

УДК 57.016

**ГИБРИДНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ
КАЛЬЦИЙ-МАГНИЕВОЙ СИЛИКАТНОЙ
КЕРАМИКИ ДИОПСИДА В КАЧЕСТВЕ НОСИТЕЛЯ
РЕКОМБИНАНТНОГО BMP-2
И ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА
В КАЧЕСТВЕ КАРКАСА: ЭКТОПИЧЕСКИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ
ПРИ ВНУТРИМЫШЕЧНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ У МЫШЕЙ**

© 2023 А.С. Карягина^{1,2,3*}, П.А. Орлова¹, А.В. Жулина¹, М.С. Кривоzubов¹,
Т.М. Грунина^{1,3}, Н.В. Струкова¹, К.Е. Никитин¹, В.Н. Манских^{1,2},
Ф.С. Сенатов^{1,4}, А.В. Громов^{1*}

¹ 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

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

³ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
127550 Москва, Россия

⁴ Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»,
119049 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.06.2023

После доработки 05.07.2023

Принята к публикации 06.07.2023

Высокая эффективность гибридных имплантатов на основе кальций-магниево-силикатной керамики диоксида в качестве носителя рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 (BMP-2) и ксеногенного деминерализованного костного матрикса (ДКМ) в качестве каркасного материала для регенерации костной ткани была продемонстрирована ранее на модели краниальных дефектов критического размера у мышей. С целью изучения возможности применения этих имплантатов для выращивания аутологичной костной ткани с использованием принципа *in vivo* биореактора в теле самого пациента проведено исследование эффективности вызываемого ими эктопического остеогенеза при внутримышечной имплантации мышам. При дозе BMP-2 в 7 мкг на имплантат через 1 неделю вокруг имплантатов наблюдалось плотное скопление клеток, вероятно, сателлитных клеток-предшественников скелетной мускулатуры, с участками интенсивного хондрогенеза, начальной стадии непрямого остеогенеза. Через 12 недель формировалась плотная костная капсула трабекулярного строения, покрытая надкостницей, со зрелым костным мозгом, расположенным в промежутках между трабекулами. Объем капсулы приблизительно в 8–10 раз превышал объем исходного имплантата. Признаки воспалительной и клеточной реакции на введение инородного тела в группе с BMP-2 практически отсутствовали. Данные микрокомпьютерной томографии показали значительно больший относительный объем костной ткани, количество трабекул и плотность костной ткани в группе с BMP-2 по сравнению с группой без BMP-2. С учетом того, что ДКМ может быть получен практически в неограниченных количествах, требуемого размера и формы, а используемый BMP-2, получаемый синтезом в клетках *E. coli*, относительно недорог, дальнейшая разработка модели *in vivo* биореактора на основе гибридных имплантатов из BMP-2, диоксида и ксеногенного ДКМ представляется перспективной.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: диоксид, кальций-магниево-силикатная керамика, имплантат, BMP-2, деминерализованный костный матрикс, эктопический остеогенез.

DOI: 10.31857/S0320972523080067, **EDN:** IJYN DL

Принятые сокращения: ГК – гиалуроновая кислота; ДКМ – деминерализованный костный матрикс; микроКТ – микрокомпьютерная томография; BMP-2 – bone morphogenetic protein-2, костный морфогенетический белок-2.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Восстановление крупных костных дефектов, вызванных травмой, остеопорозом, удалением опухоли или остеомиелитом, является одной из сложнейших задач реконструктивной хирургии [1, 2]. Золотым стандартом лечения при этом является аутотрансплантация собственной костной ткани, забираемой обычно из подвздошной кости пациента, которая, однако, имеет много проблем, таких как боли в месте забора материала, а также ограниченность объёма аутотрансплантата [3, 4]. Возможной альтернативой при этом является выращивание аутологичных костных имплантатов с использованием так называемого принципа *in vivo* биореактора, заключающегося в том, что биореактором служит тело самого пациента [5]. При этом можно вырастить кость нужной формы и размера, например, в мышце спины или живота, используя подходящий каркас и остеоиндуктивные факторы, а затем трансплантировать её в нужное место. В настоящее время имеется более сотни публикаций с описанием эктопического наращивания кости в мелких (мыши, крысы, кролики) и крупных (бараны, свиньи, обезьяны, козы, собаки) лабораторных животных. Также опубликованы статьи, описывающие клинические случаи, в основном касающиеся восполнения крупных челюстных дефектов у людей, на основе этого подхода [6–13].

Для достижения успеха при разработке новой модели *in vivo* биореактора требуется подбор комбинации целого ряда факторов, способствующих формированию зрелой костной ткани в эктопическом сайте: существенным является выбор лабораторного животного, модели имплантации, каркасного материала, обеспечивающего требуемую форму кости, носителя индуктора остеогенеза и собственно индуктора остеогенеза.

Наиболее экономичными среди лабораторных животных с точки зрения закупочной цены и стоимости содержания являются мыши. Поэтому их использование представляется целесообразным для первоначальной отработки модели с целью последующего переноса на более крупных лабораторных животных и человека.

Чрезвычайно важным является выбор модели имплантации. В настоящее время наиболее часто используемыми являются модель подкожной имплантации, имплантации в мышечный карман (внутримышечная имплантация) и имплантации в почечную капсулу [14]. При этом модель внутримышечной имплантации имеет ряд преимуществ по сравнению с

двумя другими, в частности, она практически так же удобна в плане хирургической техники, как подкожная имплантация, значительно более проста по сравнению с имплантацией в почечную капсулу и при этом полностью переносима на крупных лабораторных животных и человека. По сравнению с подкожной внутримышечная имплантация, как правило, обеспечивает более выраженное и более раннее образование костной ткани [15], что может быть связано с лучшим кровоснабжением мышечной ткани, а также наличием в скелетных мышцах сателлитных клеток-предшественников, способных к остеогенной дифференцировке под действием соответствующих индукторов, например, костных морфогенетических белков (bone morphogenetic proteins, BMPs) [14]. Так, в исследовании, проведённом на собаках и свиньях, при внутримышечной имплантации образование костной ткани наблюдалось уже через 45 дней, в то время как при подкожной имплантации – только через 60 дней [16]. С помощью внутримышечной имплантации была успешно выращена костная ткань для замещения крупных челюстных дефектов у человека. Например, в 2004 г. опубликована работа, описывающая выращивание костной ткани в мышце пациента с использованием аутологичного костного мозга и BMP-7 [7]. Собственно, именно на модели внутримышечной имплантации была показана способность BMPs индуцировать эктопический остеогенез [17].

