

## **Влияние пористости материалов на основе трикальциевого фосфата на поведение мезенхимных стволовых клеток**

**П. В. Евдокимов, А. К. Киселева, Д. С. Ларионов,  
Е. С. Новоселецкая, А. Ю. Ефименко, И. М. Щербаков,  
Г. А. Шипунов, В. Э. Дубров, В. И. Путляев**

Исследовано поведение первично выделенных стромальных клеток человека, включая дермальные фибробласты и мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК), при взаимодействии с керамическими материалами на основе трикальциевого фосфата (ТКФ) с различным размером пор. Изучено влияние эмульгатора на реологические характеристики фотоотверждаемых эмульсий на основе фосфата кальция. Продемонстрирована зависимость условий получения фотоотверждаемых эмульсий на размер пор в керамических материалах на основе  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Проведены исследования биосовместимости макропористой биокерамики при культивировании стромальных клеток человека и влияния образцов материала с различным размером пор на транскрипционную активность МСК *in vitro*.

**Ключевые слова:** биокерамика, регенерация костной ткани, фосфаты кальция, макропористость.

**DOI: 10.30791/1028-978X-2023-6-24-32**

### **Введение**

Керамические материалы для реконструкции костной ткани должны удовлетворять определенному набору требований, среди которых особенно важными являются резорбируемость, остеокондуктивность и остеоиндуктивность [1 – 3]. Резорбируемость материала (коррелирующая с его растворимостью) в значительной мере определяется его химическим составом. Интенсивно используемая ранее малорастворимая биокерамика на основе гидроксипатита (ГА)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  в настоящее время уступает место резорбируемым составам, содержащим более резорбируемый трикальцийфосфат  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (ТКФ) или его смеси с ГА [4, 5].

Остеокондуктивность — комплексная характеристика, которая описывает определенный тип остеогенеза, развивающийся на границе имплантата с растущей в него костной тканью; при этом остеобласты с края костного дефекта распро-

страняются на имплантат для создания новообразованной кости. Остеокондуктивный имплантат способствует прорастанию в него костной ткани как за счет присущей ему пористости, так и за счет физико-химических свойств поверхности, которые обеспечивают адгезию и пролиферацию остеогенных клеток [6]. Остеокондуктивные свойства обычно связывают с определенной макроструктурой (архитектурой) материала: с долей, распределением и размером пор. Считается, что распределение пор по размерам должно иметь бимодальный или даже мультимодальный характер [7 – 9]. Поры самой крупной моды (от 100 до 1000 мкм и соединяющие их переходы с диаметром не менее 50 мкм) определяют способность к врастанию костной ткани *de novo* в пористый материал. Доля крупных пор должна превышать 40 % для устойчивой интеграции новообразованной кости; современные макропористые имплантаты проектируют с долей пор от 60 до 90 % объема имплантата [10, 11], что априори предполагает связанный характер крупных пор.

Последнее исключительно важно для обеспечения проницаемости имплантата для различных биологических потоков. Относительно характеристики пор малой и средней мод консенсус, по-видимому, пока не достигнут.

Остеоиндукция описывает костеобразование не только на границе контакта материала с костью, но и во всем его объеме за счет трансформации малодифференцированных клеток в остеобласты или хондроцитов из окружающих тканей на поверхности материала с формированием кости *de novo*. Это предполагает присутствие в материале специальных стимулов направленной дифференцировки клеток в остеогенную линию. Выделяют несколько групп остеоиндуцирующих стимулов — биохимические, механические, гидродинамические и электрические. Наиболее известны биохимические стимулы — низкомолекулярные органические вещества или специальные белки (факторы), среди которых особое значение имеет семейство морфогенетических костных белков (Bone Morphogenetic Protein — BMP) [12]. Придание остеоиндуктивных свойств искусственным остеопластическим материалам за счет “нагружения” их белками BMP — довольно распространенный прием, значимость которого, однако, начинает снижаться [13]. Механический стимул включает в себя описание жесткости имплантата (упругие модули), а также кривизну поверхности, ее микрорельеф, а также деформацию [14]. В работе [15] продемонстрирован определяющий эффект жесткости клеточного субстрата на направленную дифференцировку клеток. В работе [16] показано, что вогнутая поверхность материала, напрягающая актиновый цитоскелет клеток, запускает целый каскад биохимических превращений, направляя дифференцировку и способствуя их пролиферации.

Современные материалы для регенерации костной ткани представляют собой, фактически, тканеинженерные конструкции — субстрат с мультимодальной пористостью (скаффолд), наполненный активными элементами, например, малодифференцированными (стволовыми) клетками [17]. Пористость скаффолда является необходимым условием остеоиндуктивных свойств, однако, кривизна поверхности пор средней моды (50 – 250 мкм) способна вызвать и остеоиндуцирующий эффект. В этой связи вопрос о влиянии доли и размера пор материала на эволюции культивируемых клеток приобретает особое значение.

Мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) являются источниками остеобластов при обновлении костной ткани и ее

регенерации при повреждениях. Ранее авторами с помощью МТТ теста и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) было показано поддержание жизнеспособности и изменение морфологии МСК при культивировании на макропористой керамике на основе ТКФ [18].

Цель настоящей работы — анализ влияния размера пор макропористой керамики на основе ТКФ, на первично выделенные стромальные клетки человека, включая дермальные фибробласты и МСК.

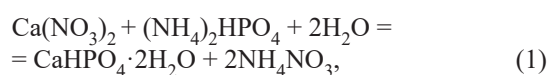
Пористая керамика на основе ТКФ с варьируемыми характеристиками порового пространства была изготовлена разрабатываемым нами методом фотоотверждаемых эмульсий [19].

### Материалы и методы исследования

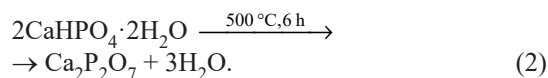
Для получения фотоотверждаемых эмульсий использовали следующие реактивы: трикальцевый фосфат (ТКФ)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , ПЭГДА-700 (полиэтиленгликоль диакрилат молекулярной массы 700 Да, Sigma Aldrich, Германия), дистиллированную воду, парафиновое масло (Sigma Aldrich, Германия), полиакриловую кислоту (Sigma Aldrich, Германия), эмульгатор полиэтоксिलированное касторовое масло (PECO, Sigma Aldrich, Германия), фотоинициатор дифенил(2,4,6-триметилбензоил) фосфин оксид (Sigma Aldrich, Германия).

ТКФ  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  синтезировали твердофазным методом из карбоната кальция  $\text{CaCO}_3$  (99,0 %, Sigma Aldrich, Германия) и пиррофосфата кальция (ПФК)  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . ПФК синтезировали путем термического разложения монокальцевого фосфата моногидрата (брушита)  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

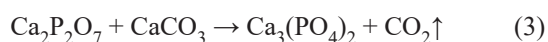
Брушит  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  осаждали по реакции



сливанием растворов с эквимольным содержанием  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (99,0 %, Sigma Aldrich, Германия) и  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (99,0 %, Fluka Analytical, Германия), при последующем перемешивании в течение 15 мин. Полученный осадок фильтровали на воронке Бюхнера, высушивали и подвергали термической обработке на воздухе при 500 °С. В процессе термической обработки протекала реакция постепенной дегидратации брушита, которую можно выразить в виде реакции):



ПФК  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  и карбонат кальция  $\text{CaCO}_3$  в мольном соотношении 1:1 смешивали в планетарной мельнице Pulverisette (Fritsch, Германия) в течение 15 мин, с соотношением по массе “мельющие тела порошок: ацетон” = 5:1:1. После помола полученные смеси высушивали на воздухе, после чего подвергали термической обработке при 900 °С в течение 6 ч. В процессе термообработки протекала следующая реакция:



Для приготовления фотоотверждаемых эмульсий необходимое количество эмульгатора (0,05, 0,15 и 0,25 %) растворяли в дистиллированной воде и смешивали с равным количеством раствора ПЭГДА с фотоинициатором, после чего добавляли в смесь различное количество порошка ТКФ (10, 20 и 30 об. %). Затем добавляли парафиновое масло (50 об. %) и перемешивали на лабораторном планетарном миксере SpeedMixer DAC 150 (Германия).

Рентгенографические исследования порошков проводили на дифрактометре Rigaku D/Max-2500 с вращающимся анодом (Япония). Съемку проводили в режиме на отражение (геометрия Брегга – Брентано) с использованием  $\text{CuK}_\alpha$  излучения (средняя длина волны = 1,54183 Å).

Исследование микроструктуры композитов осуществляли методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) на растровом электронном микроскопе с автоэмиссионным источником NVision 40 (Carl Zeiss, Германия).

Термогравиметрический (ТГ) и дифференциально-термический анализ (ДТА) композитов проводили с использованием синхронного термоанализатора с вертикальной загрузкой образцов STA 449 F3 Jupiter (Netzsch, Германия). Измерения композитов вели в воздушной атмосфере.

Для *in vitro* исследований в работе были использованы первично выделенные МСК жировой ткани и дермальные фибробласты человека, полученные из биобанка Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова. МСК культивировали с использованием базальной среды AdvanceSTEM (HyClone, США) с добавлением 10 % Mesenchymal Stem Cell Growth AdvanceSupplement (HyClone, США 1 %) раствора пенициллина/стрептомицина (HyClone, США), 1 % GlutaMAX-1 (Gibco, США). Дермальные фибробласты человека культивировали с использованием базальной среды DMEM low glucose (Gibco, США) с добавлением 10 %-й фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США), 1 %-го раство-

ра пенициллина/стрептомицина (HyClone, США), 1 %-го раствора GlutaMAX-1 (Gibco, США). Культивирование проводили при условиях поддержания 5 %  $\text{CO}_2$  и 37 °С. Среду меняли каждые 3 дня.

