

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 616.11:[543:004.352]:547.422.001.73
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-2-173-185>

Поступило в редакцию 15.11.2019
Received 15.11.2019

**А. А. Гайдаш¹, В. К. Крутько¹, член-корреспондент А. И. Кулак¹, О. Н. Мусская¹,
К. В. Скродкая², Н. Л. Будейко¹**

¹*Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Минск, Республика Беларусь*

²*Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного
университета, Минск, Республика Беларусь*

СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИБРИЛЛЯРНЫХ КОЛЛАГЕНОВЫХ ТКАНЕЙ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДИОКСИДОМ КРЕМНИЯ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Аннотация. Изучены соединительнотканые оболочки паравертебральных сухожилий (перитеноны) белых лабораторных крыс, обработанные диоксидом кремния и гиалуроновой кислотой. Установлено, что перитеноны представляют собой каркасные с ортогональной анизотропией природные композиты с развитой системой интерстициальных пористых мембран, которые регулируют тканевые гидродинамические потоки. Во внеклеточном матриксе перитенонов присутствуют карбонат-гидроксиапатит и гидроксид кальция в аморфизированном состоянии. Диоксид кремния и гиалуронат формируют гидрофобные силикатные и гиалуронатные покрытия коллагеновых фибрилл (инкапсуляция), укрепляют связи в Амидах I, II, III, снижают интенсивность полос связанных гидроксильных и плоскостных колебаний фосфатных групп, что свидетельствует о замещении карбонат-ионами ОН-групп и подавлении синтеза гидроксиапатита. Ключевым механизмом снижения интенсивности апатитогенеза является инкапсуляция коллагеновых фибрилл, сопровождающаяся экранированием центров эпитаксиальных взаимодействий, структурирующихся в ходе гетерогенной нуклеации кальцийфосфатов. В биомиметической жидкости SBF деформирующее действие модифицирующих агентов нивелируется, но усиливается гидратированность и возрастает скорость распада фибриллярного коллагена. При этом на фоне избыточного поступления экзогенных фосфатов и карбонатов из SBF апатитогенез в перитенонах осуществляется, преимущественно, по механизму гомогенной нуклеации.

Ключевые слова: перитенон, диоксид кремния, гиалуроновая кислота, фибриллярный коллаген, внеклеточный матрикс, тканевые стяжки, гидроксиапатит

Для цитирования: Структура и физико-химические свойства фибриллярных коллагеновых тканей, модифицированных диоксидом кремния и гиалуроновой кислотой / А. А. Гайдаш [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 2. – С. 173–185. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-2-173-185>

**Alexander A. Gaidash¹, Valentina K. Krut'ko¹, Corresponding Member Anatoly I. Kulak¹,
Olga N. Musskaya¹, Katarina V. Skrotskaya², Nikolay L. Budeiko¹**

¹*Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

STRUCTURE AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF FIBRILLARY COLLAGEN FABRIC MODIFIED BY SILICON DIOXIDE AND HYALURONIC ACID

Abstract. The connective tissue sheaths of paravertebral tendons (peritenons) of white laboratory rats treated with silicon dioxide and hyaluronic acid were studied. It was found that peritenones are natural composites with orthogonal anisotropy with a developed system of interstitial porous membranes that regulate tissue hydrodynamic flows. The extracellular matrix of peritenons contains carbonate-hydroxyapatite and calcium hydroxide in the amorphized state. Silicon dioxide and hyaluronate form hydrophobic silicate and hyaluronate coatings of collagen fibrils (encapsulation), strengthen bonds in Amides I, II, III, reduce the intensity of the bands of bound hydroxyl and stretching vibration bands of phosphate groups, which indicates the replacement of OH groups with carbonate ions and the suppression synthesis of hydroxyapatite. A key mechanism for reducing the intensity of apatitogenesis is the encapsulation of collagen fibrils, accompanied by screening the centers of epitaxial interactions that are structured during heterogeneous nucleation of calcium phosphates. In SBF biomimetic fluid, the deforming effect of modifying agents is leveled, but hydration and decomposition of fibrillar collagen increase. Moreover, against the background of excess supply of exogenous phosphates and carbonates from SBF, apatitogenesis in peritenons is carried out mainly by the mechanism of homogeneous nucleation.

Keywords: peritenone, silicon dioxide, hyaluronic acid, fibrillar collagen, extracellular matrix, tissue screeds, hydroxyapatite

For citation: Gaidash A. A., Krut'ko V. K., Kulak A. I., Musskaya O. N., Skrotskaya K. V., Budeiko N. L. Structure and physico-chemical properties of fibrillary collagen fabric modified by silicon dioxide and hyaluronic acid. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2020, vol. 64, no. 2, pp. 173–185 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2020-64-2-173-185>

Введение. Коллагенсодержащие материалы различных биологических источников, основу которых составляет фибриллярный коллаген I типа, активно используются при изготовлении имплантатов, предназначенных для реконструктивной медицины [1–3]. Однако на сегодняшний день не существует имплантационных материалов, которые в полном объеме удовлетворяют нормативным требованиям структурно-механического соответствия, биосовместимости и безопасности. Наиболее развитым технологическим трендом является упрочнение коллагенсодержащих материалов с помощью химических сшивающих агентов, среди которых чаще используют глутаровый альдегид и производные диглицидиловых эфиров [1]. Структурные преобразования материалов, обусловленные действием этих агентов, сводятся к формированию молекулярных сшивок и тканевых стяжек [2–4]. При этом остаются нерешенными такие проблемы, как потеря эластичности, тромбогенность, чувствительность к протеолизу и кальцификация, что определяет направление дальнейших, перспективных разработок, одной из которых является исследование возможности применения диоксида кремния и гиалуроновой кислоты в качестве агентов, модифицирующих свойства коллагенсодержащих материалов, предназначенных для имплантации.

Опыт практического применения кремнийсодержащих агентов, модифицирующих коллагеновые материалы, имеется – это кремнекислотное дубление кож, механизм которого обусловлен формированием O–Si–O сшивок [5]. Гиалуроновая кислота обладает выраженными водоудерживающими свойствами, увеличивает объем/поверхностное отношение в пористых структурах, улучшает кондуктивные свойства и способствует заселению стволовыми клетками коллагеновых скаффолдов [6; 7]. Гиалуронаты повышают устойчивость к протеолизу [8], увеличивают вязкость коллагеновых гелей, снижают токсичность и связывают ионы кальция в имплантатах, обработанных глутаровым альдегидом [9; 10]. Однако в целом феноменология и механизм структурных и физико-химических преобразований коллагенсодержащих материалов, обусловленных действием диоксида кремния и гиалуроновой кислоты, остаются неизвестными, что затрудняет определение перспектив применения данных агентов в имплантационных технологиях. Цель работы – установить структурные и физико-химические свойства коллагенсодержащих материалов, модифицированных диоксидом кремния в комбинации с гиалуроновой кислотой.