Существенным моментом при разработке модели *in vivo* биореактора является выбор каркасного материала, который должен служить матрицей для наращивания собственной кости. Желательно, чтобы такой материал был достаточно жёстким, но эластичным, приближенным по свойствам к костной ткани. Также материал должен быть биосовместимым и биорезорбируемым, обеспечивая постепенное замещение его новой костной тканью. Одним из материалов, удовлетворяющих требуемым параметрам, является высокоочищенный ксеногенный деминерализованный костный матрикс (ДКМ), получаемый из костей крупного рогатого скота [18]. ДКМ обладает высокой остеокондуктивностью, его можно получить в большом количестве, из него могут быть получены объёмные имплантаты требуемой формы, по механическим свойствам и пористости, включая микропористость, он максимально приближен к костной ткани человека. Кроме того, возможно получение низкоиммуногенного ДКМ, обладающего повышенной биосовместимостью и пониженной аллергенностью за счёт сниженного содержания неколлагеновых

белков [19, 20]. Ограниченная остеоиндуктивность ДКМ может быть преодолена за счёт его совместного применения с экзогенными индукторами остеогенеза, например, рекомбинантным костным морфогенетическим белком-2 (ВМР-2) [19, 21]. При введении в организм ВМР-2 обеспечивает привлечение из окружающих тканей и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток, а также обладает ангиогенными свойствами, что важно для образования полноценной костной ткани с хорошим кровоснабжением [22]. ДКМ сам по себе может выступать в качестве носителя ВМР-2, однако его сорбционная ёмкость ограничена [23]. Для возможности введения больших и регулируемых доз ВМР-2, а также обеспечения более постепенного выхода белка на основе ДКМ в качестве каркасного материала разработаны гибридные имплантаты, в которых функцию носителя ВМР-2 выполняют взвешенные в гиалуроновой кислоте (ГК) частицы кальций-магниевого силикатной керамики диопсида, обладающей очень высокой сорбционной ёмкостью по отношению к ВМР-2, во много раз превышающую ёмкость гидроксилатапата. Такие имплантаты продемонстрировали высокую остеогенность на модели краниальных дефектов критического размера у мышей [23].

Целью данного исследования является разработка модели эктопического наращивания трабекулярной костной ткани на основе принципа *in vivo* биореактора при внутримышечной имплантации мыши гибридных имплантатов с ксеногенным ДКМ в качестве каркасного материала и кальций-магниевого силикатной керамикой диопсидом в качестве носителя рекомбинантного ВМР-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение порошка диопсида. В работе использовали порошок диопсида ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$), синтезированный твердофазным методом по ранее опубликованной методике [24] с модификациями [23]. Кратко, в качестве источника кальция использовали яичную скорлупу, источника кремния – рисовую шелуху, получая на её основе с помощью прогрева диоксид кремния. Измельчённую яичную скорлупу, диоксид кремния и синтетический оксид магния («Русхим», Россия) смешивали в соотношении 1 : 2 : 1 в планетарной шаровой мельнице Fritsch Pulverisette 5 («Fritsch GmbH», Германия) и выдерживали при температуре 1100 °С в течение 6 ч. Полученный диопсид

соответствовал стандартной карточке ICDD № 01-075-1092 с небольшой примесью вторичной фазы – акерманита [23].

Получение пористых каркасов для имплантатов из ДКМ. Высокоочищенный ксеногенный ДКМ получали по ранее описанной методике из эпифизов бедренных костей крупного рогатого скота [25]. Имплантаты, представляющие собой диски диаметром 4 мм и толщиной 1 мм, изготавливали из костных пластин с помощью металлического пробойника. Для стерилизации диски ДКМ выдерживали в 96%-ном спирте в течение 1 ч, отмывали стерильным PBS и высушивали в ламинарном шкафу с ультрафиолетом в течение ночи.

Насыщение порошка диопсида ВМР-2. Рекомбинантный ВМР-2, полученный синтезом в клетках *Escherichia coli* и очищенный, как описано ранее [26], с удельной активностью 0,1 Ед./мкг иммобилизовывали на порошке диопсида, как описано ранее [23]. Кратко, 50 мг порошка диопсида выдерживали 30 мин в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 5,5) с 50 мМ NaCl, центрифугировали, раствор удаляли, осадок суспендировали в том же растворе, содержащем 500 или 1000 мкг ВМР-2, и инкубировали в течение 2 ч. Несвязавшийся белок удаляли после центрифугирования, осадок трижды промывали тем же буфером без белка.

Подготовка образцов для имплантации. Для приготовления 5%-ной (w/v) суспензии диопсида в ГК 50 мг порошка диопсида (с 10 или 20 мкг/мг ВМР-2 или без него) в 250 мкл стерильного физраствора добавляли к 750 мл 2%-ной ГК (~100 кДа, «Shanghai Macklin Biochemical Industry Co., Ltd.», Китай) в физрастворе и тщательно перемешивали. Непосредственно перед имплантацией простерилизованные диски ДКМ погружали в предварительно ещё раз перемешанную суспензию. Один диск впитывал примерно 7 мкл суспензии и содержал около 0,35 мг диопсида и 3,5 или 7 мкг ВМР-2.

Имплантация. Провели 2 эксперимента на самцах аутбредных мышей линии ICR (CD-1) возраста 38–47 дней. Первый – пилотный – проводился на 24 мышах, которых случайным образом разделили на две группы по 12 мышей. Первой группе имплантировали диски из ДКМ с суспензией частиц диопсида, не содержащих ВМР-2, второй группе – диски с суспензией частиц, содержащих около 3,5 мкг ВМР-2 на диск. Каждому животному вводили по 2 идентичных имплантата – в левое и правое бедро. Второй эксперимент проводили аналогично первому, но использовали 16 мышей,

разделённых на две группы по 8 мышей. В первой группе вводили имплантаты без белка, во второй количество BMP-2 составляло 7 мкг на диск. В обоих случаях операцию проводили на термостатируемом хирургическом столе («Medax», Германия) при температуре 37 °С. Подготовив хирургическое поле, в каудальной части бедра производили кожный разрез, далее формировали карманы в ягодичных мышцах тупым методом, после чего в них закладывали имплантаты, ткани послойно ушивали атраumaticким шовным материалом Merfil № 4/0 и обрабатывали антибиотиком «Тетрацилин» («Pfizer Animal Health», США). В первом эксперименте эвтаназию углекислым газом проводили на 7, 24, 63 и 84 сутки трём мышам из каждой группы. Во втором – на 7 сутки двум мышам, на 84 – шести мышам из каждой группы. Гистологический анализ образцов, извлечённых из мышц после эвтаназии, проводили на сроке 1 и 12 недель с начала эксперимента; микрокомпьютерную томографию (микроКТ) – на сроке 12 недель.

Гистологический анализ. Образцы, включающие область имплантации и окружающие ткани, извлекали из бедренных мышц, фиксировали забуференным нейтральным формалином в течение 24 ч, декальцинировали в 14%-ном растворе ЭДТА, отмывали и проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. Срезы толщиной 3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, Сафранином О, гематоксилином

и быстрым зелёным FCF [27] и азаном по Гейденгайну [28].

Микрокомпьютерная томография. МикроКТ образцов проводили *ex vivo* на томографе SkyScan 1172 («Bruker», США) с помощью программ NRecon и CTAп с подбором параметров, позволяющих отличить минерализованную костную ткань от других тканей.

