

DOI 10.30898/1684-1719.2020.4.14

УДК 539.2

ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ БИОСОВМЕСТИМЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

А. Ф. Белянин¹, А. С. Багдасарян^{2,3}, Н. С. Сергеева⁴, С. А. Багдасарян², Е. Р. Павлюкова³

¹ Центральный научно-исследовательский технологический институт “Техномаш”,
Москва, 121108, ул. Ивана Франко, 4

² Научно-производственное предприятие “Технологии радиочастотной идентификации
и связи”, Москва, 127051, Сухаревская пл. 4, стр. 1

³ Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН
125009, Москва, ул. Моховая 11-7

⁴ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена,
125284, Москва, 2-й Боткинский пр., 3

Статья поступила в редакцию 15 апреля 2020 г.

Аннотация. Создание биоискусственных органов и тканей в реконструктивно-пластической хирургии во многом зависит от разработки каркасных носителей для клеток с использованием микро- и наночастиц различной природы. В настоящей работе исследовано взаимодействие микрочастиц порошков опаловых матриц (правильных упаковок шаровых наночастиц аморфного SiO₂ с диаметром 200–260 нм) и гейзерита (природного аналога опаловых матриц) с клеточными системами. Проведена оценка биосовместимости опаловых матриц (гейзерита) и динамики нарастания на них клеток на модели иммортализованных фибробластов человека. Рассмотрены особенности формирования и строения биоконпозиционного материала “опаловая матрица (гейзерит) – культура клеток”. Показано, что размножение клеток происходит на поверхности микрочастиц порошка опаловых матриц (гейзерита) с поперечным размером от единиц до десятков микрометров. Приведенные результаты исследования “in vitro” острой цитотоксичности и матриксных (адгезивных) свойств микрочастиц опаловых матриц и гейзерита, а также “in vivo” – их биосовместимости, позволяют рассматривать образование клеточными системами и микрочастицами трехмерного композита как элемента самоорганизации. Установлена устойчивость объемной двухфазной структуры

(“опаловая матрица (гейзерит) – культура клеток”), обусловленная тем, что твердая фаза (микрочастицы порошка опаловых матриц или гейзерита) армирует биологическую массу, создавая возможность объемного формирования последней.

Ключевые слова: опаловые матрицы, гейзериты, биокomпозиционные материалы, растровая электронная микроскопия.

Abstract. Construction of bio-artificial organs and tissues in reconstructive plastic surgery depends largely on the development of the cell scaffolds using micro- and nanoparticles of different nature. In the present paper, we consider the interaction of microparticles of opal matrix powders (regular packings of spherical nanoparticles of amorphous SiO₂ with a diameter of 200–260 nm) and geyselite (a natural analogue of opal matrixes) with cell systems. The biocompatibility of opal matrixes (geyselite) and the cell growth dynamics in an immortalized human fibroblast model were evaluated. The features of the formation and structure of the biocomposite material “opal matrix (geyselite) - cell culture” have been considered. It was demonstrated that cell reproduction take place on the surface of opal matrix powder (geyselite) microparticles with a crosswise size from units up to tens of micrometers. Given “in vitro” investigation results of the acute cytotoxicity and matrix (adhesive) properties of opal matrixes and geyselite microparticles, as well as “in vivo” of their biocompatibility, make us possible to consider the formation of three-dimensional composite by cell systems and microparticles as an element of self-organization.

The stability of the three-dimensional two-phase structure (“opal matrix (geyselite) - cell culture”) has been determined, due to the fact that the solid phase (opal matrix powder or geyselite microparticles) reinforces the biological mass, creating the possibility of volumetric formation of the last one.

Keywords: opal matrixes, geyselites, biocomposite materials, scanning electron microscopy (SEM).

