

БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ОПАЛОВЫХ МАТРИЦ

А. Ф. Белянин^{1,2}, А. С. Багдасарян^{2,3}, Ю. В. Гуляев³, Н. С. Сергеева⁴,
С. А. Багдасарян^{1,2}, Е. Р. Павлюкова³

¹ Центральный научно-исследовательский технологический институт “Техномаш”,
121108 Москва, ул. Ивана Франко, 4

² Научно-производственное предприятие “Технологии радиочастотной идентификации
связи”, 127051 Москва, Сухаревская пл. 4, стр. 1

³ Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН,
125009, Москва, Моховая 11-7

⁴ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена –
филиал ФГБУ НМИЦ радиологии МЗ РФ, 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., д.3

Статья поступила в редакцию 6 мая 2019 г.

Аннотация. Ключевыми проблемами для создания био искусственных органов и тканей является разработка каркасных матриц (носителей) для клеток с использованием наночастиц из разных материалов. Для разработки адекватных гибридных структур необходимо изучить взаимодействие синтетических опаловых матриц и природных аналогов подобных материалов, в частности, гейзерита, с клеточными системами с целью создания биосовместимых материалов для реконструктивной пластической хирургии. В представленной работе показана возможность получения и применения биосовместимых опаловых матриц (природных и искусственных) для культивирования клеточных систем, в том числе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК): а именно, особенности формирования и состав для «опалового матрикса (гейзерита) - культура клеток». Исследование биосовместимости микрочастиц опаловой матрицы *in vivo* было проведено для следующего образца: фракция частиц опаловой матрицы <40 мкм, температура обработки 790°C. В экспериментах были продемонстрированы лучшие свойства матрицы. Проведенные исследования подтверждают биосовместимость опаловых матриц (синтетических и натуральных) в формирователе формы для биологически инертных материалов и применения в регенеративной медицине.

Ключевые слова: опаловые матрицы, нанокompозиты, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК).

Abstract. The key problems for creation of bioartificial organs and tissues are the development of frame matrixes (carriers) for cells using nanoparticles of the different materials. To develop the adequate hybrid structures it is necessary to study the interaction of synthetic opal matrixes and natural analogues of similar materials, in particular, geyselite with cellular systems in order to create biocompatible materials for reconstructive plastic surgery. In the presented article the possibility to obtain and apply biocompatible opal matrixes (natural and artificial) for the cultivation of cellular systems, including multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC): namely, the features of the formation and composition for "opal matrix (geyselite) - cell culture" type structure are considered. Investigation of biocompatibility for microparticles of opal matrixes *in vivo* was made for the following sample sample: fraction of opal matrix particles $<40\ \mu\text{m}$, treatment temperature 790°C). The best matrix properties were demonstrated in experiments. Executed investigations confirm the biocompatibility of opal matrixes (synthetic and natural) in a shape-shifter for biologically inert materials and the application in regenerative medicine.

Keywords: opal matrices, nanocomposites, multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC).

Введение

Прогресс в реконструктивно-пластической хирургии в различных разделах медицины в значительной мере зависит от внедрения современных нанобиоматериалов в качестве трехмерных матриксов для клеточных и тканевых культур. Следовательно, одной из ключевых проблем создания биоискусственных органов и тканей является разработка каркасных матриксов (носителей) для клеток с использованием наночастиц различных материалов. В указанном направлении в последние годы внимание исследователей привлекли мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) в связи с их уникальной пластичностью: *in vitro* такие клетки могут дать начало остео-,

хондро-, адипо-, кардиомиоцитам и другим клеточным линиям. Исследования возможностей дифференцировки негемопозитических стволовых клеток из костного мозга, жировой ткани, периферической крови и других источников позволяют надеяться на возможность восстановления, с использованием таких клеток, структурных и функциональных дефектов многих органов и тканей. Для разработки адекватных гибридных структур необходим поиск в области моделирования, синтеза и изучения взаимодействия соответствующих биологических тканей и наночастиц как основы композиционных материалов.

Выбранный для технологической проработки метод формирования наноструктур должен обеспечивать получение на их основе биоматериалов нового поколения (с учетом результатов моделирования свойств живых биологических тканей) таким образом, чтобы при необходимости они могли замещать структурные и (по возможности) функциональные дефекты, возникающие при оперативных вмешательствах, а также иметь высокую биологическую безопасность.

Область применения подобных материалов достаточно широка: имплантаты жизненно важных органов; трансплантация клеток; трансдермальные или имплантируемые системы с контролируемым и регулируемым выходом биологически активных веществ; изделия с "памятью формы" для ортопедии и сердечно-сосудистой хирургии; биосенсоры; различные биотехнологические способы сепарации, очистки и идентификации биологических структур на молекулярном и клеточном уровнях. Известны различные физико-химические способы формирования микрогетерогенных мозаичных структур, в которых исследователи пытаются имитировать морфологические и энергетические свойства поверхности биологических структур. Поэтому представляется необходимым изучение взаимодействия синтетических опаловых матриц и природных аналогов подобных материалов, в частности, гейзерита с клеточными системами с целью создания биосовместимых материалов для реконструктивно-пластической хирургии. В работе показана возможность получения и применения биосовместимых

опаловых матриц (природных и искусственных) для культивирования клеточных систем, включая ММСК: а именно, рассмотрены особенности формирования и строение структур вида "опаловая матрица (гейзерит) – культура клеток".

Материалы и методы их получения

При разработке клеточных технологий необходимым этапом является создание наноструктурированного биосовместимого матрикса как композиционного материала на основе наночастиц со специфическими свойствами. Однако все ранее полученные данные свидетельствуют, что без учета эффектов биоспецифического распознавания, характерных для стволовых клеток, невозможно создание биоматериалов-матрикс для искусственных биоорганов. Таким образом, главная методическая особенность получения биоматериалов нового поколения заключается в моделировании свойств и взаимодействия наночастиц и живых биологических тканей.