Статистическая обработка данных микроКТ проводилась с использованием пакета программ Statistica 12.0 («Statsoft», США). Проверку на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Для оценки достоверности отличий проводили анализ с применением критерия Манна–Уитни. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. В пилотном эксперименте по внутримышечной имплантации мышам дисков из ДКМ, содержащих суспензию порошка диоксида в ГК, в опытной группе использовали BMP-2 в количестве около 3,5 мкг на имплантат, как в ранее описанном исследовании по имплантации в краниальные дефекты мышей [23], в которых за 9 недель происходило практически полное заполнение пор имплантата новообразованной костной тканью с костным мозгом и ремоделирование матрикса ДКМ. На 1, 4, 9 и 12 неделях гистологический анализ выявил картину непрямого

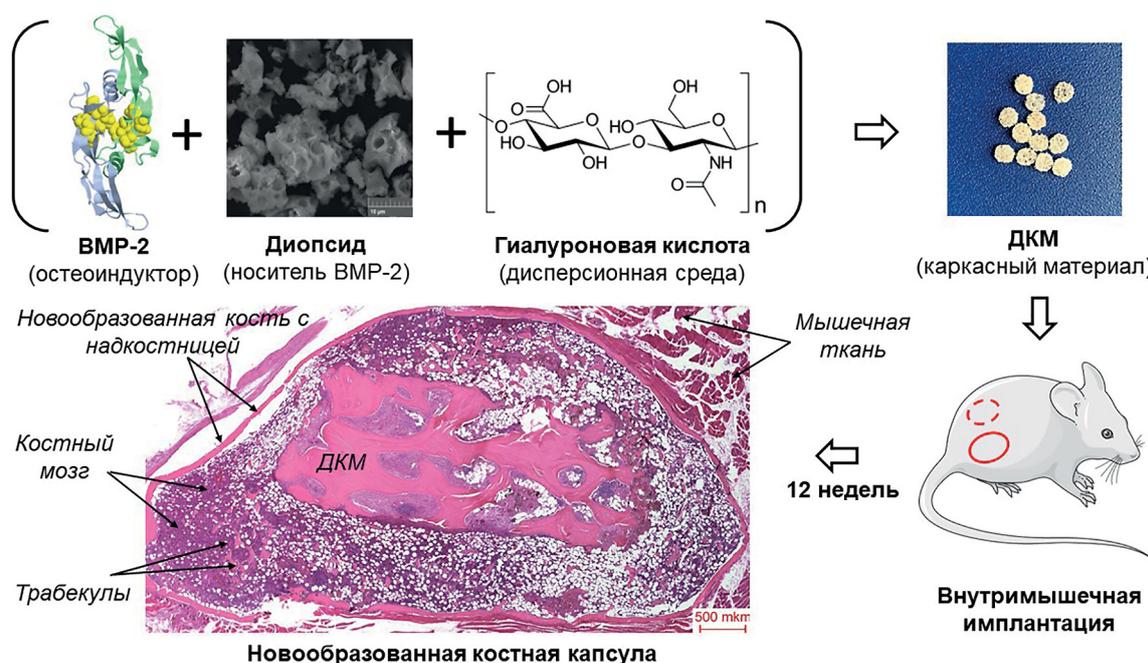


Рис. 1. Дизайн эксперимента по внутримышечной имплантации мышам гибридных имплантатов из ДКМ и взвеси частиц диоксида с адсорбированным BMP-2 в ГК

эктопического остеогенеза с формированием через 1 неделю хрящевой ткани, а на более поздних сроках – костной структуры, похожей по строению на трабекулярную кость, которая к 12 неделе у некоторых животных оказалась покрыта слоем костной ткани с надкостницей (данные не приводятся). По результатам этого эксперимента было решено общий дизайн основного эксперимента оставить неизменным (рис. 1), но увеличить в два раза количество BMP-2, гистологический анализ проводить на 1 и 12 неделе, микроКТ – на 12 неделе.

Оценка результатов внутримышечной имплантации гибридных имплантатов с помощью микроКТ и гистологического анализа. Данные по микроКТ образцов, полученных через 12 недель после проведения внутримышечной имплантации гибридных имплантатов из ДКМ, ГК и диопсида, содержащих и не содержащих BMP-2, представлены на рис. 2. Присутствие частиц диопсида без BMP-2 в ряде образцов индуцировало формирование объёмной сетки минерализации, соответствующей по форме макропорам диска из ДКМ (рис. 2, а). Однако по данным гистологического анализа

это не сопровождалось появлением новообразованной костной ткани (рис. 3, а, 4–6, рис. 4, а, 4–6).

В присутствии BMP-2 через 12 недель по данным микроКТ во всех образцах наблюдалась крупная, сильно минерализованная костная капсула (рис. 2, а), значительно превышающая по объёму (в 8–10 раз) первоначальный имплантат, с выраженной трабекулярной структурой (рис. 2, в). Параметры BV/TV (относительный объём костной ткани), Tb.Th (толщина трабекул), Tb.N (количество трабекул) и BMD (плотность костной ткани) в группе с BMP-2 достоверно различаются (в большую сторону) с группой без BMP-2 ($p < 0,05$) (рис. 2, б).

Согласно гистологическому исследованию, в группе без BMP-2 через одну неделю после имплантации диск был окружён молодой грануляционной тканью (рис. 3, а, 1–3). Вокруг частиц диопсида обнаруживались скопления эпителиоидных клеток (рис. 4, а, 1–3). Через 12 недель диск был окружён и заполнен хорошо организованной фиброзной тканью (рис. 3, а, 4–6). Вокруг частиц диопсида