Материалы и методы исследования. Исследованы наружные оболочки хвостовых сухожилий (перитеноны) 24 самцов белых лабораторных крыс. Протоколы, содержание и способ эвтаназии животных соответствовали Санитарным нормам 2.1.2.12-18–2006 и утверждены этическим комитетом Института физиологии НАН Беларуси. В качестве исходных реагентов применяли диоксид кремния марки ч. д. а., 2 %-ный гиалуронат натрия, стабилизированный в 0,5 %-ном растворе маннитола («Гилартен»), безбелковую биомиметическую жидкость SBF (Simulated Body Fluid). Перитеноны обрабатывали по модифицированной методике. Вначале готовили 3 %-ную водную суспензию диоксида кремния при pH 2,0. Суспензию центрифугировали, супернатант ошелачивали (pH 7–9) и инкубировали образцы в течение 60 мин при 38–40 °С. После этого добавляли Гилартен из расчета 1 мг гиалуроната на 1 г образца и выдерживали в течение 60 мин при 38–40 °С. Перитеноны, обработанные диоксидом кремния и гиалуронатом, выдерживали в SBF (pH 7,1) в течение 24 ч при 38–40 °С. Раствор SBF готовили по прописи. Эксперимент выполнен по факторной схеме, в соответствии с которой материал распределен на 8 групп [11]. Изучено по 5 образцов для каждого вида анализа из каждой группы. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы фиксировали в 3 %-ном глутаровом альдегиде, обезвоживали этанолом, вакуумировали, напыляли золотом и изучали на микроскопе LEO 1420 (Carl Zeiss, Германия). Фазовый состав (РФА) определяли на дифрактометре ADVANCE D8 (Bruker, Германия) при $Cu_{K\alpha} = 1,5405 \text{ \AA}$ с использованием баз данных ICDD PDF-2: моноклинный карбонат-гидроксиапатит [00-035-0180], гексагональный гидроксиапатит [01-084-1998], гидрок-

сид кальция [00-044-1481]. Термический анализ (ТГ, ДТГ, ДТА) проводили на дериватографе STA 409 PC LUXX (NETZSCH, Германия) при скорости потока воздуха 50 мл/мин. ИК-спектры (ИКС) образцов, высушенных на воздухе, записывали на спектрометре Tensor-27 (Bruker, Германия) с использованием таблеток бромида калия в диапазоне 400–4000 см^{-1} и влажных образцов на ИК фурье-микроскопе Nuregion (Bruker, Германия) с использованием 15-кратного G1r-объектива в диапазоне 2000–8000 см^{-1} . Концентрацию ионов Ca^{2+} в растворе SBF определяли титриметрически.

Результаты и их обсуждение. *Обработка диоксидом кремния и гиалуронатом.* На СЭМ изображениях перитенонов контрольной группы визуализируется трехмерная каркасная структура, пористые образования интерстициального флюида, гладкая поверхность коллагеновых волокон, линии поперечной исчерченности, отражающие доменную организацию фибрилл, матричные везикулы (МВ), расположенные преимущественно в цитоплазме тендиобластов (рис. 1, *a*). Вышеуказанные морфологические признаки в дальнейшем использовались в качестве ключевых электронно-микроскопических маркеров структурной изменчивости.

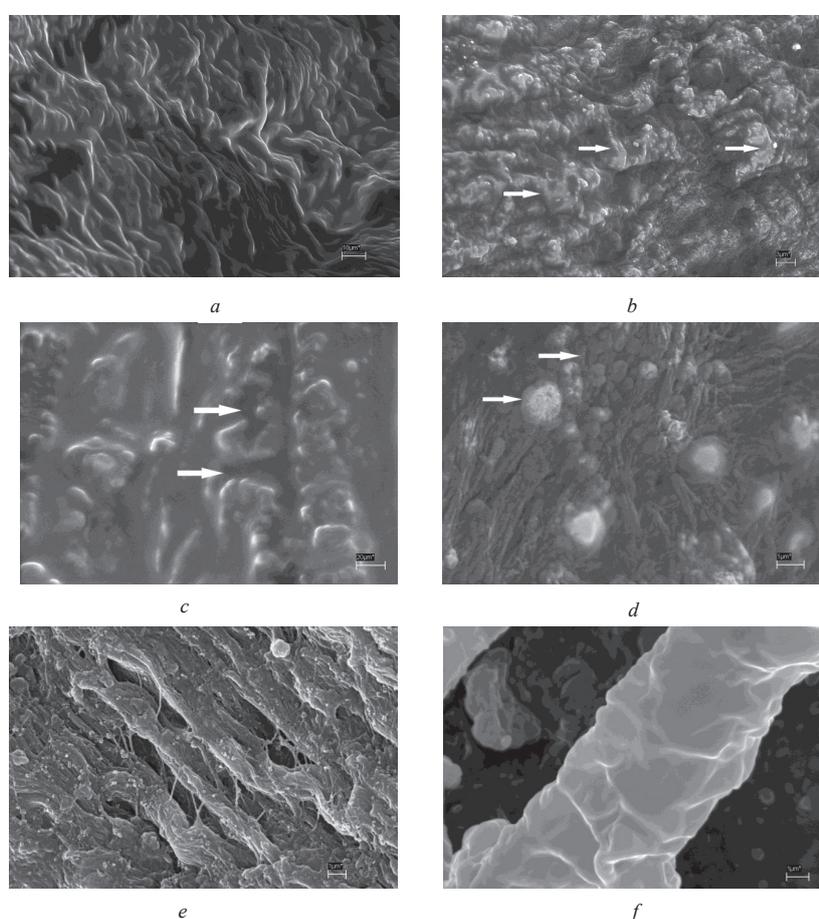


Рис. 1. СЭМ-изображения перитенонов, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом: упорядоченная организация коллагеновых волокон в образце контрольной группы (*a*); силикатное покрытие на поверхности коллагеновых волокон, обработанных диоксидом кремния (*b*); продольное расслоение коллагеновых волокон, обработанных гиалуронатом (*c*); миграция клубков полимеризованной гиалуроновой кислоты в межфибрилярные пространства при обработке гиалуронатом (*d*); поперечное расслоение коллагеновых волокон и раскрытие интерстициальных мембран при обработке гиалуронатом (*e*); гиалуронатное покрытие коллагенового волокна при обработке диоксидом кремния и гиалуронатом (*f*)

Fig. 1. SEM images of of peritenons treated with silicon dioxide and hyaluronate: ordered organization of collagen fibers in a sample of the control group (*a*); silicate coating on the surface of collagen fibers treated with silicon dioxide (*b*); longitudinal delamination of collagen fibers treated with hyaluronate (*c*); the migration of tangles of polymerized hyaluronic acid into the inter-fibrillar spaces when treated with hyaluronate (*d*); the transverse separation of collagen fibers and the opening of interstitial membranes during processing hyaluronate (*e*); hyaluronate coating of collagen fiber when treated with silica and hyaluronate (*f*)

Обработка диоксидом кремния способствует формированию на поверхностях коллагеновых фибрилл силикатных микрочернистых покрытий и трансформирует внеклеточный матрикс в вязкий флюид. Покрытие состоит из Si–O частиц, образующих неоднородную по структуре и толщине гидрофобную пленку, которая стягивает коллагеновый каркас и деформирует структуру доменов. Парафибрилярные пространства расширены, интерстициальные мембраны расправлены. Внеклеточный матрикс пропитан вязким флюидом, агрегирующим Si–O частицы и MB. Тендинобласты подвергаются клазматозу с частичным распадом цитоплазмы и секвестрацией MB в интерстициальный флюид (рис. 1, *b*).