Процесс получения образцов опаловых матриц (трехмерных наноструктур на основе правильных упаковок шаровых частиц SiO_2 с размерами шаровых частиц $\sim 200\text{--}260$ нм) с применением ранее разработанных технологических принципов и специального технологического оборудования описан в работе [1].

В работе использовали образцы ОМ объемом $0,5\text{--}1$ см³ с диаметром шаровых частиц SiO_2 $\sim 200\text{--}260$ нм (рис. 1, растровый электронный микроскоп (РЭМ) Carl Zeiss Leo 1430 VP). Были получены образцы, которые содержали монокристаллические домены размерами до $0,1$ мм³. Упаковка шаровых частиц SiO_2 образуют решетку, имеющую тетраэдрические ($T1$, $T2$) и октаэдрические (Ok) пустоты (рис. 2,а,б), которые условно состоят из сфер, вписанных в пустоты, и соединяющего их пространства. В предположении жестких шаровых частиц SiO_2 диаметры сфер, вписанных в октаэдрические и тетраэдрические пустоты, имеют размеры $\sim 0,41d$ и $\sim 0,22d$ соответственно. На вписанные в пустоты сферы приходится $\sim 7\%$ объема ОМ. Следует отметить, что в

упрочненных ОМ размер пустот меньше теоретических. На рис. 2, в представлена объемная модель ОМ.

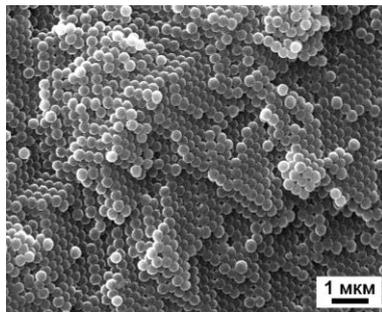


Рис. 1. Строение поверхности ОМ (РЭМ).

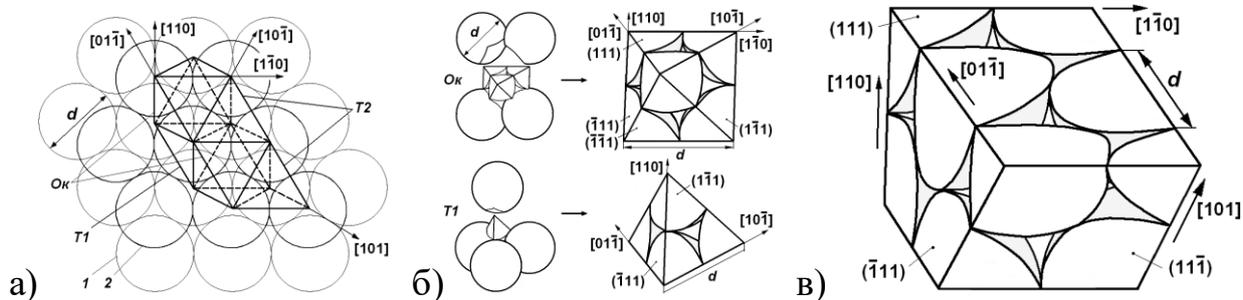


Рис. 2. а) Два (1, 2) уровня шаровых частиц SiO_2 , формирующих межшаровые пустоты. б) Геометрическое представление полигонских октаэдра и тетраэдра. в) Объемный фрагмент (вырез по плоскостям $\{111\}$) ОМ.

Гейзериты (или кремнистые туфы) – отложения аморфного кремнезема, образующиеся из термальных вод горячих источников, важной особенностью которых является участие микроорганизмов в их формировании. Строение порошков гейзеритов, использованных в экспериментах по наращиванию клеточной биомассы, представлено в работах [2, 3].

Полученные образцы дробились и, с использованием стандартных сит, из такого материала выделялись фракции 5–40 мкм, которые применялись в экспериментальной части работы. Для некоторых опытов использовались образцы опаловых матриц, полученные методом центрифугирования, для которых было характерно ускоренное диспергирование (в клеточных системах), вплоть до образования отдельных наносфер [4]. Сформированные массивные

образцы опаловых матриц после рассеивания до необходимых размеров, обрабатывали специально подготовленными растворами, промывали и просушивали.

Биомедицинские испытания клеточных систем в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

Перед началом исследований все образцы частиц опаловых матриц тщательно отмывали в дистиллированной воде в объеме 130–150 мл с последующим осаждением и высушиванием (150°C). Данную операцию повторяли дважды и затем стерилизовали образцы в сухожаровом шкафу (150°C, 120 мин). Скрининг представленных образцов осуществляли в 24-х луночных планках (*Costar*, США). При проведении эксперимента в планшеты помещали заранее подготовленные стерильные материалы (200 мг на лунку) и вносили 1 мл ростовой среды для полного их насыщения культуральной жидкостью. Каждый образец в планках был представлен в триплетах.

Приготовление и внесение ростовой среды, а также биологического материала проводили по стандартной методике. Особенности строения структуры опаловая матрица – прикрепляющиеся клетки изучались на модели иммортализованных фибробластов человека (ФЧ, (клон № 1608), полученной из Коллекции Типовых Клеточных Культур Медико-Генетического научного центра РАМН, Москва). Эксперименты *in vitro* по оценке биосовместимости указанных материалов и динамики нарастания на них клеток также были выполнены на модели клеточной линии иммортализованных нормальных ФЧ.