Исследуемые материалы были простерилизованы в сухожаре при 180 °С в течение 60 мин в пакетах из крафт-бумаги “СтериТ®” (производство “Винар НПФ”, Россия). Качество стерилизации контролировали с помощью индикаторов “СтериТЕСТ-Вл” (производство “Винар НПФ”, Россия). Далее перед посадкой клеток образцы помещали в среду для культивирования и инкубировали в течение 1 ч. Затем среду отбирали и проводили посадку клеток.

Первично выделенные стромальные клетки человека — фибробласты дермы и МСК были высажены на материал в количестве 250 тыс.кл./мл. Клетки культивировали в течение 3-х дней, после чего проанализировали равномерность распределения клеток и их прикрепление к образцам материала с помощью окраски кристаллическим фиолетовым (0,5 % спиртового раствора).

Далее для первично выделенных МСК человека было определено изменение уровня транскрипционной активности в зависимости от среднего размера пор поверхности исследуемого материала по отношению мРНК гена домашнего хозяйства RPLP0(Ct) к тотальному количеству РНК. Уровень мРНК гена домашнего хозяйства RPLP0(Ct) был оценен с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием набора для выделения тотальной мРНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, Великобритания), набора для проведения обратной транскрипции — MMLV Reverse Transcription Kit (Евроген, Россия) и набора для проведения ПЦР в реальном времени qPCRMix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия). Последовательности прямого и обратного праймера были использованы из ранее подобранной коллекции праймеров [20].

## Результаты и их обсуждение

Условия получения эмульсий (скорость перемешивания, скорость сдвига при перемешивании, время и т.д.) сильно влияют на их конечное состояние, например, стабильность, размер капель. Для определения оптимальных условий получения эмульсий был проведен ряд экспериментов по влиянию скорости и времени перемешивания на стабильность эмульсий и распределение пор по размерам в керамических материалах, полученных на их основе. Были выбраны эмульсии с 0,05, 0,2

Таблица 1

Данные среднего диаметра размера пор в керамических материалах в зависимости от времени и скорости перемешивания фотоотверждаемых эмульсий с различным содержанием эмульгатора и фиксированным содержанием (30 об. %) ТКФ

Table 1

Data on average pore size in ceramic materials as a function of time and speed of mixing of photoemulsions with different emulsifier contents and a fixed content (30 vol. %) of TCP

Содержание эмульгатора, масс. %	Диаметр пор в керамических материалах в зависимости от скорости и времени перемешивания, мкм								
	Скорость перемешивания, об/мин								
	2000			2750			3500		
	Время перемешивания, мин								
	1	5	20	1	5	20	1	5	20
0,05	79 ± 45	108 ± 30	101 ± 57	90 ± 42	52 ± 24	—	115 ± 42	—	—
0,2	18 ± 8	17 ± 9	20 ± 14	17 ± 7	15 ± 11	35 ± 30	26 ± 20	49 ± 31	—
1	17 ± 4	18 ± 4	16 ± 6	18 ± 6	19 ± 7	22 ± 5	20 ± 5	26 ± 11	40 ± 14

и 1 масс. % эмульгатора, скорости перемешивания в планетарном миксере варьировались от 2000 до 3500 об/мин, время перемешивания было выбрано 1, 5 и 20 мин.

В табл. 1 представлены средний диаметр пор в керамических материалах, полученных из эмульсий с различным содержанием эмульгатора и фиксированным содержанием (30 об. %) ТКФ. При низких содержаниях эмульгатора, при скорости перемешивания равной 3500 об/мин происходит небольшое отделение масляной фазы уже при небольшом времени перемешивания, увеличение

времени перемешивания приводит к полному расслоению эмульсии, что связано с недостаточным содержанием эмульгатора и разделению фаз за счет “центрифугирования” разных по плотности фаз. Подобный эффект наблюдается и при длительном перемешивании со скоростью 2750 об/мин. Уменьшение размера пор при 5 мин перемешивания на скорости 2750 об/мин связано с тем, что произошло отслоение дисперсной фазы от эмульсии, тем самым в стабильной части эмульсии уменьшилась объемная доля масла, а используемого количества эмульгатора хватило для стабилизации эмульсии с меньшим размером капель и более узким распределением пор по размерам. На рис. 1 представлена зависимость размера пор в керамических материалах, полученных из эмульсии с 0,2 масс. % эмульгатора, в зависимости от скорости и времени перемешивания. Длительные времена перемешивания при высоких скоростях перемешивания также приводит к расслоению эмульсии данного состава. Изменение скорости и времени перемешивания для эмульсий с увеличенным содержанием эмульгатора до 1 % практически не влияет на размеры пор в макропористой керамике, за исключением длительного перемешивания при высоких скоростях.

