

## ОКТАКАЛЬЦИЕВЫЙ ФОСФАТ, ДОПИРОВАННЫЙ КАТИОНАМИ БАРИЯ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

© 2025 г. И.В. Смирнов\*, П.В. Смирнова\*, А.Ю. Тетерина\*, В.В. Минайчев\*, \*\*, М.И. Кобякова\*, \*\*, П.С. Салынкин\*\*, А.И. Звягина\*\*, К.В. Пятина\*, \*\*, Е.И. Мещерякова\*\*, И.С. Фадеева\*, \*\*, #, С.М. Бариннов\*, В.С. Комлев\*

\*Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН,  
Ленинский просп., 49, Москва, 119334, Россия

\*\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: is\_fadeeva@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2025 г.

После доработки 05.02.2025 г.

Принята к публикации 19.02.2025 г.

Исследовано влияние допирования катионами бария порошка октакальцийфосфата, полученного с применением низкотемпературного подхода, на его фазовые и структурные характеристики, а также биосовместимость, в том числе в моделирующих воспаление условиях *in vitro*. Выявлено, что допирование катионами  $Ba^{2+}$  в использованном интервале концентраций (1, 5 и 10 расчетных %) не препятствует низкотемпературной химической трансформации дикальцийфосфата дигидрата и его превращению в октакальцийфосфат, однако реальное замещение составляет в максимуме 6.7 ат.%. Результаты исследований *in vitro* показывают, что замена ионов кальция на ионы бария в структуре октакальцийфосфата не приводит к повышению цитотоксических свойств; все изученные варианты низкотемпературного октакальцийфосфата и его барий-замещенных форм в рекомендованной концентрации 1 мг/мл не проявляют токсического действия и являются биосовместимыми. Выявленные для октакальцийфосфата с максимальной степенью замещения  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$ , равной 10%, эффекты, а именно: отсутствие влияния на содержание лизосом и активных форм кислорода в макрофагах человека в нормальных условиях и значительное снижение продукции активных форм кислорода в условиях, моделирующих воспаление, а также значимое повышение конститутивной активации Т-лимфоцитов *in vitro*, указывают на то, что данные процессы непосредственно и дозозависимо ассоциированы с катионами  $Ba^{2+}$  в составе октакальцийфосфата. Таким образом, предложенный подход низкотемпературной химической трансформации  $Ba^{2+}$ -замещенных вариантов октакальцийфосфата перспективен и представляет интерес для получения на основе кальций-фосфатных соединений материалов с иммунорегуляторными свойствами. Полученные  $Ba^{2+}$ -замещенные варианты октакальцийфосфата являются безопасными и биосовместимыми, при этом октакальцийфосфат с максимальной степенью замещения  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$  не только является биоактивным, но и обладает потенциальным антиоксидантным и иммуномодулирующим действием.

**Ключевые слова:** биокерамика, остеопластические материалы, низкотемпературная химическая трансформация, фосфаты кальция, октакальцийфосфат, допирование, барий-замещенные фосфаты кальция.

DOI: 10.31857/S0006302925020124, EDN: KYYYQQ

Среди современных тканеинженерных остеопластических материалов наибольшее распространение получили синтетические кальций-фосфатные соединения (КФС) — естественные предшественники гидроксиапатита костной тка-

ни [1, 2]. В сравнении с другими видами материалов для остеопластики синтез КФС прост и недорог, позволяет получать варианты с различной структурой, формой и необходимыми прочностными характеристиками [2]. Помимо этого, благодаря сходству с неорганической частью костной ткани, КФС обладают остеокондуктивными (т.е. способными обеспечивать адгезию, пролиферацию и миграцию клеток костной ткани на своей поверхности) и остеоиндуктивными

**Сокращения:** КФС — кальций-фосфатные соединения, ОКФ — октакальцийфосфат, ОКФ-Ва — барий-замещенные образцы октакальцийфосфата, ИК — инфракрасный, ДКФД — дикальцийфосфата дигидрат, АФК — активные формы кислорода, ЛПС — липополисахарид.

(т.е. способными стимулировать дифференцировку клеток-предшественников в клетки костной ткани) свойствами [2–4] и, как следствие, способны стимулировать регенерацию костной ткани в реципиентном ложе без инициации DAMP-ассоциированного иммунного ответа, развивающегося на поврежденный минеральный компонент костной ткани (гидроксиапатит) [5].

Одновременно с вышесказанным все более становится очевидным влияние остеоиммунологического ландшафта на эффективность остеоинтеграции и регенерации материалов в организме реципиента [6, 7]. При этом помимо разработки эффективных биоактивных материалов, ученым необходимо иметь «видимые» материалы, которые позволяют неинвазивно (например, рентгенографически) и безопасно для пациента отслеживать поведение материала на различных стадиях регенеративного процесса, в том числе непосредственно в иммунорегуляторной нише периимплантного ложа, с целью своевременной корректировки хирургического лечения тех или иных видов травм у пациентов как различного возраста, так и с различными сопутствующими заболеваниями.

Современные подходы, направленные на улучшение эффективности КФС-материалов, включают внедрение подхода биомиметического низкотемпературного синтеза [8–10], осуществляемого в интервале физиологических температур (температуры тела), а также различные модификации полученных КФС (например, замещение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на иные биоактивные ионы) за счет их химической и фазовой трансформации. По мнению ряда авторов, ионные замещения могут одинаково эффективно стабилизировать и дестабилизировать кристаллическую решетку КФС, обеспечивая как необходимую скорость резорбции, так и нужные биологические свойства (активация или ингибирование васкуляризации, пролиферации и дифференцировки остеобластов и остеокластов) [11–13]. Во время резорбции КФС в естественных условиях высвобождается большое количество ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$ . Это вызывает локальное повышение концентрации ионов до нефизиологических уровней, вплоть до запуска кальциптоза, что может оказывать значительное и преимущественно негативное влияние на многие регенераторные процессы. В основном при легировании КФС ионами различных двухвалентных металлов преследуется цель снизить скорость высвобождения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$ , что должно обеспечить долговременную эффективность ионных биологических функций в процессе формирования и перестройки костной ткани [2, 3, 14, 15].

В свою очередь, известно, что важным фактором, определяющим остеоиндуктивность материала, является специфическая воспалительная реакция тканей на КФС [16–18]. Одним из первых событий при попадании материала в биологическую среду является сорбция белков (альбумина, фибриногена, комплемента, фибронектина, витронектина,  $\gamma$ -глобулина и др.). Эти белки могут связываться со специфическими интегринами на мембране и инициировать взаимодействие между клетками и внеклеточным матриксом, влияя на такие важные типы поведения клеток, как адгезия, пролиферация и остеогенная дифференцировка [19–21]. Взаимодействие адсорбированных белков с рецепторами адгезии, присутствующими и в популяциях воспалительных клеток, представляет собой основную систему клеточного распознавания имплантируемых синтетических материалов, связанную с последующими воспалительными реакциями и заживлением ран [22–24]. Наличие имплантированного КФС обеспечивает приток ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , который путем хемотаксиса привлекает в раневое ложе макрофаги [25], которые, как известно, могут выделять цитокины, стимулирующие дифференцировку остеобластов из клеток-предшественниц [26]. При этом макрофаги, прикрепившиеся к поверхности биоматериала, могут сливаться, образуя гигантские клетки инородного тела [27], которые на фоне избытка  $\text{Ca}^{2+}$  в микроокружении и наличия не полностью растворенного КФС могут способствовать трансформации макрофагов в остеокласты, смещая таким образом баланс в сторону остеокластогенеза и, как следствие, способствуя дальнейшей резорбции как материала, так и костной ткани периимплантного ложа [28, 29]. Таким образом, КФС за счет своих физико-химических характеристик могут по-разному влиять на биологическое поведение клеток, участвующих в репаративном остеогенезе, и ученым, разрабатывающим «регенераторные» композитные материалы, необходимо управлять как физико-химическими, так и ассоциированными с ними биологическими свойствами КФС, одновременно придавая этим материалам «видимость», обеспечивающую получение знаний о динамике интеграции материала и его влиянии на репаративный гистогенез костной ткани в периимплантном ложе.