Эксперименты *in vitro* по оценке острой цитотоксичности данных материалов и динамики нарастания на них клеток выполнены на модели клеточной линии иммортализованных нормальных ФЧ (клон № 1608). Клеточную линию поддерживали в полной ростовой среде следующего состава: 10% эмбриональная телячья сыворотка (ФУРО, Москва), глютамин (600 мг/л), гентамицин (50 мкг/мл) (среда ДМЕМ, Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П.Чумакова РАМН, Москва). В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста (предконфлюэнтный

монослой). Для получения суспензии одиночных клеток монослой ФЧ обрабатывали 0,25% раствором трипсина (*Sigma*, США), а полученную взвесь клеток дважды отмывали центрифугированием в большем объеме полной ростовой среды, производили их подсчет и оценку жизнеспособности, окрашивая клеточную суспензию 0,04% раствором трипанового синего. В платы с исследуемыми образцами (опыт) и без них (контроль) помещали ФЧ (190 тыс. клеток/см³, 380 тыс. клеток в лунке) в объеме 1500 мкл полной ростовой среды и инкубировали: для определения острой цитотоксичности в течение 4–24 ч, для оценки матриксных свойств микрочастиц опаловых матриц – 3, 7, 14 суток (а частицы гейзерита также 24, 60, 90 и 120 суток) с регулярной (дважды в неделю) заменой полной ростовой среды. Культивирование проводили в атмосфере влажного воздуха (37°C), содержащего 5 об.% CO₂. Жизнеспособность ФЧ в динамике эксперимента оценивали с использованием метода, основанного на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый (МТТ, *Sigma*, США) в голубые кристаллы формазана, нерастворимые в воде (МТТ-метод). Количество образовавшегося формазана может характеризовать пролиферативную активность различных клеток человека и животных (жизнеспособность/количество).

Для проведения МТТ-теста в опытах *in vitro* по окончании культивирования ФЧ на культуральном пластике–полистирене (контроль) и ФЧ на образцах частиц опаловых матриц (опыт) из каждой лунки отбирали по 1000 мкл среды и вносили по 125 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл. Через 3 ч инкубации (5% CO₂, 37°C) из каждой лунки декантировали по 250 мкл среды. Образовавшийся формазан растворяли в изопропиловом спирте (2-пропанол, (CH₃)₂CHOH, 750 мкл на лунку). От осадка, образующегося в результате преципитации белков в изопропанол, освобождались центрифугированием плат в течение 10 мин. при 3000 об/мин. Далее из каждой лунки переносили по 100 мкл супернатанта в 96-луночный плоскодонный планшет (*Costar*, США) и оценивали оптическую плотность (*D*) раствора

формаза на с использованием спектрофотометра МСС–340 при длине волны 540 нм. В качестве спектрофотометрического контроля (бланк) использовали пробы с чистой полной ростовой средой и пробы, содержащие тестируемые образцы в полной ростовой среде (без клеток). Для определения цитотоксичности материалов рассчитывали фракцию выживших клеток (ФВК) после 4–24 ч инкубации с ними, по формуле:

$$\text{ФВК} = (D^* \text{ опыт.} / D \text{ контр.}) \times 100\%,$$

где D^* – оптическая плотность раствора формаза на, усл. ед.

При оценке матричных свойств образцов (опаловые матрицы или гейзериты) определяли изменение пула ФЧ (Δ) для фиксированного периода по формуле:

$$\Delta = ([D \text{ наст.} - D \text{ пред.}] / D \text{ пред.}) \times 100\%,$$

где D наст. – величина оптической плотности раствора формаза на для фиксированного периода, D пред. – величина оптической плотности раствора формаза на для предыдущего периода. Положительная величина пула свидетельствовала о приросте популяции ФЧ, отрицательная – о гибели части популяции. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента (достоверным считали разницу при $p < 0,05$).

С целью исследования биосовместимости микрочастиц опаловых матриц, в экспериментах *in vivo*, использовали модель подкожной трансплантации. Для этого мышам–самкам линии *BDF1* весом 18–20 г под наркозом (смесь 0,5 мл раствора кетамина и 0,5 мл раствора реланиума; 0,08 мл/мышь внутримышечно) делали кожный надрез в области грудного отдела позвоночника (паравертебрально). Кожу отделяли от прилегающего слоя подкожной клетчатки и мышц и в образованный "карман" трансплантировали (при помощи шпателя) предварительно отмытый, высушенный, стерильный образец опаловых матриц. Вес и объем материала был одинаковым для всех животных и составлял 120 мг. На область раны накладывали 2 операционных шва. Мышей забивали под эфирным наркозом на 7, 14, 30 сутки эксперимента (по два животных на каждый срок), образцы опаловых матриц извлекали, и

исследовали. Для микроскопии из образцов опаловых матриц изготавливали парафиновые блоки и гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилинэозином. Образцы исследовали с использованием стереомикроскопа.

Особенности взаимодействия клеточных систем с упорядоченными упаковками шаровых частиц SiO_2

Особенности поведения образцов опаловых матриц, сформированных из шаровых частиц SiO_2 диаметром ~ 200 нм и подготовленных для нанесения биологических объектов, а также поведение отдельных шаровых частиц SiO_2 , нано- и микрочастиц гейзерита в питательном растворе показаны на рис. 3.



Рис. 3. Формирование двухфазной структуры: природный гейзерит + клеточная биологическая масса (1 сутки культивирования). Справа представлены увеличенные выделенные участки. Снимки сделаны с использованием оптического микроскопа. Диаметр кюветы 6,72 мм

При взаимодействии клеток с фрагментами опаловой матрицы, равно как и гейзерита, наблюдается появление характерных нитевидных отростков, а также в ряде случаев отделение от участков опаловой матрицы (гейзерита) и иногда "захват" отдельных шаровых частиц SiO_2 или микрочастиц гейзерита, используемых клеточной системой для увеличения объема биологической массы и последующего образования каркасной структуры. В ряде случаев формируется оболочка толщиной $\approx 0,3$ диаметра шаровых частиц SiO_2 , при этом единой структуры типа "сферических комплексов" (объемных структур двухфазной системы: клеточная биологическая масса + опаловая матрица) не наблюдается (рис. 4,а, просвечивающий электронный микроскоп (ПЭМ))

ЕМ–200СХ). Устойчивая структура образуется только при формировании биомассы вокруг опаловой матрицы – упаковок шаровых частиц (рис. 4,б,в). При отсутствии строительного материала (вне контакта с отдельными шаровыми частицами SiO_2 и объемными частицами опаловой матрицы) биологическая масса разрастается планарно и имеет ячеистую структуру (рис. 5).