Гиалуронат структурирует внеклеточный матрикс: появляются нитчатые спайки, фрагментирующие интерстициальные пространства, расширяются предсуществующие и образуются *de novo* поры, расправляются интерстициальные мембраны. В продольном и поперечном направлениях расслаиваются коллагеновые фибриллы (рис. 1, *c*). При продольном расслоении упругие клубки полимеризованного гиалуроната проникают в межфибрилярные пространства (рис. 1, *d*). Размеры клубков варьируют от 10 нм до 2 мкм, что значительно больше диаметров интердигитирующих каналов первичных коллагеновых фибрилл. Отсюда возникает расклинивающий эффект: фибриллы сжимаются, нити протоколлагенов рвутся, домены теряют связь с волокном и высвобождаются из его структуры. Расклинивающий эффект распространяется на все уровни организации коллагеновых фибрилл, но захватывает небольшую часть, объем которой варьирует в пределах ремоделирования коллагенового каркаса. В этом смысле гиалуроновая кислота активирует обновление коллагеновых волокон. Как известно, матричный апатитогенез инициируется в интердигитирующих каналах путем увеличения численной плотности и сближения центров Ca–P нуклеации, что ускоряет образование зародышей структурных предшественников гидроксиапатита (ГА), растущих в концевые отделы коллагеновых доменов. При этом на поверхностях коллагеновых фибрилл формируется метастабильная аморфная фаза кальцийфосфатов, которая в ходе эпитаксиальных взаимодействий преобразуется в термодинамически устойчивый ГА [12]. На скорость созревания ГА влияет структура гидратных оболочек, окружающих коллагеновые фибриллы [13]. Очевидно, что при расслоении увеличивается удельная площадь поверхности фибрилл и, соответственно, растет число контактов с гиалуронатным покрытием, что неизбежно усиливает его экранирующий эффект.

При совместном действии диоксида кремния и гиалуроната силикатные и гиалуронатные покрытия модифицируют материал, действуя синергично. Силикатные покрытия распространяются на тонкие нити коллагеновых фибрилл, гиалуронатные – плотно склеивают первичные коллагеновые фибриллы, удерживая их от расщепления (рис. 1, *f*). Клубки гиалуроната массово проникают в межфибрилярные пространства. Коллагеновый каркас деформирован: в расплавленных участках парафибрилярные каналы заполняются вязким интерстициальным флюидом, а в спавшихся участках первичные фибриллы сшиваются полиморфными стяжками (рис. 1, *f*). Поверхность клеточных и волокнистых структур освобождается от MB и Si–O частиц.

На РФА влажных перитенонов, обработанных отдельно диоксидом кремния и гиалуронатом, рефлексы гало сдвинуты в широкоуголовую область (рис. 2, *a*, табл. 1). При совместной обработке гиалуронат нивелирует действие диоксида кремния – рефлекс гало приближается к контролю (рис. 2, *a*), что обусловлено, по-видимому, «склеивающим» действием гиалуроновой кислоты. В высушенных образцах всех экспериментальных групп проявляются рефлексы (рис. 2, *b*) моноклинных (2θ при $23,358^\circ$) и гексагональных (2θ при $31,791^\circ$) форм ГА, а также гидроксида кальция (2θ при $34,102^\circ$).

На ДТГ и ДТА кривых перитенонов, обработанных диоксидом кремния, ускорена потеря массы кипящей воды и понижена температура разложения органической фазы (рис. 2, *c*, *d*, табл. 1). Гиалуронат снижает температуру разложения органической фазы, но оставляет в пределах контрольных значений скорость потери массы кипящей воды (рис. 2, *c*, табл. 1). В образцах, подвергнутых совместной обработке диоксидом кремния и гиалуронатом, вышеозначенные тренды усиливаются (рис. 2, *c*, *d*, табл. 1). Увеличение скорости потери массы воды при кипении свидетельствует об увеличении ее подвижности и «проскальзывании» по поверхностям тканевых структур, покрытых гидрофобными силикатными и гиалуронатными пленками. Наиболее веро-