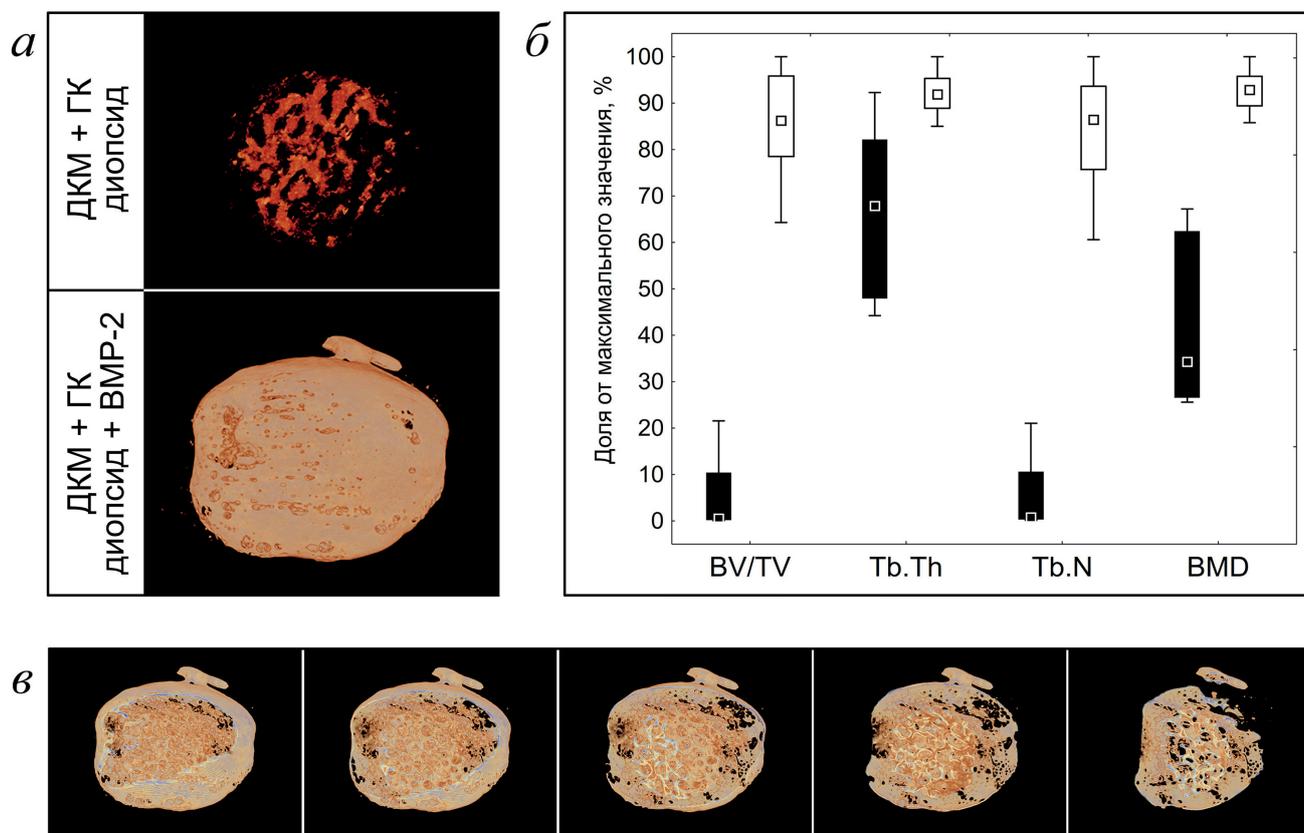


Рис. 2. Результаты микроКТ образцов, извлечённых через 12 недель после внутримышечной имплантации. а – Визуализация участков минерализации. б – Выраженность относительного объёма костной ткани (BV/TV), количества трабекул (Tb.N), толщины трабекул (Tb.Th) и плотности костной ткани (BMD) в группах без (чёрные прямоугольники) и с (незакрашенные прямоугольники) BMP-2. в – Последовательные поперечные срезы при 3D-визуализации результатов микроКТ костной капсулы из группы с BMP-2

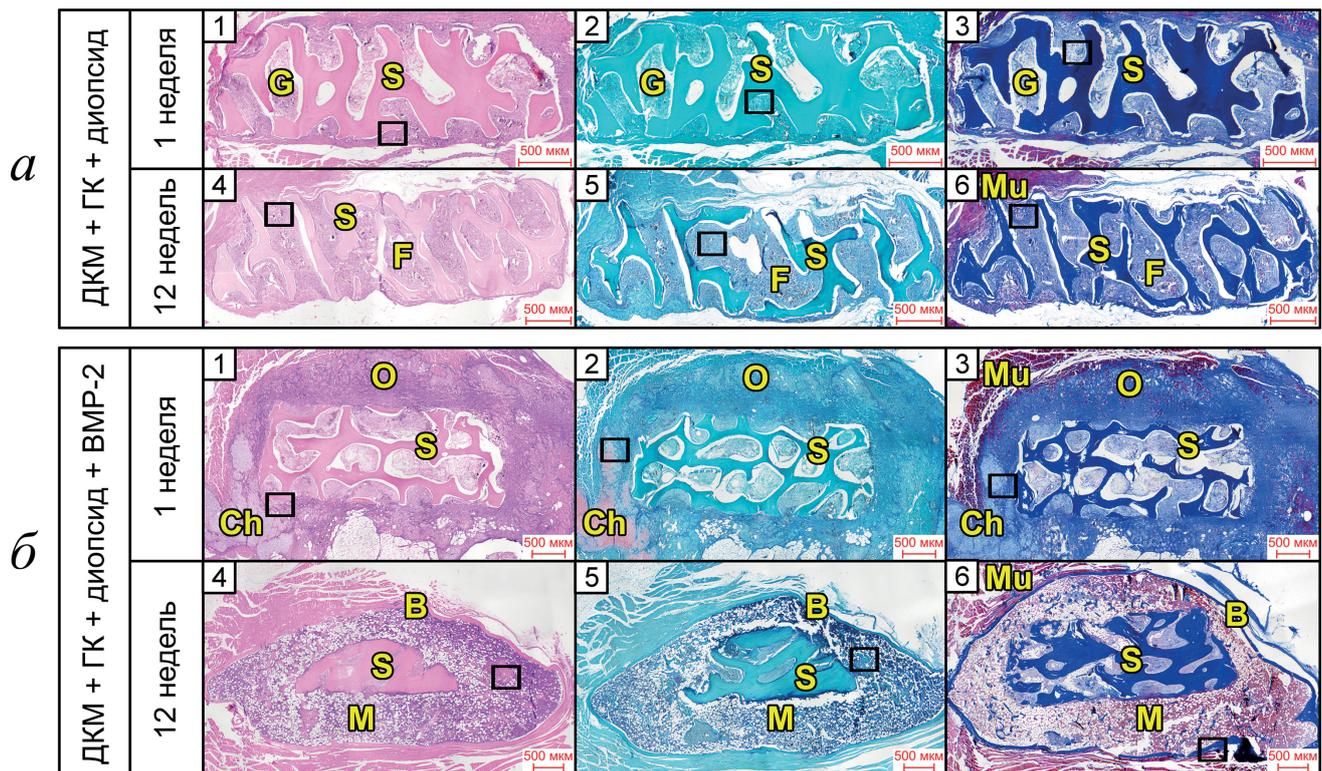


Рис. 3. Гистологический анализ образцов, полученных в результате имплантации в бедренную мышцу мышей гибридных имплантатов из ДКМ, диопсида и ГК, не содержащих (*a*) и содержащих (*б*) ВМР-2. *a, б*: Слева – окраска гематоксилином и эозином, по центру – Сафранином О, гематоксилином и быстрым зелёным FCF, справа – азаном по Гейденгау. Увеличение 10×. Обозначения: В – новообразованная костная ткань, трабекулы, Ch – хондроциты, F – фиброз, G – грануляционная ткань, М – костный мозг, Му – мышечная ткань, О – остеопрогениторные клетки, S – скаффолд ДКМ. Чёрными прямоугольниками обозначены области, соответствующие областям, показанным при большем увеличении на рис. 4

наблюдалось присутствие гигантских многоядерных клеток инородных тел, а также коллагенизация и фиброзирование гранулематозных узелков/очагов воспаления без признаков неоостеогенеза (рис. 4, *a*, 4–6).