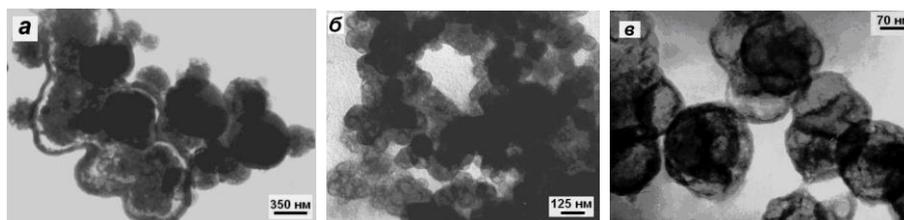


Рис. 4. Взаимодействие клеточной системы: с отдельными шаровыми частицами SiO_2 (а); с отдельными фрагментами опаловой матрицы (б); с фрагментами опаловой матрицы, содержащими 2–5 шаровых частиц SiO_2 (в) (ПЭМ)

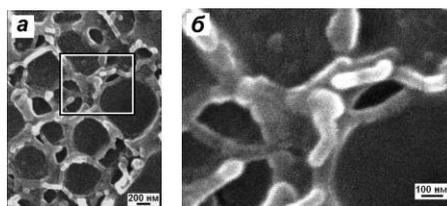


Рис. 5. Снимки, характеризующие поведение фибробластов вне контакта с частицами опаловой матрицы (РЭМ, справа представлен увеличенный выделенный участок)

Строение трехмерной каркасной структуры: клеточная масса + опаловая матрица (гейзерит)

Фибробласты – культура клеток, которые на поверхностях с выраженными матричными свойствами распластаются, иммобилизуются на ней и затем начинают пролиферировать. Установлено, что фибробласты, как правило, не распластаются на поверхности опаловых матриц и гейзерита, а формируют, начиная со 2-го дня эксперимента, вокруг отдельных их фрагментов сфероподобные структуры концентрического типа, которые увеличиваются в объеме как за счет нарастания количества клеток, так и за счет вовлечения новых фрагментов в структуру каркасного типа (матрикс) (рис. 6).

Объемная структура двухфазной системы (биологическая масса + опаловая матрица) устойчива, так как твердая фаза (фрагменты опаловой матрицы или гейзерита) армирует мягкую фазу (биологическую массу), создавая возможность объемного формирования последней. На первом этапе рост клеток происходит на фрагментах опаловой матрицы до толщины 50–100 мкм, после чего разрастающиеся клетки захватывают из окружающей их питательной среды порцию частиц опаловой матрицы и рост продолжается (рис. 7). Строение структур прослеживается на последовательных срезах толщиной ~14 мкм (рис. 8). Приведенные данные свидетельствуют о реальных возможностях создания трехмерных матриксов для клеточных систем с использованием наночастиц на основе опаловых матриц как природных (гейзерита), так и синтетических.

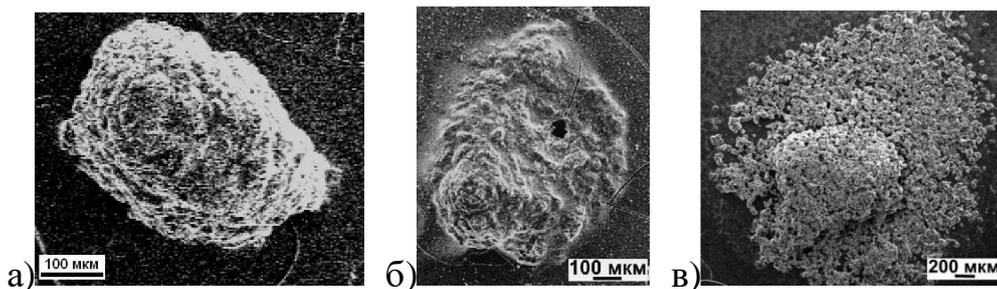


Рис. 6. Общий вид (РЭМ) отдельных объемных структур двухфазной системы: а) клеточная биологическая масса + опаловая матрица (21 день культивирования); б, в) клеточная биологическая масса + гейзерит: б) 14 дней; в) 28 дней

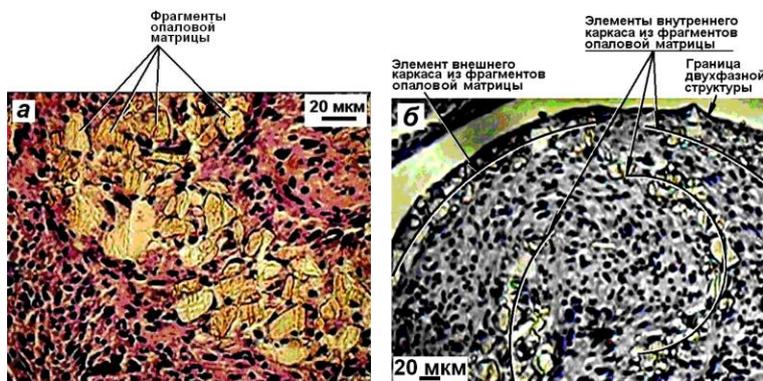


Рис. 7. Взаимное положение фрагментов опаловой матрицы и клеток фибробластов человека в сферической двухфазной структуре: а) центральная область; б) край. Снимки сделаны с использованием оптического микроскопа. Для окрашивания применялся гематоксилин-эозином

