

Научная статья

УДК 616.71-004.8-089.844-74-003.93

<https://doi.org/10.18019/1028-4427-2024-31-1-28-41>



Применение композитных скаффолдов на основе стеклоуглерода в инженерии костной ткани

Е.И. Тимошук, Д.В. Пономарева✉, А.Р. Гареев

Научно-исследовательский институт конструкционных материалов на основе графита «НИИГрафит», Москва, Россия

Автор, ответственный за переписку: Дарья Владимировна Пономарева, DVPonomareva@rosatom.ru

Аннотация

Введение. Восстановление костных дефектов остаётся одной из острых проблем регенеративной медицины, для решения которой наиболее перспективным является использование тканево-инженерных конструкций на основе композитных скаффолдов, стимулирующих остеогенез. Одна из основных задач тканевой инженерии — разработка скаффолда, имитирующего трехмерную архитектуру, для остеогенных прогениторных клеток внутри скаффолда с возможностью взаимодействия клеток с химическими и физическими стимулами естественной кости.

Цель работы — оценить возможность применения композитных скаффолдов на основе стеклоуглерода в тканевой инженерии.

Материалы и методы. В данном исследовании описан воспроизводимый метод получения трехмерных пористых скаффолдов на основе стеклоуглерода с поверхностями, модифицированными пироуглеродом (CF-C) и пироуглеродом с гидроксиапатитом (CF-C-HAP), и исследованы пористость, прочностные характеристики, цитотоксичность, остеоиндуктивность полученных композитных скаффолдов. Остеогенную дифференциацию культивируемых мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека оценивали на скаффолдах CF-C и CF-C-HAP с использованием общих остеогенных маркеров, таких как активность щелочной фосфатазы (ЩФ), окрашивание ализарином красным и количественной ПЦР в реальном времени (qPCR).

Результаты. Исследования *in vitro* показали биосовместимость разработанных скаффолдов. Установлена способность CF-C-HAP индуцировать дифференцировку МСК в остеогенном направлении и продуцировать кальцийсодержащий матрикс.

Обсуждение. Получаемые на основе стеклоуглеродной пены скаффолды с покрытиями пироуглеродом и гидроксиапатитом обладают трехмерной структурой с открытой пористостью, прочностью, сопоставимой с прочностью замещающей ткани, и имитируют структуру трабекулярной кости. При этом прочность стеклоуглеродной пены без покрытий отличается низкими значениями предела прочности при сжатии. Для всех исследуемых материалов установлено наличие адгезионной и пролиферативной активности МСК, высокой клеточной адгезии и отсутствие цитотоксичности. Определение уровня экспрессии мРНК методом ПЦР в реальном времени показало, что у клеток, культивированных на CF-C-HAP, через 14 сут. наблюдается экспрессия генов VDR, BMP7, IGFR1, SPP1, что демонстрирует остеогенный потенциал. Результаты наших исследований по изучению активности фосфатазы и окрашивания ализариновым красным продемонстрировали, что скаффолд CF-C-HAP стимулирует дифференцировку остеобластов *in vitro* в остеогенном направлении, а также процессы внутриклеточной минерализации.

Заключение. Композитные скаффолды CF-C-HAP на основе стеклоуглеродной пены поддерживают пролиферацию и дифференциацию клеток и могут быть перспективными для использования в инженерии костной ткани.

Ключевые слова: скаффолд, стеклоуглерод, гидроксиапатит, остеогенез, мезенхимальные стромальные клетки, восстановление костной ткани

Для цитирования: Тимошук Е.И., Пономарева Д.В., Гареев А.Р. Применение композитных скаффолдов на основе стеклоуглерода в инженерии костной ткани. *Гений ортопедии*. 2025;31(1):28-41. doi: 10.18019/1028-4427-2025-31-1-28-41.



Possible application of glassy carbon composite scaffolds in bone tissue engineering

E.I. Timoshchuk, D.V. Ponomareva✉, A.R. Gareev

Research Institute of Structural Materials Based on Graphite "NIIgrazit", Moscow, Russian Federation

Corresponding author: Daria V. Ponomareva, DVPonomareva@rosatom.ru

Annotation

Introduction Bone defect management remains one of the challenging problems of regenerative medicine, for the solution of which the most promising trend is the use of tissue-engineered implants based on composite scaffolds that stimulate osteogenesis. One of the main tasks of tissue engineering is the development of a scaffold that mimics three-dimensional architecture for osteogenic progenitor cells inside the scaffold, with the possibility of cell interaction with appropriate chemical and physical stimuli of natural bone.

The **purpose** of the work is to evaluate the possibility of using composite scaffolds based on glassy carbon in tissue engineering.

Materials and Methods This study describes a reproducible method of obtaining three-dimensional porous glass-carbon-based scaffolds with surfaces modified with pyrocarbon (CF-C) and pyrocarbon and hydroxyapatite (CF-C-HAP) and investigates the porosity, strength characteristics, cytotoxicity, and osteoinductivity of the composite scaffolds obtained. Osteogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells (MSCs) was evaluated on CF-C and CF-C-HAP scaffolds using common osteogenic markers such as: alkaline phosphatase (ALP) activity, alizarin red staining and quantitative real-time PCR (qPCR).

Results *In vitro* studies showed the biocompatibility of the developed scaffolds. The ability of CF-C-HAP to induce MSC differentiation in osteogenic direction and to produce calcium-containing matrix was established.

Discussion The scaffolds based on glassy carbon foam with pyrocarbon and hydroxyapatite coatings have a three-dimensional structure with open porosity, along with the strength comparable to the strength of the replaced tissue, and imitate the structure of trabecular bone. However, the strength of glassy carbon foam without coating is characterized by low compressive strength. All the studied materials demonstrated adhesive and proliferative activity of MSCs, high cell adhesion and absence of cytotoxicity. Determination of the mRNA expression level by real-time PCR showed that after 14 days, cells cultured on CS-C-HAP showed expression of the VDR, BMP7, IGFR1, SPP1 genes, what demonstrates osteogenic potential. The results of our studies on phosphatase activity and alizarin red staining demonstrated that the CF-C-HAP scaffold stimulates osteoblast differentiation *in vitro* in the osteogenic direction, as well as intracellular mineralization processes.

Conclusion Composite CF-C-HAP scaffolds based on glassy carbon foam support cell proliferation and differentiation and may be promising for use in bone tissue engineering.

Keywords: scaffold, glassy carbon, hydroxyapatite, osteogenesis, mesenchymal stromal cells, bone tissue engineering

For citation: Timoshchuk EI, Ponomareva DV, Gareev AR. Possible application of glassy carbon composite scaffolds in bone tissue engineering. *Genij Ortopedii*. 2025;31(1):28-41. doi: 10.18019/1028-4427-2025-31-1-28-41.

ВВЕДЕНИЕ

Кость является твердым, васкуляризированным органом человека, выполняющим защитную и опорно-механическую функции. Помимо этого, костную ткань можно отнести к части эндокринной системы: остеокальцин секретируется преимущественно остеобластами и в декарбоксилированном виде способен связываться с собственным рецептором на бета-клетках поджелудочной железы и клетках Лейдига [1], FGF23 (фактор роста фибробластов 23) синтезируется остеоцитами и является основным регулятором фосфорно-кальциевого обмена [1]. Костная ткань обладает хорошими регенеративными свойствами и способна восстанавливать свою структуру без образования рубцовой фиброзной ткани, однако в случае разможения или наличия отягчающих факторов, таких как старческий возраст и/или сопутствующие соматические заболевания, возможно отклонение регенерации костной ткани от органотипической в сторону заместительной (формирование фиброзной и хрящевой ткани) [2]. В случае возникновения дефектов критического размера самостоятельное восстановление становится невозможным, и требуется медицинское вмешательство. Обширные дефекты костной ткани могут быть вызваны различными факторами: травмы, опухолевые и инфекционные процессы, хирургические вмешательства (резекция патологических участков). Кроме этого, увеличение гериатрической популяции также способствует росту числа заболеваний опорно-двигательной системы.

Традиционно подходы к лечению дефектов критического размера включают использование ауто- и аллотрансплантатов [3, 4]. Аутоотрансплантаты считаются «золотым стандартом» за счет наличия хорошей остеоиндуктивности, остеокондуктивности, остеоинтеграции, способствующей формированию ткани в месте дефекта [5, 6]. Однако использование аутоотрансплантатов сопровождается рядом существенных недостатков, таких как увеличение объема оперативного вмешательства, ограниченный объем донорской ткани, возрастание риска возникновения постоперационных осложнений (инфицирование, кровотечение, повреждение нервно-сосудистой системы донорского участка). К недостаткам аллотрансплантатов относятся низкая остеоиндуктивность, риск передачи инфекционных заболеваний от реципиента к донору, возможность развития реакции гистонесовместимости и хронического воспаления, а также этические и религиозные принципы [7–9].

В последние годы тканевую инженерию рассматривают перспективной альтернативой ауто- и аллотрансплантатам для лечения заболеваний и повреждений костной ткани [10, 11]. В концепцию тканевой инженерии входят три основных блока: клетки, скаффолд и остеоиндуктивные факторы роста [12, 13].