На рис. 2 представлены условия для получения стабильных фотоотверждаемых эмульсий с содержанием 0,05 масс. % эмульгатора для получения макропористых керамических материалов на основе ТКФ. Для последующего изучения эмульсий были выбраны условия, которые позволяют получать стабильные эмульсии для различного содержания эмульгатора: скорость 2000 об/мин и 1 мин перемешивания, что также является оптимальным

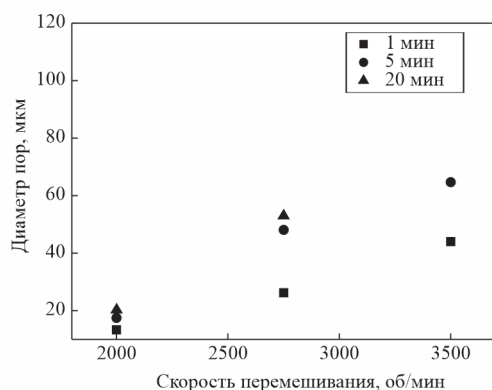


Рис. 1. Зависимость размера пор в керамических материалах от скорости и времени перемешивания. УФ-полимеризацию проводили сразу после приготовления эмульсии с 0,2 масс. % эмульгатора.

Fig. 1. Pore size in ceramic materials as a function of stirring speed and time, UV-polymerization was performed immediately after emulsion preparation with 0.2 wt. % emulsifier.

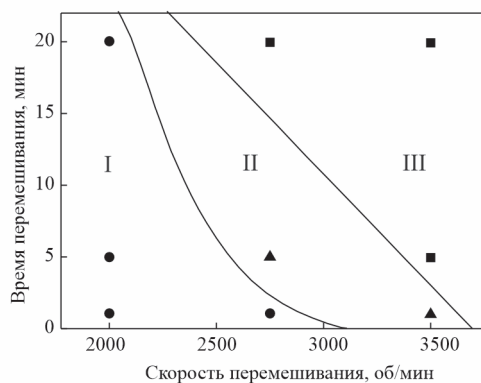


Рис. 2. Условия для получения стабильных фотоотверждаемых эмульсий с содержанием 0,05 масс. % эмульгатора для получения макропористых керамических материалов на основе ТКФ. Область I — поле условий, которые позволяют создавать стабильные эмульсии, область II — условия, при которых происходит незначительное отделение масляной фазы, область III — происходит значительное расслоение фаз, что приводит к уменьшению доли пор в керамическом материале.

Fig. 2. Conditions for obtaining stable photocured emulsions with 0.05 wt. % emulsifier for obtaining TCP-based macroporous ceramic materials. Area I — the field of conditions that allow creating stable emulsions, area II — conditions under which there is a slight separation of the oil phase, area III — there is a significant separation of phases, which leads to a decrease in the pore fraction in the ceramic material.

с точки зрения затраты времени и энергии для получения подобного рода эмульсий.

Для расчета среднего размера пор в керамических материалах полученных из фотоотверждаемых эмульсий проведены исследования методом РЭМ сколов соответствующих керамик. Для определения размеров пор из данных РЭМ было использовано открытое программное обеспечение ImageJ. Исходное изображение РЭМ (рис. 3а) сегментировали на две области “керамика” и “поры” (рис. 3б) с использованием машинного обучения. После применения фильтров для удаления “шума” на изображении получали ч/б картинку, где белая область соответствовала поровому пространству (рис. 3с). В дальнейшем, анализируя изображения данного типа, определяли средний размер пор керамических материалов на основе ТКФ, полученных из фотоотверждаемых эмульсий. Поры попадающие на границу изображения не учитывали при расчете. Среднее количество пор для определения распределения пор по размерам составляло не менее 400 на образец. Увеличение содержания