Введение

Формирование биоискусственных органов и тканей в реконструктивно-пластической хирургии в значительной степени зависит от разработки

каркасных носителей для клеток с использованием микро- и наночастиц различной природы, поскольку их размеры и особенности строения могут оказаться совместимыми с культивируемыми клеточными структурами. Для разработки биоконпозиционных материалов перспективно изучение физического и биохимического взаимодействия биологических тканей и наночастиц различных веществ. Способ формирования биоконпозиционных структур, в перспективе, должен обеспечивать замещение структурных дефектов, возникающих при оперативных вмешательствах. Известны различные физико-химические методы получения гетерогенных структур, позволяющих имитировать структурно-морфологические свойства поверхности биологических объектов. Для создания гетерогенных структур среди неорганических материалов перспективны синтетические материалы (опаловые матрицы (ОМ)) и минералы (гейзерит – природный аналог ОМ) на основе кремнезема (аморфного SiO_2). Указанные вещества могут найти применение в медицине для культивирования на них клеток различных типов, что позволяет их использовать в качестве каркаса биомассы при создании гибридных (биоискусственных) трансплантатов органов и тканей. Возможность применения ОМ и гейзерита для культивирования на них клеток различных типов, в том числе стволовых, а также поддержка их дифференцирования в разных направлениях в соответствии с особенностями мест трансплантации, описана ранее [1, 2]. По указанной причине представляется важным изучение взаимодействия ОМ и гейзерита с клеточными системами для создания стабильных с воспроизводимыми характеристиками композитных структур биосовместимых материалов.

Гейзериты (кремнистые туфы), относят, в основном, к биогенным отложениям и представляют наслоения кремнезема, образующиеся из термальных вод горячих источников, важной особенностью которых является участие в их формировании микроорганизмов [3–5]. В местах выходов термальных вод обитают бактериальные сообщества, включающие как продуцентов (фототрофов, хемотрофов), так и редуцентов [3, 4]. Часто в таких

системах образуются бактериальные маты, содержащие различную концентрацию кремнезема. Выделено несколько “генетических” типов гейзеритов, отличающихся друг от друга размером и распределением частиц кремнезема, а также наличием силифицированных остатков микроорганизмов [3, 4].

ОМ представляют собой плотнейшую 3D-упаковку одинаковых по диаметру ($\Delta d < 5\%$) шаровых наночастиц из аморфного SiO_2 [6–9]. Диаметр шаровых наночастиц SiO_2 зависит от условий получения ОМ и варьируется от ~200 до ~700 нм [9–12]. Упаковка шаровых наночастиц SiO_2 образует упорядоченную 3D-систему структурных пустот, занимающих 26% объема ОМ. При заполнении пустот различными веществами получают нанокompозиты, относящиеся к метаматериалам. Нанокompозиты на основе ОМ перспективны при создании аппаратуры электронной техники с уникальными характеристиками, в частности, твердотельных СВЧ-устройств [6, 8, 11–14]. Метаматериалы на основе ОМ могут быть использованы в качестве магнитных носителей и магнитных датчиков [8, 13, 15–22]. Возможно применение ОМ и нанокompозитов на их основе в автоэмиссионных катодах, источниках электромагнитных излучений и других устройствах [6, 23–25]. Помимо представленных применений, ОМ и композиционные материалы, включающие ОМ, перспективны в медицине в качестве функциональных сред, используемых для генерации акустических волн и рентгеновского излучения, а также создания управляющих устройств для преобразования сигналов [12, 23].

Целью работы является получение и изучение возможности применения биосовместимых ОМ и гейзеритов для культивирования клеточных систем.

Методика эксперимента

Получение и подготовка к экспериментам ОМ и гейзеритов. ОМ получали по ранее разработанной методике при температурах 310–350 К из эмульсии, приготовленной смешением 1 части 25% водного раствора гидроксида аммония (NH_4OH), 50 частей этанола ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) и 1,6 частей тетраэфира ортокремниевой кислоты ($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$) [8, 11]. При получении 3D-

наноструктур с регулируемыми размерами шаровых наночастиц SiO_2 , чьи высокоупорядоченные упаковки образовывали бы области с размерами, достаточными для проведения необходимых медико-биологических исследований применялись специально разработанные процессы и технологическое оборудование. Вещества, использованные при получении ОМ, удалялись термообработкой массивных образцов (775–975 К) при давлении ~ 1 Па. После вакуумной термообработки массивные образцы упрочняли при повышенных температурах и давлениях, при которых происходил перенос кремнезема в область соприкосновения шаровых наночастиц SiO_2 с образованием химических связей $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$. Были изготовлены массивные образцы ОМ объемом до 3 см^3 с диаметром шаровых наночастиц SiO_2 ~ 200 – 260 нм ($\Delta d \approx 2$ – 4%) и размером монодоменных областей (области правильной укладки шаровых наночастиц SiO_2) $> 0,1 \text{ мм}^3$. Массивные образцы ОМ дробились и, с использованием стандартных сит, из полученного порошка выделялись необходимые фракции микрочастиц. Для экспериментов применялись микрочастицы порошков ОМ различных фракций (до 5–40 мкм). Порошки из ОМ получали также методом центрифугирования, при использовании которого помимо микрочастиц получали отдельные шаровые наночастицы SiO_2 [1, 2]. В качестве матрисов (носителей) использовали гейзериты субквального типа, которые образуются на дне водотоков с термальной водой в результате пересыщения растворов и выпадения коллоидов кремнезема. У использованных в экспериментах гейзеритов размер глобул кремнезема (овалоидные частицы) находился в диапазоне 0,8–1 мкм. При получении порошков гейзеритов объемные образцы растирали в агатовой ступке.