Благодаря своей биоинертности, пористые материалы на основе углерода могут быть кандидатными для использования в качестве скаффолдов. Сообщалось, что скаффолды на основе композита гидроксиапатит / пористый углерод способствуют адгезии и пролиферации MG-63 [14]. Однако, несмотря на это, использование пористых углеродных материалов в качестве скаффолдов ограничено, что связано с их незначительными прочностными характеристиками (например, прочность при сжатии углеродной пены Duacel® составляет 0,47 МПа). В связи с тем, что имплантируемые скаффолды подвергаются различным механическим нагрузкам, включая сжатие, растяжение, кручение и сдвиг [1], крайне важной задачей является создание материала, способного выдерживать нагрузку в процессе регенерации.

Цель работы — оценить возможность применения композитных скаффолдов на основе стеклоуглерода в тканевой инженерии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Композитные скаффолды. В качестве углеродного прекурсора использован коммерчески доступный порошок фенолформальдегидной смолы марки СФП-012А2 (ООО «Метадинеа»). Порошок фенолформальдегидной смолы растворяли в этиловом спирте с получением раствора с концентрацией 30 масс. % для последующей импрегнации полимерных темплатов (Regicell® PPI 80). Импрегнацию образцов проводили путем погружения в спиртовой раствор фенолформальдегидной смолы при температуре 35–40 °С с обработкой в ультразвуковой ванне в течение 30 мин., после чего образцы извлекали и отжимом из них удаляли излишек импрегнирующего раствора. Пропитанные образцы сушили с применением принудительной конвекции в течение 15 мин. при температуре 70 °С. Затем сушку осуществляли в сушильном шкафу при температурах 70, 90, 120 °С. Отверждение проводили при температуре 150 °С в течение 4 ч. Пиролиз пен-прекурсоров проводили в атмосфере азота при температуре (1000 ± 50) °С, со скоростью подъема температуры 2,5 °С/мин и изотермической выдержкой в течение 30 мин. В результате пиролиза получали стеклоуглеродную пену, реплицирующую полимер предшественник. Затем проводили процесс осаждения пироуглерода на поверхность стеклоуглеродной пены методом CVI. В качестве газа прекурсора использовали метан (чистота 99,9 %, АО «МПЗ», Россия), температура процесса составляла (1050 ± 50) °С, продолжительность процесса — 20 ч.

Покрытие на основе гидроксиапатита. Для придания материалу остеоиндуктивных свойств его поверхность модифицировали гидроксиапатитом. Для этого проводили операции, описанные ниже.

Пористый углеродный скаффолд с пироуглеродным покрытием с геометрическими размерами $10 \times 10 \times 20$ мм обезжиривали и очищали от механических примесей путем кипячения в этиловом спирте, после чего промывали дистиллированной водой до нейтрального pH. Очищенный скаффолд погружали в раствор электролита с концентрацией компонентов, обеспечивающей соотношение Ca/P — 1,67, pH поддерживали на уровне 3–5, время осаждения составляло 25 мин. при температуре 40°C при постоянном перемешивании магнитной мешалкой. Образец углеродного скаффолда с пироуглеродным покрытием, выступающий в качестве катода, помещали в центр спиралевидного платинового анода. Для электрохимического осаждения использовали источник тока Matrix MPS-3020 (China). По окончании электролитического осаждения образец извлекали и сушили на воздухе до постоянной массы, после чего осуществляли удаление остатков электролита отмыжкой в дистиллированной воде до нейтрального pH промывных вод. Отмытый образец подвергали сушке при температуре 140°C до постоянной массы.

Образцы маркировали следующим образом: CF (англ.: carbon foam) — стеклоуглеродная пена, C (англ.: carbon coating) — пироуглеродное покрытие, НАР (англ.: hydroxyapatite) — гидроксиапатит.

Плотность и пористость. Объемная плотность образцов рассчитана как отношение массы к объему, объем определен измерением геометрических размеров образца с помощью цифрового штангенциркуля. Пикнометрия с использованием гелия осуществлена для установления истинной плотности углеродного «скелета» на приборе AccuPyc II 1340 [13].

Пористость P (%) и объем пор V_p ($\text{см}^3/\text{г}$):

$$P = \left(1 - \frac{\rho_b}{\rho_s}\right) \times 100 \% \quad (1)$$

$$V_p = \frac{1}{\rho_b} - \frac{1}{\rho_s} \quad (2)$$

где ρ_b — объемная плотность, $\text{г}/\text{см}^3$; ρ_s — истинная плотность, $\text{г}/\text{см}^3$.

Предел прочности при сжатии. Механические свойства скаффолдов исследовали при комнатной температуре на универсальной испытательной машине производства Zwick/Roell (Германия) при постоянной скорости перемещения активной траверсы $0,5$ мм/мин.

Для проведения испытаний по определению предела прочности при сжатии использованы образцы формы параллелепипеда размерами $10 \times 10 \times 20$ мм.

При подготовке (вырезке) образцов обращали внимание на обработку нагруженных поверхностей. Торцы образцов изготавливали плоскопараллельными друг другу во избежание перекоса при нагружении. В противном случае разрушение могло произойти на торцах образца, предел прочности при этом был бы значительно ниже фактического. Для минимизации влияния перекоса испытания проводили с применением специальной плавающей опоры (рис. 1). Во время испытания производили запись диаграммы нагружения в координатах «Нагрузка-деформация», предел прочности $\sigma_{\text{сж}}$ рассчитывали по формуле:

$$\sigma_{\text{сж}} = P_{\text{max}} / bh \quad (3)$$

где: P_{max} — максимальная нагрузка, Н; b — ширина образца, мм; h — толщина образца, мм.

Для статистической достоверности данных получено среднее значение, по меньшей мере, пяти различных измерений и вычислено стандартное отклонение.

Клеточная культура. При проведении исследования использовали первичную культуру мезенхимальных стромальных клеток из пульпы зуба человека (DPSC), фенотип которых (CD44+CD54+, CD90+, CD105+, CD34–, CD45–, HLA–DR–, CD31–, CD133–) соответствует МСК. Первичную культуру мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека выделяли из зачатка третьего моляра, извлеченного по ортодонтическим показаниям (DPSC, Dental Pulp Stem Cells) у здорового пациента 16 лет. Асептически извлеченный зачаток зуба измельчали ножницами до размеров $1\text{--}2$ мм³ и диссоциировали раствором $0,25\%$ трипсин — $0,02\%$ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) (ПанЭко, Россия) в течение 30 мин. при 37°C . Выделенные клетки центрифугировали в течение 3 мин. при 200 g и помещали в среду для культивирования DMEM/F-12 (англ.: Dulbecco's modified Eagles medium, ПанЭко) в соотношении 1:1 с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного

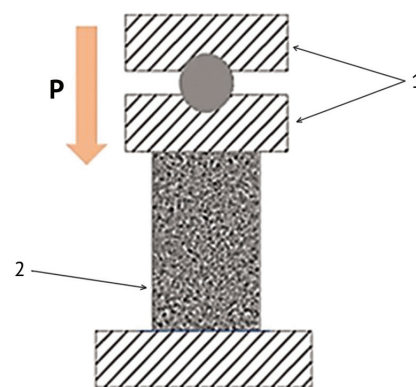


Рис. 1. Схема нагружения: 1 — плавающая опора, 2 — образец углеродного пористого материала

рогатого скота (ЭТС), переносили в 25 см² флаконы и культивировали в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C в среде DMEM (ПанЭко), содержащей 10 % ЭТС (HyClone), 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина с добавлением 2 мМ L-глутамина. При достижении субконфлюентного состояния клетки обрабатывали 0,25 % раствором трипсин-ЭДТА и переносили в 75 см² флаконы, культивирование проводили в среде DMEM/F-12 10 % ЭТС, 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина и добавлением 2 мМ L-глутамина в соотношении 1:1 (Life technologies, США) при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. По мере роста и достижения субконфлюентного состояния клетки обрабатывали 0,25 % раствором трипсин-ЭДТА и пассировали в новые флаконы в соотношении 1:2. Для проведения исследований использовали клетки на 3 пассаже.

Цитотоксичность. Исследование жизнеспособности клеток проводили с применением МТТ-теста, основанного на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолия бромид, МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде.

Спустя 2 сут. после внесения вытяжек материалов культуральную среду удаляли и в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора МТТ 0,5 мг/мл в культуральной среде DMEM/F12 без сыворотки. После выдерживания в течение 3 час. при 37 °C в увлажненной атмосфере 5 % CO₂ жидкость удаляли, вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и, встряхивая планшеты при комнатной температуре в течение 10 мин., растворяли образовавшиеся соли формазана. Количество восстановленного формазана определяли по оптической плотности растворов на фотометре модели 680 (BIO-RAD, США) при длине волны 540 нм. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test). За ошибку принимали среднеквадратичное отклонение от среднего значения, за достоверные принимали различия по U-критерию Манна – Уитни при $p < 0,05$.