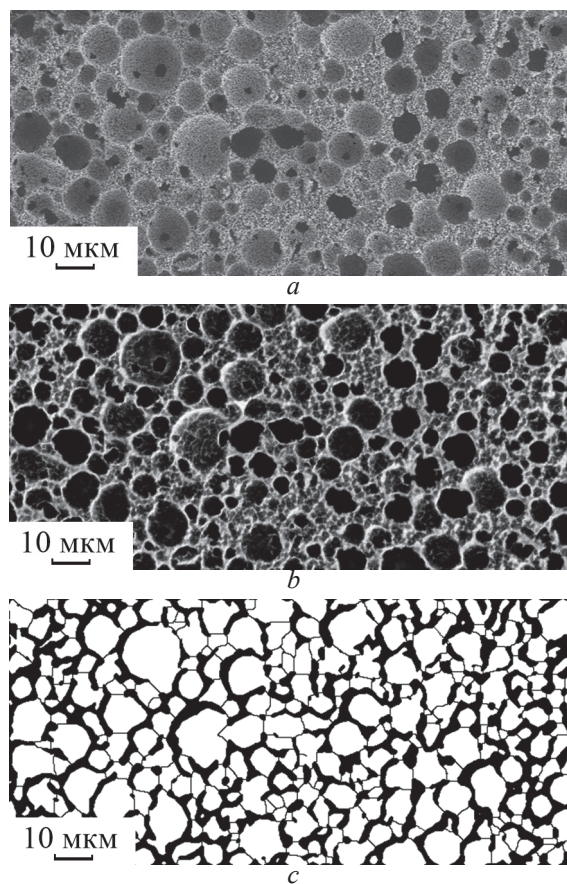


Рис. 3. Схема обработки РЭМ изображения для оценки размера пор в керамическом материале на примере керамики, полученной из эмульсии с содержанием 0,05 масс. % эмульгатора: а — исходное РЭМ изображение, б — сегментированное на “керамику” и “поры” изображение, полученное после обработки с использованием машинного обучения, с — выделение пор для расчета среднего размера и доли пор.

Fig. 3. SEM image processing scheme for estimating the pore size in a ceramic material using the example of ceramics obtained from an emulsion with 0.05 wt. % emulsifier: a — original SEM image, b — image segmented into “ceramics” and “pores” obtained after processing using machine learning, c — pore selection for calculating the average size and proportion of pores.

эмульгатора приводит к уменьшению размера капель масла в исследуемых эмульсиях, что в итоге приводит к повышению их вязкости (рис. 4).

Оценка влияния среднего размера пор поверхности макропористых керамических материалов на основе ТКФ на стромальные клетки человека представлена на рис. 5 и 6. Фотографии фибробластов дермы человека, культивируемых на экспериментальных образцах и окрашенные кристаллическим

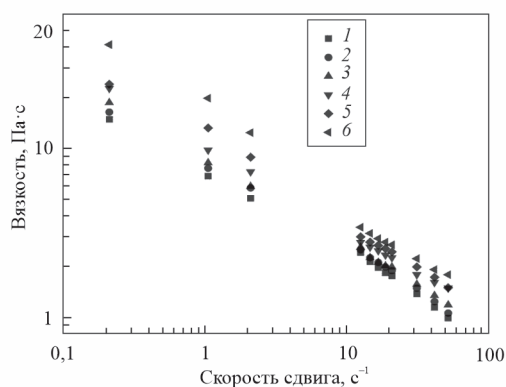


Рис. 4. Зависимости вязкости для эмульсий с различным содержанием эмульгатора PECO, в масс. %: 1 — 0,035, 2 — 0,05, 3 — 0,1, 4 — 0,15, 5 — 0,2, 6 — 0,25.

Fig. 4. Viscosity dependences for emulsions with different contents of PECO emulsifier, in wt. %: 1 — 0.035, 2 — 0.05, 3 — 0.1, 4 — 0.15, 5 — 0.2, 6 — 0.25.

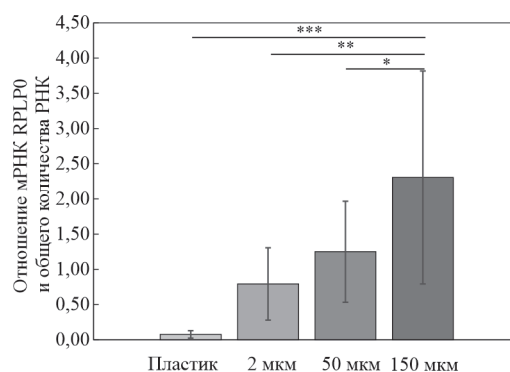


Рис. 6. Зависимость уровня транскрипции МСК человека от размера пор материала по отношению мРНК гена домашнего хозяйства RPLP0(Ct) к общему количеству РНК, выделенному из клеток.

Fig. 6. Graph of changes in the transcription level of human MSCs depending on the pore size of the material in relation to the mRNA of the housekeeping gene RPLP0(Ct) to the total amount of RNA.

фиолетовым на 3 день культивирования получены с помощью стереомикроскопа Nikon SMZ18.

Стромальные клетки человека после высаживания на образцы материала равномерно прикре-

плялись к поверхности и сохраняли способность к адгезии и фибробластоподобную морфологию при культивировании в течение трех дней вне зависимости от среднего размер пор (рис. 5). Однако, мы