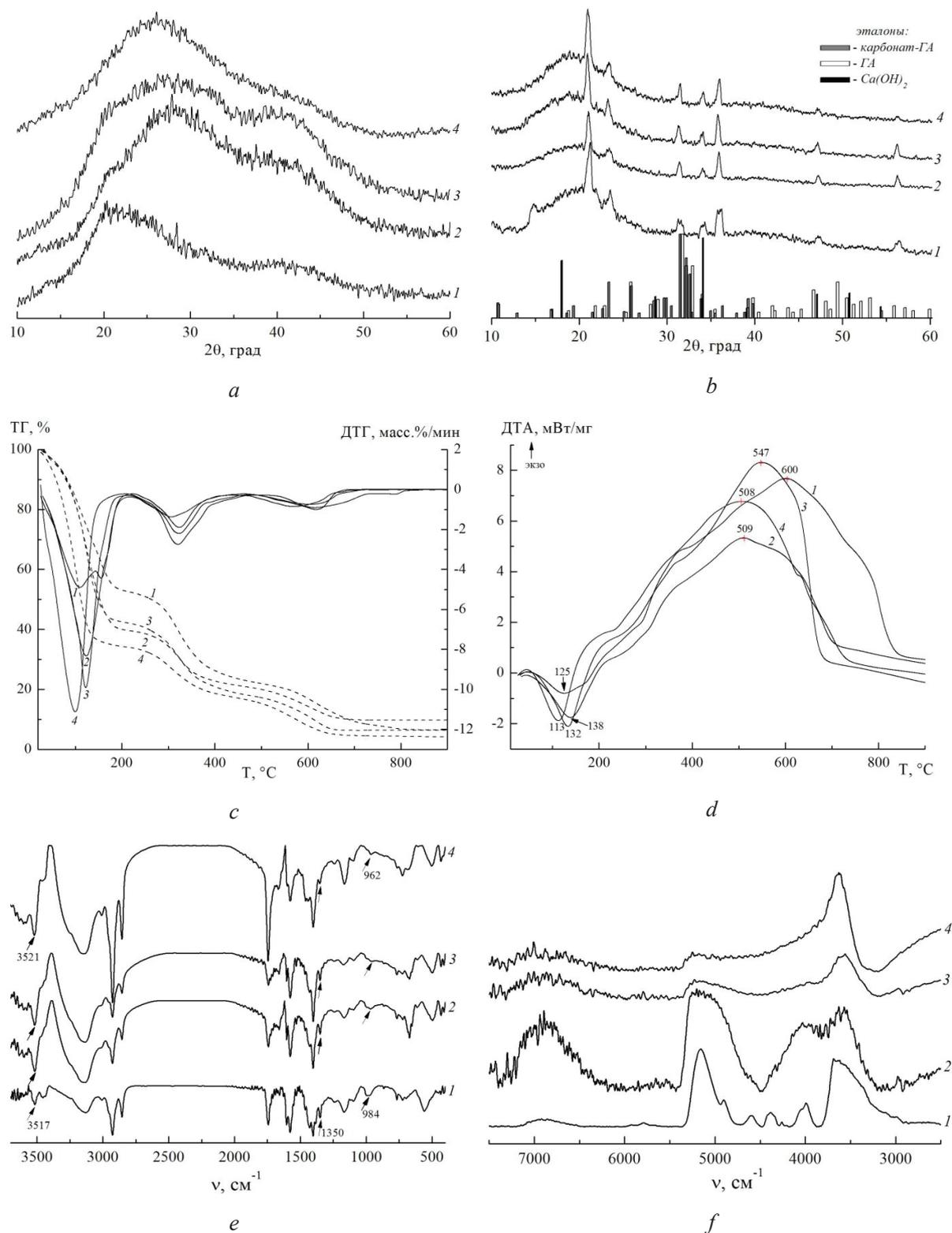


Рис. 2. Физико-химические данные образцов перитенонов: РФА влажных (а) и высушенных (б); ТГ, ДТГ (с) и ДТА (д) кривые; ИК-спектры высушенных (е) и влажных (ф): 1 – контроль, 2 – модификация диоксидом кремния, 3 – модификация гиалуронатом, 4 – последовательная модификация диоксидом кремния и гиалуронатом

Fig. 2. Physico-chemical data of peritene samples: XRD of wet (a) and dried (b); TG, DTG (c) and DTA (d) curves; IR spectra of dried (e) and wet (f): 1 – control, 2 – modification with silicon dioxide, 3 – modification with hyaluronate, 4 – sequential modification with silicon dioxide and hyaluronate

Таблица 1. Данные РФА, ДТГ, ДТА, ИКС перитенонов, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом

Table 1. XRD, DTG, DTA, IR data for peritenons treated with silicon dioxide and hyaluronate

Параметр Parameter	Контрольные группы Control groups		Обработка диоксидом кремния Silicon dioxide treatment		Обработка гиалуронатом Hyaluronate treatment		Обработка диоксидом кремния и гиалуронатом Silicon dioxide and hyaluronate treatment	
	До SBF Before SBF	После SBF After SBF	До SBF Before SBF	После SBF After SBF	До SBF Before SBF	После SBF After SBF	До SBF Before SBF	После SBF After SBF
Углы гало 2 θ , °	20,3	28,4	28,0	20,7	26,0	22,7	24,0	22,7
Скорость потери массы воды, %	29,0	55,6	44,0	54,0	30,0	54,6	50,0	54,3
Температура разложения органической фазы, °С	600	516	509	522	547	520	508	543
Валентные колебательные моды воды ν , см ⁻¹	3657	3631	3558	3631	3603	3618	3666	3589

ятной причиной низкотемпературных сдвигов термодеструкции органической фазы может быть растущая структурная анизотропия фибриллярного каркаса.

Коллагеновые белки в образцах контрольной группы идентифицируются наличием на ИК-спектрах (рис. 2, *e*, табл. 2) характеристичных полос валентных колебаний свободных групп NH₂ в составе Амида А, валентных колебаний C=O пептидных групп и групп COOH в полосе Амида I, деформационных колебания NH и колебаний C–N в полосе Амида II (составные частоты), деформационных колебаний NH валентных колебаний C–N в полосе Амида III, группы колебаний связанных гидроксильных групп и C=O связей, а также колебаний скелетных связей C–C.

В результате обработки диоксидом кремния регрессирует полоса валентных колебаний свободных NH₂ групп в составе первичных амидов (Амид А), снижается интенсивность колебаний связанных гидроксильных групп, уменьшаются интенсивность и сужаются полосы колебаний Амидов I, II, III (рис. 2, *f*). Значительно увеличивается интенсивность и расширяется полоса скелетных колебаний C–C, что свидетельствует о растяжении полипептидных цепей. Увеличивается интенсивность и поднимается высокочастотное крыло полосы валентных колебаний воды, сочетающееся с возбуждением первых обертонов при 6000–7200 см⁻¹.

Под воздействием гиалуроната регрессирует полоса валентных колебаний NH₂ Амида А, сужается полоса колебаний связанных гидроксильных групп, уменьшается интенсивность и сужаются полосы валентных колебаний Амидов I, II, III, расширяются полосы связей C–C. Полоса валентных колебаний воды сдвинута в низкочастотную область (рис. 2, *e, f*), что свидетельствует о кластеризации воды.

При совместном действии диоксида кремния и гиалуроната значительно увеличивается интенсивность и сужаются полосы колебаний связанных гидроксильных групп и Амида I (рис. 2, *e, f*). Уменьшается интенсивность и сужаются полосы Амидов II и III, увеличивается интенсивность и расширяется полоса скелетных колебаний C–C, уменьшается интенсивность валентных колебаний воды.

На ИК-спектрах перитенонов контрольной группы присутствуют следующие характеристичные полосы иона PO₄³⁻ с симметрией правильного тетраэдра: полностью симметричные колебания связи P–O (ν^1), деформационные валентные колебания P–O (ν^3), симметричные деформационные колебания P–O с выходом полос в области ~440 см⁻¹ (ν^2) и асимметричные деформационные колебания P–O в диапазоне 640–550 см⁻¹ (ν^4). В характеристичном диапазоне выходит полоса групповых колебательных мод карбонильных групп (табл. 2). Присутствие колебательных мод апатитового комплекса свидетельствует о наличии в исходных образцах карбонат-гидроксиапатита. При действии диоксида кремния или гиалуроната увеличиваются интенсивности полос карбонильных групп, но снижается интенсивность полосы валентных колебаний фосфатных (ν^1) и полосы связанных гидроксильных групп, что свидетельствует о прогрессирующем замещении карбонат-ионами OH-групп, расположенных в кальциевых каналах ГА [15]. При совместном дей-

Таблица 2. Значения волновых чисел в ИК-спектрах перитенонов, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом (экспериментальные и литературные данные)

Table 2. The values of the wave numbers in the IR spectra of peritenons treated with silicon dioxide and hyaluronate (experimental and published data)

Функциональная молекулярная группа Functional molecular group	Характеристичные частоты (ν , cm^{-1}) Characteristic frequencies (ν , cm^{-1})				
	Экспериментальные данные Experimental data				Литературные данные [14] Literature [14]
	Контроль Control	Диоксид кремния Silicon dioxide	Гиалуронат Hyaluronate	Диоксид кремния/гиалуронат Silicon dioxide/hyaluronate	
<i>Кальцийфосфаты и карбонильные группы</i> <i>Calcium phosphates and carbonyl groups</i>					
PO_4 растяжения (ν^1)	984* 982	966	958	962 –	962
PO_4 изгиба (ν^3)	1092 1049	1093 1092	1093 1092	1093 1092	1092
PO_4 изгиба (ν^2)	626–473 617–445	573–455 575–455	573–455 617–455	569–460 551–455	645–430
CO_3 групповая	872	872	872	872	875
	1403	1403	1403	1403	1427
<i>Коллагеновые белки</i> <i>Collagen proteins</i>					
Амид А	3556–3403 3555–3406	3552–3473 3560–3473	3552–3473 3564–3473	3556–3473 3564–3478	3540–3480
Амид I	1774–1687 1697	1770–1705 1700	1774–1705 1760	1774–1691 1706	1738–1600
Амид II	1612–1542 1536	1600–1547 1572	1608–1547 1572	1608–1552 –	1575–1480
Амид III	1272–1215	1272–1215	1272–1224	1276–1215	1235–1330
О–Н и С–О связи	2988–2818	2980–2822	2975–2827	2988–2822	3300–2500
	2951–2826	–	2989–2826	2960–2826	
Скелетные колебания связей С–С	722	674	674	726	765
	675	670	675	670	

Примечания: * – здесь и далее в таблице верхняя строка значения (ν , cm^{-1}) для образцов, обработанных модифицирующими агентами без инкубации в SBF, нижняя строка – для образцов, обработанных модифицирующими агентами после инкубации в SBF.