В настоящем исследовании было изучено влияние допированного катионами бария порошка октакальцийфосфата (ОКФ), полученного с применением низкотемпературного (в условиях, приближенных к физиологическим) подхода на его фазовые, структурные, морфологические и биологические характеристики, в том числе в специализированных провоспалительных *in vitro* условиях, с целью выявления биинтеграционного,

проинфламаторного и прорегенераторного потенциала полученных барий-замещенных вариантов ОКФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Сканирующая электронная микроскопия.** Морфологию барий-замещенных образцов ОКФ (ОКФ-Ва) исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа VEGA III (Tescan, Чехия) с встроенной системой энергодисперсионного анализа химического состава INCA Energy (Oxford Instruments, Великобритания). Перед исследованием образцы покрывали золотом с помощью установки Q150R (Quorum Technologies, Англия). Изображения поверхности материалов получали при давлении  $7.3 \cdot 10^{-2}$  Па в колонке и  $1.5 \cdot 10^{-1}$  Па в камере.

**Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия.** Для исследования примесей на поверхности порошков использовали ЭДС-приставку AZtec Energy X-act (Oxford Instruments, Великобритания) к электронному сканирующему микроскопу VEGA III и специализированное программное обеспечение Oxford AZtecO 4.3 (Oxford Instruments, Великобритания).

**Рентгенофазовый анализ.** Для оценки кристаллографической структуры фосфатов кальция проводили рентгенофазовый анализ с использованием рентгеновского дифрактометра XRD-600 (Shimadzu Corp., Япония). Дифрактограммы исследовали в диапазоне углов  $2\theta$  от  $10^\circ$  до  $45^\circ$  при напряжении на трубке 40 кВ и токе 100 мА. Дифракционные пики определяли по литературным данным и базе данных ICDD (International Center for Diffraction Data, Power Diffraction File; 2 Campus Blvd: Newtown Square, PA, USA, 2007).

**Инфракрасная спектроскопия.** Инфракрасные (ИК) спектры дикальцийфосфата дигидрата (ДКФД) регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре Avatar 330 (Nicolet, Великобритания) в диапазоне длин волн  $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$ . Для этого небольшое количество экспериментального порошкообразного ДКФД смешивали с бромидом калия (KBr) спектроскопической чистоты в соотношении 1:50. Исследование образцов на предмет их элементного состава (качественного и количественного) проводили с помощью рентгенофлуоресцентного волнодисперсионного спектрометра последовательного типа S8 Tiger (серия 2, BRUKER, Германия) в среде гелия. Методика анализа не предполагала использования стандартных образцов, а для обработки данных применяли специализированное программное обеспечение QUANT EXPRESS Software (Германия).

**Культуры клеток.** Моноциты и Т-лимфоциты периферической крови человека были получены

из CLS Cell Lines Service GmbH (Германия). Полученные клетки культивировали в среде RPMI/F12 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), 40 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) при температуре  $37^\circ\text{C}$  и 5%-ном содержании  $\text{CO}_2$  в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в течение 24 ч. Макрофаги из моноцитов периферической крови получали в соответствии с методикой, описанной в работе [30]. После 7 суток культивирования клеток в среде с низким содержанием эмбриональной бычьей сыворотки и достижения ими макрофагального фенотипа клетки использовали в экспериментах. Для открепления макрофагов от поверхности культурального пластика использовали коктейль аккутаз (Capricorn Scientific GmbH, Германия) [29]. Макрофаги тестировали на наличие микоплазменной инфекции с помощью набора для обнаружения микоплазмы MycoFluor™ (Thermo Fisher Scientific, США). В культурах клеток микоплазменная инфекция не обнаружена.

**Исследование цитотоксических свойств ОКФ и ОКФ-Ва.** Клетки в концентрации  $15 \cdot 10^3$  кл/см<sup>2</sup> высевали в лунки 96-луночного планшета (SPL Life Sci., Южная Корея). Через 24 ч после начала культивирования среду заменяли на 100 мкл среды, содержащей предварительно простерилизованные по методике [9] экспериментальные КФС в различных концентрациях, и культивировали таким образом в течение 72 ч. Для оценки цитотоксического эффекта использовали следующие концентрации КФС: 10, 3, 1, 0.3 и 0.1 мг/мл. Далее, после открепления клеток от культурального пластика, полученную суспензию клеток окрашивали в культуральной среде с добавлением 200 нМ флуоресцентных красителей Calcein AM (Sigma-Aldrich, США) и 1 мкг/мл йодида пропидия (Sigma-Aldrich, США) и анализировали цитотоксический эффект материалов с помощью проточного цитометра Accuri C6 (BD Bioscience, США) [9, 10].

**Оценка содержания кислотных компартментов.** Для оценки содержания кислотных компартментов в клетках после 96 ч совместной инкубации с ДКФД и ДКФД-Ва клетки промывали три раза фосфатно-солевым буфером (Sigma-Aldrich, США), открепляли от культурального пластика и окрашивали 50 нМ LysoTracker Green DND-26 (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 30 мин в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора. В качестве положительного контроля часть клеток инкубировали с 50 мкМ хлорохином (Sigma-Aldrich, США) в течение 4 ч. Измерения проводили с помощью проточного цитометра Accuri C6. Всего для каждого образца было проанализировано  $3 \cdot 10^4$  клеток [8, 9].

**Оценка продукции активных форм кислорода.** Исследование влияния ОКФ и ОКФ-Ва на

продукцию активных форм кислорода (АФК) в макрофагах проводили при стандартных условиях культивирования и в воспалительных условиях. Для изучения продукции АФК в воспалительных условиях макрофаги предварительно инкубировали с 10 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) из *E. coli* O111:B4 в течение 24 ч. Для оценки продукции АФК в клетках после 96 ч совместной инкубации клеток с ОКФ и ОКФ-Ва клетки промывали три раза раствором фосфатно-солевого буфера, открепляли от культурального пластика и окрашивали 20 мкМ 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора [30]. В качестве положительного контроля клетки инкубировали с 1 мМ перекисью водорода (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин. Измерения флуоресценции анализировали с помощью проточного цитометра Accuri C6. Для каждого образца анализировали не менее  $3 \cdot 10^4$  клеток.

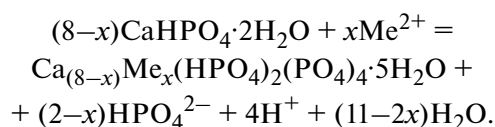
**Исследование поверхностных маркеров Т-лимфоцитов.** Маркеры поверхностной экспрессии Т-лимфоцитов исследовали как в неактивированных, так и активированных клетках. Для активации Т-лимфоцитов клетки предварительно культивировали 72 ч с конканавалином А в концентрации 10 мкг/мл [31]. Для изучения поверхностной экспрессии маркеров Т-лимфоцитов клетки после этого собирали из культуральных флаконов и промывали в буфере для окрашивания с последующим центрифугированием при 300 g в течение 5 мин. Клетки окрашивали моноклональными антителами FITC Anti-human CD3, PE Anti-human CD25 и APC Anti-human CD71 (BioLegend, США). Для определения неспецифического связывания клетки окрашивали соответствующими контрольными антителами изотипа. Окрашивание проводили при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. После этого клетки фиксировали 2% раствором параформальдегида и анализировали поверхностную экспрессию CD с помощью проточного цитометра Accuri C6.

**Статистический анализ.** Результаты проведенного исследования представлены как среднее

значение  $\pm$  стандартное отклонение. Во всех экспериментах использовались статистические выборки с не менее чем 4 наблюдениями ( $n \geq 4$ ). Полученные данные были статистически проанализированы с использованием языка программирования Python 3 (версия 3.10.6) в среде разработки Spyder (версия 5.4.1) с использованием библиотек Pandas (версия 1.5.3), Numpy (версия 1.23.5) и Scipy (версия 1.10.0). Перед проведением множественных сравнений данные предварительно тестировали на нормальность распределения и равенство дисперсий с использованием критериев Шапиро–Уилка и Брауна–Форсайта соответственно. Для данных с ненормальным распределением использовали *H*-критерий Краскела–Уоллеса с последующим сравнением экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Данна. Для данных с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим сравнением экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение вариантов Ва-замещенного ОКФ было реализовано за счет фазового превращения исходного порошка дикальцийфосфата дигидрата [9]. Выдержку ДКФД проводили в буферном растворе (1.5 М ацетата натрия с добавлением нитрата бария в количестве, указанном в табл. 1) при соотношении масса образца/масса жидкости, равном 1/100, в течение минимум 24 ч при температуре  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  в условиях постоянного перемешивания. Внедрение катионов Ва<sup>2+</sup> в структуру ОКФ проходило согласно предполагаемой реакции:



**Таблица 1.** Расчетные массы добавок допирующих элементов, необходимые для процесса с исходным порошком массой 10 г

Название	Сокращенное наименование	Теоретическое замещение, %	mBa
ОКФ, допированный 1% Ва	ОКФ-Ba1	1	0.152
ОКФ, допированный 5% Ва	ОКФ-Ba5	5	0.760
ОКФ, допированный 10% Ва	ОКФ-Ba10	10	1.519

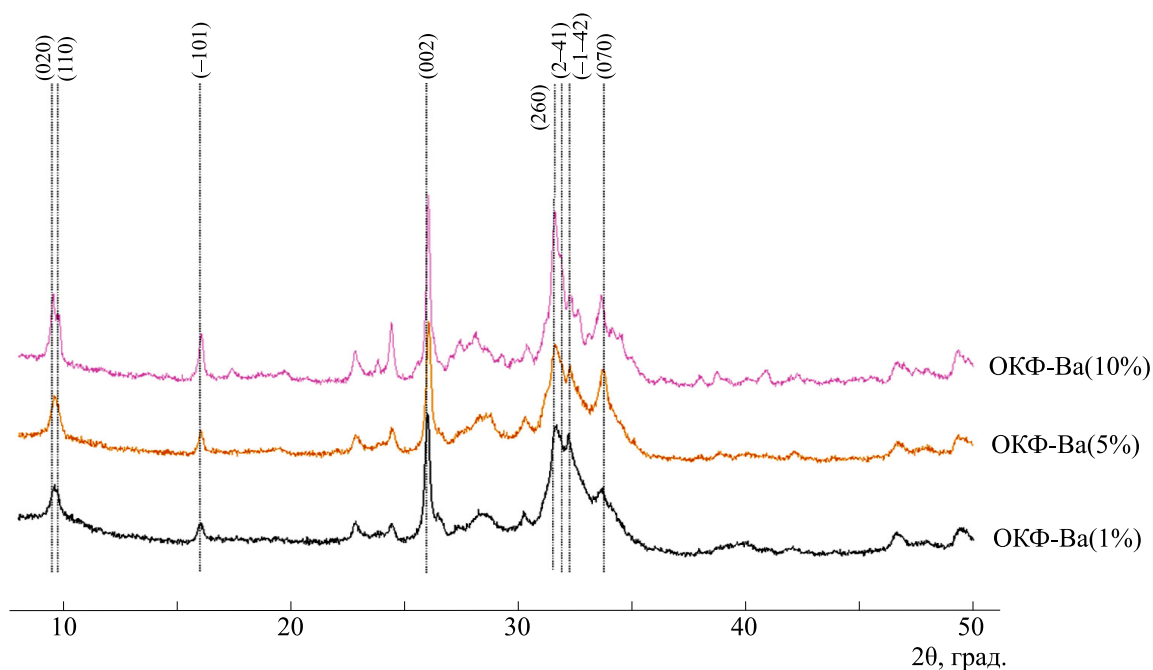


Рис. 1. Рентгенограмма порошков ОКФ, допированных ионами бария.

В результате синтеза были получены три варианта Ва-замещенного ОКФ с различным содержанием катионов бария в составе (табл. 1).

Результаты эксперимента по исследованию взаимосвязи между концентрацией  $\text{Ba}^{2+}$  и свойствами конечного ОКФ показали, что введение катионов  $\text{Ba}^{2+}$  не приводит к ингибированию процесса трансформации ДКФД в ОКФ в использованном интервале концентраций. Рентгенофазовый анализ исследованных образцов (рис. 1) подтвердил фазу ОКФ со следующими характеристиками: пики (020), (110), (-101), (002), (260), (2-41), (-1-42) и (070), соответствующие стандартной карте материала (карточка № 00-026-1056). Согласно рентгенофазовому анализу, состав материала соответствует 100% ОКФ в широком спектре концентраций  $\text{Ba}^{2+}$ .

Данные сканирующей электронной микроскопии (рис. 2) показали, что структура порошков с введенным  $\text{Ba}^{2+}$  в широком спектре концентраций соответствует структуре ОКФ. Размер частиц порошков не превышал 100 мкм, что обусловлено размерами исходных частиц, при большем увеличении на их поверхности наблюдаются кристаллы размером до 5 мкм, которые соответствуют стандартным ОКФ-кристаллам. Результаты подтверждают данные рентгенофазового анализа о том, что влияние катионов  $\text{Ba}^{2+}$  на процесс трансформации ДКФД в ОКФ не наблюдается.

Данные ИК-спектроскопии также подтверждают результаты рентгенофазового анализа. На

рис. 3 показаны ИК-спектры для образцов ОКФ с различным содержанием бария. Характерным для образцов на основе ОКФ является наличие полосы при  $1295\text{ см}^{-1}$ , соответствующей группе  $\text{HPO}_4$ , и  $\nu_1$ - и  $\nu_3$ -моды групп  $\text{PO}_4$  при 960 и  $1029\text{ см}^{-1}$ . Важной особенностью является наличие в спектрах ОКФ и ДКФД полосы при  $870\text{ см}^{-1}$ , которая может быть отнесена к моде колебаний  $\nu_3$  карбонатных групп, источником которых является  $\text{CO}_2$  в воздухе.

Согласно данным химического анализа, приведенным в табл. 2, соотношение  $(\text{Ca} + \text{Ba})/\text{P}$  лежит в диапазоне 1.33–1.39, что соотносится с теоретическим соотношением 1.33 для октакальций-фосфата.

Присутствие в элементном анализе ионов  $\text{Ba}^{2+}$  в совокупности с результатами других методов говорит о внедрении катионов в структуру, при этом процент реального замещения отличен от расчетного с максимальным значением 6.7 ат. %.

При исследовании цитотоксического эффекта ОКФ и его Ва-замещенных вариантов через 72 ч культивирования с макрофагами человека было выявлено, что как чистый ОКФ, так и все варианты ОКФ-Ва проявляют наиболее выраженный цитотоксический эффект при концентрации 10 мг/мл (рис. 4). При данной концентрации число живых клеток после инкубации с материалами составляло порядка 35%. Однако при концентрации 3 мг/мл наблюдалось увеличение числа

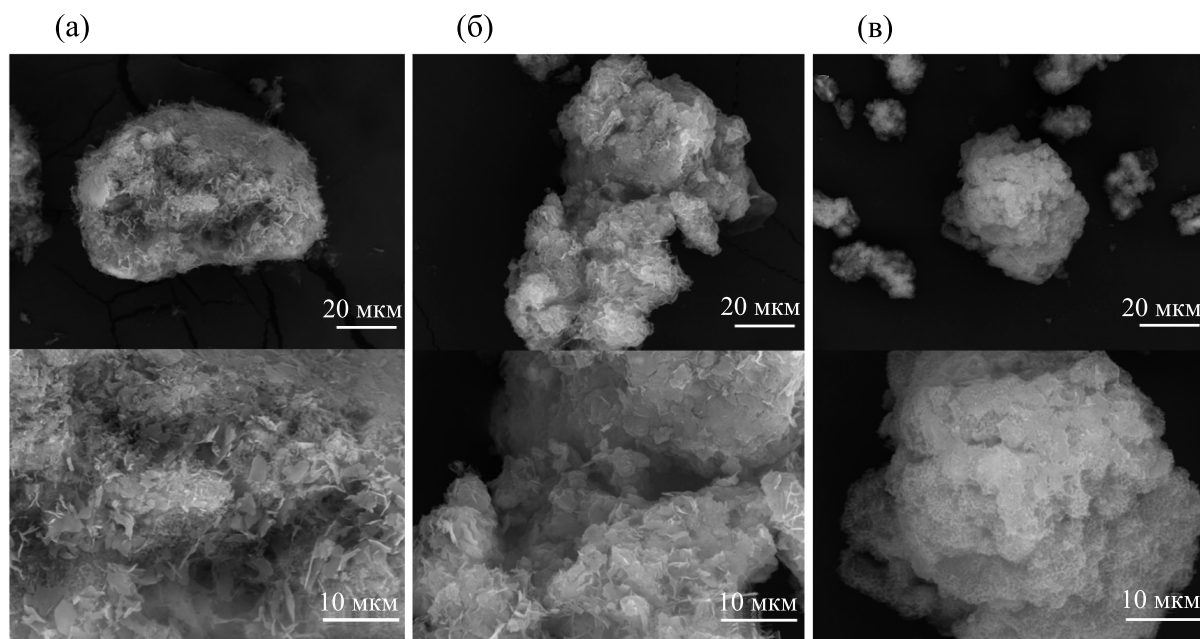


Рис. 2. Электронно-микроскопические изображения порошков ОКФ, допированных ионами бария: (а) – ОКФ-Ba1, (б) – ОКФ-Ba5, (в) – ОКФ-Ba10.