Жизнеспособность, адгезионная, пролиферативная и дифференцировочная активность МСК человека. Для проведения исследования жизнеспособности, адгезионной, пролиферативной и дифференцировочной активности МСК человека клетки высевали на поверхности образцов с плотностью 40 тыс./см² и культивировали в течение 14 сут., при этом объем среды составил 0,5 мл/лунку. Смену среды производили каждые 3–4 дня. Дифференцировочную активность клеток оценивали путем определения степени кальцификации и выявления активности в клетках щелочной фосфатазы. Для определения жизнеспособности клеток использовали метод флуоресцентного окрашивания смесью красителей SYTO 9, йодида пропидия и Hoechst 33342. Флуоресцентный краситель SYTO 9 в режиме исследования $\lambda_{\text{возб}} = 450\text{--}490$ нм, $\lambda_{\text{эмисс}} = 515\text{--}565$ нм окрашивал в зеленый цвет ДНК и РНК живых и мертвых клеток. Интеркалирующий реагент йодид пропидия в режиме исследования $\lambda_{\text{возб}} = 546$ нм, $\lambda_{\text{эмисс}} = 575\text{--}640$ нм окрашивал в красный цвет ядра погибших клеток. Флуоресцентный краситель Hoechst 33342 в режиме исследования $\lambda_{\text{возб}} = 355$ нм, $\lambda_{\text{эмисс}} = 460$ нм окрашивал в синий цвет ДНК живых и мертвых клеток. Микрофотосъемку клеток проводили на микроскопе Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

Степень кальцификации определяли путем окрашивания отложений фосфорнокислого кальция красителем ализариновый красный (рН = 4,1). Для этого после окончания культивирования клетки промывали 0,01 М фосфатным буфером (рН = 7,4) и фиксировали в течение 20 мин. в 3,7 % забуференном растворе формальдегида. После удаления фиксатора и промывки деионизованной водой клетки были окрашены 2 % раствором ализаринового красного в течение 5 мин. для выявления образования минерализованного матрикса. Оценку морфологии клеток и количества кальцификатов проводили на микроскопе Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

Определение активности щелочной фосфатазы проводили с использованием набора реагентов (Alkaline phosphatase kit, Sigma 86-R) согласно инструкции производителя. Клетки фиксировали в течение 30 сек. цитрат-ацетон-формальдегидным фиксатором, промывали деионизованной водой и окрашивали в течение 15 мин. забуференным раствором, содержащим нафтол-AS-фосфат, fast red violet (хромогенный субстрат, используемый для определения активности щелочной фосфатазы). Промывали лунки деионизованной водой и в течение 2 мин. проводили докрасивание раствором гематоксилина. После трехкратной промывки деионизованной водой образцы подсушивали на воздухе. Оценку морфологии и окрашивания клеток проводили на микроскопе Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия).

По завершении культивирования проводили подготовку образцов для исследования методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы промывали в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (рН = 7,4) и фиксировали 12 час. при температуре 5 °C в 2,5 % забуференном растворе глутарового альдегида. После фиксации образцы промывали водой и дегидратировали при 4 °C последовательно в батарее водного раствора этанола возрастающей концентрации (50 %, 75 %, 80 %, 90 %) и в абсолютном этаноле на заключительном этапе. На каждой стадии образцы дважды погружали на 5 мин. в соответствующий раствор этилового спирта. Для удаления спирта образцы переносили на 30 мин. в гексаметилдисилазан

(HMDS), после чего высушивали на воздухе. Исследование микроструктуры образцов проводили на сканирующем электронном микроскопе с автоэмиссионным источником Tescan Vega II (TESCAN, Чехия) во вторичных электронах (детектор типа SE) при ускоряющем напряжении 20 кВ.

Фенотипический экспрессионный профиль культивируемых клеток оценивали методом ПЦР в реальном времени на 14-е сут. Исследовали экспрессию 22 генов-маркеров, отображающих процессы остеогенной дифференцировки. Анализируемые гены подбирали из базы данных <http://www.sabiosciences.com/> для ПЦР-профилирования различных биологических процессов (табл. 1).

Уровень транскрипции генов нормировался по средним уровням экспрессии хаус-кипинг генов β -актина и rplp0 (ribosomal protein, large, P0). Ген-специфические праймеры подбирали в программе Primer Express 3 (Applied Biosystems, США) (табл. 1). Для выделения общей матричной РНК из клеток применяли набор «Выделение полноразмерной поли (А) мРНК на магнитных частицах» (Силекс, Россия). Полученную мРНК использовали для синтеза комплементарной ДНК с помощью набора «Синтез первой цепи кДНК (олиго(дТ)15)» (Евроген, Россия). кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени, который проводили на приборе CFX 96 (BioRad, США), используя набор фирмы Евроген, содержащий интеркалирующий краситель SybrGreen. Для этого реакционную смесь размораживали и тщательно перемешивали. Смешивали компоненты реакции в следующей последовательности (на 25 мкл реакции): qPCRmix-HS SYBR — 5 мкл, ПЦР праймер 1 — 0,3 мкМ, ПЦР праймер 2 — 0,3 мкМ, кДНК матрица — 1 нг на реакцию и стерильная вода — до 25 мкл. Концентрация праймеров в реакциях по оптимизации составляла 0,05 пмоль/мкл, концентрация ионов Mg^{2+} составляла от 1,5 мМ, концентрация фермента от 0,2 ед. на 20 мкл реакции. Длина праймеров составляла в среднем 24 нуклеотида. Температура отжига 60 °С, длина амплифицируемого фрагмента 94–100 пар нуклеотидов.

Таблица 1

Гены, экспрессию которых оценивали в исследовании

Аббревиатура	Название гена	NCBI Reference Sequence
ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	NM_000478.4
BGLAP	osteocalcin (bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein)	NM_199173.4
BMP1	bone morphogenetic protein 1	NM_006129.4
BMPRIIA	bone morphogenetic protein receptor, type IA	NM_004329.2
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	NM_000088.3
COL3A1	collagen, type III, alpha 1	NM_000090.3
EGFR	epidermal growth factor receptor	NM_005228.3
FGF-2	fibroblast growth factor 2 (basic)	NM_002006.4
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	NM_015850.3
IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	NM_000618.3
IGFR1	insulin-like growth factor 1 receptor	NM_000875.3
IGF2	insulin-like growth factor 2	NM_000612
RUNX2	runt-related transcription factor 2	NM_004348.3
SMAD2	SMAD family member 2	NM_005901.5
SMAD4	SMAD family member 4	NM_005359.5
SMAD5	SMAD family member 5	NM_005903.6
SPP1	osteopontin-1 (secreted phosphoprotein 1)	NM_000582.2
TGFR1	transforming growth factor, beta receptor 1	NM_004612.2
TNF	tumor necrosis factor	NM_000594.3
VDR	vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D3) receptor	NM_000376.2
BMP7	bone morphogenetic protein 7	NM_001719.2
Twist1	twist family bHLH transcription factor 1	NM_000474.3
RPLP0	ribosomal protein, large, P0	NM_001002.3
ACTIN	beta-actin	XM_006715764.1

Реакцию проводили по следующей схеме: 1 цикл 95 °С — 5 мин; 2–40 циклы 95 °С — 30 сек, 60 °С — 40 сек; 1 цикл (стадия диссоциации) 95 °С — 15 сек, 60 °С — 1 мин, 95 °С — 15 сек. Для определения специфичности реакции продукты амплификации проверяли электрофорезом в 2 % агарозе. Также специфичность реакции определяли по кривым температурной диссоциации ампликонов с помощью программы CFX Manager 2.0 (BioRad, США). Анализ данных, полученных с помощью ПЦР в реальном времени, производили по пороговой флуоресценции методом $\Delta\Delta C(T)$, используя web ресурс для анализа PCR данных Qiagen (<http://www.qiagen.com>), построение тепловых карт экспрессии генов проводили с помощью программы Genesis (https://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient_description.shtml).

Полученные данные экспрессии анализировали методом пороговой флуоресценции методом $\Delta C(T)$:

$$\Delta C(T)_{\text{гена}} = C(T)_{\text{гена}} - C(T)_{\text{хаус кипинг}},$$

где $C(T)_{\text{хаус кипинг}}$ — пороговая флуоресценция хаус кипинг гена.

Разницу между экспрессией гена в опыте и контроле вычисляли методом $\Delta\Delta C(T)$:

$$\Delta\Delta C(T)_{\text{гена}} = \Delta C(T)_{\text{гена опыт}} - \Delta C(T)_{\text{гена контр.}}$$

Относительный уровень экспрессии гена вычисляли по формуле:

$$\text{Отн. экспр.} = 2^{\Delta\Delta C(T)_{\text{гена}}}.$$

Для анализа массива данных использовали онлайн сервисы <http://www.qiagen.com/>, программу Mayday-2.14 (Center for Bioinformatics Tübingen, Германия) и программу Genesis (Sturn et al., 2002). Контролем служил образец без стадии обратной транскрипции. Учитывались лишь те результаты, для которых изменения уровня экспрессии генов наблюдали при $p < 0,05$.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Origin 8.1, за ошибку принимали среднеквадратичное отклонение от среднего значения, за достоверные принимали различия по U-критерию Манна – Уитни при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 и 3 представлены СЭМ-фотографии углеродных скаффолдов с различным типом модификации поверхности и без нее в сравнении с губчатой костью. Все исследуемые образцы имеют ячеистую структуру, состоящую из ячеек, сообщающихся между собой, по своей морфологии схожую с губчатой костью. Размер макропор находится в диапазоне от 150 до 200 мкм.