Note: * – here and below in the table, the upper row of the value (ν , cm^{-1}) for samples treated with modifying agents without incubation in SBF, the lower row for samples processed modifying agents after incubation in SBF.

ствии диоксида кремния и гиалуроната полосы валентных колебаний фосфатных групп регрессируют, а интенсивность полос связанных гидроксильных групп наоборот растет (рис. 2, e). Таким образом, диоксид кремния и гиалуронат, действуя совместно, повышают степень гидратирования карбонат-гидроксиапатита и его прекурсоров, способствуя их разрушению.

Данные СЭМ и ИКС объясняют механизм ослабления гетерогенной нуклеации кальцийфосфатов в модифицированных перитенонах экранированием Са–Р центров силикатным и гиалуронатным покрытием. Кроме того, диоксид кремния и гиалуронозная кислота способствуют повышению плотности поперечных водородных связей, что, по-видимому, и составляет смысл стягивающего действия на молекулярном уровне.

Инкубация в SBF. В исходных образцах, инкубированных в SBF, каналы тканевой дренажной системы расширены и заполнены вязким флюидом (рис. 3, a). После инкубации в SBF в образцах, обработанных отдельно или совместно диоксидом кремния и гиалуронатом, сохраняются покрытия коллагеновых волокон, характерные для каждого модифицирующего агента. Они истончены и подчеркивают упорядоченную структуру поперечной исчерченности (рис. 3, b). Силикатные покрытия более дисперсны, расслаивающие эффекты гиалуроната сглажены. Внеклеточный матрикс пропитан вязким, а при обработке гиалуронатом «стеклообразным» флюидом,

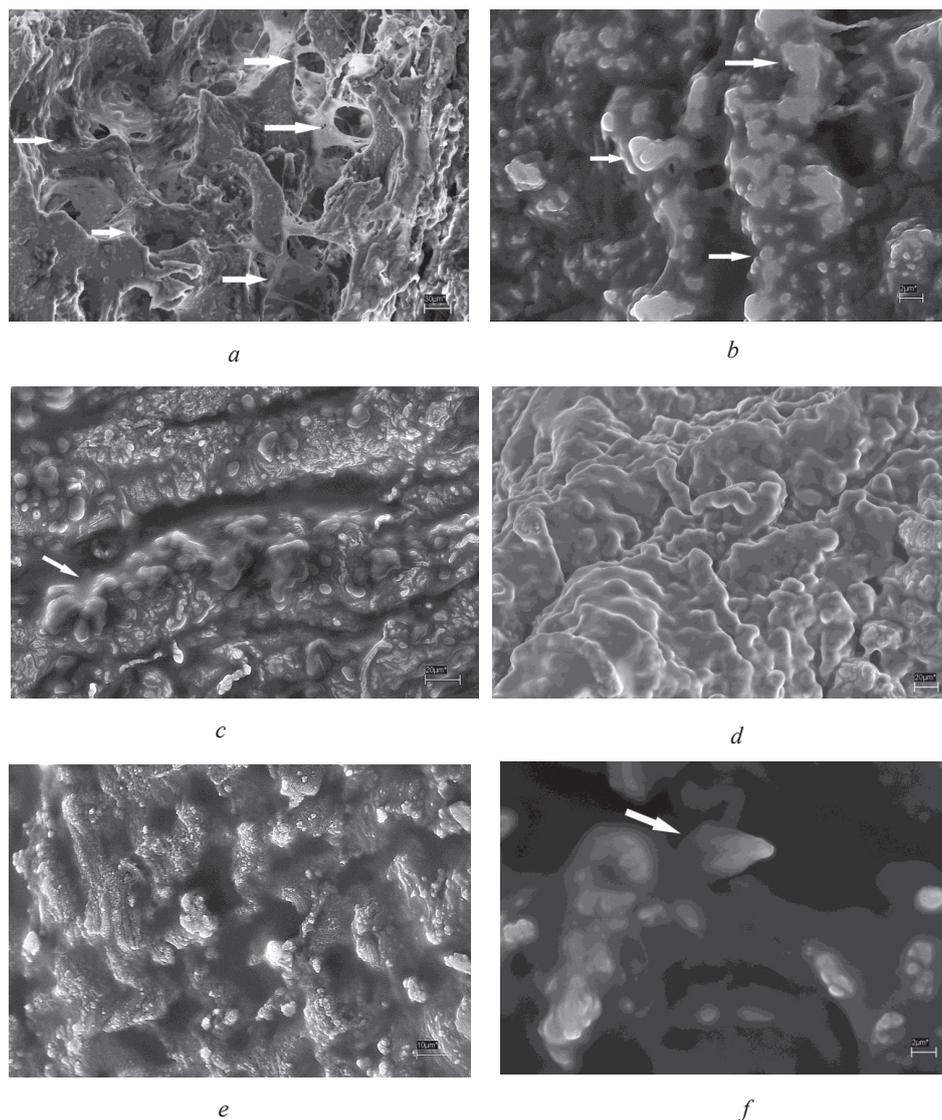


Рис. 3. СЭМ-изображения перитенонов, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом после инкубации в SBF: расширенные каналы дренажной системы в образце контрольной группы (*a*); силикатное покрытие на поверхности коллагеновых волокон при обработке диоксидом кремния (*b*); продольное расслоение коллагеновых волокон, обработанных гиалуронатом (*c*); гиалуронатное покрытие (*d*); осаждение преципитатов в интерстиции при обработке диоксидом кремния и гиалуронатом (*e*); игольчатые структуры во внеклеточном матриксе при обработке диоксидом кремния и гиалуронатом (*f*)

Fig. 3. SEM images of peritenons treated with silicon dioxide and hyaluronate after incubation in SBF: expanded channels of the drainage system in the sample of the control group (*a*); silicate coating on the surface of collagen fibers when treated with silicon dioxide (*b*); longitudinal delamination of collagen fibers treated with hyaluronate (*c*); hyaluronate coating (*d*); precipitation of precipitates in the interstitium when treated with silicon dioxide and hyaluronate (*e*); needle structures in the extracellular matrix when treated with silica and hyaluronate (*f*)

в котором рассеяны МВ, глобулы полимеризованной гиалуроновой кислоты и ветвящиеся преципитаты осажденных кальцификатов (рис. 3, *d, e*). Местами в матриксе выявляются игольчатые структуры (рис. 3, *f*), характерные для растущего ГА в регенерирующей костной ткани [15].