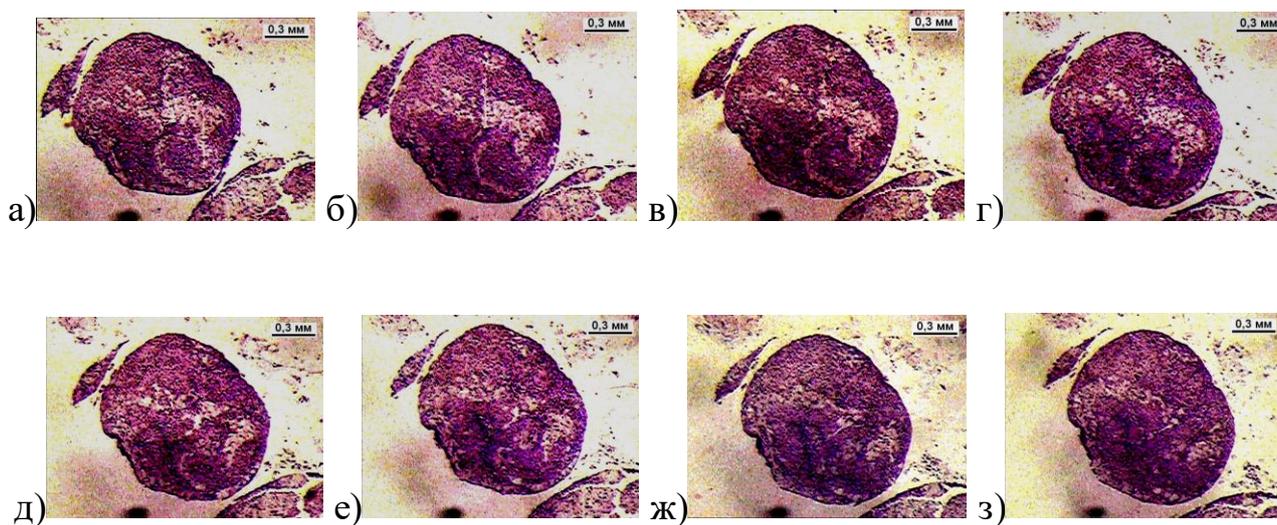


Рис. 8. Взаимное положение фрагментов опаловой матрицы и клеток фибробластов человека в сферической двухфазной структуре в экспериментах *in vitro* (21-й день культивирования): а-з) последовательность нескольких срезов. Снимки сделаны с использованием оптического микроскопа. Для окрашивания применялся гематоксилин-эозином

Наблюдаемый эффект специфического биораспознавания и, как следствие, наличие биосовместимости указанных наноматериалов, эволюционно обусловлено тем, что древние организмы палеозоя и мезозоя (в частности, белемниты и аммониты) и некоторые современные организмы (например, солнечники) имеют опалоподобный скелет.

Испытания биоконплексов

В данном разделе приведены результаты исследования *in vitro* острой цитотоксичности и матричных (адгезивных) свойств опаловых матриц и гейзерита, а также *in vivo* – биосовместимости опаловых матриц. Для первичного скрининга было получено 4 типа образцов частиц опаловых матриц, различающихся размерами и температурой обработки (табл. 1). При оценке острой цитотоксичности (4, 24 ч культивирования ФЧ на использованных материалах), показано, что данная партия образцов не токсична в отношении культуры фибробластов человека: через 4 ч культивирования фракция выживших клеток в опытных группах составила 85–97%, через 24 ч – показатель незначительно снизился (до 70–78%) в отдельных группах (табл. 2).

Таблица 1. Характеристика образцов микрочастиц опаловых матриц

Показатели	Образцы микрочастиц матриц			
	1	2	3	4
Размер частиц, мм	0,2–0,3	0,3–0,5	0,52–1,0	0,1–1,0
Температура обработки, °С	120	300	790	790

Таблица 2. Оценка острой цитотоксичности образцов микрочастиц опаловых матриц (№1–4) в отношении культуры ФЧ (время культивирования 4 и 24 ч, МТТ-тест)

Изменяемые параметры		Образцы				
		Контроль	№ 1 (опыт)	№ 2 (опыт)	№ 3 (опыт)	№ 4 (опыт)
4 часа	Оптическая плотность раствора формазана (усл. ед.)	0,205	0,198	0,188*	0,189*	0,175*
	Фракция выживших клеток (%)	100	97	92	92	85
24 часа	Оптическая плотность раствора формазана (усл. ед.)	0,366	0,287*	0,270*	0,255*	0,276*
	Фракция выживших клеток (%)	100	78	74	70	75

* фактически достоверная разница по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

При исследовании динамики популяции ФЧ при культивировании данных клеток в течение 1–14 суток на полистирене (контроль) и разных образцах частиц опаловых матриц, выявлено отставание во всех опытных группах (по сравнению с контролем) по величине оптической плотности раствора формазана в сроки до 3-х суток эксперимента, увеличение пула фибробластов во всех группах в период с 3-го по 7-ой день опыта с достоверным превышением над контролем величины оптической плотности раствора формазана для образцов № 3 и № 4 и снижение величины D во всех группах к 14-му дню наблюдения, что связано с ограниченным объемом культурального планшета и дефицитом питательных веществ (рис. 9).

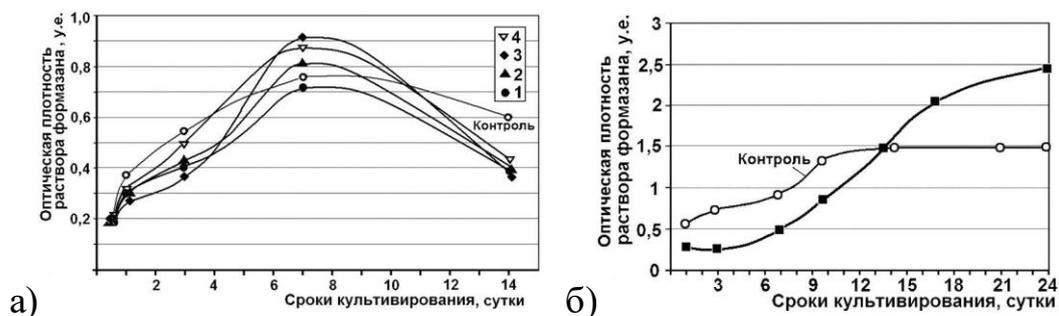


Рис. 9. Динамика величины оптической плотности раствора формазана (МТТ-теста) при культивировании фибробластов человека на полистирене (контроль) и микрочастицах: а) опаловых матриц (№ 1–4); б) гейзерита

При сравнении величины прироста пула ФЧ в указанные временные интервалы обнаружено, что в контроле указанный показатель на протяжении эксперимента практически не менялся и составил 32–44%, для образцов № 1–4 величина прироста пула ФЧ возрастала к 7 суткам наблюдения и составила 83% (№ 1), 89% (№ 2), 152% (№ 3) и 79% (№ 4) соответственно и была, таким образом, максимальной в образце № 3 (рис. 10).

