

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ МАТЕРИАЛОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ**

Е.А. Кувшинова^{1*}, Н.В. Петракова², Н.С. Сергеева¹, В.А. Кирсанова¹, И.К. Свиридова¹, А.Ю. Тетерина²,
В.С. Комлев², А.Д. Каприн¹

¹Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена – филиал «Национального медицинского исследовательского центра радиологии», 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., 3; *e-mail: beliy@mail.ru

²Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской Академии Наук
119334 г. Москва, Ленинский проспект, 49

В последнее время активно разрабатываются подходы к функционализации кальцийфосфатных (КФ) материалов лекарственными препаратами и биологически активными соединениями с целью использования их в качестве платформы для адресной доставки в зону костного дефекта. Однако существующие технологии характеризуются низкой эффективностью инкорпорации и неудовлетворительной скоростью высвобождения препаратов из материалов, не обеспечивающей постоянный и длительный терапевтический эффект в области дефекта. Целью данной работы стала разработка эффективного способа функционализации КФ материалов биологически активными соединениями и изучение динамики их высвобождения. В работе использовали гранулированные КФ материалы октакальциевый фосфат (ОКФ), β -трикальциевый фосфат (β -ТКФ) и β -ТКФ с дополнительным КФ слоем на поверхности (β -ТКФ_{мод.}), а в качестве модельного соединения - бычий сывороточный альбумин (BSA). Инкорпорацию BSA на поверхность керамики производили совместно с биомиметическим осаждением из различных КФ буферных растворов, содержащих инкорпорируемое соединение. Эффективность инкорпорации BSA оценивали, измеряя его концентрации в растворах до и после инкубации с материалами. Динамику выхода BSA из материалов исследовали в течение 6 суток. Поверхность и структуру КФ материалов исследовали с помощью комплекса методов: сканирующей электронной микроскопии, рентгенофазового анализа, ИК-Фурье спектрального анализа, низкотемпературной адсорбции азота. В работе показано, что удельная площадь поверхности ($S_{уд.}$) ОКФ составила 5.9 м²/г, β -ТКФ – 0.5 м²/г. Модификация поверхности β -ТКФ привела к увеличению $S_{уд.}$ в 1.6 раз и увеличению количества встроенного BSA на его поверхность в 3 раза. Совместная преципитация BSA и фосфатов кальция в процессе биомиметического осаждения была значительно эффективнее адсорбции BSA без использования КФ растворов. Исследование динамики высвобождения BSA из функционализированного ОКФ выявило, что в течение 6 суток наблюдения высвобождается 45% встроенного в материал белка. Таким образом, был разработан эффективный метод функционализации КФ материалов, основанный на инкорпорации биологически активных соединений совместно с биомиметическим осаждением из кальцийфосфатного раствора и обеспечивающий низкую скорость их высвобождения.

Ключевые слова: функционализация; биомиметическое осаждение; биологически активные соединения; октакальциевый фосфат; β -трикальциевый фосфат

DOI: 10.18097/BMCRM00096

ВВЕДЕНИЕ

При восстановлении дефектов костной ткани для активации процессов регенерации в остеопластической хирургии используется широкий круг материалов естественного и искусственного происхождения. Особую роль среди них играют кальцийфосфатные (КФ) материалы, которые обладают химическим составом, близким к составу минерального компонента нативной кости, что определяет их остеокондуктивные свойства. Кроме того, большинство из них биорезорбируемы и замещаются новообразованной костной тканью в течение постоперационной реабилитации. Однако использование этих материалов не предотвращает появление осложнений, связанных с недостаточной консолидацией имплантируемого материала с окружающими тканями и, в ряде случаев, с инфицированием костной раны. Кроме того, в онкологии после удаления злокачественных образований в костной ткани зачастую приходится прибегать к повторным операциям, связанным с продолженным

опухолевым процессом. Для устранения негативных последствий хирургического вмешательства используется системное введение лекарственных препаратов в высоких дозах (вследствие низкой биодоступности для них костной ткани), которое часто обладает токсичным действием и недостаточной эффективностью. Альтернативный способ – это использование имплантируемых материалов в качестве платформы для адресной доставки лекарственных препаратов непосредственно в область костного дефекта.

В последнее время активно разрабатываются подходы к функционализации КФ материалов лекарственными препаратами и биологически активными соединениями. Ведется поиск способов, позволяющих получить материал с заданными биоактивными свойствами и с контролируемой скоростью высвобождения депонируемого соединения [1–4]. Разрабатываемые подходы можно разделить на два основных направления. Первое – это внедрение препарата в состав материала в процессе его изготовления. Например, введение лекарственного соединения в раствор при синтезе



Таблица 1. Ионный состав использованных буферных растворов

Ионы	Концентрация, мМ				
	SCS	SBF ^{мод.} (2x Ca и P)	DPBS	2xSBF	TRIS
Na ⁺	136.8	142.0	152.99	284.0	-
K ⁺	3.71	5.0	4.2	10.0	-
Mg ²⁺	-	1.5	0.5	3.0	-
Ca ²⁺	3.1	5.0	0.9	5.0	-
Cl ⁻	144.5	147.8	139.6	295.6	-
HPO ₄ ²⁻	1.86	2.0	8.1	2.0	-
SO ₄ ²⁻	-	0.5	-	1.0	-
HCO ₃ ⁻	-	4.2	-	8.4	-
H ₂ PO ₄ ⁻	-	-	1.5	-	-
pH	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4

фосфатов кальция [5, 6], растворение лиофилизированного антибиотика при затворении КФ цементов [7, 8]. Второе – функционализация материала с помощью адсорбции препарата на его поверхности [9, 10] или ковалентного связывания лекарственного соединения с поверхностными структурами [11, 12]. Однако существующие технологии характеризуются низкой эффективностью инкорпорации и неудовлетворительной скоростью высвобождения препаратов из материалов, не обеспечивающей постоянный и длительный терапевтический эффект в области дефекта [13, 14].

Целью данной работы была разработка эффективного способа инкорпорации биологически активных соединений на поверхность КФ материалов. В качестве модельного соединения был выбран бычий сывороточный альбумин (BSA), который представляет собой глобулярный белок плазмы крови с молекулярной массой 69 кДа. В качестве платформы для функционализации были выбраны КФ материалы: октакальциевый фосфат (ОКФ) и β-трикальций фосфат (β-ТКФ). Известно, что ОКФ является возможным предшественником биологического апатита кости и обладает ярко выраженными osteoconductive свойствами [15, 16]; β-ТКФ – хорошо изученный, наиболее простой в получении и часто используемый в клинической практике биокерамический материал [17, 18].