Микрочастицы порошков ОМ и гейзерита после рассеивания до необходимых размеров промывали специально подготовленными растворами и просушивали. Полученные порошки подвергали ступенчатому отжигу в течение 3 часов при максимальной температуре 570 К. Непосредственно перед биомедицинскими исследованиями порошки ОМ и гейзеритов отмывали в

дистиллированной воде с последующим осаждением и высушиванием при 420 К. Операции отмывки и высушивания повторяли дважды, после чего микрочастицы порошков стерилизовали в сухожаровом шкафу при 420 К в течение 2 часов.

Техника и технология биомедицинских испытаний клеточных систем в экспериментах “in vitro” и “in vivo”. Подготовку материалов для экспериментов “in vitro” проводили по стандартной методике [1, 2]. Особенности строения биокомпозитов “ОМ (гейзерит) – размножающиеся клетки”, биосовместимость указанных материалов и динамику нарастания клеток изучали на модели иммортализованных диплоидных фибробластов человека (ФЧ) (клон № 1608), полученных из коллекции типовых клеточных культур Медико-генетического научного центра имени академика Н.П. Бочкова, Москва. Испытание образцов проводили в 24-х луночных платах (Costar, США). В планшеты помещали стерильные материалы (200 мг на лунку) и вносили 1 мл ростовой среды для полного их насыщения культуральной жидкостью. Образцы в платах были представлены в триплетах. Эксперименты “in vitro” по оценке биосовместимости исследуемых материалов, их острой цитотоксичности и динамики нарастания клеток также были выполнены на модели клеточной линии иммортализованных нормальных ФЧ.

Клеточную линию поддерживали в полной ростовой среде состава: 10% эмбриональная телячья сыворотка (ФУРО, Москва), глютамин (600 мг/л), гентамицин (50 мкг/мл) (среда ДМЕМ, Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва). В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста (предконфлюэнтный монослой). Для получения суспензии одиночных клеток монослой ФЧ обрабатывали 0,25% раствором трипсина (Sigma, США), а полученную взвесь клеток отмывали центрифугированием в большем объеме полной ростовой среды. Подсчет и оценку жизнеспособности ФЧ проводили, окрашивая клеточную суспензию 0,04% раствором трипанового синего. В платы с исследуемыми образцами

(опыт) и без них (контроль) помещали ФЧ (190 тыс. клеток/см³, 380 тыс. клеток в лунке) в объеме 1500 мкл полной ростовой среды и инкубировали для определения острой цитотоксичности в течение 4–24 часов, а также для оценки матриксных свойств микрочастиц порошка ОМ – 3, 7, 14 суток (микрочастицы порошка гейзерита – 24, 60, 90 и 120 суток) с заменой через каждые три дня полной ростовой среды. Культивирование проводили при температуре 310 К в воздухе, содержащем 5% СО₂.

Жизнеспособность ФЧ в динамике эксперимента оценивали с использованием метода, основанного на умении дегидрогеназа живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый (МТТ, Sigma, США) в голубые кристаллы формаза, нерастворимые в воде (МТТ-метод).