В группе с ВМР-2 начальные признаки остеогенеза появлялись уже через неделю после имплантации: вокруг имплантата наблюдались обширные зоны хондрогенеза (окрашиваемые Сафранином О в красный цвет) в окружении многочисленных остеопрогениторных клеток, вероятно, образовавшихся из пула нативных скелетных прогениторных клеток (рис. 3, *б*, 1–3). При большем увеличении наблюдаются резидуальные хондроидные клетки, замещающиеся на клетки с признаками остеоцитов, которые погружены в матрикс, не дающий положительной реакции на Сафранин О (рис. 4, *б*, 1–3). Через 12 недель имплантат окружён костной капсулой, значительно превышающей размеры имплантата, весь объём которой заполнен преимущественно костным мозгом с адипоцитами и тонкими костными трабекулами (рис. 3, *б*, 4–6). Наружный слой капсулы представлен плотной новообразованной костью, покрытой надкостницей, что

хорошо видно при окраске по Гейденгау, где синим цветом окрашиваются коллагенсодержащие структуры (рис. 3, *б*, 6; рис. 4, *б*, 6). На большом увеличении можно наблюдать включение частиц диопсида в новообразованную костную ткань (рис. 4, *б*, 4, 5), которую можно отличить от деминерализованной кости каркасного материала по присутствию остеоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам микроКТ области имплантации выраженная минерализация тканей наблюдается как в случае образцов с ВМР-2, так и без него (рис. 2). В отсутствие ВМР-2 через 12 недель после имплантации минерализованные участки располагаются в открытых порах скаффолда ДКМ, образуя характерную сетку (рис. 2, *a*), однако это не сопровождается появлением новообразованной костной ткани – на гистологических срезах видно присутствие в порах имплантатов фиброзной ткани (рис. 4, *a*, 4–6). Наблюдаемые рентгеноконтрастные участки, по-видимому, соответствуют кальциевым депозитам на частицах

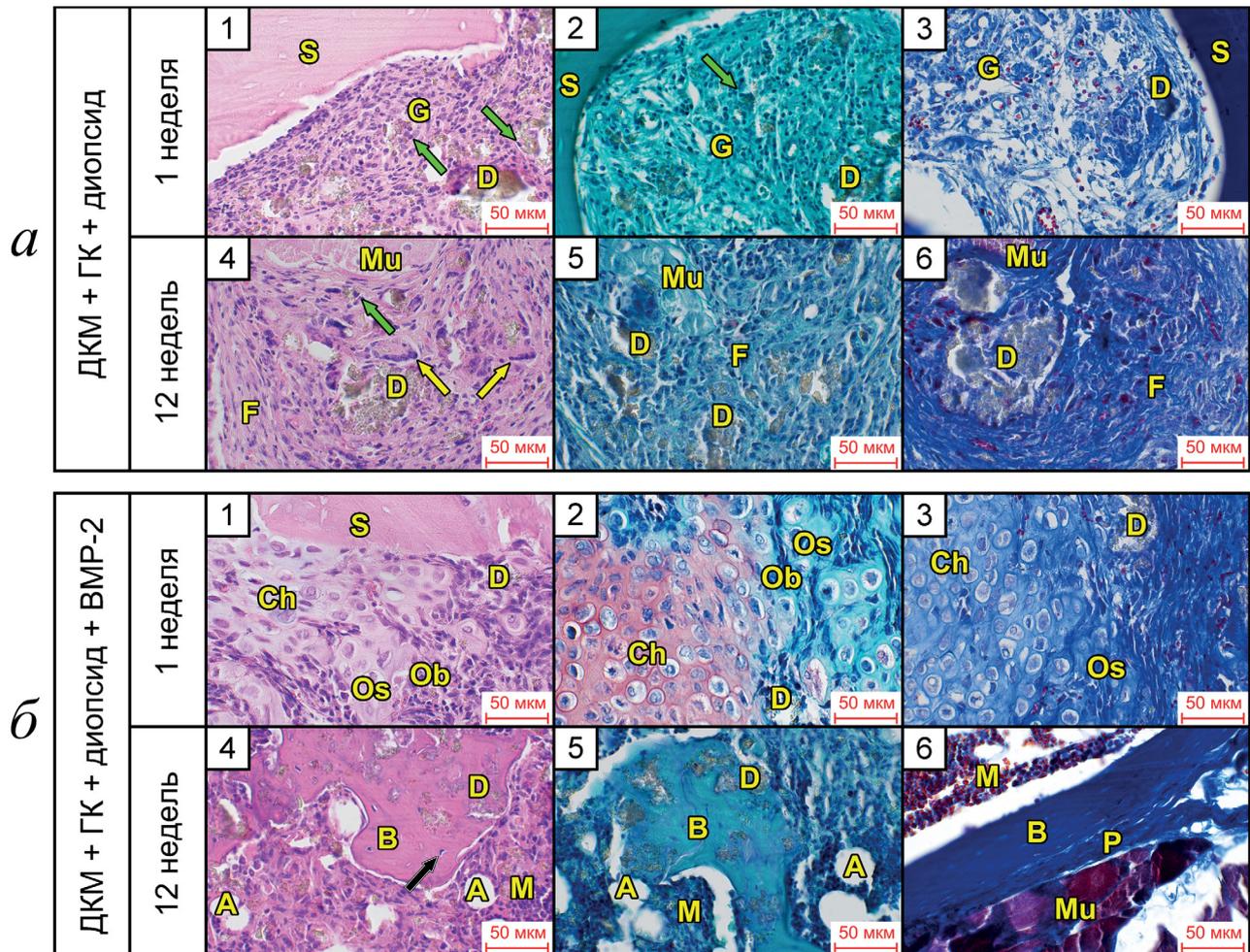


Рис. 4. Гистологический анализ образцов, полученных в результате имплантации в бедренную мышцу мышей гибридных имплантатов из ДКМ, диопсида и ГК, не содержащих (*a*) и содержащих (*б*) ВМР-2. *a*, *б*: Слева – окраска гематоксилином и эозином, по центру – Сафранином О, гематоксилином и быстрым зелёным FCF, справа – азаном по Гейденгайну. Увеличение 40×. Обозначения: А – адипоциты, В – новообразованная костная ткань, трабекулы, Ch – хондроциты, Os – клетки с признаками остеоцитов, Ob – остеобласты, D – диопсид, F – фиброз, G – грануляционная ткань, М – костный мозг, Му – мышечная ткань, Р – надкостница, S – скаффолд ДКМ. Чёрной стрелкой обозначены остеоциты в новообразованной костной ткани, зелёными стрелками – эпителиоидные клетки, жёлтыми стрелками – гигантские клетки инородных тел

диопсида, появляющимся в результате характерной для диопсида биоминерализации – образования поверхностного слоя апатита при инкубации в организме или в SBF (simulated body fluid, раствор, имитирующий внеклеточную жидкость организма) [29]. Таким образом, диопсид, обладая способностью к биоминерализации, тем не менее не способен сам по себе индуцировать остеогенез.