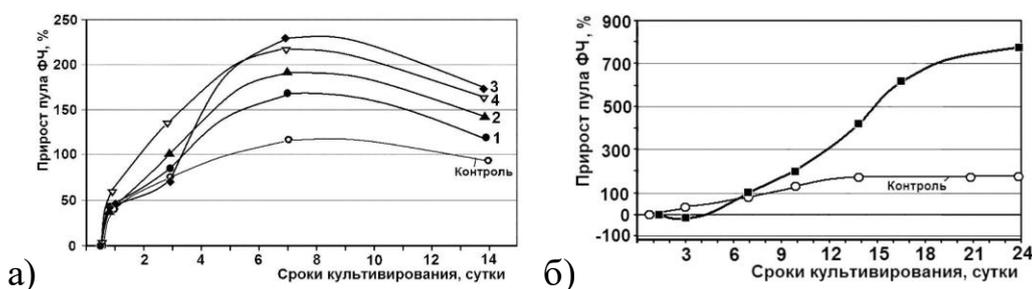


Рис. 10. Динамика прироста пула ФЧ при культивировании на полистирене (контроль) и образцах: а) опаловых матриц (№ 1–4) в разные строки наблюдения; б) гейзерита

Интегрально, за неделю роста культуры фибробластов на полистирене и образце № 1 общий пул клеток увеличился в 3,7 раза, на образце № 2 в 4,3 раза, а на материалах № 3 и № 4 – в 4,8 и 5,0 раз соответственно. Таким образом, при скрининге данных материалов выявлено, что лучшими матричными (для клеток) качествами данной лабораторной партии обладают образцы частиц опаловых матриц № 3 и № 4 (размер частиц, до 1 мм, температура обработки

790°C), которые обеспечивали наиболее благоприятные условия для эффективной экспансии клеток на их поверхности. Следует подчеркнуть, что рост оптической плотности раствора формазана и пула ФЧ при использовании гейзеритов в качестве матриксов не прекращался даже после 90 дней культивирования, при этом в объемной двухфазной структуре: гейзерит + клеточная биомасса, достигающей сантиметровых размеров, формируется пористость в виде пустот.

Опыты показали также, что фибробласты не распластаются на поверхности использованных опаловидных материалов, а формируют (начиная со 2 дня эксперимента) вокруг отдельных микрочастиц SiO₂, структуру с концентрическим типом роста, которые увеличиваются в объеме как за счет нарастания количества клеток, так и за счет вовлечения новых опаловидных частиц в такую структуру. Показанное поведение изучаемой системы немаловажно, поскольку, как известно, одиночные клетки дифференцируются плохо, а в ряде случаев спектр дифференцировки расширяется при возрастании общего объема клеточной системы. Именно наблюдаемая пористость обеспечивает возможности значительного увеличения клеточной системы.

Оценка биосовместимости частиц опаловых матриц в экспериментах *in vivo*

Исследование биосовместимости микрочастиц опаловых матриц в экспериментах *in vivo* проведено для образца № 3 (фракция частиц опаловых матриц <40 мкм, температура обработки 790°C), который продемонстрировал в экспериментах *in vitro* наилучшие матриксные свойства. Установлено, что на ранних сроках наблюдения (одна и две недели после подкожной имплантации мышам частиц опаловых матриц) развивались микропризнаки воспалительной реакции в имплантате: массивная лейкоцитарная инфильтрация практически во всех полях зрения вокруг частиц опаловых матриц и наличие единичных макрофагов (рис. 11,а). Через месяц после операции вокруг имплантата отмечается формирование многослойной соединительнотканной капсулы с выраженным рисунком неоангиогенеза – обширной капиллярной сетью по

поверхности и отсутствие клеточных элементов воспаления внутри нее (рис. 11,б).

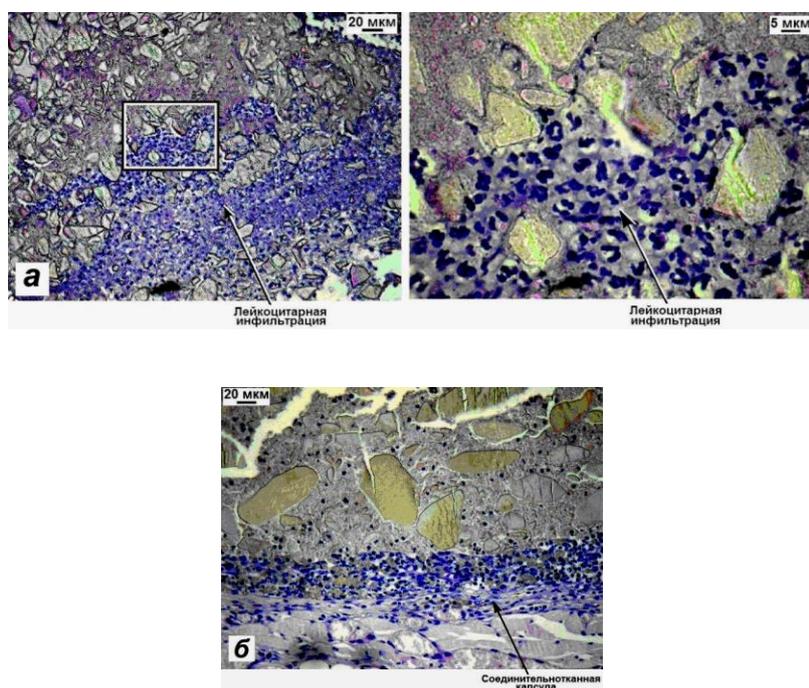


Рис. 11. Частицы опаловых матриц при подкожной трансплантации мышам (окраска гематоксилин-эозином): а) 7 сутки, справа увеличенный выделенный участок; б) соединительнотканная капсула вокруг частиц опаловых матриц под кожей мыши (28 сутки). Снимки сделаны с использованием оптического микроскопа