Для проведения МТТ-теста в опытах “in vitro” после завершения культивирования ФЧ на культуральном пластике–полистирене (контроль) и ФЧ на микрочастицах порошков ОМ и гейзерита (опыт) из каждой лунки отбирали по 1000 мкл среды и вносили по 125 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл. Через 3 часа инкубации в воздухе, содержащем 5 объемных % СО₂ (310 К) из каждой лунки декантировали по 250 мкл среды. Образовавшийся формаза растворяли в изопропиловом спирте (750 мкл на лунку). Осадок, образующийся в результате преципитации белков в изопропанол, удаляли центрифугированием (3000 об/мин) плат в течение 10 минут. Далее из каждой лунки переносили по 100 мкл супернатанта в 96-луночный планшет (Costar, США) и оценивали оптическую плотность (*D*) раствора формаза. В качестве спектрофотометрического контроля (бланк) использовали пробы с чистой полной ростовой средой и пробы, содержащие тестируемые образцы в полной ростовой среде (без клеток). Для определения цитотоксичности материалов по оптической плотности раствора формаза (опыт и контроль) рассчитывали фракцию выживших клеток после 4–24 часов инкубации с ними [1, 2]. При оценке матриксных свойств микрочастиц порошка ОМ или гейзерита, используя величины оптической плотности раствора формаза для

фиксированного и предыдущего периодов, определяли изменение пула (Δ) ФЧ для фиксированного периода. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента.

При исследовании биосовместимости микрочастиц порошков SiO_2 , в экспериментах “in vivo”, использовали модель подкожной трансплантации. Мышам (самки линии BDF1 весом 18–20 г) под наркозом (внутримышечно смесь 0,5 мл раствора кетамина и 0,5 мл раствора реланиума; 0,08 мл/мышь) делали кожный надрез в области грудного отдела позвоночника (паравертебрально). Кожу отделяли от прилегающего слоя подкожной клетчатки и мышц и в образованный “карман” трансплантировали (при помощи шпателя) предварительно отмытые, высушенные, стерильные микрочастицы порошка ОМ (120 мг). Биоконпозиты на основе микрочастиц порошка ОМ извлекали из мышей на 7, 14, 30 сутки эксперимента. Для микроскопического изучения (стереомикроскоп) из извлеченных биоконпозитов на основе микрочастиц порошка ОМ изготавливали парафиновые блоки и гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилинэозином.

Методы анализа биоконпозитов. Состав и строение ОМ, гейзерита и биоконпозитов на их основе исследовали с использованием растровых электронных микроскопов (РЭМ) Carl Zeiss Supra 40-30-87 и JSM-5610LV; просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) JEM 200С. Наличие кристаллических фаз в ОМ и гейзерите определяли рентгеновской дифрактометрией (прибор ARL X'tra, Thermo Fisher Scientific, Cu $k\alpha$ -излучение) и спектроскопией комбинационного рассеяния света (LabRAM HR800, HORIBA Jobin-Yvon, линия 632,8 нм He-Ne лазера). Оптическую плотность раствора формазана измеряли спектрофотометром МСС-340 (длина волны $\lambda = 540$ нм).

При изучении методом РЭМ микрочастицы порошков ОМ и гейзерита, а также образцы композиционных биологических объектов (клеточные системы) размещались на подложках из кремния или аморфного диоксида кремния (плавленый кварц). Анализируемую поверхность сформированных структур

для отвода заряда, возникающего от воздействия пучка электронов, покрывали рентгеноаморфной пленкой титана (Ti) толщиной < 7 нм. Пленку Ti на исследуемые образцы наносили магнетронным распылением аргоном (Ar) мишени из Ti при следующих условиях: давление Ar 2 Па; мощность разряда 1 кВт (постоянный ток); температура образца 295 К. Пленку Ti наносили в течение 12 секунд без подогрева образцов. Использовали специально сконструированную установку на базе вакуумного поста Alcatel, снабженного шлюзовой камерой загрузки. Исследуемые образцы находились при давлении 2 Па менее 3 мин. Специально разработанный цельнометаллический магнетрон позволял получать сплошные пленки при толщине 3–7 нм, что обеспечивало эффективный отвод заряда и не искажало рельеф анализируемой поверхности. Образцы анализировали при ускоряющем напряжении электронов в РЭМ равном 9 кВ при токе пучка < 1 мА (остаточное давление газа в аналитической ячейке электронного микроскопа $\sim 10^{-4}$ Па). Указанные режимы и не использование ионной чистки анализируемой поверхности снижали вносимые искажения в исследуемые образцы биокomпозитов [1, 26].