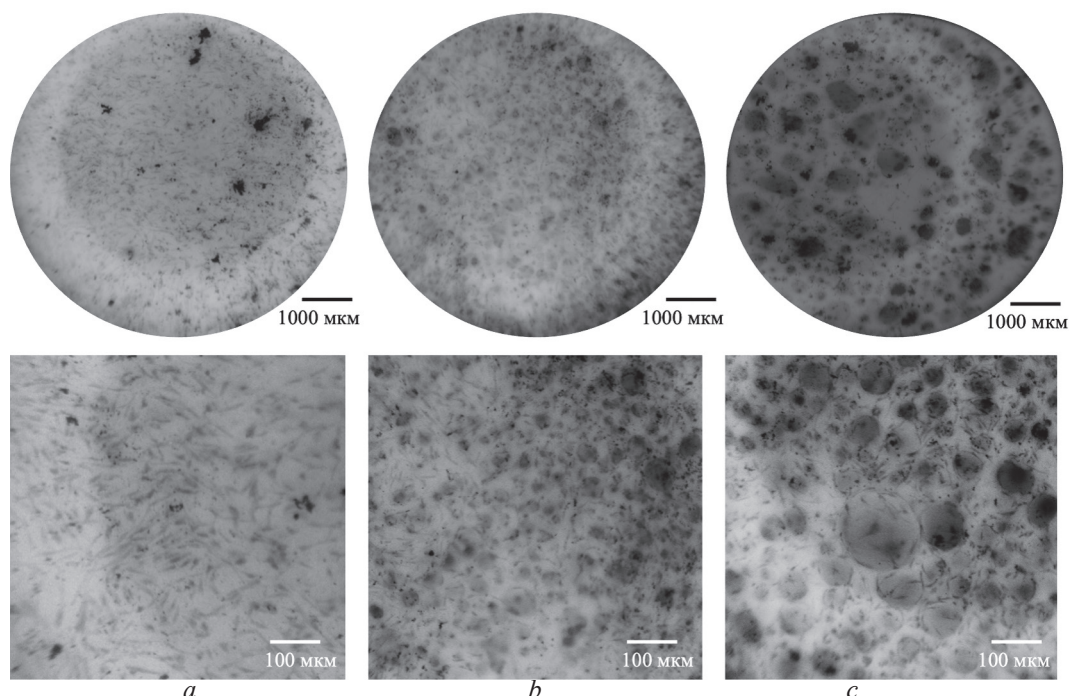


Рис. 5. Результаты при культивировании фибробластов дермы человека на образцах керамики со средним размером пор 2 (a), 50 (b) и 150 (c) мкм, окрашенные кристаллическим фиолетовым на 3 день культивирования.

Fig. 5. The results of the cultivation of human dermal fibroblasts on ceramic samples with an average pore size of 2 (a), 50 (b) and 150 (c) μm, stained with crystal violet on day 3 of cultivation.

обнаружили, что транскрипционная активность МСК различается при культивировании клеток на образцах биокерамики с разным размером пор. Статистически значимые различия были обнаружены для клеток, культивируемых на образцах материала со средним размером пор 150 мкм, как при сравнении с контролем (культуральным пластиком), так и с клетками, которые культивировали на образцах фосфатной керамики с порами меньшего размера (рис. 6).

## Выводы

Продемонстрировано поведение стромальных клеток человека, включая МСК и фибробласты дермы, при взаимодействии с керамическими материалами на основе трикальциевого фосфата в зависимости от различного размера пор.

Исследовано влияние эмульгатора на релогические характеристики фотоотверждаемых эмульсий на основе фосфата кальция. Продемонстрирована зависимость условий получения фототверждаемых эмульсий на размер пор в керамических материалах на основе  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

Проведены исследования воздействия макропористой биокерамики на общую транскрипционную активность МСК *in vitro*. Предложенные в работе пористые керамические материалы демонстрируют хорошую биосовместимость при взаимодействии с исследованными клетками *in vitro*, а с помощью модулирования средних размеров пор можно, по-видимому, регулировать транскрипцию генов в клетках, участвующих в регенерации костной ткани.

Представлен подход для получения определенного размера пор в макропористой керамике, который может быть использован для создания керамики с мультимодальным распределением пор.

*Работа выполнена в рамках гранта РНФ 20-79-10210. Результаты, представленные в работе, получены на оборудовании ЦКП ФМИ ИОНХ РАН, а также приобретённом за счет средств Программы развития Московского университета.*