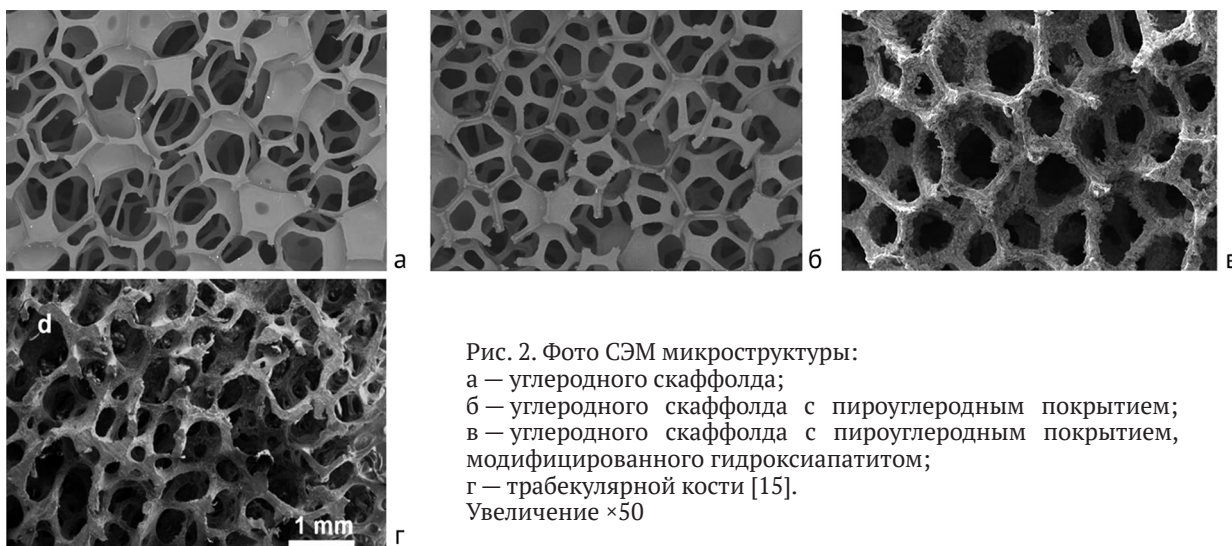


Рис. 2. Фото СЭМ микроструктуры:
а — углеродного скаффолда;
б — углеродного скаффолда с пироуглеродным покрытием;
в — углеродного скаффолда с пироуглеродным покрытием, модифицированного гидроксиапатитом;
г — трабекулярной кости [15].
Увеличение $\times 50$

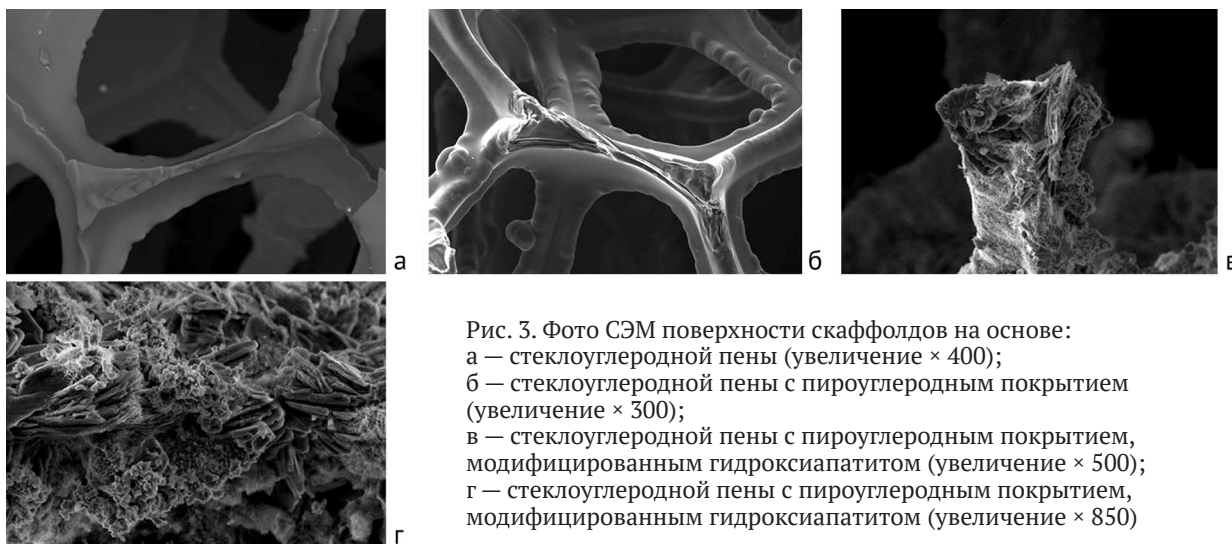


Рис. 3. Фото СЭМ поверхности скаффолдов на основе:
а — стеклоуглеродной пены (увеличение $\times 400$);
б — стеклоуглеродной пены с пироуглеродным покрытием (увеличение $\times 300$);
в — стеклоуглеродной пены с пироуглеродным покрытием, модифицированным гидроксиапатитом (увеличение $\times 500$);
г — стеклоуглеродной пены с пироуглеродным покрытием, модифицированным гидроксиапатитом (увеличение $\times 850$)

По своим механическим характеристикам скаффолды, используемые в тканевой инженерии, должны быть сопоставимы с характеристиками замещающей костной ткани (рис. 4).

Как видно из представленной зависимости, прочность при сжатии модифицированных скаффолдов составила ~ 3 МПа, что укладывается в диапазон значений для трабекулярной кости (2 ~ 10 МПа) [16]. Пористость исследуемых образцов находилась в диапазоне от 89 до 96 %.

На основании полученных данных для исследований *in vitro* отобраны образцы, получившие наилучшие результаты при проведении физико-механических испытаний, CF-C и CF-C-HAP.

Исследование метаболической активности МСК человека показало отсутствие токсического воздействия на клетки вытяжек из всех исследованных материалов (рис. 5).

Результаты исследования жизнеспособности, адгезионной и пролиферативной активности МСК человека при культивировании на поверхности углеродных скаффолдов, проведенного методами флуоресцентной микроскопии, приведены на рис. 6.

Метод дифференцированного флуоресцентного окрашивания основан на мониторинге жизнеспособных клеток в зависимости от целостности их мембраны. Краситель SYTO 9 окрашивает все клетки в культуре (зеленое окрашивание), в то время как нарушение целостности мембраны обеспечивает ее проницаемость для селективного ДНК-красителя пропидия иодида (красное окрашивание ядра). Hoechst 33342 является клеточным проницателем (синее окрашивание), окрашивает ДНК живых и мертвых клеток [17].

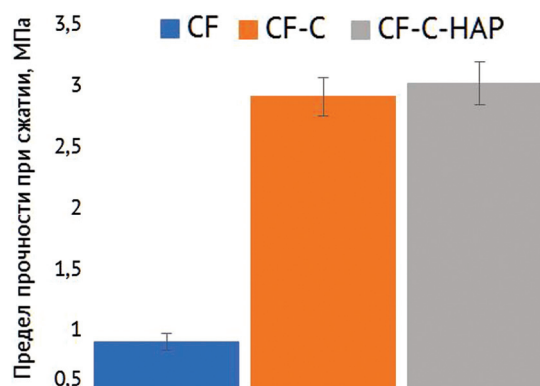


Рис. 4. Предел прочности при сжатии углеродных скаффолдов в зависимости от типа модификации поверхности

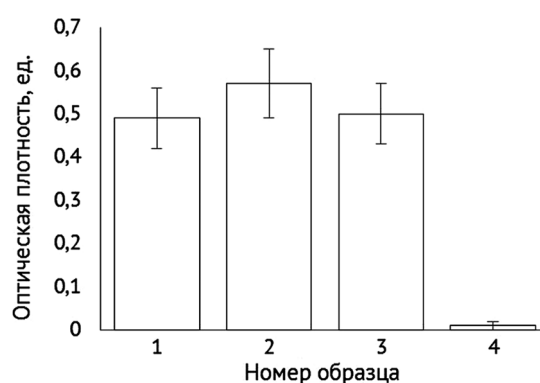


Рис. 5. Метаболическая активность МСК человека по результатам МТТ-теста при инкубации 48 ч с трехсуточными вытяжками из исследуемых материалов: 1 — CF-C; 2 — CF-C-HAP; 3 — контроль отрицательный (среда DMEM / F12); 4 — контроль положительный (среда DMEM / F12 + 10 % DMSO)