В присутствии ВМР-2 наблюдается формирование замкнутой костной капсулы, покрытой надкостницей, с развитой системой трабекул, построенных из новообразованной костной ткани, промежутки между которыми заполнены зрелым костным мозгом. Таким образом, разработанный нами имплантат при введении в мышцу приводит к образованию полностью сформированной аутогенной костной структуры, готовой к аутотрансплантации,

что свидетельствует об оптимальном подборе компонентов имплантата, в частности, носителя ВМР-2. Выбор носителя для ВМР-2 очень существенен для успешного формирования эктопической костной ткани. Так, в случае использования в качестве носителя ВМР-2 β -трикальцийфосфата наблюдалось образование эктопической кости при внутримышечной имплантации крысам [30], в то же время при использовании гидроксилапатита лишь дополнительное введение в имплантат коллагена привело к образованию костной ткани [17]. Выраженная способность диопсида к биоминерализации может приводить к усилению остеогенеза в окрестности частиц диопсида в присутствии остеоиндуктора вследствие создания высокой локальной концентрации ионов кальция в месте имплантации. Это может быть дополнительным фактором, обеспечивающим

выраженность эктопического остеогенеза в данном эксперименте, а также ортотопического остеогенеза в ранее проведённом эксперименте по имплантации ДКМ и диопсида с ВМР-2 в краниальные дефекты критического размера у мышей [23]. В пользу перспективности применения диопсида в качестве носителя ВМР-2 свидетельствует также то обстоятельство, что в отсутствие ВМР-2 в области имплантации наблюдается умеренно выраженная воспалительная и клеточная реакция на введение имплантата, не превышающая обычную реакцию на введение остеопластических материалов, содержащих ДКМ и частицы керамики. При этом такая реакция значительно снижена на фоне присутствия ВМР-2.

Нас интересовала не только возможность получения эктопической кости, но и характеристика ранних и поздних стадий остеогенеза, включая структуру и качество получаемой костной ткани. В связи с этим были проведены микроКТ и детальный гистологический анализ с тремя окрасками на разном увеличении, позволивший оценить на двух сроках как общую картину, наблюдающуюся при имплантации, так и явления, происходящие на клеточном уровне. Картина, наблюдаемая в присутствии ВМР-2, соответствует непрямому остеогенезу, проходящему с образованием на раннем сроке хрящевой ткани. Структуры, подобные образующейся на позднем сроке костной капсуле с трабекулярной структурой (подобие кортикальной и губчатой кости), достаточно редко наблюдаются в исследованиях по эктопическому остеогенезу. Возможно, это связано с меньшей остеогенностью используемых материалов, использованием более жёстких моделей эктопического остеогенеза, а также тем, что во многих случаях исследователей интересует сам факт возможности эктопического остеогенеза с использованием тех или иных материалов, и сроки эксперимента, как правило, относительно небольшие.

Интересно проследить судьбу ксеногенного костного матрикса, выступающего в качестве скаффолда в используемых имплантатах. Через 12 недель исходный скаффолд ДКМ всё ещё присутствует внутри капсулы, однако наблюдается ремоделирование его верхних слоёв с образованием новой костной ткани с лакунами, включающими остециты. Относительная толщина трабекул скаффолда ДКМ к 12 неделям существенно увеличивается, что хорошо заметно на рис. 3, б с общим видом образовавшихся костных капсул. Однако полной перестройки костного матрикса ДКМ в случае нашего эксперимента на сроке 12 недель не

происходит. При этом в случае введения аналогичного имплантата в краниальные дефекты критического размера у мышей уже через 9 недель с начала эксперимента и при вдвое меньшем количестве ВМР-2 наблюдалось практически полное ремоделирование ДКМ с формированием новообразованной костной ткани с включёнными в неё остеócитами [23]. Разная скорость ремоделирования может быть обусловлена различными причинами, в частности, вариациями в интенсивности и путях остеогенеза из-за разного происхождения остеопрогениторных клеток: в случае ортотопического остеогенеза это мезенхимальные стромальные стволовые клетки костного мозга материнской кости и периоста (надкостницы), в случае же эктопического остеогенеза в мышечном кармане — сателлитные клетки-предшественники скелетной мускулатуры [14]. Представляет интерес исследование судьбы такого имплантата на более поздних сроках. В перспективе можно предположить полную перестройку с замещением ксеногенного костного матрикса аутогенной костью за счёт подключения в качестве источника остеопрогениторных клеток периоста костной капсулы.

Рекомбинантный ВМР-2, используемый в эксперименте, был синтезирован в клетках *E. coli* [26]. Высокая остеогенная активность данного белка показана при совместном применении с различными природными и синтетическими материалами [21, 31–36]. Этот вариант ВМР-2 способен самопроизвольно сорбироваться на частицах диопсида в количестве более 150 мкг/мг, демонстрируя постоянный выход на протяжении нескольких дней [23], что делает данную комбинацию «остеоиндуктор — носитель» очень привлекательной для использования в экспериментах по регенерации костных дефектов. В данном исследовании мы подобрали дозу ВМР-2 в 7 мкг на имплантат, обеспечивающую эффективный эктопический остеогенез с образованием трабекулярной кости. Следует отметить, что обычно доза ВМР-2, используемая в экспериментах по эктопическому остеогенезу, в особенности на крупных животных, существенно выше [17, 35], кроме того, как правило, используется коммерческий ВМР-2, синтезируемый в клетках китайского хомячка, что заведомо будет определять очень высокую стоимость получения аутологичной кости на основе принципа *in vivo* биореактора и ограничит применимость такого подхода. Использование более дешёвого, но не менее активного ВМР-2, полученного синтезом в клетках *E. coli*, должно способствовать более широкому распространению данного метода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе на модели внутримышечной имплантации у мышей проведён эксперимент по эктопическому остеогенезу, индуцируемому гибридными имплантатами, состоящими из губчатого ДКМ, заполненного суспензией частиц диоксида в ГК. Через 12 недель на месте имплантации образовывались округлые костные капсулы трабекулярной структуры, заполненные зрелым костным мозгом и покрытые костью с надкостницей, в несколько раз превышающие по объёму исходный имплантат. Гистологическое исследование на раннем сроке – 1 неделя после имплантации – подтвердило механизм непрямого остеогенеза с промежуточным образованием хрящевой ткани. Предлагаемый подход для эктопического наращивания кости с использованием в качестве носителя ВМР-2 частиц кальций-магниевого силикатной керамики диоксида является новым, преимуществом данного подхода является возможность очень высокой и регулируемой загрузки ВМР-2 в имплантат. Имплантаты на основе ДКМ и диоксида, насыщенного ВМР-2, могут быть использованы для разработки подходов по получению аутологичной костной ткани с использованием принципа *in vivo* биореактора для замещения крупных дефектов трабекулярных костей. Перспективной представляется также разработка других видов гибридных имплан-

татов на основе диоксида в качестве носителя ВМР-2 – например, включающих различные гидрогели и/или пористые скаффолды полимерной природы.