Результаты и их обсуждение

Строение и состав OM и гейзерита. В работе использовали микрочастицы порошков OM с диаметром шаровых наночастиц аморфного SiO₂ $d \approx 200\text{--}260$ нм ($\Delta d \approx 4\%$). Диаметр шаровых наночастиц SiO₂, составляющих OM, зависел от условий формирования (концентрации растворов, температуры и др.). Строение использованных микрочастиц порошков, сформированных из правильных упаковок шаровых наночастиц SiO₂ диаметром ~ 250 нм, представлено на рис. 1, а, б. OM представляют плотнейшую упаковку шаровых наночастиц SiO₂, заполняющих 74% объема матрицы, и содержат систему сообщающихся структурных межшаровых пустот, занимающих 26% объема OM. Шаровые наночастицы SiO₂ в OM имеют соприкосновение, близкое к точечному и образуют решетку. Упрочненные образцы OM имели контактные площадки диаметром $0,1\text{--}0,3d$ в области соприкосновения шаровых наночастиц SiO₂. Плотнейшую упаковку шаровых

наночастиц SiO_2 можно представить в виде тетраэдров и октаэдров, полностью заполняющих пространство. На рис. 1,в показано образование октаэдрических (1) и тетраэдрических (2) пустот (по числу формирующих пустоту шаровых наночастиц SiO_2 (3)), при этом каждая шаровая наночастица SiO_2 окружена восемью тетраэдрическими и шестью октаэдрическими пустотами. На рис. 1,в (слева) на гранях тетраэдров и октаэдров (плоскости $\{111\}$ на стыке тетраэдрических и октаэдрических пустот) приведены вогнутые линии треугольных сечений каналов, соединяющих межшаровые пустоты и имеющих максимальный размер $\sim 0,37d$. Тетраэдрические и октаэдрические пустоты условно состоят из сфер диаметром $\sim 0,22d$ и $\sim 0,41d$, вписанных в межшаровые пустоты, и соединяющего их пространства. На вписанные в пустоты сферы приходится $\sim 7\%$ объема ОМ. На рис. 1,г представлена объемная модель ОМ, показывающая упорядоченное расположение сообщающихся пустот.