## Литература/References

1. Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V., Forgacs G., Drake C.J., Markwald R.R. Organ Printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 2009, no. 30, pp. 2164 – 2174.
2. Zocca A., Colombo P., Gomes C.M., Gunsher J. Additive Manufacturing of Ceramics: Issues, Potentialities, and Opportunities. *J. Am. Ceram. Soc.*, 2015, v. 98, no. 7, pp. 1984 – 2001.
3. Uchida A., Nade S.M.L., McCartney E., Ching W. The use of ceramics for bone replacement. a comparative study of three different porous ceramics. *J. of Bone Joint Surg. Br.*, 1984, v. 66-B, no. 2, pp. 269 – 275.
4. LeGeros R.Z., Lin S., Rohanizadeh R., Mijares D., Legeros J.P. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2003, v. 14, no. 3, pp. 201 – 209.
5. Seidenstuecker M., Kerr L., Bernstein A., Mayr H.O., Suedkamp N.P., Gadow R., Krieg P., Hernandez Latorre S., Thomann R., Syrowatka F., Esslinger S. 3D powder printed bioglass and  $\beta$ -tricalcium phosphate bone scaffolds. *Materials (Basel)*, 2017, v. 11, no. 13, pp. 1 – 21.
6. Cancedda R., Dozin B., Giannoni P., Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*, 2003, v. 22, pp. 81 – 91.
7. Hsu Y., Turner I., Miles A. Fabrication of porous bioceramics with porosity gradients similar to the bimodal structure of cortical and cancellous bone. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 2007, v. 18, no. 12, pp. 2251 – 2256.
8. Баринов С.М., Комлев В.С. Подходы к созданию пористых материалов на основе фосфатов кальция, предназначенных для регенерации костной ткани. *Неорганические материалы*, 2016, т. 52, № 4, с. 383 – 391.
9. Barinov S.M., Komlev V.S. Podkhody k sozdaniyu poristykh materialov na osnove fosfatov kalcziya, prednaznachennykh dlya regeneraczii kostnoj tkani [Approaches to the creation of porous materials based on calcium phosphates intended for bone tissue regeneration]. *Neorganicheskie materialy [Inorganic Materials]*, 2016, v. 52, no. 4, pp. 383 – 391.
10. Hasegawa M., Sudo A., Komlev V.S., Barinov S.M., Uchida A. High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 2004, v. 70-B, pp. 332 – 339.
11. Chang B.S., Lee C.K., Hong K.S., Youn H.J., Ryu H.S., Chung S.S., Park K.W. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*, 2000, v. 21, no. 12, pp. 1291 – 1298.
12. Studart A.R., Gonzenbach U.T., Tervoort E., Gauckler L.J. Processing routes to macroporous ceramics: A review. *J. Am. Ceram. Soc.*, 2000, v. 89, pp. 1771 – 1789.
13. Reddi A.H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat. Biotechnol.*, 1998, v. 16, no. 3, pp. 247 – 252.
14. James A.W., LaChaud G., Shen J., Asatrian G., Nguyen V., Zhang X., Ting K., Soo C. A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2016, v. 22(4), pp. 284 – 297.
15. Rosa N., Simoes R., Magalhães F.D., Marques A.T. From mechanical stimulus to bone formation: A review. *Med. Eng. Phys.*, 2015, v. 37, no. 8, pp. 719 – 728.

15. Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.*, 2006, v. 126, no. 4, pp. 677 – 689.
16. Bidan C.M., Kommareddy K.P., Rumpfer M., Kollmannsberger P., Bréchet Y.J. M., Fratzl P., Dunlop J.W.C. How linear tension converts to curvature: geometric control of bone tissue growth. *Plos One*, 2012, v. 7, no. 5, pp. 1 – 11.
17. Almubarak S., Nethercott H., Freeberg M., Beaudon C., Jha A., Jackson W., Marcucio R., Miclau T., Healy K., Bahney C. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. *Bone*, 2016, v. 83, pp. 197 – 209.
18. Евдокимов П.В., Тихонова С.А., Киселева А.К., Филиппов Я.Ю., Новоселецкая Е.С., Ефименко А.Ю., Путляев В.И. Влияние размера пор на биологическую активность резорбируемых макропористых керамических материалов на основе  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , полученных методом фотополимеризации. *Журнал неорганической химии*, 2021, т. 66, № 11., с. 1507 – 1513.
- Evdokimov, P.V., Tikhonova, S.A., Kiseleva, A.K. et al. Vliyaniye razmera por na biologicheskuyu aktivnost rezorbiруemykh makroporistykh keramicheskikh materialov na osnove  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , poluchennykh metodom fotopolimerizatsii [Effect of the pore size on the biological activity of  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -based resorbable macroporous ceramic materials obtained by photopolymerization]. *Zhurnal Neorganicheskoi Khimii* [Russ. J. Inorg. Chem.], 2021, v. 66, pp. 1609–1615.
19. Тихонова С.А., Евдокимов П.В., Просвирнин Д.В., Путляев В.И. Формирование пористой керамики на основе  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  из фотоотверждаемых эмульсий. *Материаловедение*, 2021, № 7., с. 43 – 48.
- Tikhonova S.A., Evdokimov P.V., Prosvirnin D.V. et al. Formirovaniye poristoy keramiki na osnove  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  iz fotootverzhdayemykh emulsiy [Formation of porous  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -based ceramic from photocurable emulsions]. *Materialovedenie* [Inorg. Mater. Appl. Res.], 2022, v. 13, pp. 205 – 210.
20. Novoseletskaaya E., Grigorieva O., Nimiritsky P., Basalova N., Eremichev R., Milovskaya I., Kulebyakin K., Kulebyakina M., Rodionov S., Omelyanenko N., Efimenko A. Mesenchymal stromal cell-produced components of extracellular matrix potentiate multipotent stem cell response to differentiation stimuli. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2020, v. 8, art. no. 555378, pp. 1 – 25.