С целью изучения влияния структуры поверхности β-ТКФ на процесс инкорпорации модельных соединений была произведена ее модификация. Для этого на поверхности β-ТКФ методом биомиметического осаждения был сформирован дополнительный слой фосфатов кальция [19]. Ранее было показано, что с помощью этого метода возможно сформировать на поверхности различных материалов (титановых, полимерных, керамических) КФ слой, что значительно изменяет архитектуру поверхности и усиливает их osteoconductive свойства [20-23].

Таким образом, задачей данного исследования стал подбор условий для успешной инкорпорации модельного соединения на поверхность КФ материалов, а также изучение динамики его высвобождения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы биоматериалы на основе ОКФ (Ca/P=1.33) и β-ТКФ (Ca/P=1.5) в виде пористых гранул размером 500–1000 мкм. В качестве исходного материала для получения гранул двух составов был использован порошок трикальцийфосфата гексагональной модификации (β-ТКФ) со средним размером частиц 0.2–0.5 мкм. Синтез β-ТКФ проводили классическим методом осаждения из водных растворов нитрата кальция (Ca(NO₃)₂), гидрофосфата аммония ((NH₄)₂HPO₄) и водного 25%-ного раствора аммония (NH₄OH) при pH=7.0–7.3 [24, 25]. Из полученного порошка готовили суспензию на основе водного раствора полиакриламида концентрацией 1 г/мл с соотношением порошок:раствор=1:1. Формование керамики проводили суспензионным методом реплики полимерной высокопористой ячеистой губки необходимой архитектуры (полиуретан (ПУ), плотность 19 кг/м³); заготовки сушили и обжигали при температуре 1200°C – для получения фазы β-ТКФ, при 1350°C – для α-ТКФ [26]. Полученную после обжига керамику дробили и отсеивали по фракциям. Для получения фазы ОКФ производили двухэтапную химическую обработку α-ТКФ путем выдерживания гранул в буферных растворах для трансформации в промежуточную фазу дикальцийфосфата дигидрата (ДКФД), и затем окончательно в фазу ОКФ, согласно [27]. В результате химических реакций формируется ОКФ, при этом размер и основная структура полученных керамических гранул подобны исходным.

В качестве модельного соединения использовали BSA («РАА», Австрия).

Поверхность КФ материалов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, Tescan Vega II SBU, «Tescan», Чехия) совместно со спектральным анализом (ЭДА, INCA Energy, «Oxford Instruments», Великобритания). Фазовый состав материалов изучали путем рентгенофазового анализа (РФА, Rigaku, «Shimadzu», Япония), наличие функциональных групп в структуре – с помощью ИК-Фурье спектрального анализа (ИК, Avatar-330, Thermo Nicolet, «Thermo Fisher Scientific», США) методом

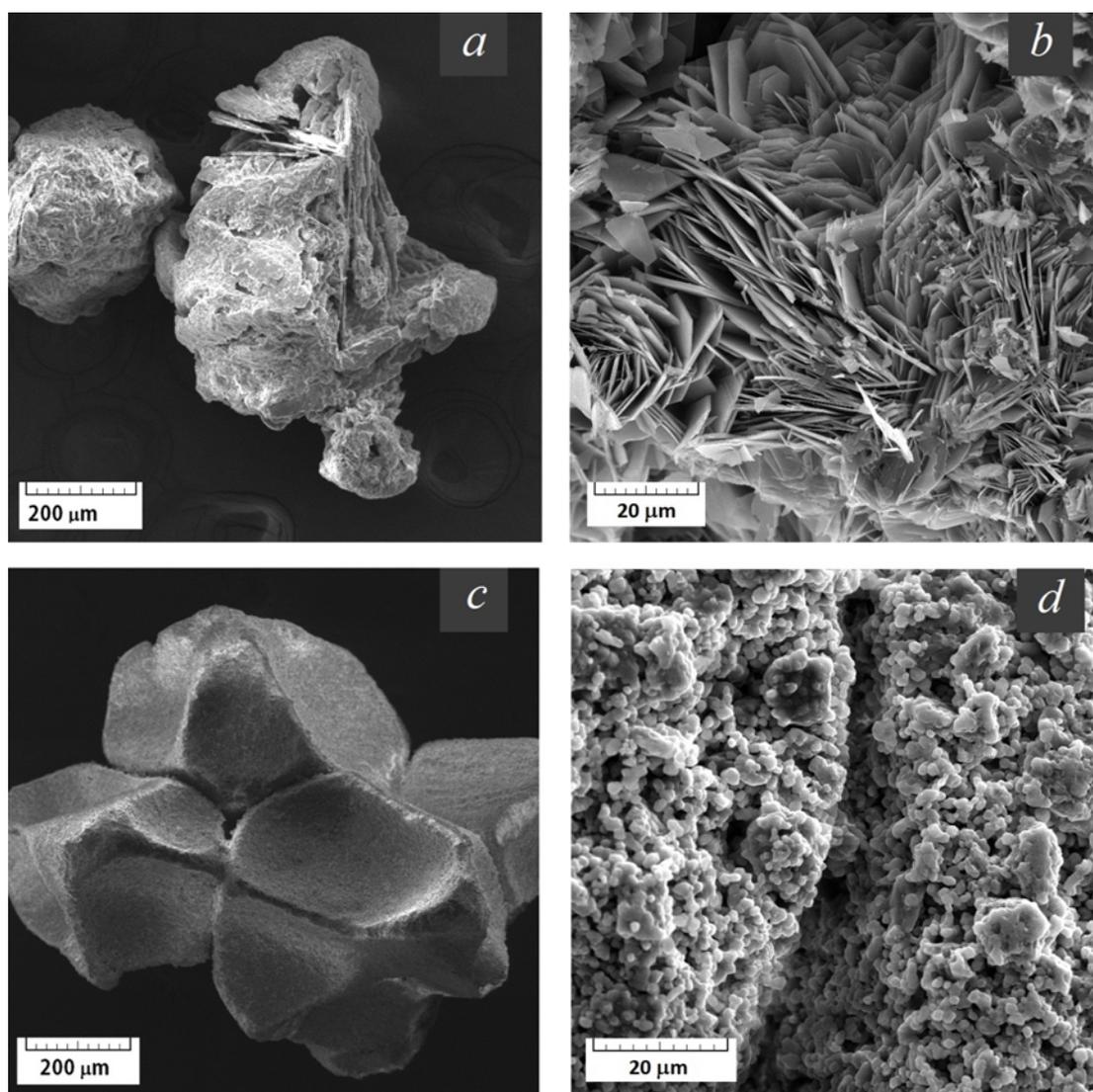


Рисунок 1. Микрофотографии экспериментальных материалов: a, b – ОКФ, (a – x200, b – x2000), c, d – β-ТКФ (c – x200, d – x2500).