Таким образом, результаты данного раздела работы свидетельствуют о том, что частицы опаловых матриц (образец № 4) при подкожном введении вызывают первичную асептическую воспалительную реакцию как инородное тело с последующим прекращением воспалительного процесса. В то же время, учитывая факт формирования колоний (фибробластов человека *in vitro* с частицами опаловых матриц) с быстрым концентрическим ростом, перспективы дальнейшего исследования опаловых матриц могут быть связаны с их использованием по крайней мере быстрого наращивания клеточной массы прилипающих культур клеток в объеме путем формирования 3-х мерных структур.

Обсуждение результатов

Приведенные выше данные позволяют рассматривать образование изученными клеточными системами своеобразного скелета – трехмерного матрикса – как существенный элемент самоорганизации. При этом проявляются составные части указанного процесса, а именно, специфическое биораспознавание как в "конструкционных требованиях" к составу, размерам и плотности частиц, используемых при формировании указанных структур, так и в виде особенностей биологического взаимодействия элементов живого организма с неорганической составляющей.

Имеются определенные аналогии в формировании специализации для элементов клеточных структур и в особенностях развития зародыша (эмбриогенеза), как процесса деления, при котором клетки специализируются, а именно, приобретают различные функциональные свойства. Действительно, возникающая в клеточных структурах специализация клеток, в зависимости от их положения в объединенной системе, соотносится с особенностями формирования, например, бластомеров, при которых возникает пространственная организация бластулы. Каждое деление бластомеров является дихотомическим обособлением различных функциональных значений, изначально скрытых в зиготе. Для возникновения такого рода структур необходимо пространственное разделение ее отдельных частей материалом, создающим границы, но не нарушающим при этом целостности системы, в том смысле, что материал должен обладать определенными свойствами биологической инертности и совместимости. Именно такие процессы наблюдаются при образовании 3D-структур, построенных из частичек опаловых матриц и клеток, когда при размножении после стадии радиального и геликоидального деления происходит "осферичивание" системы, которое иллюстрируется на рис. 12. Такой процесс соответствует минимизации ее взаимодействия с окружающей средой и своеобразной физиологической инертности.

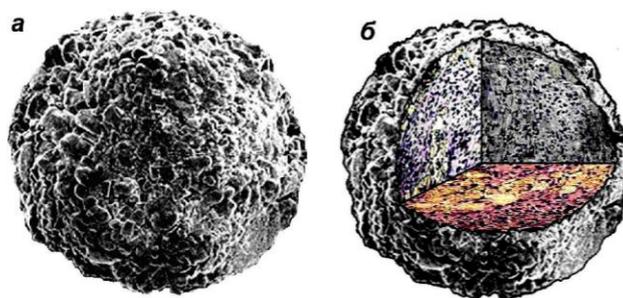


Рис. 12. Объемная реконструкция "осфериченной" клеточной системы и частиц опаловых матриц (а – внешний вид, б – внутреннее строение)

Следует учитывать, что процессы упорядочения и фазовых превращений, протекающие в биологических (живых) системах, существенно отличаются от аналогичных для твердотельных (неживых) структур отсутствием процессов кристаллизации. С формальной, точнее симметричной, точки зрения, биологические структуры относятся к локально-периодическим и на атомарном (молекулярном) уровне описываются во многих случаях как геликоидальные системы, характеризующиеся нецелочисленными осями (иррациональные углы поворотов) определенного типа. Подобное строение не дает таким системам преобразовываться (закристаллизовываться в живых системах) в решетки кристаллического типа, характеризующиеся небольшим набором целочисленных осей (элементов симметрии). Сказанное относится к особенностям строения материальных носителей генома, присутствующих в клетках. Что касается сложных систем нано- и микро размеров, можно полагать, что подобные структуры должны относиться к фрактальным, поскольку в них происходят процессы самоорганизации, инвариантные относительно группы масштабных преобразований. Существенно, что фрактальные системы не только нелинейны, но и, в отличие от твердотельных систем, связаны не столько с топологическими характеристиками, сколько с метрикой или, проще говоря, со способом построения системы, так что сама фрактальность структуры и характеризующая ее размерность являются основными свойствами такой системы. Как результат, наблюдается несколько эффектов, из которых наиболее значимыми будут нижеперечисленные. Во-первых, определяющая

роль (в поведении и свойствах отдельных подсистем, например, в развитии специализации) типа локальной упорядоченности, а во вторых, недавно обнаруженное (ранее известное для сложных колебательных систем) свойство сложных стохастических систем с неоднородностями (фрактальностью) определенного типа – резонансное возрастание чувствительности к подпороговым периодическим воздействиям.

Порождаемая фрактальным развитием системы пористость изучаемых клеточных структур обеспечивает поступление питательных веществ для всех локальных областей биомассы. Последнее, в свою очередь, позволяет предполагать, что подобный тип роста сопровождается появлением возможностей для полидифференцирования клеточной системы благодаря наличию «разделенных областей», что, по-видимому, является необходимым условием развития сложных органов и организмов.