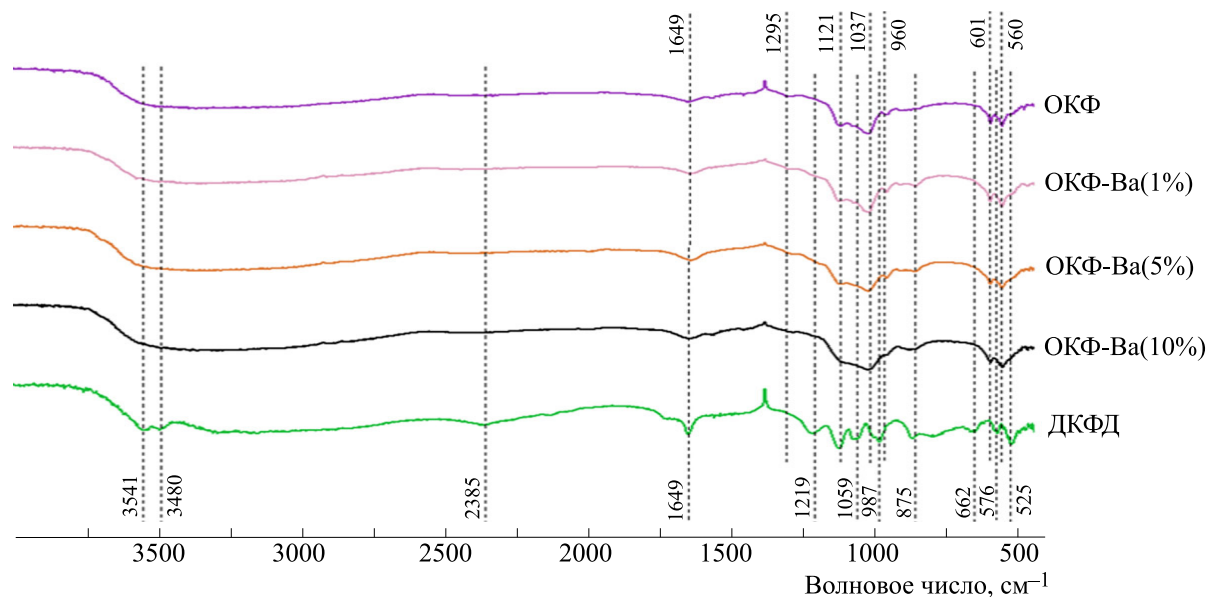


Рис. 3. ИК-спектроскопия порошков ОКФ, допированных ионами бария.

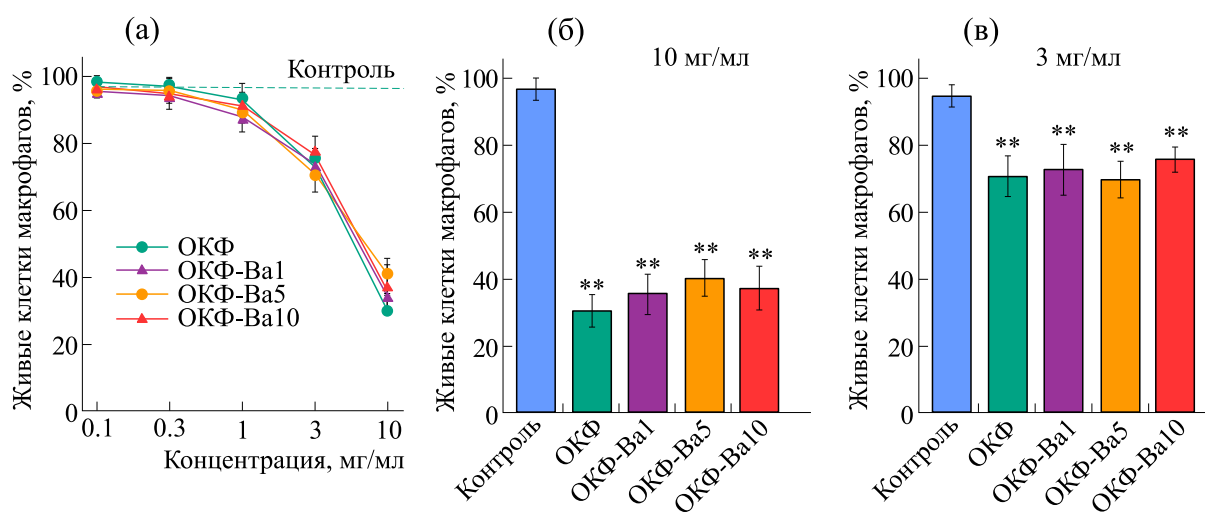
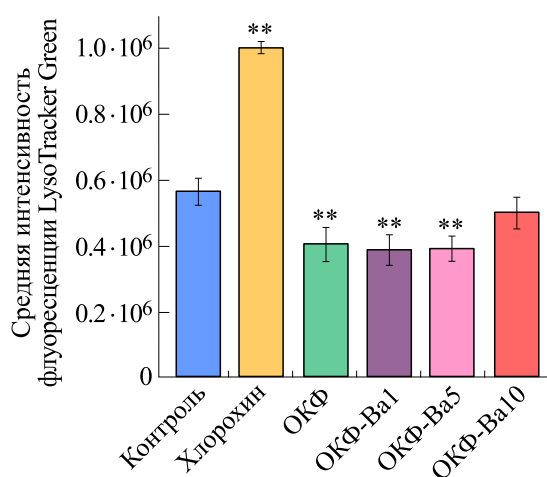
живых клеток до допустимого стандартами ISO 10993 уровня в 75%. Начиная с концентрации 1 мг/мл, число живых клеток после инкубации с ОКФ и всеми вариантами ОКФ-Ва не отличалось от контрольных условий. При этом различия в цитотоксическом действии между ОКФ и его Ва-замещенными вариантами не наблюдались вне зависимости от степени замещения  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Ba}^{2+}$ . Таким образом, выявлено, что замещение  $\text{Ca}^{2+}$

на  $\text{Ba}^{2+}$  в структуре ОКФ не оказывает влияния на его цитотоксические свойства. Для дальнейших исследований материалов использовали максимальную нетоксическую концентрацию 1 мг/мл.

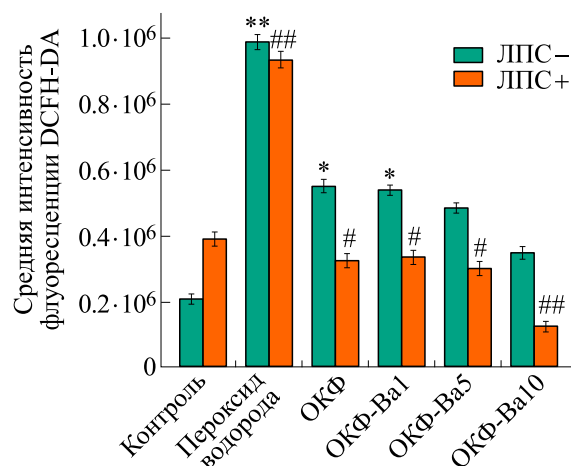
При исследовании влияние КФС на содержание кислотных компартментов было обнаружено, что добавление ОКФ, ОКФ-Ba1 и ОКФ-Ba5 к культуре макрофагов приводит к снижению

**Таблица 2.** Результаты рентгенофлуоресцентного элементного анализа ОКФ и ОКФ-Ва

Образец	Ca, ат. %	P, ат. %	Ba, ат. %	Замещение, %	(Ca + Ba)/P
ОКФ-Ва1 %	57.6	41.9	0.59	1.0	1.39
ОКФ-Ва5 %	55.0	42.5	2.47	4.3	1.35
ОКФ-Ва10 %	53.3	42.86	3.84	6.7	1.33

**Рис. 4.** Цитотоксический эффект ОКФ и ОКФ-Ва с различной степенью замещения после 72 ч культивирования с макрофагами человека. Сравнение экспериментальных групп относительно контроля с использованием ANOVA с поправкой Бонферрони: \*\* –  $p < 0.01$ .**Рис. 5.** Содержание кислых компартментов в макрофагах человека через 72 ч инкубации с ОКФ и ОКФ-Ва с различной степенью замещения. Сравнение экспериментальных групп относительно контроля с использованием ANOVA с поправкой Бонферрони: \*\* –  $p < 0.01$ .