В перитенонах, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом, увеличивается масса (табл. 3), что, по-видимому, обусловлено адсорбцией модифицирующих агентов. После инкубации в SBF значимое увеличение массы наблюдается только в контрольной группе, возможно, в связи с заполнением водой расширенных каналов дренажной системы. В образцах, обработанных отдельно диоксидом кремния или гиалуронатом, после инкубации в SBF темп привеса

снижается, а после совместной обработки образцы теряют массу (табл. 3). Это свидетельствует об исчерпании ресурсов вакантных водных «емкостей» и снижении скорости диффузионных потоков экзогенной воды в вязком интерстициальном флюиде. Кроме того, образцы могут механически «сбрасывать» воду из тканевых каналов, стенки которых покрыты гидрофобными пленками модифицирующих агентов. В перитенонах, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом, после инкубации в SBF концентрация ионов Ca^{2+} превышает контрольную в 2–3 раза, что свидетельствует об интенсивном выходе ионов кальция. Максимальный выход ионов Ca^{2+} наблюдается из перитенонов, обработанных только гиалуроновой кислотой.

Т а б л и ц а 3. Показатели масс перитенонов, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом, и концентрация ионов Ca^{2+} после инкубации образцов в SBF

T a b l e 3. The mass indices of peritenons treated with silicon dioxide and hyaluronate, and the concentration of Ca^{2+} ions after incubation of the samples in SBF

Тип допантов Type of dopant	Масса исходных образцов, мг Weight of the original samples, mg	Масса образцов, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом, мг Weight of the samples treated with silicon dioxide and hyaluronate, mg	Масса образцов после инкубации в SBF, мг Weight of the samples after incubation in SBF, mg	pH SBF с образцом pH SBF with sample	Привес кальция в SBF, $m_{\text{Ca}^{2+}\text{ в SBF}}$, мг Calcium gain in SBF, $m_{\text{Ca}^{2+}\text{ in SBF}}$, mg	Индекс выхода кальция в SBF, ИВ(Ca^{2+})* Calcium yield index in SBF, IW (Ca^{2+})*
Контроль	1010 ± 10	–	1600 ± 10	6,90 ± 0,05	0,70 ± 0,05	0,069
Диоксид кремния	470 ± 5	790 ± 8	890 ± 9	7,03 ± 0,05	0,55 ± 0,05	0,117
Гиалуронат	300 ± 4	490 ± 6	500 ± 6	7,05 ± 0,05	0,60 ± 0,05	0,201
Диоксид кремния/ гиалуронат	470 ± 5	810 ± 8	770 ± 8	7,03 ± 0,05	0,50 ± 0,05	0,106

П р и м е ч а н и е: * – индекс выхода кальция рассчитывали: $\text{ИВ}(\text{Ca}^{2+}) = \frac{m_{\text{Ca}^{2+}\text{ в SBF}}}{m_{\text{контр}}} \cdot 100$.

N o t e: * – Calcium yield index was calculated as follows: $\text{IW}(\text{Ca}^{2+}) = \frac{m_{\text{Ca}^{2+}\text{ в SBF}}}{m_{\text{contr}}} \cdot 100$.

На РФА влажных образцов исходных перитенонов, инкубированных в SBF, рефлекс гало расширен и смещен в широкоуголовую область (рис. 4, *a*, табл. 1). В образцах, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом, после инкубации в SBF гало сужается, а положение рефлексов приближается к контрольным значениям. На РФА высушенных образцов воспроизводится выход рефлексов моноклинных и гексагональных форм ГА, а также гидроксида кальция (рис. 4, *b*). При этом интенсивность рефлексов возрастает в ряду «контроль–модифицирующие агенты» и достигает максимума в образцах, обработанных совместно диоксидом кремния и гиалуронатом.

После инкубации в SBF ускоряется потеря массы воды при кипении в образцах, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом (рис. 4, *c*, табл. 1). При разложении органической фазы на ДТА появляются дополнительные высокотемпературные пики (рис. 4, *d*), возможно, в связи с продолжающимся уплотнением силикатных и гиалуронатных покрытий в ходе инкубации в SBF. В образцах, обработанных диоксидом кремния и гиалуронатом и инкубированных в SBF, регрессируют полосы валентных колебаний NH_2 групп в составе первичных амидов (Амид А), снижается интенсивность колебаний связанных гидроксильных групп, уменьшается интенсивность и расширяются полосы валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$ групп Амида I, снижается интенсивность полос Амидов II и III (рис. 4, *e*). Значительно расширяются полосы скелетных колебаний $\text{C}-\text{C}$ связей. Положение полос валентных колебаний воды варьирует в пределах контрольных значений. Однако регистрируется уширение пиков, что характерно для разрежения водородных связей (рис. 4, *f*, табл. 1).

Таким образом, при инкубации в SBF в коллагеновых волокнах развивается комплекс изменений, обусловленных мацерацией и ослаблением стягивающего эффекта. Наибольшую чувствительность проявляют Амиды I, II и III, где связи $\text{C}=\text{O}$ и $\text{N}-\text{H}$ разрываются.