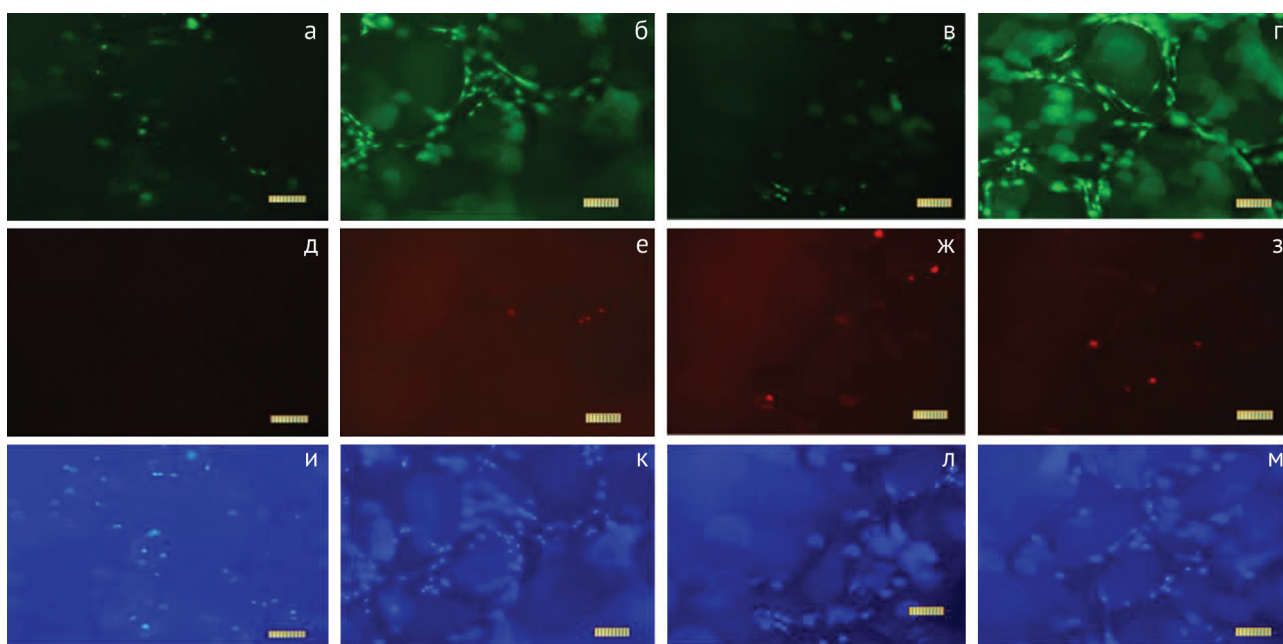


Рис. 6. Внешний МСК человека при культивировании на поверхности CF-C и CF-C-HAP на седьмые (а, д, и; в, ж, л) и четырнадцатые (б, е, к; г, з, м) сутки после посева. Окраска SYTO 9 (а, б, в, г); PI (д, е, ж, з); Hoechst 33342 (и, к, л, м). Линейка 100 мкм

Для контроля флуоресцентную микроскопию проводили на клетках, культивируемых на покровное стекло (рис. 7).

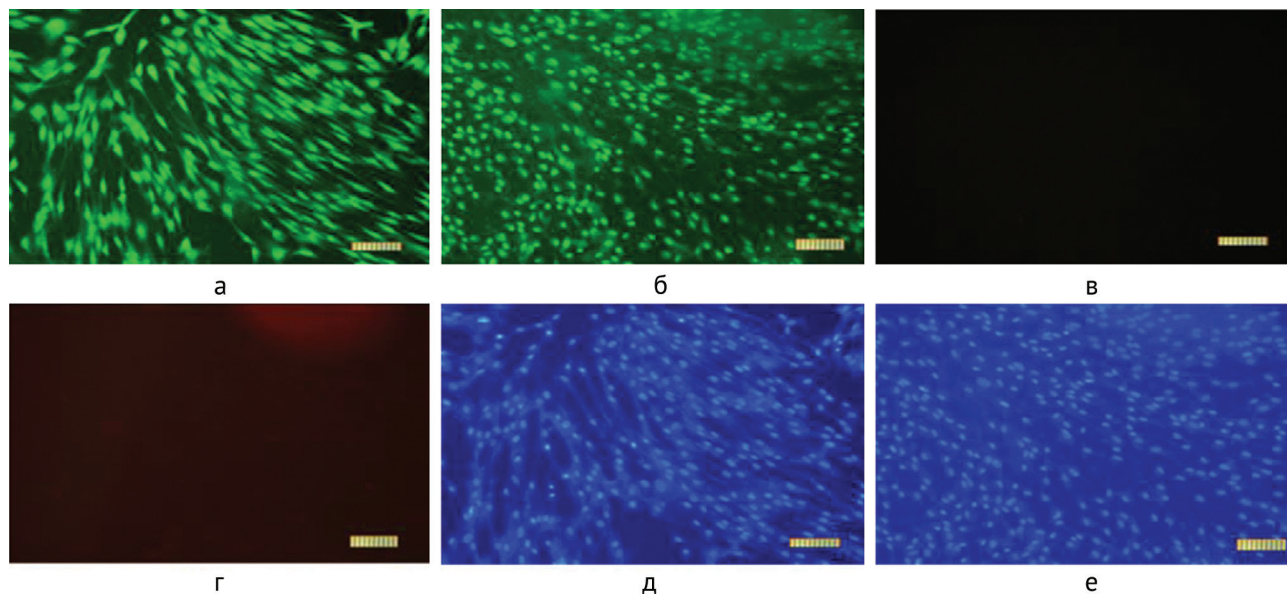


Рис. 7. Внешний вид МСК человека при культивировании на поверхности покровного стекла (контроль) на седьмые (а, в, д) и четырнадцатые (б, г, е) сутки после посева. Окраска SYTO 9 (а, б); PI (в, г); Hoechst 33342 (д, е). Линейка 100 мкм

Также, с помощью СЭМ, анализировали морфологию клеток после культивирования в течение 14 дней (рис. 8).

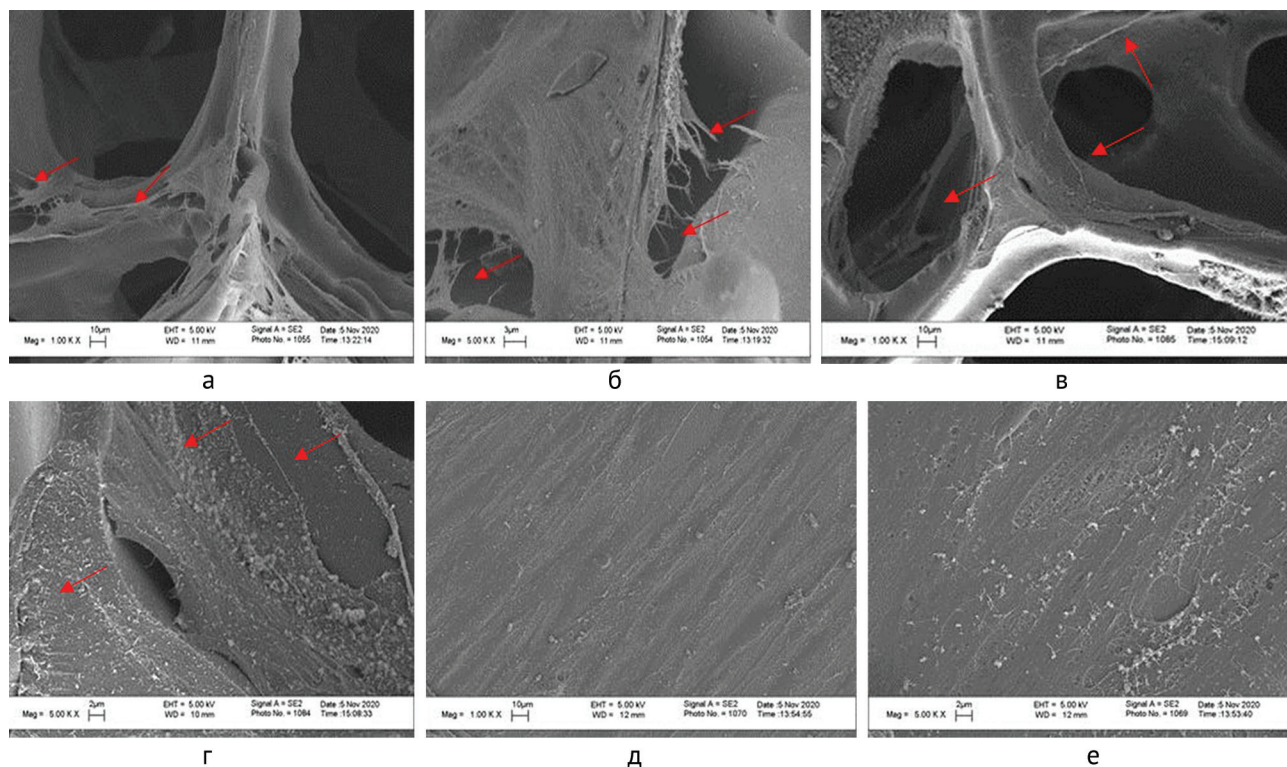


Рис. 8. Внешний вид МСК человека при культивировании на поверхности: скаффолдов на основе CF-C (а — увеличение 1000, б — увеличение 5000), CF-C-HAP (в — увеличение $\times 1000$, г — увеличение $\times 5000$) и покровного стекла (д — увеличение $\times 1000$, е — увеличение $\times 5000$) на 14-е сутки после посева

Определение уровня экспрессии мРНК с использованием метода ПЦР в реальном времени. В качестве контроля взят показатель МСК человека, культивируемых на покровном стекле в среде DMEM /F12 с добавкой 10 % ЭТС, 100 ед./мл пенициллина/стрептомицина.

Сравнение материалов с различной модификацией поверхности показало, что в культивируемых клетках наблюдаются преимущественно схожие паттерны экспрессии исследуемых генов (рис. 9, табл. 2). В целом при сравнении с контрольными образцами отмечали снижение транскрипционной активности всех исследуемых генов, но на образцах B1 и в клетках обнаружили увеличенное содержание транскриптов генов SPP1, VDR и BMP7.

