinant human BMP-2, *Biomater. Res.*, **25**, 25, doi: 10.1186/s40824-021-00225-7.
52. Kang, W., Lee, D. S., and Jang, J. H. (2015) Evaluation of sustained BMP-2 release profiles using a novel fluorescence-based retention assay, *PLoS One*, **10**, e0123402, doi: 10.1371/journal.pone.0123402.

## HYBRID IMPLANTS BASED ON CALCIUM-MAGNESIUM SILICATE CERAMICS DIOPSIDE AS A CARRIER OF RECOMBINANT BMP-2 AND DEMINERALIZED BONE MATRIX AS A SCAFFOLD: DYNAMICS OF REPARATIVE OSTEOGENESIS IN A MOUSE CRANIOTOMY MODEL

A. S. Karyagina<sup>1,2,3\*</sup>, P. A. Orlova<sup>1</sup>, M. S. Poponova<sup>1</sup>, I. N. Bulygina<sup>1,4</sup>, R. Choudhary<sup>5,6</sup>,  
A. V. Zhulina<sup>1</sup>, T. M. Grunina<sup>1,3</sup>, K. E. Nikitin<sup>1</sup>, N. V. Strukova<sup>1</sup>, M. S. Generalova<sup>1</sup>,  
A. V. Ryazanova<sup>1</sup>, P. A. Kovalyova<sup>4</sup>, A. I. Zimina<sup>4</sup>, E. M. Lukinova<sup>4</sup>, E. D. Plakhotniuk<sup>4</sup>,  
M. A. Kirsanova<sup>7</sup>, E. A. Kolesnikov<sup>4</sup>, E. V. Zakharova<sup>4</sup>, V. N. Manskikh<sup>2</sup>,  
F. S. Senatov<sup>1,4</sup>, and A. V. Gromov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia; e-mail: akaryagina@gmail.com, alexander.v.gromov@gmail.com

<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

<sup>3</sup> All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia

<sup>4</sup> National University of Science and Technology "MISIS", 119049 Moscow, Russia

<sup>5</sup> Riga Technical University, LV-1007 Riga, Latvia

<sup>6</sup> Baltic Biomaterials Centre of Excellence, Headquarters at Riga Technical University, LV-1048 Riga, Latvia

<sup>7</sup> Skolkovo Institute of Science and Technology, 121205 Moscow, Russia

Calcium-magnesium silicate ceramics, diopside, is a promising material for use in bone plastics, but until now the possibility of its use as a carrier of recombinant bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) has not been studied, as well as the features of reparative osteogenesis mediated by the materials based on diopside with BMP-2. Powder of calcium-magnesium silicate ceramics was obtained by solid-state synthesis using biowaste – rice husks and egg shells – as source components. Main phase of the obtained ceramics was diopside. The obtained particles were irregularly shaped with an average size of about 2.3 μm and ~20% porosity; average pore size was about 24 nm, which allowed the material to be classified as mesoporous. Diopside powder adsorbs more than 150 μg of recombinant BMP-2 per milligram, which exceeds binding capacity of hydroxyapatite, a calcium-phosphate ceramic often used in hybrid implants, by more than 3 times. *In vitro* release kinetics of BMP-2 was characterized by a burst release in the first 2 days and a sustained release of approximately 0.4 to 0.5% of the loaded protein over the following 7 days. *In vivo* experiments were performed with a mouse model of cranial defects of critical size with implantation of a suspension of diopside powder with/without BMP-2 in hyaluronic acid incorporated into the disks of demineralized bone matrix with 73-90% volume porosity and macropore size from 50 to 650 μm. Dynamics of neoosteogenesis and bone tissue remodeling was investigated histologically at the time points of 12, 21, 48, and 63 days. Diopside particles were evenly spread in the matrix and caused minimal foreign body reaction. In the presence of BMP-2 by the day 63 significant foci of newly formed bone tissue were formed in the implant pores with bone marrow areas, moreover, large areas of demineralized bone matrix in the implant center and maternal bone at the edges were involved in the remodeling. Diopside could be considered as a promising material for introduction into hybrid implants as an effective carrier of BMP-2.

**Keywords:** diopside, calcium-magnesium silicate ceramics, implant, BMP-2, demineralized bone matrix, cranial defects, bone tissue regeneration