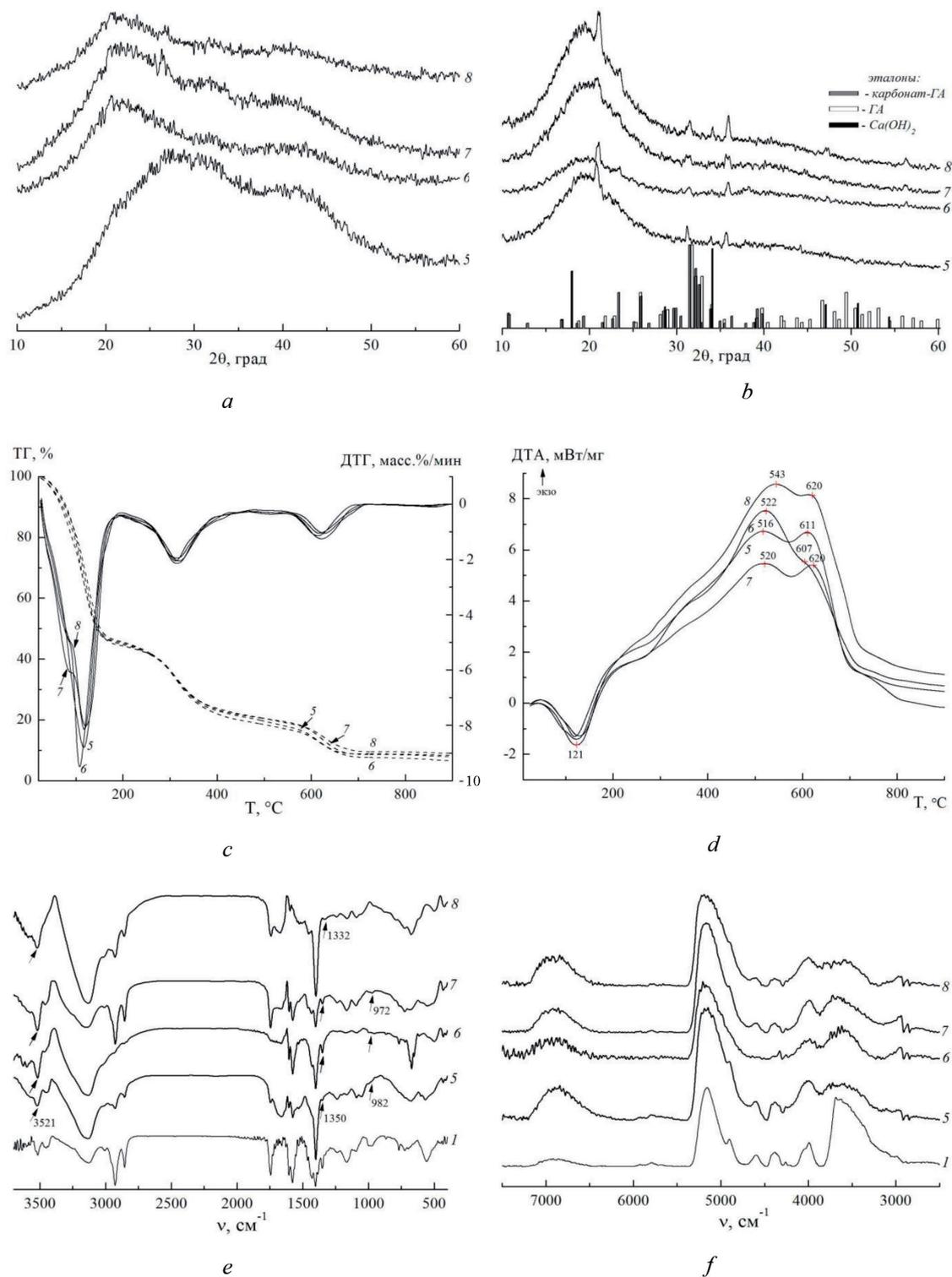


Рис. 4. Физико-химические данные образцов перитенонов после инкубации в SBF: РФА влажных (*a*) и высушенных (*b*); ТГ, ДТГ (*c*) и ДТА (*d*) кривые; ИК-спектры высушенных (*e*) и влажных (*f*): 1 – контроль до SBF, 5 – контроль после SBF, 6 – модификация диоксидом кремния, 7 – модификация гиалуронатом, 8 – последовательная модификация диоксидом кремния и гиалуронатом

Fig. 4. Physico-chemical data of peritenone samples after incubation in SBF: X-ray powder analysis of wet (*a*) and dried (*b*); TG, DTG (*c*) and DTA (*d*) curves; IR spectra of dried (*e*) and wet (*f*): 1 – control before SBF, 5 – control after SBF, 6 – modification with silicon dioxide, 7 – modification with hyaluronate, 8 – sequential modification with silicon dioxide and hyaluronate

В исходных образцах, инкубированных в SBF, полосы валентных колебательных мод фосфатных групп (ν^1 и ν^3) сливаются с формированием одной уширенной полосы средней интенсивности в области 1092 см^{-1} . Интенсивность полос деформационных колебаний фосфатных групп уменьшена, и они смещены за счет уширения низкочастотного плеча. Полоса карбонильных групп сужена, но ее интенсивность увеличена (рис. 4, е). Таким образом, в исходных образцах, инкубированных в SBF, осуществляются процессы Ca–P зародышеобразования, сопровождающиеся замещением фосфатных групп карбонатами. Под воздействием диоксида кремния в образцах, инкубированных в SBF, полностью регрессируют полосы валентных и значительно уменьшается интенсивность деформационных колебаний фосфатных групп, что свидетельствует о подавлении кальцийфосфатной нуклеации. При этом усиливается деформация полипептидных цепей коллагеновых белков, на что указывает сильное уширение и рост за пределы контроля интенсивности скелетных колебаний C–C связей (рис. 4, е). Гиалуроновая кислота, действуя отдельно или совместно с диоксидом кремния в условиях инкубации в SBF, наоборот, активизирует апатитогенез. Если судить по интенсивности характеристичных полос валентных колебаний фосфатных групп (рис. 4, е), то этот процесс явно более интенсивный, чем в контроле.

Заключение. Диоксид кремния и гиалуронат, действуя отдельно или совместно, формируют на поверхностях коллагеновых фибрилл гидрофобные силикатные и гиалуронатные покрытия. На молекулярном уровне модифицирующие агенты увеличивают плотность связей в Амидах I, II, III, а коллагеновый каркас деформируется. Ожидаемыми последствиями инкапсуляции являются: упрочнение материала (за счет молекулярных стяжек), снижение адгезивности поверхностей тканевых структур (за счет гидрофобизации поверхностей тканевых структур), повышение устойчивости к коллагеназам, обусловленное конформационными преобразованиями первичных фибрилл, и ослабление интенсивности гетерогенной нуклеации кальцийфосфатов в связи с экранированием центров эпитаксии.

В биомиметической среде SBF структура силикатных и гиалуронатных покрытий сохраняется, но стягивающие эффекты регрессируют. Под воздействием SBF увеличивается гидратированность полипептидных цепей коллагеновых фибрилл. В условиях избыточного поступления экзогенных фосфатов и карбонатов увеличивается интенсивность апатитогенеза. На фоне ограничения доступа к центрам эпитаксии наиболее вероятным механизмом усиления апатитогенеза является преимущественно гомогенная нуклеация кальцийфосфатов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках задания 1.04 ГПНИ «Химические технологии и материалы».

Acknowledgements. The work was supported by the SPSI “Chemical technologies and materials” (task 1.04).

Список использованных источников

1. Структурные и физико-химические преобразования перикардальных имплантатов, модифицированных эпоксидной смолой / А. А. Гайдаш [и др.] // Док. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 6. – С. 703–711. <https://10.29235/1561-8323-2018-62-6-703-711>
2. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: *in vitro* material assessment and *in vivo* anticalcification effect / C. Lee [et al.] // *Europ. J. Cardio-Thoracic Surg.* – 2011. – Vol. 39, N 3. – P. 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2010.07.015>
3. Triglycidylamine crosslinking of porcine aortic valve cusps or bovine pericardium results in improved biocompatibility, biomechanics, and calcification resistance: Chemical and biological mechanisms / J. M. Connolly [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2005. – Vol. 166, N 1. – P. 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62227-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62227-4)
4. Сканирующая зондовая микроскопия перикардов, модифицированных диглицидиловым эфиром этиленгликоля / А. А. Гайдаш [и др.] // *Новости мед.-биол. наук.* – 2018. – Т. 18, № 2. – С. 96–106.
5. Страхов, И. П. Химия и технология кожи и меха / И. П. Страхов, Ю. Н. Аронина, Л. П. Гайдаров. – М., 1970. – 632 с.
6. Fabrication and characterization of porous hyaluronic acid-collagen composite scaffolds / S. Tang [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2007. – Vol. 82A, N 2. – P. 323–335. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30974>
7. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration / L. S. Liu [et al.] // *Biomaterials.* – 1999. – Vol. 20, N 12. – P. 1097–1108. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00006-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00006-x)
8. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking / Si-N. Park [et al.] // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23, N 4. – P. 1205–1212. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00235-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00235-6)
9. Comprising Cross-Linked Hyaluronic Acid and Human Collagen for Tissue Reconstruction / Z.-H. Kim [et al.] // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 25, N 3. – P. 399–406. <https://doi.org/10.4014/jmb.1411.11029>