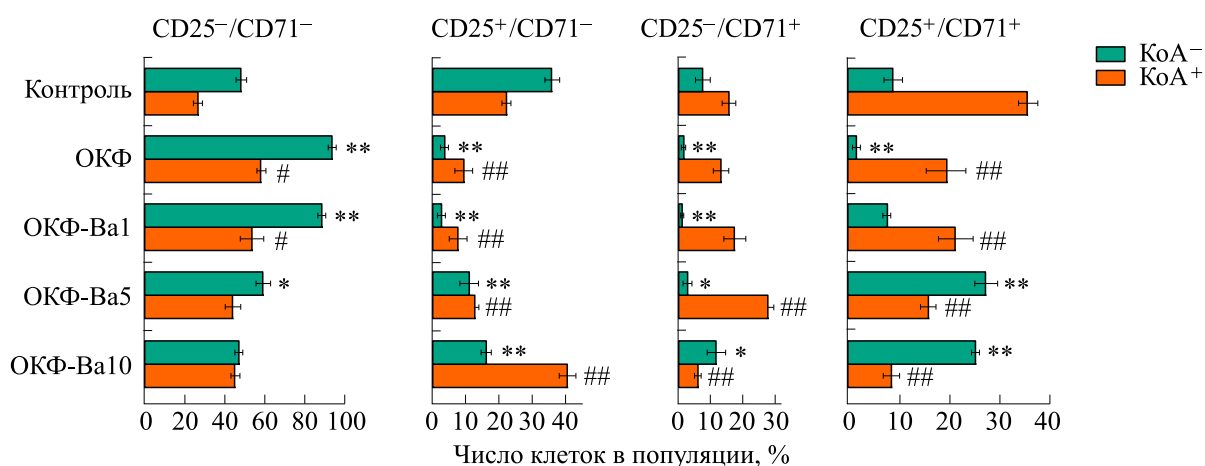
**Рис. 6.** Продукция активных форм кислорода неактивированными (ЛПС–) и активированными (ЛПС+) макрофагами после 72 ч инкубации с ОКФ и ОКФ-Ва с различной степенью замещения: \*\* или \* – сравнение экспериментальных групп относительно контроля без добавления ЛПС с использованием *H*-критерия Краскела–Уоллеса с поправкой Данна; ## или # – сравнение экспериментальных групп относительно контроля с добавлением ЛПС с использованием ANOVA с поправкой Бонферрони; \* –  $p < 0.05$ , # –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , ## –  $p < 0.01$ .

данного параметра (рис. 5). При этом ОКФ с максимальной степенью замещения  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Ba}^{2+}$  10% (ОКФ-Ba10) не оказывал влияния на содержание кислых компартментов внутри клеток.

Исследование продукции активных форм кислорода после 72 ч инкубации с ОКФ и ОКФ-Ва вариантами показало, что ОКФ и ОКФ-Ba1 статистически значимо увеличивали продукцию АФК в неактивированных липополисахаридом макрофагах (рис. 6). При дополнительной активации макрофагов ЛПС наблюдалось снижение продукции АФК у ОКФ, ОКФ-Ba1, ОКФ-Ba5 по

сравнению с контролем. В то же время ОКФ с максимальным замещением (ОКФ-Ba10) в воспалительных условиях показал наибольшее снижение (в 4 раза) продукции АФК в клетках по сравнению с контролем.

Далее проводили исследование влияния ОКФ и ОКФ-Ва на лектин-зависимую активацию Т-лимфоцитов периферической крови человека (рис. 7). Активацию лимфоцитов оценивали по поверхностной экспрессии альфа-цепи рецептора интерлейкина-2 (CD25) и белка 1 рецептора трансферрина (CD71), которые после 72 ч обра-



**Рис. 7.** Анализ количества Т-лимфоцитов ( $\text{CD}3^+$ -клеток), положительных по CD25 и CD71 ( $\text{CD}25^+/\text{CD}71^+$ ), только по CD25 ( $\text{CD}25^+/\text{CD}71^-$ ) или по CD71 ( $\text{CD}25^-/\text{CD}71^+$ ), а также не несущих CD25 и CD71 ( $\text{CD}25^-/\text{CD}71^-$ ) после инкубации с ОКФ и ОКФ-Ва. KoA– – неактивированные Т-лимфоциты, KoA+ – активированные конканавалином А Т-лимфоциты, \*\* – сравнение экспериментальных групп относительно контроля без добавления KoA с использованием ANOVA с поправкой Бонферрони; ## – сравнение экспериментальных групп относительно контроля с добавлением KoA с использованием ANOVA с поправкой Бонферрони; \* –  $p < 0.05$ , # –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$ , ## –  $p < 0.01$ .



ботки Т-клеток конканавалином А (ConA) являются маркерами клеточной активации [31]. Результаты показали, что инкубация неактивированных Т-лимфоцитов с ОКФ и ОКФ-Ba1 приводила к увеличению числа  $CD25^{-}/71^{-}$  по сравнению с контролем. При этом у клеток, инкубированных с ОКФ, также статистически значимо снижалось число  $CD25^{+}/71^{+}$ -клеток. Инкубация с ОКФ, ОКФ-Ba1 и ОКФ-Ba5 приводила к снижению числа клеток  $CD25^{+}/71^{-}$  и  $CD25^{-}/71^{+}$  в неактивированных клетках. Для ОКФ-Ba10 наблюдалось увеличение числа клеток  $CD25^{-}/71^{+}$  и  $CD25^{+}/71^{+}$  и снижение числа  $CD25^{+}/71^{-}$ -клеток, при этом не изменялось количество  $CD25^{-}/71^{-}$ -клеток. В активированных конканвалином А Т-лимфоцитах после инкубации с ОКФ и ОКФ-Ba1 наблюдалось увеличение числа  $CD25^{-}/71^{-}$ -клеток. ОКФ, ОКФ-Ba1 и ОКФ-Ba5 снижали число  $CD25^{+}/71^{-}$  клеток, в то время как ОКФ-Ba10 увеличивал его. Все исследованные КФС, в особенности ОКФ-Ba10, снижали число активированных  $CD25^{+}/71^{+}$ -клеток.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный комплексный физико-химический анализ показывает, что допирование катионами  $Ba^{2+}$  в использованном интервале концентраций не препятствует низкотемпературной химической трансформации ДКФД в ОКФ. Эффективное внедрение катионов  $Ba^{2+}$  в структуру ОКФ указывает на эффективность предлагаемого подхода получения барий-замещенных вариантов октакальцийфосфата, потенциально пригодного для получения рентгеноконтрастных КФС-материалов, однако процент реального замещения отличается в своем максимальном значении от расчетного в 10% и составляет 6.7 ат.%. С одной стороны, полученные результаты указывают на то, что технологию получения материалов можно изменить и повысить реальное содержание катионов  $Ba^{2+}$ , с другой стороны, учитывая, что полученные предельные значения замещения являются достаточными для достижения рентгеноконтрастности, большие концентрации  $Ba^{2+}$  могут быть избыточны для организма реципиента.

В свою очередь, известно, что норма потребления бария у взрослых людей составляет  $8.5 \pm 4$  ppm [31]. При этом выявлено, что человеческий организм не аккумулирует барий в процессе своей жизнедеятельности [2, 32], а сравнительно больший, чем у  $Ca^{2+}$ , ионный радиус  $Ba^{2+}$  (у бария — 1.34 Å, гексакоординированный с шестью отрицательно заряженными атомами кислорода, у

$Ca^{2+}$  — от 0.99 Å [33]) указывает на то, что в процессе перекристаллизации ОКФ в гидроксипатит  $Ba^{2+}$  с большей вероятностью будет безопасно выведен из организма [2], что в целом указывает на безвредность предлагаемой технологии получения Ва-замещенных вариантов ОКФ.