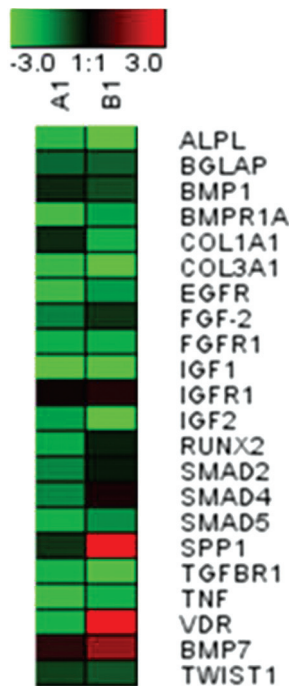


Рис. 9. Паттерны экспрессии генов в клетках, растущих на образцах A1 (CF-C), B1 (CF-C-HAP), в виде тепловых карт. На диаграммах: черный цвет — уровень экспрессии сравним с контролем, градации цвета от черного до зеленого отражают степень ингибирования экспрессии генов, градации от черного до красного цвета — уровень стимуляции относительно контроля

Таблица 2

Данные параметров изменений экспрессии генов из анализируемых образцов, выраженные через Log2

Гены	A1	B1
ALPL	-2,28	-3,80
BGLAP	-1,11	-0,76
BMP1	-0,47	-1,21
BMPR1A	-2,57	-1,14
COL1A1	-0,49	-2,50
COL3A1	-2,40	-3,33
EGFR	-2,47	-1,79
FGF-2	-1,40	1,10
FGFR1	-1,95	-1,85
IGF1	-2,90	-1,60
IGFR1	1,14	1,77
IGF2	-1,75	-2,17
RUNX2	-1,85	-0,81
SMAD2	-1,44	-0,59
SMAD4	-1,46	-0,65
SMAD5	-2,05	-1,87
SPP1	-0,58	46,21
TGFB1	-2,08	-2,23
TNF	-2,49	-1,88
VDR	-2,09	17,51
BMP7	1,44	1,62
TWIST1	-0,73	-0,95

Остеоиндуктивный потенциал пористых матриксов на основе углерода. Начальные этапы остеогенной дифференцировки МСК анализировали с помощью набора Alkaline Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich, США), оценивая гистохимическое выявление в клетках активности щелочной фосфатазы. Щелочная фосфатаза, эктофермент, секретируемый зрелыми остеобластами, является ранним фенотипическим маркером остеогенной дифференцировки МСК [18–20]. Активность щелочной фосфатазы обычно отмечают *in vitro* на седьмой день после начала остеоиндукции и визуализируют при окрашивании на 14 день.

Для оценки влияния скаффолдов на остеогенную дифференцировку клетки культивировали на поверхность покровного стекла, CF-C, CF-C-HAP (рис. 10).

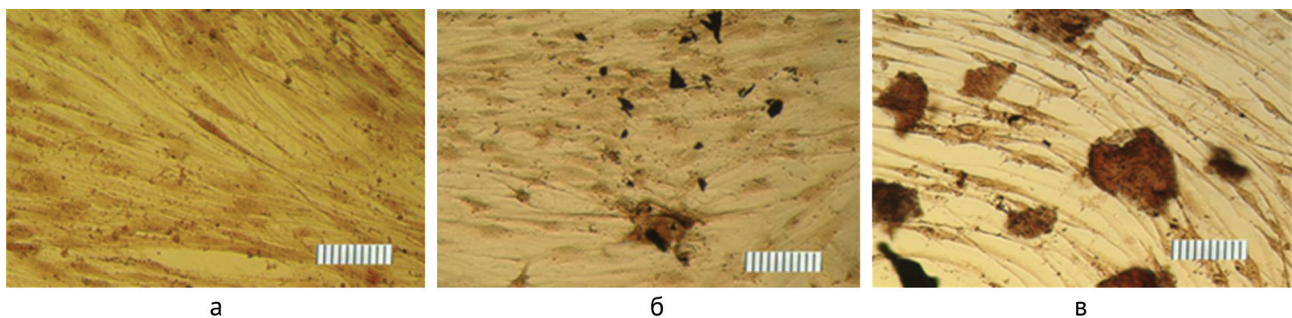


Рис. 10. Активность щелочной фосфатазы МСК человека, культивированных в течение 14 дней на поверхности образцов материалов: покровное стекло (а), CF-C (б); CF-C-HAP (в). Среда DMEM/F-12. Линейка 100 мкм

Одним из количественных методов определения минерализации во время остеогенной дифференциации является окрашивание ализариновым красным. Внешний вид МСК, культивированных в течение 14 сут., показан на рис. 11.

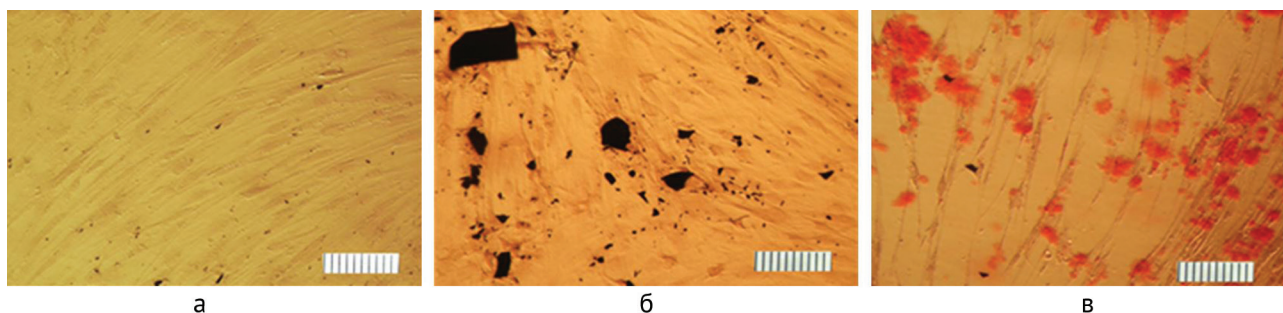


Рис. 11. Внешний вид МСК, культивированных в течение 14 суток в среде DMEM/F-12 (а) и в присутствии образцов материалов CS (б); CS-NAP (в). Окрашивание ализариновым красным. Линейка 100 мкм

ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из основных задач тканевой инженерии является разработка скаффолда, имитирующего трехмерную архитектуру, для остеогенных прогениторных клеток внутри скаффолда с возможностью взаимодействия клеток с соответствующими химическими и физическими стимулами естественной кости [21]. Несмотря на значительное количество исследований, проводимых в данном направлении, требования к конструкции скаффолдов для тканевой инженерии до конца не сформулированы. При этом выделяют ряд ключевых структурных характеристик, определяющих возможность межклеточного взаимодействия внутри скаффолда. Известно, что размер пор, степень канальной взаимосвязанности, а также общая пористость играют решающую роль в регулировании морфологии и поведения различных типов клеток [1, 22–25]. Пористость и размер пор вносят большой вклад в способность скаффолда поддерживать клеточную адгезию, что, в свою очередь, влияет на плотность заселения клеток в объеме скаффолда, а также их распространение и миграцию [24, 26]. Размеры пор, необходимые клеткам различного типа, существенно варьируют, но в среднем для эффективного роста, миграции клеток, а также проникновения питательных веществ и удаления продуктов жизнедеятельности приемлемым является диапазон размера пор 100–500 мкм. Увеличение размера пор скаффолда приводит к снижению площади поверхности, ограничению адгезии клеток и предотвращению образования белково-клеточных мостиков. Помимо этого, механические свойства скаффолда ухудшаются за счет увеличения объема пустот, что является еще одним критическим параметром в конструкции [17, 22]. У скаффолдов, предназначенных для регенерации костной ткани, размер пор в диапазоне 150–400 мкм является оптимальным для стимуляции остеогенеза и васкуляризации вглубь тканево-инженерной конструкции [22, 27].

В настоящем исследовании мы предлагаем технически простой и недорогой метод получения скаффолдов, имитирующих структуру трабекулярной костной ткани человека. В качестве основы композитного скаффолда выбрана стеклоглеродная пена. Стеклоглеродная пена на основе полиуретанового темплата представляет собой трехмерную структуру с размером пор 150–200 мкм, открытой пористостью, преимущественно состоящую из углерода. Поры в данном диапазоне способствуют инфильтрации клеток, участвующих в пролиферации, миграции и васкуляризации *in vivo* [27].

Благодаря сетчатой структуре, а также биоинертности, стеклоглеродные пены подходят для применения в качестве скаффолдов в тканевой инженерии [28, 29]. Наиболее значимыми характеристиками материала для использования в качестве скаффолдов являются пористость, прочность, отсутствие токсичности, остеоиндуктивность и остеокондуктивность [22, 30]. Материал скаффолда должен обладать прочностью, сопоставимой с прочностью замещаемой ткани. В связи с тем, что стеклоглеродные пены являются хрупкими материалами, их прочностные характеристики оценивают по пределу прочности при сжатии [28]. Предел прочности при сжатии и модуль упругости стеклоглеродных пен зависят, прежде всего, от таких параметров, как объемная плотность и пористость. Для скаффолдов чрезвычайно важно сохранить высокую открытую пористость, поскольку это благоприятствует адгезии и пролиферации клеток [27, 31]. Одним из путей повышения прочностных характеристик является модификация поверхности путем нанесения покрытий различной природы. Осаждение пироуглерода позволило повысить предел прочности при сжатии до ~3 МПа, при сохранении общей пористости на уровне 93 %. Высокая пористость скаффолда за счет значительной площади поверхности обеспечивает большее взаимодействие с внеклеточным матриксом [32], что, в свою очередь, способствует прорастанию костной ткани и васкуляризации [32]. Кроме того, постоянный контакт скаффолда с внеклеточным матриксом со временем приводит к окклюзии пор, в связи с чем высокая пористость скаффолда обеспечивает достаточную проницаемость для транспорта питательных веществ и биомолекул [32].