прессования таблеток точно взвешенной навески пробы с КВг. Площадь удельной поверхности ($S_{уд.}$) гранул измеряли методом низкотемпературной адсорбции азота Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ, TriStar 3000, «Micromeritics Instrument Corporation», США).

Для гранул β-ТКФ производили модификацию поверхности, используя метод биомиметического осаждения фосфатов кальция из двукратно концентрированного раствора, моделирующего внутреннюю среду организма (2xSBF, табл. 1) [19]. Для этого 50.1 ± 0.03 мг материала помещали в 1.0 мл 2xSBF и инкубировали в течение 24 ч при 37°C и постоянном перемешивании. Взвешивание производили на аналитических весах Mettler AT200 ($d=0.1$ мг) («Mettler Toledo», Швейцария).

Полученный материал обозначили как β-ТКФ_{мод.} Таким образом, инкорпорацию модельных соединений осуществляли для 3-х видов биокерамики: ОКФ, β-ТКФ и β-ТКФ_{мод.}

Инкорпорацию BSA на поверхность керамики производили путем выдерживания материала в различных буферных растворах: Дюльбекко модифицированном фосфатно-солевом буфере (DPBS), в перенасыщенном КФ растворе (SCS), в модифицированном растворе SBF (SBF_{мод.})

и буфере на основе трис-(гидроксиметил)аминометана (TRIS) (табл. 1), содержащих инкорпорируемое соединение. Исходная концентрация BSA в инкорпорационных растворах составляла 3.0 мг/мл и 6.0 мг/мл. Гранулированный материал (50.3 ± 0.08 мг) помещали в пластиковые пробирки с инкорпорационными растворами (объем 1.0 мл) и инкубировали при 37°C и постоянном перемешивании в течение 48 ч.

Эффективность инкорпорации BSA оценивали с использованием BCA Protein Assay Kit («ThermoFisher Scientific») путем измерения концентрации белка в инкорпорационных растворах до и после инкубации с материалами. Спектрофотометрические измерения осуществляли на спектрофотометре Multiscan FC («ThermoFisher Scientific»).

Динамику выхода BSA из материалов исследовали в течение 6 суток. Для этого функционализированный материал помещали в пробирки с 1.0 мл DPBS, в заданные сроки полностью отбирали весь буферный раствор для оценки содержания в нем белка, после чего заливали материал таким же объемом свежего раствора. Выход альбумина оценивали в сроки 1, 3 и 6 суток.

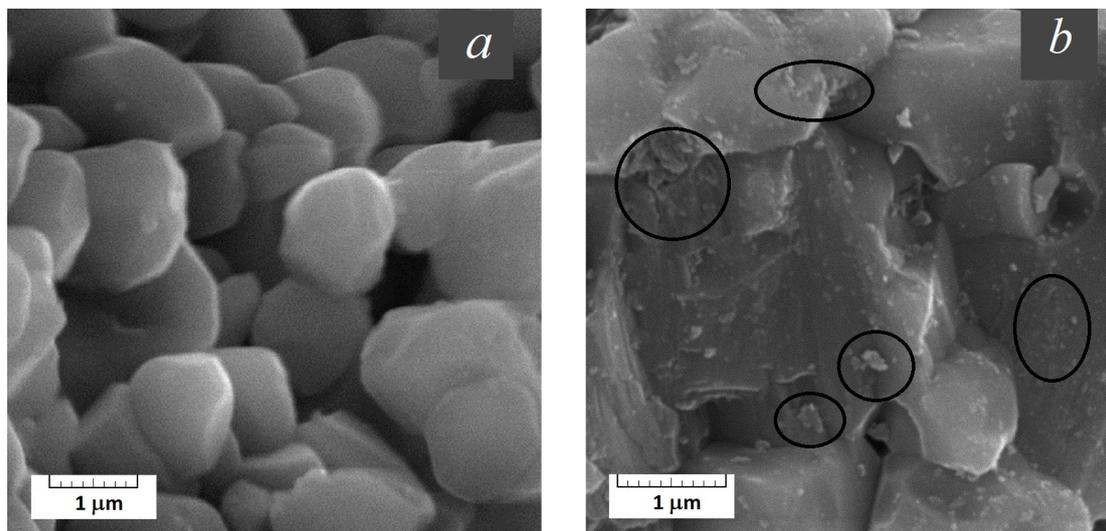


Рисунок 2. Микрофотографии поверхности керамики β -ТКФ: (а) – исходных гранул (x32000), (б) – гранул, выдержанных в растворе 2xSBF в течение 24 ч (x40000).

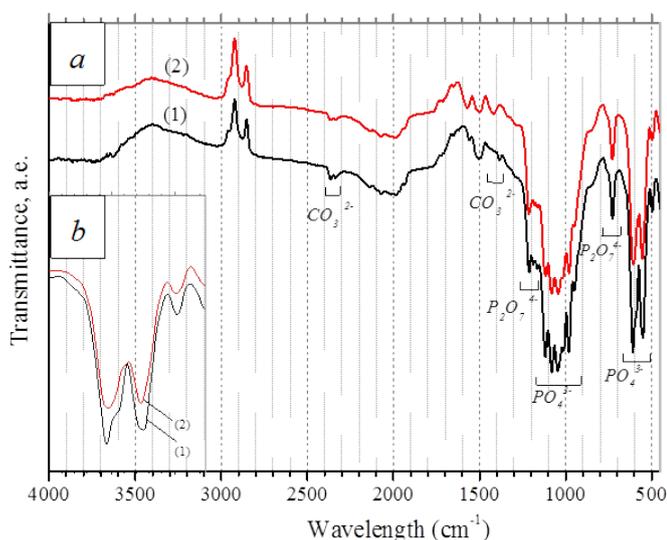


Рисунок 3. ИК-спектры исходных гранул β -ТКФ (1) и выдержанных в модельном растворе 2xSBF в течение 24 ч (2), (а) – общий вид спектров, (б) – детализация фосфатных пиков в интервале 550–600 cm^{-1} .