Вклад авторов. А.С. Карягина – концепция и руководство работой, написание статьи; П.А. Орлова, А.В. Жулина, М.С. Кривоzubов, Т.М. Грунина, Н.В. Струкова – проведение экспериментов; П.А. Орлова, М.С. Кривоzubов, А.В. Громов – написание фрагментов статьи, подготовка иллюстраций; А.С. Карягина, В.Н. Манских, Ф.С. Сенатов, А.В. Громов – обсуждение результатов, редактирование текста статьи.

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

Благодарности. Авторы выражают благодарность Раджану Чоулдхари и Инне Булыгиной за предоставление порошка диоксида, Марии Генераловой и Анне Рязановой за помощь в проведении имплантации. Синтез диоксида проводился на базе НИТУ МИСИС, ряд стадий выделения ВМР-2 – в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова и во ВНИИСБ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tan, W., Gao, C., Feng, P., Liu, Q., Liu, C., Wang, Z., Deng, Y., and Shuai, C. (2021) Dual-functional scaffolds of poly(L-lactic acid)/nanohydroxyapatite encapsulated with metformin: Simultaneous enhancement of bone repair and bone tumor inhibition, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **120**, 111592, doi: 10.1016/j.msec.2020.111592.
2. Xu, B., Zheng, P., Gao, F., Wang, W., Zhang, H., Zhang, X., Feng, X., and Liu, W. A. (2017) Mineralized high strength and tough hydrogel for skull bone regeneration, *Adv. Funct. Mater.*, **27**, 1604327, doi:10.1002/adfm.201604327.
3. Farokhi, M., Mottaghtalab, F., Shokrgozar, M. A., Ou, K. L., Mao, C., and Hosseinkhani, H. (2016) Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering, *J. Control. Release*, **225**, 152-169, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.0334.
4. Norbertczak, H. T., Fermor, H. L., Edwards, J. H., Rooney, P., Ingham, E., and Herbert, A. (2022) Decellularised human bone allograft from different anatomical sites as a basis for functionally stratified repair material for bone defects, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **125**, 104965, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104965.
5. Huang, R. L., Kobayashi, E., Liu, K., and Li, Q. (2016) Bone graft prefabrication following the *in vivo* bioreactor principle, *EBioMedicine*, **12**, 43-54, doi: 10.1016/j.ebiom.2016.09.016.
6. Orringer, J. S., Shaw, W. W., Borud, L. J., Freymiller, E. G., Wang, S. A., and Markowitz, B. L. (1999) Total mandibular and lower lip reconstruction with a prefabricated osteocutaneous free flap, *Plast. Reconstr. Surg.*, **104**, 793-797, doi: 10.1097/00006534-199909030-00028.
7. Warnke, P. H., Springer, I. N., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmöller, M., Russo, P. A., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E., and Terheyden, H. (2004) Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man, *Lancet*, **364**, 766-770, doi: 10.1016/S0140-6736(04)16935-3.

8. Warnke, P., Wiltfang, J., Springer, I., Acil, Y., Bolte, H., Kosmahl, M., Russo, P., Sherry, E., Lutzen, U., and Wolfart, S. (2006) Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible, *Biomaterials*, **27**, 3163-3167, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.050.
9. Heliotis, M., Lavery, K. M., Ripamonti, U., Tsiroidis, E., and di Silvio, L. (2006) Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **35**, 265-269, doi: 10.1016/j.ijom.2005.07.013.
10. Cheng, M., Brey, E. M., Ulusal, B. G., and Wei, F. (2006) Mandible augmentation for osseointegrated implants using tissue engineering strategies, *Plast. Reconstr. Surg.*, **118**, 1e-4e, doi: 10.1097/01.prs.0000221120.11128.1a.
11. Mesimäki, K., Lindroos, B., Törnwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., Miettinen, S., and Suuronen, R. (2009) Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **38**, 201-209, doi: 10.1016/j.ijom.2009.01.001.
12. Kokemueller, H., Spalthoff, S., Nolff, M., Tavassol, F., Essig, H., Stuehmer, C., Bormann, K. H., Rücker, M., and Gellrich, N. C. (2010) Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts *in vivo* for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application, *Int. J. Oral Maxillofac Surg.*, **39**, 379-387, doi: 10.1016/j.ijom.2010.01.010.
13. Horch, R. E., Beier, J. P., Kneser, U., and Arkudas, A. (2014) Successful human long-term application of *in situ* bone tissue engineering, *J. Cell. Mol. Med.*, **18**, 1478-1485, doi: 10.1111/jcmm.12296.
14. Scott, M. A., Levi, B., Askarinam, A., Nguyen, A., Rackohn, T., Ting, K., Soo, C., and James, A. W. (2012) Brief review of models of ectopic bone formation, *Stem Cells Dev.*, **21**, 655-667, doi: 10.1089/scd.2011.0517.
15. Habibovic, P., and de Groot, K. (2007) Osteoinductive biomaterials – properties and relevance in bone repair, *J. Tissue Engin. Regenerat. Med.*, **1**, 25-32, doi: 10.1002/term.5.
16. Yang, Z., Yuan, H., Tong, W., Zou, P., Chen, W., and Zhang, X. (1996) Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals, *Biomaterials*, **17**, 2131-2137, doi: 10.1016/0142-9612(96)00044-0.
17. Takaoka, K., Nakahara, H., Yoshikawa, H., Masuhara, K., Tsuda, T., and Ono, K. (1988) Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein, *Clin. Orthopaed. Rel. Res.*, **234**, 250-254.
18. Zhang, H., Yang, L., Yang, X. G., Wang, F., Feng, J. T., Hua, K. C., Li, Q., and Hu, Y. C. (2019) Demineralized bone matrix carriers and their clinical applications: an overview, *Orthopaedic Surg.*, **11**, 725-737, doi: 10.1111/os.12509.
19. Bartov, M. S., Gromov, A. V., Poponova, M. S., Savina, D. M., Nikitin, K. E., Grunina, T. M., Manskikh, V. N., Gra, O. A., Lunin, V. G., Karyagina, A. S., and Gintsburg, A. L. (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.
20. Громов А. В., Никитин К. Е., Карпова Т. А., Зайцев В. В., Сидорова Е. И., Андреева Е. В., Бартов М. С., Мишина Д. М., Субботина М. Е., Шевлягина Н. В., Сергиенков М. А., Соболева Л. А., Котнова А. П., Шарапова Н. Е., Семихин А. С., Диденко Л. В., Карягина А. С., Лунин В. Г. (2012) Разработка методики получения остеопластического материала на основе деминерализованного костного матрикса с максимальным содержанием нативных факторов роста костной ткани, *Биотехнология*, **5**, 66-75.
21. Gromov, A. V., Bartov, M. S., Orlova, P. A., Manskikh, V. N., Krivozubov, M. S., Grunina, T. M., Manukhina, M. S., Strukova, N. V., Nikitin, K. E., Lunin, V. G., Karyagina, A. S., and Gintsburg, A. L. (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.
22. 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.
23. Karyagina, A. S., Orlova, P. A., Poponova, M. S., Bulygina, I. N., Choudhary, R., Zhulina, A. V., Grunina, T. M., Nikitin, K. E., Strukova, N. V., Generalova, M. S., Ryazanova, A. V., Kovalyova, P. A., Zimina, A. I., Lukinova, E. M., Plakhotniuk, E. D., Kirsanova, M. A., Kolesnikov, E. A., Zakharova, E. V., Manskikh, V. N., Senatov, F. S., and Gromov, A. V. (2022) 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, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1277-1291, doi: 10.1134/S0006297922110074.
24. Choudhary, R., Venkatraman, S. K., Bulygina, I., Senatov, F., Kaloshkin, S., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Knyazeva, M., Kukui, D., Walther, F., and Swamiappan, S. (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.
25. Plantz, M. A., Minardi, S., Lyons, J. G., Greene, A. C., Ellenbogen, D. J., Hallman, M., Yamaguchi, J. T.,