Результаты *in vitro* исследований подтверждают безопасность предложенного способа получения допированного катионами  $Ba^{2+}$  низкотемпературного ОКФ. Выявленная дозозависимость цитотоксического эффекта ОКФ и его Ва-замещенных вариантов хорошо согласуется с нашими предшествующими результатами [34–36] и указывает на то, что даже при предельном замещении ионов  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$ , свойственному образцам ОКФ-Ba10, какого-либо увеличения токсического эффекта, достоверно отличного от образцов ОКФ, не наблюдалось. Важно отметить, что уже концентрация в 3 мг/мл обеспечивала получение необходимого показателя биосовместимости как ОКФ, так и его Ва-замещенных вариантов (>70% живых клеток согласно требованиям ГОСТ ISO 10993-5-2023), а гипотетическая расчетная доза в 1 мг/мл (максимально возможная доза для использования в условиях *in vivo*) вообще не оказывала какого-либо токсического действия на исследованные клеточные культуры. Таким образом можно резюмировать, что замещение  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$  в структуре ОКФ не оказывает влияния на его цитотоксические свойства и все исследованные варианты низкотемпературного ОКФ и его Ва-замещенных вариантов являются безопасными и биосовместимыми.

В свою очередь, исследование влияния ОКФ и его Ва-замещенных вариантов на содержание кислых компартментов (лизосом и иных внутриклеточных структур с низким значением pH) в неактивированных макрофагах показало, что как сам ОКФ, так и его варианты с низким содержанием  $Ba^{2+}$  (ОКФ-Ba1 и ОКФ-Ba5) приводили к снижению содержания кислых компартментов в культуре клеток, а вариант ОКФ с максимальной степенью замещения  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$  10% (ОКФ-Ba10) не оказывал какого-либо влияния на содержание исследуемого показателя. При этом выявленное для образца ОКФ с наибольшим замещением кальция барием (ОКФ-Ba10) максимальное (в 4 раза) снижение содержания АФК у активированных ЛПС макрофагов, т.е. при моделировании воспалительных условий, указывает, что такой вариант КФС-материала является наиболее предпочтительным для использования в воспаленной асептической ране. Полученные данные могут указывать на то, что вариант с максимальным содержанием  $Ba^{2+}$  (ОКФ-Ba10) в нормальных условиях как минимум не влияет на содержание лизосом и АФК в клетках, а в воспалительных

условиях — значительно снижает количество АФК, что может предотвращать развитие материал-ассоциированной костной резорбции в перимплантном ложе. Конечно, данное предположение нуждается в эмпирическом подтверждении, что и будет сделано на последующих этапах работы, однако полученные данные уже на стадии *in vitro* исследований могут подтверждать правильность выбранного нами пути катионного замещения барием низкотемпературных ОКФ-материалов.

В свою очередь, выявленное для ОКФ и ОКФ-Ba1 статистически значимое увеличение продукции АФК в неактивированных ЛПС макрофагах на фоне снижения продукции АФК в активированных ЛПС макрофагах свидетельствует как о потенциальном про-, так и антиоксидантном действии данных вариантов ОКФ и, следовательно, нестабильности биологического эффекта данных материалов. При этом отсутствие влияния на продукцию АФК в нормальных условиях и подавление АФК в воспалительных условиях для ОКФ-Ba5 и ОКФ-Ba10 свидетельствует о дозозависимом антиоксидантном эффекте, непосредственно связанном с наличием ионов  $Ba^{2+}$  в структуре ОКФ, что может быть полезно для получения КФС-материалов с заданными свойствами.

Результаты исследования лектин-опосредованной активации Т-лимфоцитов в присутствии ОКФ и его Ba-замещенных вариантов показали, что инкубация клеток с ОКФ и ОКФ-Ba1 приводила к значимому увеличению числа неактивированных ( $CD25^{-}/71^{-}$ ) Т-лимфоцитов в стандартных условиях и увеличению числа активированных ( $CD25^{+}/71^{+}$ ) Т-лимфоцитов в условиях их преактивации конканавалином А. В свою очередь, при инкубации клеток с образцами ОКФ-Ba5 и ОКФ-Ba10 наблюдалось слабое влияние или отсутствие влияния на количество неактивированных ( $CD25^{-}/71^{-}$ ) Т-лимфоцитов в стандартных условиях (особенно выраженное для ОКФ-Ba10) и значительно выраженное увеличение числа активированных ( $CD25^{+}/71^{+}$ ) Т-лимфоцитов в стандартных условиях и их значимое снижение в условиях их лектин-опосредованной активации. Полученные данные также указывают на дозозависимый биологический эффект и практически полное отсутствие влияния малых концентраций бария в образце ОКФ-Ba1, неотличимых по эффекту от образцов чистого ОКФ. При этом более значимые концентрации  $Ba^{2+}$  в образцах ОКФ-Ba5 и, особенно, ОКФ-Ba10 оказывают явное позитивное влияние на конститутивную активацию Т-лимфоцитов, блокируя тем самым лектин-опосредованную активацию Т-лимфоцитов. Полученные данные могут свиде-

тельствовать о том, что чистый ОКФ оказывает ингибирующее воздействие как на конститутивную, так и лектин-зависимую активацию Т-лимфоцитов, при этом варианты ОКФ с максимальным содержанием  $Ba^{2+}$  (особенно ОКФ-Ba10) способствует достоверной и значимой конститутивной активации Т-лимфоцитов, т.е. данный процесс непосредственно ассоциирован с катионами бария в составе материала. Таким образом, необходимо учитывать выявленный биологический эффект при проведении *in vivo* экспериментов, предполагая, что Ba-замещенные варианты могут, гипотетически, способствовать активации Т-лимфоцитов и успешной реализации ассоциированных с этим явлением механизмов адаптивного иммунного ответа в ране.

Из литературы известно, что  $Ba^{2+}$  обладает некой тропностью и в основном накапливается в минеральной неорганической части костной ткани и зубов [2, 37], и что этот процесс гораздо интенсивнее происходит в молодом возрасте. Так например, при приеме с пищей 33 мг/кг/день свободного  $Ba^{2+}$  выявлено, что молодые 4-недельные крысы накапливали более чем в 2 раза больше  $Ba^{2+}$  в костях, чем старые 34–35-недельные крысы [38, 39]. При этом выявлено, что в норме барий накапливается в минерализующихся областях новообразованной костной мозоли, а также в эндосте, надкостнице и эпифизарных пластинах («зонах роста») длинных трубчатых костей [38–40]. Таким образом, можно предположить, что Ba-замещенный ОКФ может быть не только рентгенологически видим, но и полезен для процесса минерализации новообразованной костной ткани.

В свою очередь, важно отметить, что выявленные позитивные эффекты необходимо в дальнейшем подтвердить в специальных условиях (нормальных и воспалительных) с помощью модельных тест-систем лабораторных животных, прежде всего в SPF-условиях, в соответствии с международными стандартами GLP и ISO 10993. Необходимо понимать, что редуccionистские модельные *in vitro* системы культур клеток не отражают реакцию целого организма и обнаруженные эффекты могут не воспроизвестись *in vivo*. Однако, использование нами первичных культур клеток человека и валидированных методик оценки реакции иммунных клеток в условиях *in vitro* позволяют транслировать полученные результаты непосредственно на реакцию организма человека, а не животных, и приблизиться к пониманию реакции высокоспецифичной человеческой иммунной системы на условно неиммуногенные синтетические материалы. Только выполненные с использованием современных методов исследования помогут выявить истинный потенциал бария в современном материаловедении и, возмож-

но, вывести его на лидирующие позиции в тканевой инженерии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показывает проведенное исследование, внедрение катионов  $Ba^{2+}$  в структуру ДКФД не препятствует его трансформации в стабильный эталонный ОКФ в низкотемпературных условиях. Важность использования именно низкотемпературных условий и довольно-таки весомый процент реального включения бария (6.7 ат.%) указывают на то, что механизм включения ионов бария может быть подобным физиологическому и соответствовать фазовым превращениям, наблюдаемым в процессе естественной биоминерализации костной ткани. Отсутствие влияния допирования  $Ba^{2+}$  на цитотоксические свойства ОКФ указывает на безопасность использования Ва-замещенных вариантов даже при максимальном замещении  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$ . При этом отсутствие негативного влияния на биогенез лизосом и продукцию АФК в макрофагах человека в нормальных условиях, на фоне снижения концентрации АФК и активации Т-лимфоцитов в модельных воспалительных условиях *in vitro*, указывают на перспективность предложенного подхода в отношении новой ниши потенциальных иммуномодулирующих КФС-материалов с антиоксидантными свойствами. По результатам комплексной оценки влияния дозозависимого допирования катионами бария порошка ОКФ, получаемого с помощью низкотемпературной фазовой трансформации ДКФД, на структурные, морфологические и биологические характеристики ОКФ и его Ва-замещенных вариантов выявлено, что предложенный подход получения вышеозначенных КФС перспективен и представляет интерес для получения материалов с заданными свойствами. Полученные материалы являются безопасными и биосовместимыми, а наиболее эффективный вариант ОКФ с максимальной степенью замещения  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$  10% (ОКФ-Ba10) является биоактивным и обладает потенциальным антиоксидантным и иммуномодулирующим действием.