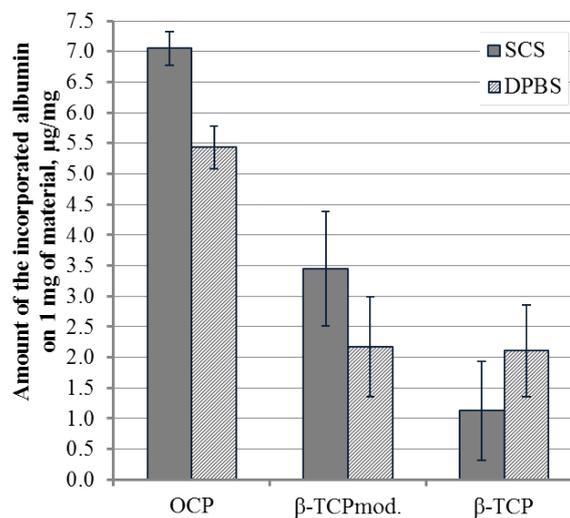


Рисунок 4. Сравнение эффективности инкорпорации BSA на поверхность ОКФ, β -ТКФ_{мод.} и β -ТКФ с концентрацией белка в растворах SCS и DPBS 3.0 мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика биокерамических материалов

Гранулы ОКФ и β -ТКФ, использованные в работе, имели неправильную форму, размер от 500 мкм до 1000 мкм и пористость порядка 40–60 % (рис. 1). Поверхность гранул ОКФ была сложена крупными кристаллами пластинчатой формы, образующими скопления в виде «цветков» (рис. 1 а,б). Форма пластин приближалась к гексагональной с длиной диагонали до 20 мкм и поперечным сечением 100–200 нм. Керамические гранулы на основе β -ТКФ были представлены округлыми по форме и однородными по размеру кристаллами, величиной 1–2 мкм. Кристаллы формировали сетку с порами разных размеров: крупными протяженными порами порядка – 150–250 мкм в поперечном сечении, средними – 10–20 мкм, и мелкими межкристаллическими – до 0.1–0.5 мкм (рис. 1 с,д). $S_{уд}$ исследуемых материалов составляла 5.9 $\text{m}^2/\text{г}$ для ОКФ и 0.5 $\text{m}^2/\text{г}$ для β -ТКФ.

На рисунке 2 представлены микрофотографии поверхности исходных гранул β -ТКФ и β -ТКФ_{мод.} В результате модифицирования на поверхности кристаллов наблюдалось неравномерное покрытие новообразованным слоем материала в виде рыхлых аморфных частиц размером 50–100 нм (некоторые такие области выделены для примера на рис. 2 б).

На ИК-спектрах исходного β -ТКФ и β -ТКФ_{мод.} присутствовали наборы полос поглощения, характерные для β -ТКФ (рис. 3 а). Однако у β -ТКФ_{мод.} наблюдалось уменьшение интенсивности линий групп $(\text{PO}_4)^{3-}$, что продемонстрировано на рис. 3 б. При наложении спектров в интервале волновых чисел 550–600 cm^{-1} ; также снижалась полуширина пиков. Это свидетельствует о снижении общего содержания основной фазы ТКФ [28], вероятно, вследствие осаждения аморфного фосфата кальция (АФК) из солевого раствора на поверхность гранул. $S_{уд}$ β -ТКФ_{мод.} составила 0.8 $\text{m}^2/\text{г}$.

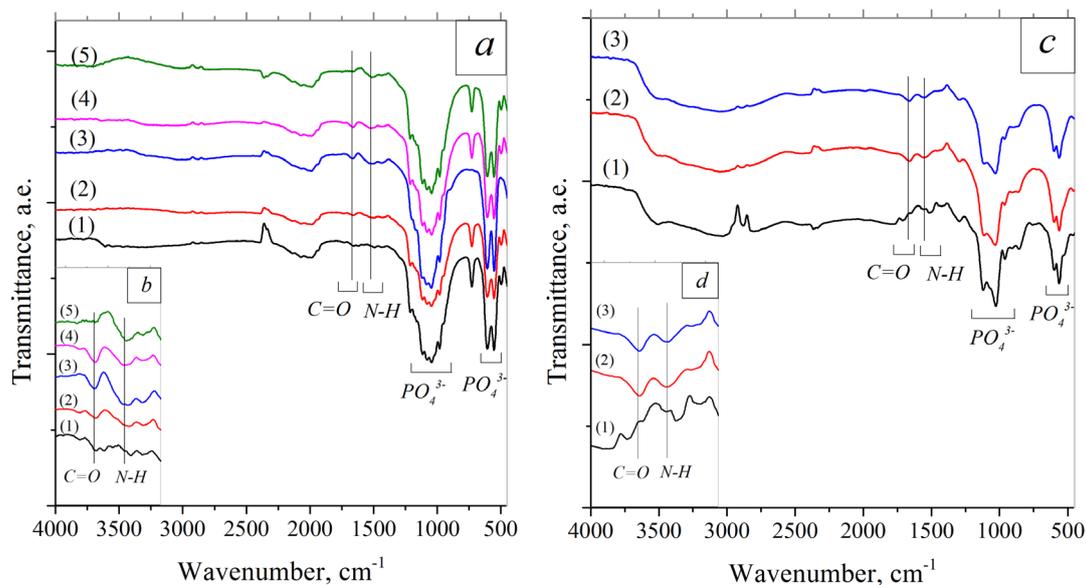


Рисунок 5. ИК-спектры материалов до и после функционализации BSA в различных растворах: (a) - β -ТКФ, 1- β -ТКФ исходный, 2 - β -ТКФ в SCS, 3 - β -ТКФ_{мод.} в SCS, 4 - β -ТКФ в DPBS, 5 - β -ТКФ_{мод.} в DPBS; (c) - ОКФ, 1- ОКФ исходный, 2 - ОКФ в SCS, 3 - ОКФ в DPBS, (b) и (d) - детализация пиков в интервале 1350-1850 см⁻¹.