Для улучшения остеоиндуктивных свойств скаффолда поверхность дополнительно модифицировали гидроксиапатитом [27, 33]. Исследование СЭМ показало, что получаемое покрытие формируется как на внешних, так и на внутренних поверхностях скаффолда, является однородным и преимуще-

ственно состоит из пластинчатых кристаллов гидроксиапатита. Нанесение покрытия гидроксиапатита привело к незначительному повышению прочностных характеристик, что согласуется с результатами, полученными в работе S.F. Rahman [27].

Исследование метаболической активности МСК человека показало отсутствие токсического воздействия на клетки вытяжек из всех исследованных материалов. При этом отмечено некоторое увеличение оптической плотности раствора, в который добавлена вытяжка из CF-C-HAP (рис. 5), что может свидетельствовать о наличии в ней водорастворимых факторов, стимулирующих активность клеток. Однако статистический анализ результатов исследования метаболической активности клеток DPSC, проведенный с использованием непараметрического U критерия Манна – Уитни, не показал значимых различий с контролем при воздействии на клетки вытяжек из всех материалов. Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии цитотоксичности у всех исследуемых материалов и отсутствии водорастворимых компонентов, негативно воздействующих на жизнеспособность МСК человека.

Исследования жизнеспособности, адгезионной и пролиферативной активности МСК показали, что на всех сроках наблюдения для CF-C и CF-C-HAP выявлены адгезированные клетки, динамика плотности расположения которых увеличивалась в течение сроков наблюдения. На 14 день после инкубации наблюдается плотное расположение клеток, как на поверхности, так и внутри трехмерных скаффолдов (рис. 6).

СЭМ-анализ прикрепления и морфологии клеток показал, что клетки активно пролиферировали на поверхности скаффолдов, модифицированных пироуглеродом, и гидроксиапатитом. Модификация поверхности углеродных скаффолдов приводит к появлению шероховатости (рис. 2, б, в), что, в свою очередь, является одним из факторов, стимулирующих остеогенез [34].

Клетки образуют плотный монослой, прорастающий через поры внутри трехмерного углеродного скаффолда. По своей морфологии клетки — удлинённые с плоской поверхностью, наблюдаются обширные филоподии (рис. 8, а, б), что свидетельствует о сильной клеточной адгезии и росте.

Определение уровня экспрессии мРНК с использованием метода ПЦР в реальном времени показало (табл. 2), что у клеток, культивированных на CS-C-HAP, через 14 сут. наблюдается экспрессия генов. VDR кодирует рецептор витамина D3, регулирующий активность генов минерального обмена и контролирующий гомеостаз кальция и фосфора [35, 36]. BMP7 является стимулятором дифференцировки остеобластов, который необходим для дифференцировки преостеобластов в зрелые остеобласты [37]. IGFR1 выступает важным регулятором гомеостаза костной ткани, который, вероятно, стимулирует репликацию и дифференцировку остеобластов [38, 39], а также увеличивает экспрессию коллагена I типа в остеобластах и снижает транскрипцию матриксной металлопротеиназы (ММП)-13 [40], которая разрушает коллагеновые волокна и кости [41]. SPP1 — гликопротеин, участвующий в остеогенезе [42–44], усиливает дифференцировку и пролиферацию остеобластов [42, 44, 45], модулирует как формирование костной ткани, так и ее резорбцию за счет прикрепления остеокластов к минерализованному костному матриксу [45]. На основании данных об увеличении экспрессии генов, ассоциированных с остеогенезом, можно сделать вывод, что разрабатываемые материалы обладают остеогенным потенциалом.

Остеогенез — это процесс образования новой кости, включающий кальцификацию предкостного матрикса и дифференциацию остеобластов, предшественников костной ткани, в зрелые остециты. Минерализация матрикса или кальцификация в МСК, подвергающихся остеоиндукции, может быть обнаружена с помощью определения активности ЩФ и окрашивания ализариновым красным. После индукции в течение 14 дней небольшое количество положительных на ЩФ клеток наблюдалось на поверхности CF-C. Клетки, культивированные на поверхности CF-C-HAP (рис. 10, в), демонстрировали более высокую по сравнению с поверхностями покровного стекла и CF-C (рис. 10 а, б) активность ЩФ. Окрашивание культивированных клеток ализариновым красным показало, что в случае контроля (рис. 11, а) отсутствовала спонтанная дифференцировка клеток в остеогенном направлении. Окрашивание культуры МСК в присутствии CF-C дало отрицательный результат, аналогичный контролю, что свидетельствует об отсутствии минерализации и дифференцировки в остеогенном направлении (рис. 11, б). В присутствии CF-C-HAP (рис. 11, в) наблюдаются скопления клеток в виде узелков остеобластов и отложения внеклеточного матрикса, выявленного гистохимически окрашиванием ализариновым красным как кальцификаты, что свидетельствует о его способности индуцировать дифференцировку МСК в остеогенном направлении и продуцировать кальцийсодержащий матрикс.

Результаты наших исследований по изучению активности фосфатазы и окрашивания ализариновым красным показали, что скаффолд CF-C-HAP стимулирует дифференцировку остеобластов *in vitro* в остеогенном направлении, а также процессы внутриклеточной минерализации в остеобластах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Углеродные скаффолды на основе стеклоглеродной пены с поверхностью, модифицированной гидроксиапатитом, обладают высокой пористостью, развитой поверхностью, а также воспроизводят архитектуру трабекулярной костной ткани. Нанесение покрытия на основе пиролизического углерода способствует увеличению прочностных характеристик и снижает гидрофобность углеродного скаффолда. Модификация гидроксиапатитом значительно повышает шероховатость материала, что оказывает положительное влияние на адгезию и прикрепление клеток. Все исследуемые в работе углеродные скаффолды показали отсутствие цитотоксичности.

Установлено, что скаффолды, модифицированные гидроксиапатитом, обладают остеиндуктивностью, способны индуцировать дифференцировку МСК в остеогенном направлении, продуцировать кальцийсодержащий матрикс и увеличивают экспрессии генов, ассоциированных с остеогенезом.

Разработанный материал является перспективным для использования в тканевой инженерии.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования. Работа выполнена за счет средств ГК «Росатом».

Этическая экспертиза. Не требуется.