Таким образом, на основании полученных результатов можно резюмировать, что допирование катионами  $Ba^{2+}$  в использованном интервале концентраций не препятствует низкотемпературной химической трансформации ДКФД и его превращению в ОКФ, однако процент реального замещения составляет в максимуме 6.7 ат.%. Результаты *in vitro* исследований подтверждают, что

замещение  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$  в структуре ОКФ не оказывает влияния на его цитотоксические свойства и все исследованные варианты низкотемпературного ОКФ и его Ва-замещенных вариантов в рекомендуемой концентрации 1 мг/мл не обладают цитотоксическим эффектом и являются биосовместимыми. Выявленные для ОКФ-Ba10 эффекты, а именно, отсутствие влияния на содержание лизосом и АФК в макрофагах человека в нормальных условиях и значительное снижение продукции АФК в воспалительных условиях, а также значимое повышение конститутивной активации Т-лимфоцитов, указывают на то, что данные процессы непосредственно и дозозависимо ассоциированы с катионами  $Ba^{2+}$  в составе ОКФ, что может быть полезно для получения КФС-материалов с заданными свойствами.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою признательность Центрам коллективного пользования исследовательским оборудованием ИТЭБ РАН и ИМЕТ РАН.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Публикация настоящей работы поддержана Российским научным фондом (проект № 21-73-20251 «Влияние структурных и фазовых трансформаций кальцийфосфатных соединений на механизмы биоинтеграции или отторжения материалов, предназначенных для регенерации костной ткани»).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями Международного стандарта ГОСТ ISO 10993-5-2023 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность методами *in vitro*». Работа не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate ( $CaPO_4$ ) containing composites for biomedical applications:

- Formulations, properties, and applications. *J. Composites Sci.*, **8** (6), 218 (2024). DOI: 10.3390/jcs8060218
2. Минайчев В. В. *Клеточные и тканевые аспекты биосовместимости кальций-фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом*. Дис. ... канд. биол. наук (ИТЭБ, Пушино, 2024).
  3. Kovrlija I., Locs J., and Loca D. Incorporation of barium ions into biomaterials: Dangerous liaison or potential revolution? *Materials*, **14** (19), 5772 (2021). DOI: 10.3390/ma14195772
  4. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate ( $\text{CaPO}_4$ )-based bioceramics: Preparation, properties, and applications. *Coatings*, **12** (10), 1380 (2022). DOI: 10.3390/coatings12101380
  5. Pankratov A. S., Fadeeva I. S., Minaychev V. V., Kirsanova P. O., Senotov A. S., Yurasova Y. B., and Akatov V. S. A biointegration of micro- and nanocrystalline hydroxyapatite: problems and perspectives. *Genes & Cells*, **13** (3), 46–51 (2018). DOI: 10.23868/201811032
  6. Takayanagi H., Ogasawara K., Hid, S., Chiba T., Murata S., Sato K., Takaoka A., Yokochi T., Oda H., Tanaka K., Nakamura K., and Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*, **408** (6812), 600–605 (2000). DOI: 10.1038/35046102
  7. Okamoto K. and Takayanagi H. Osteoimmunology. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.*, **9** (1), a031245 (2019). DOI: 10.1101/cshperspect.a031245
  8. Boanini E., Gazzano M., and Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomater.*, **6** (6), 1882–1894 (2010). DOI: 10.1016/j.actbio.2009.12.041
  9. Teterina A. Y., Smirnov I. V., Fadeeva I. S., Fadeev R. S., Smirnova P. V., Minaychev V. V., Kobayakova M. I., Fedotov A. Y., Barinov S. M., and Komlev V. S. Octacalcium phosphate for bone tissue engineering: Synthesis, modification, and in vitro biocompatibility assessment. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (23), 1274 (2021). DOI: 10.3390/ijms222312747
  10. Minaychev V. V., Smirnova P. V., Kobayakova M. I., Teterina A. Y., Smirnov I. V., Skirda V. D., Alexandrov A. S., Gafurov M. R., Shlykov M. A., Pyatina K. V., Senotov A. S., Salynkin P. S., Fadeev R. S., Komlev V. S., and Fadeeva I. S. Octacalcium phosphate for bone tissue engineering: synthesis, modification, and in vitro biocompatibility assessment. *Biomedicines*, **12** (2), 263 (2024). DOI: 10.3390/biomedicines12020263
  11. O'Neill E., Awale G., Daneshmandi L., Umerah O., and Lo K. W. The roles of ions on bone regeneration. *Drug Discov. Today*, **23** (4), 879–890 (2018). DOI: 10.1016/j.drudis.2018.01.049
  12. Garbo C., Locs J., D'Este M., Demazeau G., Mocanu A., Roman C., Horovitz O., and Tomoaia-Cotisel M. Advanced Mg, Zn, Sr, Si multi-substituted hydroxyapatites for bone regeneration. *Int. J. Nanomed.*, **15**, 1037–1058 (2020). DOI: 10.2147/IJN.S226630
  13. Mouriño V., Cattalini J. P., and Boccaccini A. R. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: An overview of their biological applications and strategies for new developments. *J. Roy. Soc. Interface*, **9** (68), 401–419 (2012). DOI: 10.1098/rsif.2011.0611
  14. Li P., Jia Z., Wang Q., Tang P., Wang M., Wang K., Fang J., Zhao C., Ren F., Ge X., and Lu X. Resilient and flexible chitosan/silk cryogel incorporated with Ag/Sr co-doped nanoscale hydroxyapatite for osteoinductivity and antibacterial properties. *J. Mater. Chem. B*, **6** (45), 7427–7438 (2018). DOI: 10.1039/c8tb01672k
  15. Laskus A. and Kolmas J. Ionic substitutions in non-apatitic calcium phosphates. *Int. J. Mol. Sci.*, **18** (12), 2542 (2017). DOI: 10.3390/ijms18122542
  16. Barradas A. M., Yuan H., van Blitterswijk C. A., and Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur. Cells Mater.*, **21**, 407–429 (2011). DOI: 10.22203/ecm.v021a31
  17. Fellah B. H., Josselin N., Chappard D., and Weiss P., Layrolle P. Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **18** (2), 287–294 (2007). DOI: 10.1007/s10856-006-0691-8
  18. Wang J., Liu D., Guo B., Yang X., Chen X., Zhu X., Fan Y., and Zhang X. Role of biphasic calcium phosphate ceramic-mediated secretion of signaling molecules by macrophages in migration and osteoblastic differentiation of MSCs. *Acta Biomater.*, **51**, 447–460 (2017). DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.059
  19. Giancotti F. G. and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science (N.Y.)*, **285** (5430), 1028–1032 (1999). DOI: 10.1126/science.285.5430.1028
  20. Chen X., Wang J., Chen Y., Cai H., Yang X., Zhu X., Fan Y., and Zhang X. Roles of calcium phosphate-mediated integrin expression and MAPK signaling pathways in the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem. B*, **4** (13), 2280–2289 (2016). DOI: 10.1021/acsbomaterials.7b00232
  21. Shekaran A. and García A. J. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **96** (1), 261–272 (2011). DOI: 10.1002/jbm.a.32979
  22. Hu W. J., Eaton J. W., Ugarova T. P., and Tang L. Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood*, **98** (4), 1231–1238 (2001). DOI: 10.1182/blood.v98.4.1231
  23. Brodbeck W. G., Colton E., and Anderson J. M. Effects of adsorbed heat labile serum proteins and fibrinogen on adhesion and apoptosis of monocytes/macrophages on biomaterials. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **14** (8), 671–675 (2003). DOI: 10.1023/a:1024951330265
  24. Jenney C. R. and Anderson J. M. Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior. *J. Biomed. Mater. Res.*, **49** (4), 435–447 (2000).

- DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(20000315)49:4<435::aid-jbm2>3.0.co;2-y
25. Olszak I. T., Poznansky M. C., Evans R. H., Olson D., Kos C., Pollak M. R., Brown E. M., and Scadden D. T. Extracellular calcium elicits a chemokinetic response from monocytes *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, **105** (9), 1299–1305 (2000). DOI: 10.1172/JCI9799
  26. De Bruijn J. D., Shankar K., Yuan H., and Habibovic P. Osteoinduction and its evaluation. In: *Bioceramics and their clinical applications*, Ed. by T. Kokubo (Woodhead Publ., Cambridge, 2008), pp. 199–219  
DOI: 10.1201/9781439832530
  27. McNally A. K. and Anderson J. M. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am. J. Pathol.*, **147** (5), 1487–1499 (1995).
  28. Kanatani M., Sugimoto T., Fukase M., and Fujita T. Effect of elevated extracellular calcium on the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells: its direct and indirect effects via monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **181** (3), 1425–1430 (1991).  
DOI: 10.1016/0006-291x(91)92098-5
  29. Terkawi M. A., Matsumae G., Shimizu T., Takahashi D., Kadoya K., and Iwasaki N. Interplay between inflammation and pathological bone resorption: insights into recent mechanisms and pathways in related diseases for future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (3), 1786 (2022).  
DOI: 10.3390/ijms23031786
  30. Lomovskaya Y. V., Kobyakova M. I., Senotov A. S., Fadeeva I. S., Lomovsky A. I., Krasnov K. S., and Fadeev R. S. Myeloid differentiation increases resistance of leukemic cells to TRAIL-induced death by reducing the expression of DR4 and DR5 receptors. *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology*, **17** (1), 43–57 (2023).  
DOI: 10.1134/S1990747822060101
  31. Lomovskaya Y. V., Kobyakova M. I., Senotov A. S., Lomovsky A. I., Minaychev V. V., Fadeeva I. S., Shtatnova D. Y., Krasnov K. S., Zvyagina A. I., Akatov V. S., and Fadeev R. S. Macrophage-like THP-1 cells derived from high-density cell culture are resistant to TRAIL-induced cell death via down-regulation of death-receptors DR4 and DR5. *Biomolecules*, **12** (2), 150 (2022).  
DOI: 10.3390/ijms23147881
  32. Sabido O., Figarol A., Klein J. P., Bin V., Forest V., Pourchez J., Fubini B., Cottier M., Tomatis M., and Boudard D. Quantitative flow cytometric evaluation of oxidative stress and mitochondrial impairment in RAW 264.7 macrophages after exposure to pristine, acid functionalized, or annealed carbon nanotubes. *Nanomaterials (Switzerland)*, **10** (2), 319 (2020).  
DOI: 10.3390/nano10020319
  33. Antonaci S., Tortorella C., Polignano A., Ottolenghi A., Jirillo E., and Bonomo L. Modulating effects on CD25 and CD71 antigen expression by lectin-stimulated T lymphocytes in the elderly. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **13** (1–2), 87–100 (1991).  
DOI: 10.3109/08923979109019693
  34. Schroeder H. A., Tipton I. H., and Nason A. P. Trace metals in man: Strontium and barium. *J. Chronic Dis.*, **25** (9), 491–517 (1972). DOI: 10.1016/0021-9681(72)90150-6
  35. Peana M., Medici S., Dadar M., Zoroddu M. A., Pelucelli A., Chasapis C. T., and Björklund G. Environmental barium: Potential exposure and health-hazards. *Archives Toxicol.*, **95** (8), 2605–2612 (2021).  
DOI: 10.1007/s00204-021-03049-5
  36. Fadeeva I. S., Teterina A. Y., Minaychev V. V., Senotov A. S., Smirnov I. V., Fadeev R. S., Smirnova P. V., Menukhov V. O., Lomovskaya Y. V., Akatov V. S., Barinov S. M., and Komlev V. S. Biomimetic remineralized three-dimensional collagen bone matrices with an enhanced osteostimulating effect. *Biomimetics (Switzerland)*, **8** (1), 91 (2023).  
DOI: 10.3390/biomimetics8010091
  37. Teterina A. Y., Minaychev V. V., Smirnova P. V., Kobiakova M. I., Smirnov I. V., Fadeev R. S., Egorov A. A., Ashmarin A. A., Pyatina K. V., Senotov A. S., Fadeeva I. S., and Komlev V. S. Injectable hydrated calcium phosphate bone-like paste: Synthesis, *in vitro*, and *in vivo* biocompatibility assessment. *Technologies*, **11** (3), 77 (2023).  
DOI: 10.3390/technologies11030077
  38. Minaychev V. V., Teterina A. Y., Smirnova P. V., Menshih K. A., Senotov A. S., Kobyakova M. I., Smirnov I. V., Pyatina K. V., Krasnov K. S., Fadeev R. S., Komlev V. S., and Fadeeva I. S. Composite remineralization of bone-collagen matrices by low-temperature ceramics and serum albumin: A new approach to the creation of highly effective osteoplastic materials. *J. Function. Biomater.*, **15** (2), 27 (2024). DOI: 10.3390/jfb15020027
  39. Sowden E. M. and Stitch S. R. Trace elements in human tissue. 2. Estimation of the concentrations of stable strontium and barium in human bone. *Biochem. J.*, **67** (1), 104–109 (1957). DOI: 10.1042/bj0670104
  40. Panahifar A., Swanston T. M., Jake Pushie M., Belev G., Chapman D., Weber L., and Cooper D. M. Three-dimensional labeling of newly formed bone using synchrotron radiation barium K-edge subtraction imaging. *Physics Med. Biol.*, **61** (13), 5077–5088 (2016).  
DOI: 10.1042/bj0670104
  41. Panahifar A., Chapman L. D., Weber L., Samadi N., and Cooper D. M. L. Biodistribution of strontium and barium in the developing and mature skeleton of rats. *J. Bone Mineral Metab.*, **37** (3), 385–398 (2019).  
DOI: 10.1007/s00774-018-0936-x
  42. Foster A. D. The impact of bipedal mechanical loading history on longitudinal long bone growth. *PloS One*, **14** (2), 0211692 (2019).  
DOI: 10.1371/journal.pone.0211692

## Octacalcium Phosphate Doped with Barium Cations for Application in Tissue Engineering

I.V. Smirnov\*, P.V. Smirnova\*, A.Yu. Teterina\*, V.V. Minaichev\*, \*\*, M.I. Kobyakova\*, \*\*, P.S. Salynkin\*\*, A.I. Zvyagina\*\*, K.V. Pyatina\*, \*\*, E.I. Meshcheryakova\*\*, I.S. Fadeeva\*, \*\*, S.M. Barinov\*, and V.S. Komlev\*

\*A.A. Baykov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 49, Moscow, 119334 Russia

\*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The objective of the study was to investigate the impact of barium cation doping on the phase and structural properties of octacalcium phosphate powder synthesized via a low-temperature method, along with its biocompatibility, particularly under *in vitro* circumstances that mimic inflammation. It was revealed that doping with  $\text{Ba}^{2+}$  cations in the concentration range used (1, 5 and 10 calculated %) does not interfere with the low-temperature chemical transformation of DPCD and its transformation into OCP, however, the percentage of real substitution is at a maximum of 6.7 at.%. The results of *in vitro* studies confirm that the substitution of  $\text{Ca}^{2+}$  for  $\text{Ba}^{2+}$  in the structure of OCP does not affect its cytotoxic properties and all the studied variants of low-temperature OCP and its Ba-substituted variants at the recommended concentration of 1 mg/ml do not have a cytotoxic effect and are biocompatible. The effects revealed for OCP-Ba10, namely the absence of an effect on the content of lysosomes and ROS in human macrophages under normal conditions and a significant decrease in ROS production under inflammatory conditions, as well as a significant increase in the constitutive activation of T-lymphocytes, indicate that these processes are directly and dose-dependently associated with  $\text{Ba}^{2+}$  cations in the composition of OCP. The proposed approach of low-temperature chemical transformation of  $\text{Ba}^{2+}$ -substituted variants of OCP is promising and is of interest for obtaining CPC materials with specified properties. The obtained  $\text{Ba}^{2+}$ -substituted variants of OCP are safe and biocompatible, and the most effective variant of OCP with a maximum degree of  $\text{Ca}^{2+}$  substitution by  $\text{Ba}^{2+}$  10% (OCP-Ba10) is bioactive and has potential antioxidant and immunomodulatory effects.

**Keywords:** bioceramics, osteoplastic materials, low-temperature chemical transformation, calcium phosphates, octacalcium phosphate, doping, barium-substituted calcium phosphates