Инкорпорация BSA на поверхность биокерамики

Исследование инкорпорации BSA на поверхность 3-х видов материалов (ОКФ, β -ТКФ и β -ТКФ_{мод.}) в растворах SCS и DPBS выявило различия в их адсорбционной способности. Наибольшее количество BSA встроилось на поверхность ОКФ (7.05 мкг/мг - в растворе SCS, 5.4 мкг/мг - в растворе DPBS), меньше - на поверхность β -ТКФ_{мод.} (3.5 мкг/мг - в растворе SCS, 2.2 мкг/мг - в растворе DPBS) и наименьшее - на β -ТКФ (1.1 мкг/мг - в растворе SCS, 2.1 мкг/мг - в растворе DPBS) (рис. 4).

Эти данные были подтверждены ИК-исследованиями (рис. 5). Так, на спектрах всех исследуемых образцов после инкорпорации BSA присутствовали полосы поглощения при 1660 см⁻¹ и 1540 см⁻¹, соответствующие валентным колебаниям C=O и N-H в пептидной связи, что отражало наличие BSA на поверхности материалов [29, 30]. Однако незначительные различия в интенсивностях указанных полос не позволяли оценить по ИК-спектрам количество встроеного в материалы альбумина.

В целом, несмотря на увеличение удельной поверхности β -ТКФ, наиболее результативной оказалась инкорпорация BSA на поверхность ОКФ с использованием раствора SCS. Поэтому в дальнейших экспериментах по функционализации использовали только ОКФ.

Далее мы исследовали зависимость эффективности инкорпорации BSA на поверхность ОКФ от его концентрации в исходных растворах. При исходной концентрации BSA, составляющей 3.0 мг/мл в растворах SBF_{мод.} и DPBS, на поверхность ОКФ адсорбировалось приблизительно равное количество альбумина (11.9 ± 0.97 мкг и 10.2 ± 1.03 мкг на 1 мг материала соответственно). Увеличение концентрации BSA до 6.0 мг/мл в исходных растворах привело к возрастанию количества инкорпорированного белка менее чем вдвое: при использовании SBF_{мод.} - на 69.7%, DPBS - на 57.4% (рис. 6). Таким образом, использование концентрации BSA 3.0-6.0 мг/мл в исходных растворах не привело к насыщению

поверхности ОКФ. Кроме того, в данных условиях SBF_{мод.} в качестве исходного раствора имел некоторое преимущество в сравнении с DPBS.

Представленные выше данные свидетельствуют о влиянии состава буферного раствора на процесс инкорпорации BSA. Для определения роли отдельных ионов в процессе инкорпорации белковых молекул была выполнена серия экспериментов по функционализации ОКФ с использованием буферных растворов разного состава. Были выбраны буферные системы с различным содержанием ионов кальция, фосфора и других ионов, ранее использовавшихся в работах по функционализации: SCS [31, 32], модифицированный SBF [33] и DPBS [34]. Для сравнения был взят TRIS-буфер, не содержащий неорганических солей (табл. 1). В соответствии с полученными данными по результативности инкорпорации BSA на поверхности ОКФ, эти растворы можно расположить в следующий ряд: SCS > SBF_{мод.} > DPBS = TRIS (рис. 7).

На последнем этапе исследования была изучена динамика высвобождения BSA из ОКФ, функционализированного с помощью растворов SCS и DPBS. Показано, что в течение первых суток с поверхности ОКФ высвободилось 32.4% и 40.7% BSA (при использовании SCS и DPBS соответственно), за последующие 5 суток дополнительно вышло 12.7% и 13.0% BSA (для SCS и DPBS соответственно). В целом, в обоих случаях за 6 суток наблюдения высвободилось около половины встроеного альбумина (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты исследования функционализации керамических биоматериалов путем инкорпорации на их поверхность модельного соединения BSA.

Для функционализации было выбрано два остеопластических материала - ОКФ и β -ТКФ, различающихся

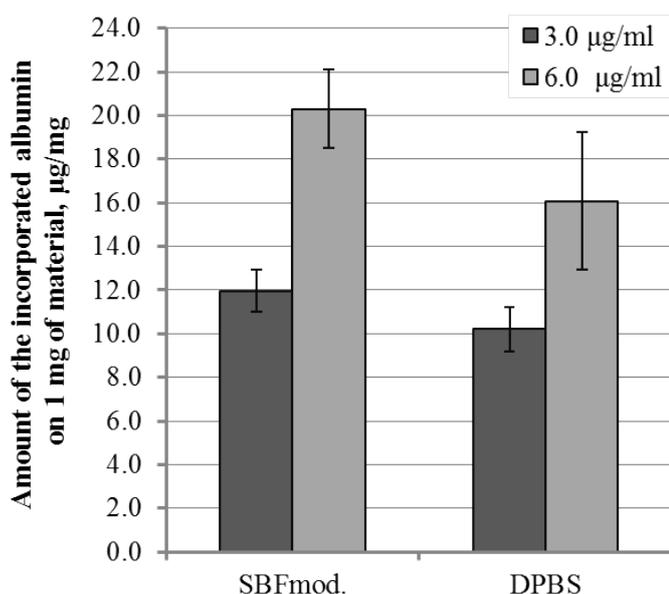


Рисунок 6. Сравнение эффективности инкорпорации BSA на поверхность ОКФ в растворах с его исходной концентрацией 3.0 и 6.0 мг/мл.

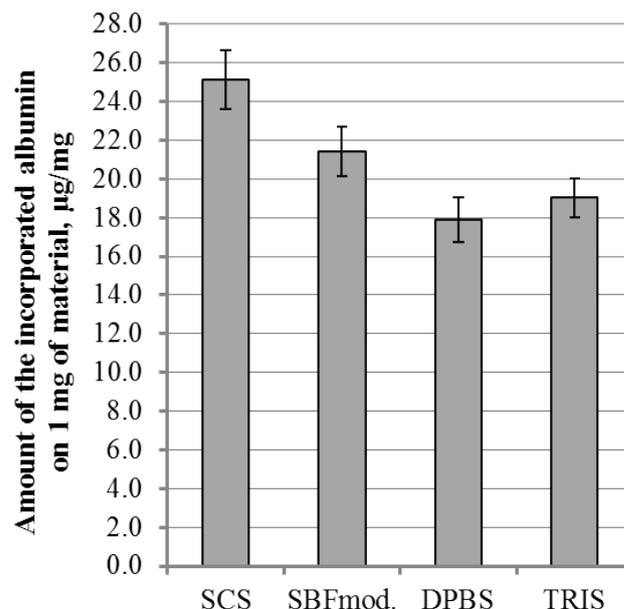


Рисунок 7. Сравнение эффективности инкорпорации BSA на поверхность ОКФ в различных инкорпорационных растворах, исходная концентрация BSA 6.0 мг/мл.