10. Hahn, S. K. Anti-calcification of bovine pericardium for bioprosthetic heart valves after surface modification with hyaluronic acid derivatives / S. K. Hahn, R. Ohri, C. M. Giachelli // *Biotechnol. Bioproc. Engin.* – 2005. – Vol. 10, N 3. – P. 218–224. <https://doi.org/10.1007/bf02932016>
11. Сканирующая электронная микроскопия коллагенсодержащих материалов, модифицированных диоксидом кремния и гиалуроновой кислотой / А. А. Гайдаш [и др.] // *Новости мед.-биол. наук.* – 2019. – Т. 19, № 3. – С. 68–83.
12. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite / S. Gajjerman [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, N 2. – P. 1193–1204. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604732200>
13. Veis, A. Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices / A. Veis, J. R. Dorvee // *Calcif. Tissue. Int.* – 2012. – Vol. 93, N 4. – P. 307–315. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9678-2>
14. Беллами, Л. Новые данные по ИК спектрам сложных молекул / Л. Беллами. – М., 1971. – 318 с.
15. Physicochemical Properties and Structure of the Bone Matrix in Simulated Tuberculous Osteitis / V. K. Krut'ko [et al.] // *Technical Physics.* – 2019. – Vol. 64, N 1. – P. 121–126. <https://doi.org/10.1134/S1063784219010183>

References

1. Gaidash A. A., Kulak A. I., Drozdovski K. V., Kazbanov V. V., Krut'ko V. K., Musskaya O. N., Skrotskaya K. V., Linnik Yu. I. Structural and physico-chemical transformations of modified with epoxy resin pericardia implants. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the national Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 6, pp. 703–711 (in Russian). <https://10.29235/1561-8323-2018-62-6-703-711>
2. Lee C., Kim S. H., Choi S.-H., Kim Y. J. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: *in vitro* material assessment and *in vivo* anticalcification effect. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2011, vol. 39, no. 3, pp. 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2010.07.015>
3. Connolly J. M., Alferiev I., Clark-Gruel J. N., Eidelman N., Sacks M., Palmatory E., Kronsteiner A., Defelice S., Xu J., Ohri R., Narula N., Vyavahare N., Levy R. J., Clark-Gruel J. N. Triglycidylamine crosslinking of porcine aortic valve cusps or bovine pericardium results in improved biocompatibility, biomechanics, and calcification resistance. *American Journal of Pathology*, 2005, vol. 166, no. 1, pp. 1–13. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62227-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62227-4)
4. Gaydash A. A., Drozdovskiy K. V., Melnikova G. B., Kuznetsova T. A., Chizhik S. A., Krut'ko V. K., Kulak A. I., Linnik Yu. I., Skrotskaya K. V., Kazbanov V. V., Gurinovich T. A., Kanunnikova A. R. Scanning probe microscopy of pericardium modified with ethylene glycol diglycidyl ether. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of Biomedical Sciences*, 2018, vol. 18, no. 2, pp. 96–106 (in Russian).
5. Strahov I. P., Aronina Yu. N., Gajdarov L. P. *Chemistry and technology of leather and fur*. Moscow, 1970. 632 p. (in Russian).
6. Tang S., Vickers S. M., Hsu H.-P., Spector M. Fabrication and characterization of porous hyaluronic acid–collagen composite scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007, vol. 82A, no. 2, pp. 323–335. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30974>
7. Liu L. Sh., Thompson A. Y., Heidarani M. A., Poser J. W., Spiro R. C. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials*, 1999, vol. 20, no. 12, pp. 1097–1108. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00006-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00006-x)
8. Park S. N., Park J. C., Kim H. O., Song M. J., Suh H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, no. 4, pp. 1205–1212. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00235-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00235-6)
9. Kim Z.-H., Lee Y., Kim S.-M., Kim H., Yun C.-K., Choi Y.-S. A Composite Dermal Filler Comprising Cross-Linked Hyaluronic Acid and Human Collagen for Tissue Reconstruction. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, vol. 25, no. 3, pp. 399–406. <https://doi.org/10.4014/jmb.1411.11029>
10. Hahn S. K., Ohri R., Giachelli C. M. Anti-calcification of bovine pericardium for bioprosthetic heart valves after surface modification with hyaluronic acid derivatives. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2005, vol. 10, no. 3, pp. 218–224. <https://doi.org/10.1007/bf02932016>
11. Gaydash A. A., Krut'ko V. K., Kulak A. I., Skrotskaya K. V., Musskaya O. N., Zamara A. S., Danilova-Tret'yak S. M. Scanning electron microscopy of collagen-containing materials modified with silicon dioxide and hyaluronic acid. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk = News of Biomedical Sciences*, 2019, vol. 198, no. 3, pp. 68–83 (in Russian).
12. Gajjerman S., Narayanan K., Hao J., Qin C., George A. Matrix Macromolecules in Hard Tissues Control the Nucleation and Hierarchical Assembly of Hydroxyapatite. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 282, no. 2, pp. 1193–1204. <https://doi.org/10.1074/jbc.m604732200>
13. Veis A., Dorvee J. R. Biomineralization Mechanisms: A New Paradigm for Crystal Nucleation in Organic Matrices. *Calcified Tissue International*, 2012, vol. 93, no. 4, pp. 307–315. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9678-2>
14. Bellami L. *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*. Springer, 1975. 433 p. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-6017-9>
15. Krut'ko V. K., Kazbanov V. V., Musskaya O. N., Gaidash A. A., Kulak A. I., Chekan N. M., Serdobintsev M. S., Skrotskaya K. V. Physicochemical Properties and Structure of the Bone Matrix in Simulated Tuberculous Osteitis. *Technical Physics*, 2019, vol. 64, no. 1, pp. 121–126. <https://doi.org/10.1134/S1063784219010183>

Информация об авторах

Гайдаш Александр Александрович – д-р мед. наук, профессор, вед. науч. сотрудник. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: jack200@ngs.ru.

Крутько Валентина Константиновна – канд. хим. наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tsuber@igic.bas-net.by.

Кулак Анатолий Иосифович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор, директор. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulak@igic.bas-net.by.

Мусская Ольга Николаевна – канд. хим. наук, доцент, ст. науч. сотрудник. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: musskaja@igic.bas-net.by.

Скροцкая Катарина Владимировна – инженер. Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Katarinaskr@gmail.com.

Будейко Николай Леонович – канд. хим. наук, заведующий лабораторией. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: bnl@igic.bas-net.by.

Information about the authors

Gaidash Alexander A. – D. Sc. (Medicine), Professor, Chief researcher. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: jack200@ngs.ru.

Krut'ko Valentina K. – Ph. D. (Chemistry), Assistant professor, Head of the Laboratory. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tsuber@igic.bas-net.by.

Kulak Anatoly I. – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor, Director. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulak@igic.bas-net.by.

Musskaya Olga N. – Ph. D. (Chemistry), Assistant professor, Senior researcher. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: musskaja@igic.bas-net.by.

Skrotskaya Katarina V. – Engineer. Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Katarinaskr@gmail.com.

Budeiko Nikolay L. – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bnl@igic.bas-net.by.