Заключение

Приоритетной областью применения разработанных биodeградируемых композиций является их использование для культивирования клеток различных типов, в том числе стволовых, а также поддержка их дифференцирования в разных направлениях, а именно, в соответствии с особенностями мест трансплантации (микроокружения). Следовательно, главное достоинство биоматериалов нового поколения будет заключаться в воспроизводстве свойств живых биологических тканей таким образом, чтобы при необходимости они могли полностью или частично, временно или постоянно заместить структурно-функциональные дефекты тех или иных органов. В конечном итоге, такие материалы должны быть пригодными для их использования при создании на их основе гибридных (биоискусственных) трансплантантов органов и тканей.

Эксперименты по созданию биоминеральных композитов, а также их исследование и апробирование *in vitro* и *in vivo* показали, что природные гейзериты, состоящие из аморфного кремнезёма и характеризующиеся разупорядоченной структурой с системой пор нано- и микро размеров,

обладают высокой биосовместимостью и лучшей способностью выполнять функции каркаса – матрикса для имплантируемых клеточных культур - по сравнению с синтетическими опаловыми матрицами, трехмерными наноструктурами на основе правильных упаковок шаровых частиц SiO_2 .

Приведенные выше данные позволяют рассматривать образование изученными клеточными системами своеобразного скелета – трехмерного матрикса как существенный элемент самоорганизации. При этом проявляются составные части указанного процесса, а именно, специфическое биораспознавание как в "конструкционных требованиях" к составу, размерам и плотности частиц, используемых при формировании указанных структур, так и в виде особенностей биологического взаимодействия элементов живого организма с неорганической составляющей. Биосовместимость опаловых матриц (синтетических и природных) в формообразователе из биологически инертных материалов позволяет предположить возможность применения указанных материалов в регенеративной медицине.

Работы в этом направлении активно продолжаются [5-9].

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 18-29-02076 мк).

Литература

1. М.И.Самойлович, С.М.Клещева, А.Ф.Белянин, В.Д.Житковский, М.Ю.Цветков. Трехмерные нанокompозиты на основе упорядоченных упаковок наносфер кремнезема. Часть 1-3 // Микросистемная техника. 2004. № 6, С.3-7. № 7, С.2-11. № 8, С.9–17.
2. В.С.Урусов, Л.В.Шванская, А.Ю.Бычков, А.В.Мохов, Е.А.Лабутова. Микроструктуры отложений кремнезема из термальных источников Камчатки // Доклады АН. 2008. Т. 418. № 2. С.262-266.
3. F.Inagaki, Y.Motomura, S.Ogata. Microbial silica deposition in geothermal hot waters. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. V. 60. P.605–611.

4. M.I.Samoilovich, N.S.Sergeeva, A.F.Belyanin, I.K.Sviridova, V.D.Zhitkovskiy. Peculiarities of interection of opal matrices based on cubic packings of SiO₂ nanospheres with cellular structures // Stem cells: policy, research and innovations. European Union – Russian Federation perspectives. British-Russian Workshop in association with the European commission. 2007. Moscow: British council. P.33–35.
5. Багдасарян А.С., Багдасарян С.А., Беянин А.Ф., Кащенко О.В., Павлюкова Е.Р. Информационные технологии для реализации пациент-ориентированного подхода в системе управления лечебно-диагностическим процессом у больных артериальной гипертензией Доклад на VI Междисциплинарном конгрессе по заболеваниям органов головы и шеи. НМИЦ Нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. г. Москва, 17 мая 2018
6. Багдасарян А.С., Багдасарян С.А. Информационные технологии с использованием радиомониторинга в общей врачебной практике / Фундаментальные проблемы радиоэлектронного приборостроения. 2018. Т. 18. № 3. С. 521-525.
7. Багдасарян А.С., Гуляев Ю.В., Каляев И.А., Багдасарян С.А., Коробкин В.В. Интеллектуальные устройства на ПАВ для атомной энергетики: новые разработки и достижения / В сборнике: «Альтернативная и интеллектуальная энергетика». Материалы Международной научно-практической конференции. Воронеж, 6-8 декабря 2018 г. Воронеж, Воронежский государственный технический университет, 2018. С. 60-62. URL <http://aie.cchgeu.ru/upload/staff/upr-nauki-i-innov/konf-aie/Материалы%20международной%20научно-практической%20конференции%20Альтернативная%20и%20интеллектуальная%20энергетика.pdf>
8. А.С.Багдасарян, В.В. Бутенко. Телекоммуникационная среда в эпоху информационного общества: Интеллектуальные устройства и материалы функциональной электроники. «II Международная научно-техническая и научно-методическая конференция «Актуальные проблемы инфотелекоммуникаций в науке и образовании» (АПИНО 2019) Санкт-

Петербург, 27 - 28 февраля 2019 г. URL <https://niir.ru/wp-content/uploads/2019/02/Статья-БутенкоБагдасарян.pdf>

9. А.С.Багдасарян, С.А.Багдасарян, А.Ф.Белянин, О.В.Кащенко, Е.Р.Павлюкова
Интеллектуальные ПАВ-устройства: новые возможности ориентированного
подхода в общей врачебной практике. Предлагаемые методы и подходы.
«Информатика и технологии. Инновационные технологии в промышленности и
информатике» («РНТК ФТИ – 2019»). Москва, 11 - 12 апреля 2019 г. Физико-
технологический институт МИРЭА. URL <https://niir.ru/wp-content/uploads/2019/04/ББСБ-Пленарный-доклад.pdf>

Для цитирования:

А.Ф.Белянин, А.С.Багдасарян, Ю.В.Гуляев, Н.С.Сергеева, С. А. Багдасарян, Е. Р. Павлюкова.
Биосовместимые наноматериалы на основе опаловых матриц. Журнал радиоэлектроники
[электронный журнал]. 2019. № 5. Режим доступа: <http://jre.cplire.ru/jre/may19/3/text.pdf>