Таблица.2. Сравнение количества встроенного и вышедшего (за 6 суток) BSA из 1 мг ОКФ.

Инкорпорационный раствор	Количество встроенного BSA, мкг/мг	Количество вышедшего BSA, мкг/мг			Доля вышедшего за 6 сут. BSA от количества встроенного, %
		за 1 сут.	за 3 сут.	за 6 сут.	
SCS	7.1 ± 0.28	2.3 ± 0.16	2.7 ± 0.09	3.2 ± 0.14	45.1
DPBS	5.4 ± 0.35	2.2 ± 0.14	2.3 ± 0.0	2.9 ± 0.02	53.7

фазовым составом и микроструктурой. Показано, что поверхность материала ОКФ существенно более развита, чем поверхность β -ТКФ, а именно, $S_{уд}$ ОКФ почти в 12 раз больше $S_{уд}$ β -ТКФ. Биомиметическое осаждение КФ слоя на поверхность β -ТКФ привело к увеличению $S_{уд}$ в 1.6 раз. Результаты физико-химических исследований свидетельствуют о формировании слоя АФК в процессе модификации. Слабая выраженность этого слоя, вероятно, связана с тем, что в процессе биомиметического осаждения одновременно происходит как растворение поверхности β -ТКФ, так и осаждение фосфатов кальция из раствора на границе раздела фаз. При этом скорость гетерогенного зародышеобразования на поверхности минеральной фазы зависит от многих факторов, в том числе, от состояния поверхности, концентрации и других параметров солевого раствора [35, 36]. Образовавшийся АФК является одной из стадий кристаллизации гидроксиапатита (ГА), которая происходит через образование ОКФ и нестехиометрического ГА [37]. Таким образом, при увеличении концентрации солевого раствора, а также времени выдержки материала в растворе можно добиться формирования ОКФ и ГА на его поверхности.

Исследование эффективности инкорпорации BSA на поверхность ОКФ, β -ТКФ и β -ТКФ_{мод.} в растворе SCS показало, что модификация поверхности материала увеличивает количество встроенного на нее белка в 3 раза, тогда как $S_{уд}$ возрастает только в 1.6 раза. Учитывая

тот факт, что раствор SCS является пересыщенным КФ раствором, а инкорпорация альбумина в этом растворе происходила совместно с биомиметическим осаждением, мы предположили, что решающую роль в этом процессе сыграли новообразованные в процессе модификации фосфаты кальция. При этом увеличение эффективности инкорпорации происходило не столько за счет увеличения площади поверхности материала, сколько за счет образования дополнительных центров кристаллизации для последующего КФ слоя и совместной копреципитации молекул BSA из раствора SCS. Действительно, согласно литературным данным, структура осажденной фазы является не упорядоченной [38]. Поэтому новообразованный КФ слой обладает множеством неоднородностей и дефектов поверхности, которые можно рассматривать как скопление активных центров для взаимодействия с растворенными ионами и молекулами, содержащими заряженные группы (в том числе белковыми).

Результаты сравнительного исследования эффективности инкорпорации BSA в различных буферных растворах (табл. 1) подтвердили это предположение. Было показано, что в растворах с увеличенным содержанием кальция (SCS и SBF_{мод.}) встроилось достоверно большее количество альбумина, чем в растворе с его минимальным содержанием (DPBS) и в растворе, не содержащем этот ион (TRIS) (табл. 3). В то же время SBF_{мод.} содержащий максимальное количество кальция, находился на втором месте по

Таблица 3. Характеристика использованных инкорпорационных растворов: SCS, SBF_{мод.}, DPBS, TRIS.

Концентрация ионов	Растворы			
	SCS	SBF _{мод.}	DPBS	TRIS
[Ca ²⁺], мМ	3.71	5.0	0.9	-
[PO ₄], мМ	1.86	2.0	9.6	-
[Mg ²⁺], мМ	-	1.5	0.5	-
[HCO ₃ ⁻], мМ	-	4.2	-	-
Количество встроенного BSA, мкг/мг	25.12 ± 1.52	21.41 ± 1.3	17.88 ± 1.15	19.02 ± 0.99

эффективности инкорпорации. Мы объясняем это наличием в растворе ионов Mg²⁺ и HCO₃⁻, которые, как показал F. Vegge с соавторами [39, 40], являются ингибиторами кристаллизации, и отрицательно влияют на формирование КФ фазы в процессе биомиметического осаждения. Напротив, увеличение содержания фосфат-ионов в инкорпорационном растворе снижает эффективность инкорпорации BSA на поверхность ОКФ (табл. 3). Вероятно, это связано с конкуренцией между этими ионами и активными группами белковой молекулы за взаимодействие с ионами кальция на поверхности материала [5]. Таким образом, совместная преципитация BSA и фосфатов кальция на поверхность ОКФ в процессе биомиметического осаждения оказалась эффективнее его адсорбции без использования концентрированных солевых растворов. Причем наилучший результат получен при инкорпорации в растворе SCS, обладающем оптимальным соотношением содержащихся в нем ионов кальция и фосфат-ионов и отсутствием ингибирующих кристаллизацию агентов.