- Jeong, S., Yun, C., Jakus, A. E., Blank, K. R., Havey, R. M., Muriuki, M., Patwardhan, A. G., Shah, R. N., Hsu, W. K., Stock, S. R., and Hsu, E. L. (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.
26. Karyagina, A. S., Boksha, I. S., Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Poponova, M. S., Sergienko, O. V., Lyashchuk, A. M., Galushkina, Z. M., Soboleva, L. A., Osidak, E. O., Bartov, M. S., Gromov, A. V., and Lunin, V. G. (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.
 27. Bryan, J. H. D. (1954) Differential staining with a mixture of safranin and fast green FCF, *Stain Technol.*, **30**, 153-157.
 28. Heidenhain, M. (1905) *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik*, S. Hirzel, Leipzig, 22, pp. 339.
 29. Wu, C., and Chang, J. (2013) A review of bioactive silicate ceramics, *Biomed. Mater.*, **8**, 032001, doi: 10.1088/1748-6041/8/3/032001.
 30. Oda, S., Kinoshita, A., Higuchi, T., Shizuya, T., and Ishikawa, I. (1997) Ectopic bone formation by biphasic calcium phosphate (BCP) combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), *J. Med. Dent. Sci.*, **44**, 53-62.
 31. Zimina, A., Senatov, F., Choudhary, R., Kolesnikov, E., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Orlova, P., Strukova, N., Generalova, M., Manskikh, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (2020) Biocompatibility and physico-chemical properties of highly porous PLA/HA scaffolds for bone reconstruction, *Polymers*, **12**, 2938, doi: 10.3390/polym12122938.
 32. Senatov, F., Gulbanu, A., Orlova, P., Bartov, M., Grunina, T., Kolesnikov, E., Maksimkin, A., Kaloshkin, S., Poponova, M., Nikitin, K., Krivozubov, M., Strukova, N., Manskikh, V., Anisimova, N., Kiselevskiy, M., Scholz, R., Knyazeva, M., Walther, F., Lunin, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (2020) Biomimetic UHMWPE/HA scaffolds with rhBMP-2 and erythropoietin for reconstructive surgery, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **111**, 110750, doi: 10.1016/j.msec.2020.110750.
 33. Senatov, F., Maksimkin, A., Chubrik, A., Kolesnikov, E., Orlova, P., Krivozubov, M., Nikitin, K., Gromov, A., and Karyagina, A. (2021) Osseointegration evaluation 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. Mater.*, **119**, 104477, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.104477.
 34. Senatov, F., Zimina, A., Chubrik, A., Kolesnikov, E., Permyakova, E., Voronin, A., Poponova, M., Orlova, P., Grunina, T., Nikitin, K., Krivozubov, M., Strukova, N., Generalova, M., Ryazanova, A., Manskikh, V., Lunin, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (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, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, **135**, 112680, doi: 10.1016/j.msec.2022.112680.
 35. Karpov, T. E., Peltek, O. O., Muslimov, A. R., Tarakanchikova, Y. V., Grunina, T. M., Poponova, M. S., Karyagina, A. S., Chernozem, R. V., Pariy, I. O., Mukhortova, Y. R., Zhukov, M. V., Surmeneva, M. A., Zyuzin, M. V., Timin, A. S., and Surmenev, R. A. (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.
 36. Chubrik, A., Senatov, F., Kolesnikov, E., Orlova, P., Poponova, M., Grunina, T., Bartov, M., Nikitin, K., Krivozubov, M., Generalova, M., Manskikh, V., Lunin, V., Gromov, A., and Karyagina, A. (2020) Highly porous PEEK and PEEK/HA scaffolds with *Escherichia coli*-derived recombinant BMP-2 and erythropoietin for enhanced osteogenesis and angiogenesis, *Polym. Test.*, **87**, 106518, doi: 10.1016/j.polymertesting.2020.

HYBRID IMPLANTS BASED ON CALCIUM-MAGNESIUM SILICATE CERAMIC DIOPSIDE AS A CARRIER OF RECOMBINANT BMP-2 AND DEMINERALIZED BONE MATRIX AS A SCAFFOLD: ECTOPIC OSTEOGENESIS IN INTRAMUSCULAR IMPLANTATION IN MICE

A. S. Karyagina^{1,2,3*}, P. A. Orlova¹, A. V. Zhulina¹, M. S. Krivozubov¹, T. M. Grunina^{1,3}, N. V. Strukova¹, K. E. Nikitin¹, V. N. Manskikh^{1,2}, F. S. Senatov^{1,4}, and A. V. Gromov^{1*}

¹ 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

² *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia*

³ *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia*

⁴ *National University of Science and Technology "MISIS", 119049 Moscow, Russia*

High efficiency of hybrid implants based on calcium-magnesium silicate ceramic diopside as a carrier of recombinant BMP-2 and xenogenic demineralized bone matrix (DBM) as a scaffold for bone tissue regeneration was demonstrated previously on the model of critical size cranial defects in mice. In order to investigate the possibility of using these implants for growing autologous bone tissue using the *in vivo* bio-reactor principle in the patient's own body, the effectiveness of the ectopic osteogenesis induced by them in intramuscular implantation in mice was studied. At 7 µg dose of BMP-2 per implant, after 1 week we observed a dense agglomeration of cells, probably skeletal muscle satellite precursor cells, with areas of intense chondrogenesis, the initial stage of indirect osteogenesis, around the implants. After 12 weeks, a dense bone capsule of trabecular structure was formed, covered with periosteum, with mature bone marrow located in the spaces between the trabeculae. The capsule volume was about 8-10 times the volume of the original implant. There were practically no signs of inflammation and foreign body reaction. Microcomputer tomography data showed a significant increase of the relative bone volume, number of trabeculae and bone tissue density in the group with BMP-2 in comparison with the group without BMP-2. Considering that DBM can be obtained in practically unlimited quantities, of the required size and shape, and the BMP-2 used, which is obtained by synthesis in *E. coli* cells, is relatively inexpensive, further development of the *in vivo* bioreactor model based on hybrid implants from BMP-2, diopside and xenogenic DBM seems promising.

Keywords: diopside, calcium-magnesium silicate ceramics, implant, BMP-2, demineralized bone matrix, ectopic osteogenesis