*Статья поступила в редакцию — 12.04.2022 г.  
после доработки — 28.04.2022 г.  
принята к публикации — 29.04.2022 г.*

**Евдокимов Павел Владимирович** — Институт общей и неорганической химии Российской академии наук (119334, Москва, Ленинский проспект, 31); Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (119191, Москва, Ленинские горы 1, стр. 3), кандидат химических наук, научный сотрудник, специалист в области биокерамики, спекания фосфатов кальция. E-mail: pavel.evdokimov@gmail.

**Киселева Анна Константиновна** — Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (119191, Москва, Ленинские горы 1, стр. 3), студентка, специалист в области биоматериалов, спекания фосфатов кальция. E-mail: anyatca@ya.ru.

**Ларионов Дмитрий Сергеевич** — Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (119191, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3), младший научный сотрудник, специалист в области биоматериалов, получения фосфатов кальция. E-mail: dmielar@gmail.com.

**Новоселецкая Екатерина Сергеевна** — Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, 1), кандидат биологических наук, лаборант-исследователь, специалист в области стволовых клеток. E-mail: kuznesova2793@mail.ru.

**Ефименко Анастасия Юрьевна** — Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, 1), кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией репарации и регенерации тканей. E-mail: efimenkoan@gmail.com.



**Щербаков Иван Михайлович** — Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, 1), ассистент кафедры общей и специализированной хирургии ФФМ МГУ, специалист в области регенерации костной ткани. E-mail: [imscherbakov@yandex.ru](mailto:imscherbakov@yandex.ru).

**Шипунов Георгий Александрович** — Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3), аспирант, специалист в области регенерации костной ткани. E-mail: [shipunovgeorge@gmail.com](mailto:shipunovgeorge@gmail.com).

**Дубров Вадим Эрикович** — Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, 1), доктор медицинских наук, заведующий кафедрой общей и специализированной хирургии, специалист в области регенерации костной ткани. E-mail: [vduort@gmail.com](mailto:vduort@gmail.com).

**Путляев Валерий Иванович** — Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова (119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3), кандидат химических наук, доцент, специалист в области материаловедения. E-mail: [valery.putlayev@gmail.com](mailto:valery.putlayev@gmail.com).

---

## Effect of porosity of tricalcium phosphate-based materials on the behavior of mesenchymal stem cells

**P. V. Evdokimov, A. K. Kiseleva, D. S. Larionov,  
E. S. Novoseletskaya, A. Yu. Efimenko, I. M. Scherbakov,  
G. A. Shipunov, V. E. Dubrov, V. I. Putlayev**

The behavior of mesenchymal stem cells depending on different pore sizes of ceramic materials based on tricalcium phosphate was studied. The effect of the emulsifier on the rheological characteristics of calcium phosphate-based photosensitive emulsions was investigated. The dependence of the conditions of photosensitive emulsions on the pore size in ceramic materials based on  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  has been demonstrated. Studies on the biocompatibility of macroporous bioceramics in medical and biological tests in vitro were carried out.

**Keywords:** bioceramics, bone tissue regeneration, calcium phosphates, macroporosity

---

**Evdokimov Pavel** — Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskiye Gory 1, bld. 3), PhD (chem.), assistant professor, specialist in the field of material science. E-mail: [pavel.evdokimov@gmail.com](mailto:pavel.evdokimov@gmail.com).

**Kiseleva Anna** — Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskiye Gory 1, bld. 3), student, specialist in calcium phosphate. E-mail: [anyatca@ya.ru](mailto:anyatca@ya.ru).

**Larionov Dmitrii** — Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskiye Gory 1, bld. 3), engineer, specialist in calcium phosphate. E-mail: [dmselar@gmail.com](mailto:dmselar@gmail.com).

**Novoseletskaya Ekaterina** — Lomonosov Moscow State University, (119991, Moscow, Leninskie Gory, 1), PhD (biology), researcher, specialist in the field of stem cells. E-mail: [kuznecova2793@mail.ru](mailto:kuznecova2793@mail.ru).

**Efimenko Anastasiya** — Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskie Gory, 1), PhD (medicine), head of the lab of reparation and regeneration of tissues. E-mail: [efimenkoan@gmail.com](mailto:efimenkoan@gmail.com).

**Shipunov Georgii** — Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskiye Gory, 1), PhD student, specialist in the field of bone tissue regeneration. E-mail: shipunovgeorge@gmail.com.

**Scherbakov Ivan** — Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskiye Gory 1, bld. 3), PhD (chem.), assistant professor, specialist in the field of bone tissue regeneration. E-mail: imscherbackov@yandex.ru.

**Dubrov Vadim** — Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskiye Gory 1), Dr. Sci. (Medicine), head of the general and specialized surgery, specialist in the field of bone tissue regeneration. E-mail: vduort@gmail.com.

**Putlayev Valery** — Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskiye Gory , bld. 3), PhD (chem.), associated professor, specialist in the field of material science. E-mail: valery.putlayev@gmail.com.