В целом, была продемонстрирована принципиальная возможность функционализации поверхности керамических материалов белковыми соединениями (на модели BSA) путем их инкорпорации в процессе биомиметического осаждения в новообразованный КФ слой. Инкорпорационная способность ОКФ оказалась значительно выше способности β-ТКФ и β-ТКФ_{мод.}. Поэтому использование ОКФ для адресной доставки лекарственных соединений в зону костного дефекта представляется наиболее перспективным. Низкая скорость высвобождения инкорпорированного BSA обосновывает дальнейшее использование разработанного метода для создания функционализированных материалов с длительным терапевтическим воздействием.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-11052

ЛИТЕРАТУРА

1. Bigi, A., Boanini, E. (2017) Functionalized biomimetic calcium phosphates for bone tissue repair. *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*, **15**(4), 313-325. DOI: 10.5301/jabfm.5000367

2. Esposti, L.D., Carella, F., Adamiano, A., Tampieri, A., Iafisco, M. (2018) Calcium phosphate-based nanosystems for advanced targeted nanomedicine. *Journal Drug Development and Industrial Pharmacy*, **44**(8), 1223-1238. DOI: 10.1080/03639045.2018.1451879

3. Parent, M., Baradari, H., Champion, E., Damia, C., Viana-Trecant, M. (2017) Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review. *Journal of Controlled Release*, **28**(252), 1-17. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.02.012

4. Bose, S., Tarafder, S. (2012) Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. *Acta Biomaterialia*, **8**, 1401-1421. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.11.017

5. Bigi, A., Boanini, E. (2018) Calcium phosphates as delivery systems for bisphosphonates. *Journal of Functional Biomaterials*, **9**(1), 6. DOI: 10.3390/jfb9010006

6. Li, W.M., Su, C.W., Chen, S.Y. (2014) In situ DOX-calcium phosphate mineralized Q1 CPT-amphiphilic gelatin nanoparticle for intracellular controlled sequential release of multiple drugs. *Acta Biomaterialia*, **15**, 191-199. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.12.013

7. Chena, G., Liuc, B., Liua, H., Zhanga, H., Yanga, K., Wang, Q., Ding, J., Chang, F. (2018) Calcium phosphate cement loaded with 10% vancomycin delivering highly and late local antibiotic concentration in vitro. *Orthopaedics and traumatology: Surgery and research*, **104**, 1271-1275. DOI: 10.1016/j.otsr.2018.07.007

8. Uchida, K., Sugo, K., Nakajima, T., Nakawaki, M., Takano, S., Nagura, N., Takaso, M., Urabe, K. (2018) In Vivo release of vancomycin from calcium phosphate cement. *BioMed Research International*, 4560647. DOI: 10.1155/2018/4560647

9. Peter, B., Pioletti, D.P., Lairb, S., Bujoli, B., Pilet, P., Janvier, P., Guicheux, J., Zambelli, P.-Y., Bouler, J.-M., Gauthier, O. (2005) Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone*, **36**, 52-60. DOI: 10.1016/j.bone.2004.10.004

10. Barroug, A., Kuhn, L.T., Gerstenfeld, L.C., Glimcher, M.J. (2004). Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles: in vitro controlled adsorption and release. *Journal of Orthopaedic Research*, **22**, 703-708. DOI: 10.1016/j.orthres.2003.10.016

11. Poli, E., Magnaudeix, A., Damia, C., Lalloué, F., Chaleix, V., Champion, E., Sol, V. (2019) Advanced protocol to functionalize CaP bioceramic surface with peptide sequences and effect on murine pre-osteoblast cells proliferation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **29**, 1069-1073. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.03.002

12. Borcard, F., Staedler, D., Comas, H., Juillerat, F.K., Sturzenegger, P.N., Heuberger, R., Gonzenbach, U.T., Juillerat-Jeanneret, L., Gerber-Lemaire, S. (2012) Chemical functionalization of bioceramics to enhance endothelial cells adhesion for tissue engineering. *Journal of Medicinal Chemistry*, **27**, 55(18):7988-97. DOI: 10.1021/jm301092r

13. Dolci, L.S., Panzavolta, S., Torricelli, P., Albertini, B., Sicuro, L., Fini, M., Bigi, A., Passerini, N. (2019) Modulation of Alendronate release from a calcium phosphate bone cement: An in vitro osteoblast-osteoclast co-culture study. *International Journal of Pharmaceutics*, **554**, 245-255. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.11.023

14. Stigter, M., Bezemera, J., Groot, K., Layrolle, P. (2004) Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. *Journal of Controlled Release*, **99**, 127-137. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.06.011

15. Gurin, A.N., Komlev, V.S., Fadeeva, I.V., Barinov, S.M. (2010) Octacalcium phosphate - precursor of biomineralization, novel bone scaffold. *Stomatologiya*, **4**, 65-72.

16. Komlev, V.S., Barinov, S.M., Bozo, I.I., Deev, R.V., Eremin, I.I., Fedotov, A.Y., Gurin, A.N., Khromova, N.V., Kopnin, P.B., Kuvshinova, E.A., Mamonov, V.E., Rybko, V.A., Sergeeva, N.S., Teterina, A.Y., Zorin, V.L. (2014) Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behavior. *ACS Applied Materials and Interfaces*, **6**, 16610-16620. DOI: 10.1021/am502583p

17. Dorozhkin, S.V. (2013) Calcium orthophosphate-based bioceramics. *Materials*, **6** (9), 3840-3942. DOI: 10.3390/ma6093840

18. Navarro, M., Michiardi, A., Castano, O., Pianell, J.A. (2008) Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface*, **5**, 1137-1158. DOI: 10.1098/rsif.2008.0151

19. Lin, X., Groot, K., Wang, D., Hu, D., Wismeijer, D., Liu, Y. (2015) A review paper on biomimetic calcium phosphate coatings. *The Open Biomedical Engineering Journal*, **9**, 56-64. DOI: 10.2174/1874120701509010056

20. Su, Y., Luo, C., Zhang, Z., Hermawan, H., Zhu, D., Huang, J., Liang, Y., Li, G., Ren, L. (2018) Bioinspired surface functionalization of metallic biomaterials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **77**, 90-105. DOI: 10.1016/j.jmbm.2017.08.035

21. Lee, J.Y., Choi, B., Wu, B., Lee, M. (2013) Customized biomimetic scaffolds created by indirect three-dimensional printing for tissue engineering. *Biofabrication*, **5**, 045003. DOI: 10.1088/1758-5082/5/4/045003