Информированное согласие. Не применимо.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Садовой М.А., Ларионов П.М., Самохин А.Г., Рожнова О.М. Клеточные матрицы (скаффолды) для целей регенерации кости: современное состояние проблемы. *Хирургия позвоночника*. 2014;2:79-86. doi: 10.14531/ss2014.2.79-86.
2. Phadke A, Hwang Y, Kim SH, et al. Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater*. 2013;25:114-129. doi: 10.22203/ecm.v025a08.
3. Taylor B, Indano S, Yankannah Y, et al. Decellularized Cortical Bone Scaffold Promotes Organized Neovascularization In Vivo. *Tissue Eng Part A*. 2019;25(13-14):964-977. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0225.
4. Sohn HS, Oh JK. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomater Res*. 2019;23:9. doi: 10.1186/s40824-019-0157-y.
5. Chiarello E, Cadossi M, Tedesco G, et al. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. *Aging Clin Exp Res*. 2013;25 Suppl 1:S101-S103. doi: 10.1007/s40520-013-0088-8.
6. Hatzenbuehler J, Pulling TJ. Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician*. 2011 Nov 1;84(9):1027-1033.
7. Wang W, Zhang B, Liu R, Zhao Y. Developing fabrication of high strength hydrogels from non-covalent interactions. *Prog Polym Sci*. 2017;71:1-25. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2017.04.001.
8. Zamborsky R, Svec A, Bohac M, et al. Infection in bone allograft transplants. *Exp Clin Transplant*. 2016;14(5):484-490. doi: 10.6002/ect.2016.0076.
9. Oakley MJ, Smith WR, Morgan SJ, et al. Repetitive posterior iliac crest autograft harvest resulting in an unstable pelvic fracture and infected non-union: case report and review of the literature. *Patient Saf Surg*. 2007;1(1):6. doi: 10.1186/1754-9493-1-6.
10. Gao Y, Ma Q. Bacterial infection microenvironment-responsive porous microspheres by microfluidics for promoting anti-infective therapy. *Smart Med*. 2022;1(1):e20220012. doi: 10.1002/SMMD.20220012.
11. Zhu Y, Kong B, Liu R, Zhao Y. Developing biomedical engineering technologies for reproductive medicine. *Smart Med*. 2022;1(1):e20220006. doi: 10.1002/SMMD.20220006.
12. Dixon DT, Gomillion CT. Conductive Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Current State and Future Outlook. *J Funct Biomater*. 2021;13(1):1. doi: 10.3390/jfb13010001.
13. Perez JR, Kouroupis D, Li DJ, et al. Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:105. doi: 10.3389/fbioe.2018.00105.
14. Liu H, Xia L, Dai Y, et al. Fabrication and characterization of novel hydroxyapatite/porous carbon composite scaffolds. *Materials Letters*. 2012;66(1):36-38. doi: 10.1016/j.matlet.2011.08.053.
15. Guillén T, Ohrndorf A, Tozzi G, et al. Compressive fatigue behavior of bovine cancellous bone and bone analogous materials under multi-step loading conditions. *Advanced Engineering Materials*. 2012;14(5):B199-B207. doi: 10.1002/adem.201180060.
16. Ramaswamy G, Bidez MW, Misch CE. Bone response to mechanical loads. In: Misch CE. *Dental Implant Prosthetics* (Second Edition). Mosby; 2015:107-125. doi: 10.1016/B978-0-323-07845-0.00006-3.
17. Попов А.Л., Татарникова О.Г., Шекунова Т.О. и др. Исследование воздействия нанокристаллического диоксида церия, допированного гадолинием (Ce1-xGdxO2-y), на функциональное состояние и жизнеспособность клеток линии NCTC clone L929. Вестник Томского государственного университета. *Химия*. 2017;(8):68-87. doi: 10.17223/24135542/8/6.
18. Wutticharoenmongkol P, Pavasant P, Supaphol P. Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2007;8(8):2602-2610. doi: 10.1021/bm700451p.
19. Tsukamoto Y, Fukutani S, Mori M. Hydroxyapatite-induced alkaline-phosphatase activity of human pulp fibroblasts. *J Mater Sci: Mater Med*. 1992;3:180-183. doi: 10.1007/bf00713446.
20. Lao L, Wang Y, Zhu Y, et al. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(8):1873-1884. doi: 10.1007/s10856-011-4374-8.
21. Chung S, King MW. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Appl Biochem*. 2011;58(6):423-438. doi: 10.1002/bab.60.
22. Saberi A, Koughjani M, Mohammadi M, Hosta-Rigau L. Novel scaffold platforms for simultaneous induction osteogenesis and angiogenesis in bone tissue engineering: a cutting-edge approach. *J Nanobiotechnology*. 2023;21(1):351. doi: 10.1186/s12951-023-02115-7.
23. He X, Zhao Q, Zhang N, et al. Impact of a staggered scaffold structure on the mechanical properties and cell response in bone tissue engineering. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2023;21:22808000231181326. doi: 10.1177/22808000231181326.
24. Abbasi N, Hamlet S, Love RM, Nguyen NT. Porous Scaffolds for Bone Regeneration. *J Sci: Adv Mater Dev*. 2020;5(1):1-9. doi: 10.1016/j.jsamd.2020.01.007.
25. Aghali A. Craniofacial Bone Tissue Engineering: Current Approaches and Potential Therapy. *Cells*. 2021;10(11):2993. doi: 10.3390/cells10112993.

26. Persson M, Lehenkari PP, Berglin L, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a 3D woven scaffold. *Sci Rep*. 2018;8(1):10457. doi: 10.1038/s41598-018-28699-x.
27. Rahman SF, Ghaffary MM, Tampubuluon JY, et al. Effect of graphite, graphene oxide, and multi-walled carbon nanotubes on the physicochemical characteristics and biocompatibility of chitosan/hyaluronic acid/hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering applications. *J Sci: Adv Mater Dev*. 2024;9(2):100719. doi: 10.1016/j.jsamd.2024.100719.
28. Bagal R, Bahir M, Lenka N, Patro TU. Polymer derived porous carbon foam and its application in bone tissue engineering: a review. *Int J Polymer Mater Polymer Biomat*. 2022;72(12):909-924. doi: 10.1080/00914037.2022.2066669.
29. Islam M, Sadaf A, Gomez MR, et al. Carbon fiber/microlattice 3D hybrid architecture as multi-scale scaffold for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;126:112140. doi: 10.1016/j.msec.2021.112140.
30. Dong J, Ding H, Wang Q, Wang L. A 3D-Printed Scaffold for Repairing Bone Defects. *Polymers (Basel)*. 2024;16(5):706. doi: 10.3390/polym16050706.
31. Lee DJ, Kwon J, Kim YI, et al. Effect of pore size in bone regeneration using polydopamine-laced hydroxyapatite collagen calcium silicate scaffolds fabricated by 3D mould printing technology. *Orthod Craniofac Res*. 2019;22 Suppl 1(Suppl 1):127-133. doi: 10.1111/ocr.12261.
32. Koushik TM, Miller CM, Antunes E. Bone tissue engineering scaffolds: function of multi-material hierarchically structured scaffolds. *Adv Healthc Mater*. 2023;12(9):e2202766. doi: 10.1002/adhm.202202766.
33. Cao J, Lian R, Jiang X, Rogachev AV. In vitro degradation assessment of calcium fluoride-doped hydroxyapatite coating prepared by pulsed laser deposition. *Surface and Coatings Technology*. 2021;416:127177. doi: 10.1016/j.surfcoat.2021.127177.
34. Zhang Y, Chen SE, Shao J, van den Beucken JJJP. Combinatorial Surface Roughness Effects on Osteoclastogenesis and Osteogenesis. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(43):36652-36663. doi: 10.1021/acsami.8b10992.
35. Meyer MB, Goetsch PD, Pike JW. Genome-wide analysis of the VDR/RXR cistrome in osteoblast cells provides new mechanistic insight into the actions of the vitamin D hormone. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(1-2):136-141. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.011.
36. Li Y, Zhao P, Jiang B, et al. Modulation of the vitamin D/vitamin D receptor system in osteoporosis pathogenesis: insights and therapeutic approaches. *J Orthop Surg Res*. 2023; 18(1):860. doi: 10.1186/s13018-023-04320-4.
37. Ott SM, Elder G. Osteoporosis associated with chronic kidney disease. In: Marcus R, Feldman D, Dempster DW, et al. (eds). *Osteoporosis*. 4th ed. Elsevier Pub.; 2013:1387-1424. doi: 10.1016/B978-0-12-415853-5.00058-3.
38. Yakar S, Rosen CJ. From mouse to man: redefining the role of insulin-like growth factor-I in the acquisition of bone mass. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003;228(3):245-252. doi: 10.1177/153537020322800302.
39. Fang J, Zhang X, Chen X, et al. The role of insulin-like growth factor-1 in bone remodeling: A review. *Int J Biol Macromol*. 2023;238:124125. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124125.
40. Canalis E, Rydziel S, Delany AM, et al. Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology*. 1995;136:1348-1354. doi: 10.1210/endo.136.4.7895645.
41. Brennan-Speranza TC, Rizzoli R, Kream BE, et al. Selective osteoblast overexpression of IGF-I in mice prevents low protein-induced deterioration of bone strength and material level properties. *Bone*. 2011;49(5):1073-1079. doi: 10.1016/j.bone.2011.07.039.
42. Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: Role in bone remodeling. *J Cell Biochem*. 1998;72 Suppl 30-31(S30-31): 92-102. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(1998)72:30/31<92::AID-JCB13>3.0.CO;2-A.
43. Choi ST, Kim JH, Kang EJ, et al. Osteopontin might be involved in bone remodelling rather than in inflammation in ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(12):1775-1779. doi: 10.1093/rheumatology/ken385.
44. Martín-Márquez BT, Sandoval-García F, Corona-Meraz FI, et al. Osteopontin: A Bone-Derived Protein Involved in Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Immunopathology. *Biomolecules*. 2023;13(3):502. doi: 10.3390/biom13030502.
45. Singh A, Gill G, Kaur H, et al. Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. *Prog Orthod*. 2018;19(1):18. doi: 10.1186/s40510-018-0216-2.

Статья поступила 18.07.2024; одобрена после рецензирования 26.09.2024; принята к публикации 10.12.2024.

The article was submitted 18.07.2024; approved after reviewing 26.09.2024; accepted for publication 10.12.2024.

Информация об авторах:

Елена Игоревна Тимошук — кандидат технических наук, начальник управления конструкционных материалов, EITimoschuk@rosatom.ru, <https://orcid.org/0009-0003-4162-1196>;

Дарья Владимировна Пономарева — заместитель начальника управления — начальник отдела конструкционных графитов, DVPonomareva@rosatom.ru, <https://orcid.org/0009-0009-4886-1436>;

Артур Радикович Гареев — кандидат технических наук, заместитель директора по науке и инновациям, ARGareev@rosatom.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5934-8456>.

Information about the authors:

Elena I. Timoshchuk — PhD in Engineering, Head of Structural Materials Department, EITimoschuk@rosatom.ru, <https://orcid.org/0009-0003-4162-1196>;

Darya V. Ponomareva — Deputy Head of Department — Head of Structural Graphite Department, DVPonomareva@rosatom.ru, <https://orcid.org/0009-0009-4886-1436>;

Artur R. Gareev — PhD in Engineering, Deputy Director for Science and Innovation, ARGareev@rosatom.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5934-8456>.

Вклад авторов:

Тимошук Е.И. — концептуализация, исследование, написание — первоначальный вариант, написание — рецензирование и редактирование, контроль.

Пономарева Д.В. — исследование, написание — рецензирование и редактирование, визуализация.

Гареев А.Р. — написание, рецензирование и редактирование.