22. Habibovic, P., Van Der Valk, C.M., Van Blitterswijk, C.A., De Groot, K. (2004) Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *Journal of materials science: materials in medicine*, **15**, 373-380.
23. Shin, K., Aciri, T., Geary, S., Salem, A.K. (2017) Biomimetic mineralization of biomaterials using simulated body fluids for bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue engineering*, **23**(19-20), 1169-1180. DOI: 10.1089/ten.tea.2016.0556
24. Mirhadi, B., Mehdikhani, B., Askari, N. (2011) Synthesis of nano-sized β -tricalcium phosphate via wet precipitation. *Processing and Application of Ceramics*, **5**(4), 193-198. DOI:10.2298/PAC1104193M
25. Fadeeva, I.V., Gafurov, M.R., Filippov, Ya.Yu., Davydova, G.A., Savintseva, I.V., Fomin, A.S., Petrakova, N.V., Antonova, O.S., Ahmetov, L.I., Gabbasov, B.F., Izotov, V.V., Orlinsky, S.B., Barinov, S.M. (2016) Copper-substituted tricalcium phosphates. *Doklady Chemistry*, **471**(2), 384-387. DOI:10.7868/S0869565216360123
26. Fadeeva, I.V., Fomin, A.S., Barinov, S.M., Petrakova, N.V. (2016) Rus Patent 2578435. A61L27/02, A61L27/10, A61F2/28. The method of obtaining porous ceramics from calcium phosphates for the treatment of bone defects № 2015112518A.
27. Komlev, V.S., Fedotov, A.Y. (2016) Rus Patent 2596504. A61L27/12, A61K6/00, A61F2/28, C35/447. The method of obtaining ceramics composed on octacalcium phosphate. № 2015122276.
28. Termine, J.D., Posner, A.S. (1966) Infra-red determination of the percentage of crystallinity in apatitic calcium phosphates. *Nature*, **211**, 6268.
29. Tarasovich, B.N. (2012) IR spectra of the main classes of organic compounds. Reference materials. Lomonosov Moscow State University.
30. Yu X., Qu, H., Knecht, D., Wei, M. (2009). Incorporation of bovine serum albumin into biomimetic coatings on titanium with high loading efficacy and its release behavior. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **20** (1), 287-294. DOI:10.1007/s10856-008-3571-6.
31. Liu, Y., Hunziker, E.B., Layrolle, P., Bruijn, J.D., De Groot, K. (2004) Bone morphogenetic protein 2 incorporated into biomimetic coatings retains its biological activity. *Tissue engineering*, **10**(1-2), 101-108.
32. Liu, Y., De Groot, K., Hunziker, E.B. (2005) BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone*, **36**, 745 – 757.
33. Yu, X., Qu, H., Knecht, D.A., Wei, M. (2009) Incorporation of bovine serum albumin into biomimetic coatings on titanium with high loading efficacy and its release behavior. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **20**, 287-294. DOI:10.1007/s10856-008-3571-6
34. Forsgren, J., Brohede, U., Stromme, M., Engqvist, H.K. (2011) Co-loading of bisphosphonates and antibiotics to a biomimetic hydroxyapatite coating. *Biotechnology Letters*, **33**, 1265-1268. DOI:10.1007/s10529-011-0542-7
35. Eliaz, N., Metoki, N. (2017). Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. *Materials*, **10**(4), 334. DOI:10.3390/ma10040334
36. Ducheyne, P., Qiu, Q. (1999) The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, **20**, 2287-2303.
37. Veresov, A.G., Putlyayev, V.I., Tretyakov, Y.D. (2004). Chemistry of inorganic biomaterials based on calcium phosphate. *Russian Chemical Journal*, **XLVIII**(4), 52-64.
38. Vasserman, I.M. (1980) Chemical precipitation from solutions. L.: Chemistry.
39. Barrere, F., Blitterswijk, C.A., De Groot, K., Layrolle, P. (2002) Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBF_5 solution: influence of magnesium. *Biomaterials*, **23**, 2211-2220.
40. Barrere, F., Blitterswijk, C.A., De Groot, K., Layrolle, P. (2002) Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF_5 solution. *Biomaterials*, **23**, 1921-1930.

Поступила: 10.04.2019

После доработки: 17.07.2019

Принята к публикации: 22.08.2019

THE FUNCTIONALIZATION OF CALCIUM PHOSPHATE MATERIALS OF PROTEIN-BASED BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES

E.A. Kuvshinova^{1*}, *N.V. Petrakova*², *N.S. Sergeeva*¹, *V.A. Kirsanova*¹, *I.K. Sviridova*¹, *A.Y. Teterina*², *V.S. Komlev*², *A.D. Kaprin*¹

¹Herzen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Centre, 3 the 2-nd Botkinskiy proezd, Moscow, 125284 Russia; *e-mail: beliy@mail.ru

²Baikov Institute of Metallurgy and Material Science, Russian Academy of Science 49 Leninskiy prospect 49, Moscow, 119334 Russia

Recent approaches to the calcium phosphate (CaP) materials functionalization with drugs and biomolecules have been actively developed for bone defect reconstruction. However, the current techniques are low efficient in context of drug incorporation and non-controlled release from the materials. Eventually, continuous therapeutic effect in bone defect area couldn't be achieved. The aim of this work was to develop an effective method for biologically active molecules incorporation onto the surface of CaP materials, and to study the dynamics of its release. Octacalcium phosphate (OCP), β -tricalcium phosphate (β -TCP) and β -tricalcium phosphate with biomimetic calcium phosphate layer (β -TCP_{mod}) were used as ceramic bioactive carriers. Bovine serum albumin (BSA) was used as a model compounds. BSA incorporation on the ceramics surface was performed by biomimetic co-precipitation from several buffer solutions containing the incorporated compound. The efficiency of biomolecules incorporation was evaluated by measuring BSA concentrations in solutions before and after materials incubation. The release of the incorporated molecules from the materials was investigated for 6 days. The structure and composition of the obtained materials were studied by application of XRD, FTIR, SEM, BET methods. It was shown that the OCP specific surface (surface area, (SBET)) was almost in 12 times higher than SBET of β -TCP. By using biomimetic approach the increase of β -TCP surface area in 1.6 times was achieved; this enhanced protein incorporation more than 3 times. The BSA biomimetic co-precipitation together with CaP on the OCP surface proved to be more effective than its adsorption from salt free solutions. The study of BSA release revealed that only 45% of loaded albumin released during 6 days of observation. Therefore, the effective method of CaP functionalization was developed. Based on biomolecules incorporation by biomimetic co-precipitation from CaP solutions, it provided a low rate of its release.

Key words: oximes; absorbtion spectra; protolytic dissociation; ionization constants; temperature effect

FUNDING: The reported study was funded by RFBR within to the research project № 18-29-11052.

Received: 10.04.2019, revised: 17.07.2019, accepted: 22.08.2019