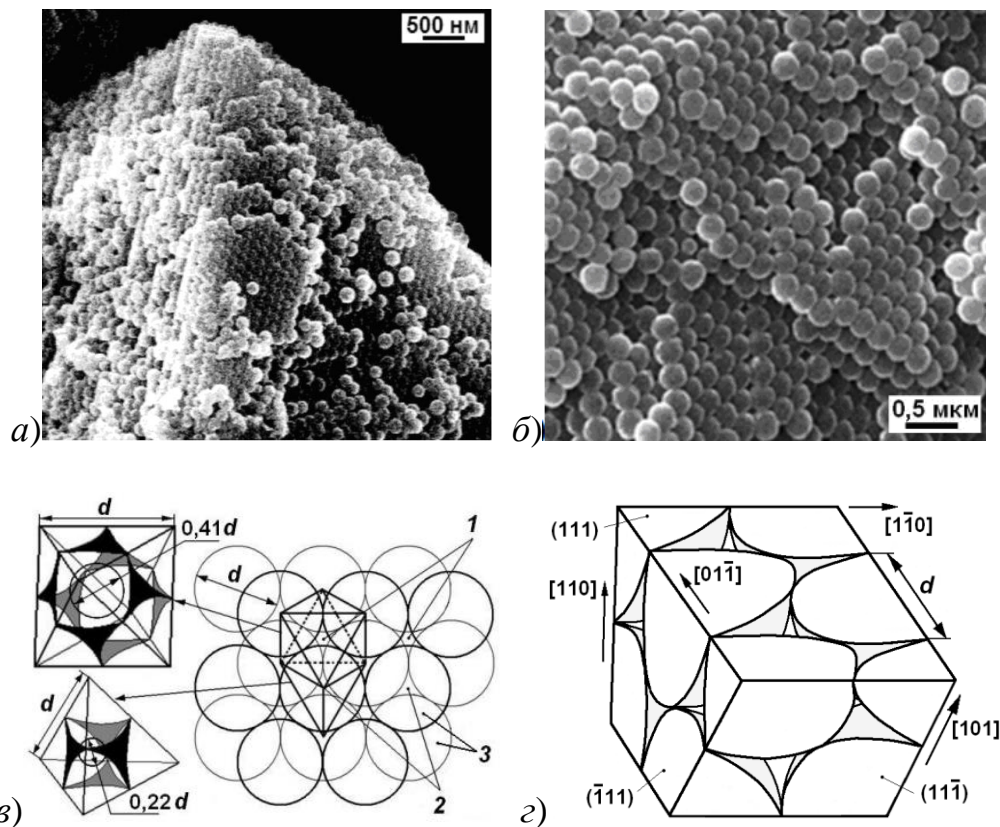


Рис. 1. а, б) РЭМ-изображение общего вида (а) и поверхности (б) отдельной объемной микрочастицы порошка ОМ. в) Два уровня шаровых наночастиц SiO_2 , формирующих октаэдрические и тетраэдрические межшаровые пустоты. г) Фрагмент объемной микрочастицы порошка ОМ (вырез по плоскостям $\{111\}$).

В отличие от ОМ, характеризующихся нанопористостью, гейзериты имеют как нанопустоты, аналогичные по размерам пустотам ОМ, так и микропустоты размером несколько микрон. Строение микрочастиц порошка гейзеритов, использованных в экспериментах по наращиванию клеточной биомассы, показано на рис. 2.

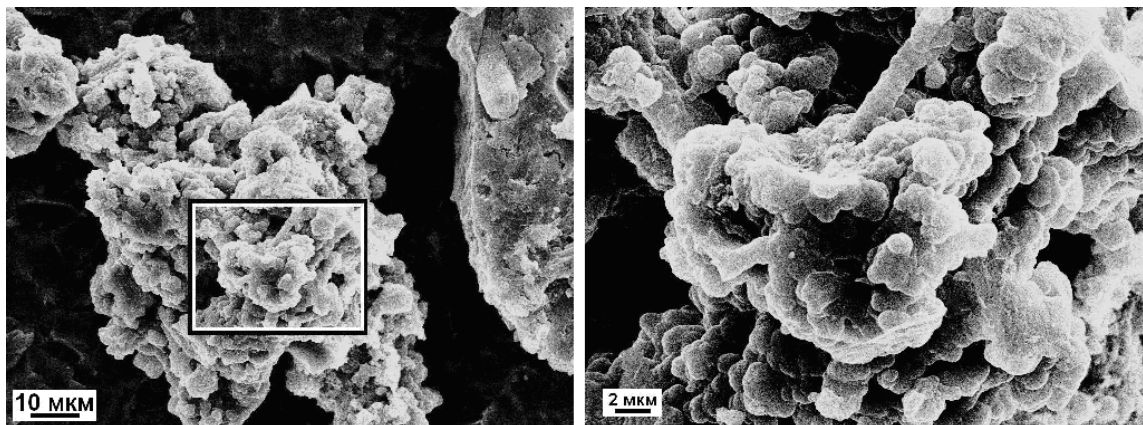


Рис. 2. РЭМ-изображение микрочастиц порошка гейзерита, использованного в экспериментах (справа показан увеличенный выделенный участок).

В настоящем разделе работы представлены фотографии микрочастиц порошка гейзеритов различных генетических типов. На микроструктуре микрочастицы порошка гейзерита субаквального генетического типа наблюдались фоссилизированные нитевидные формы бактерий длиной от 5 до 80 мкм (признаки биогенной природы) (рис. 3,а). На рис. 3,б показана микрочастица порошка гейзерита субаэрального типа, представляющая чередование слоев высокопористых (существенно биогенных) и стекловидных. На снимке наблюдается кольцо мелкодисперсного пирита (дисульфид железа, FeS_2 (пространственная группа $Pa3$)), агрегаты которого могут быть продуктами замещения микроорганизмов в анаэробных условиях при высокой температуре. На правой части снимка, внизу, представлен увеличенный выделенный участок: силифицированный обломок створки раковины диатомеи. На рис. 3,в показан массивный фрагмент частицы гейзерита, образованного в толще водонепроницаемых пород (стрелкой показана овалоидная частица, имеющая иерархическое строение). Глобулы кремнезема конденсируются и на

внутренних, и на внешних поверхностях оболочек микроорганизмов, что позволяет предположить, что для них основным механизмом образования является улавливание коллоидных частиц кремнезема поверхностью водорослей и бактерий с последующим заполнением пространства между ними плотным опаловым материалом, выступающим в роли цемента. Размер наблюдаемых глобул кремнезема составляет от 0,8 до 1 мкм, причем периодические упорядоченные структуры не возникают.

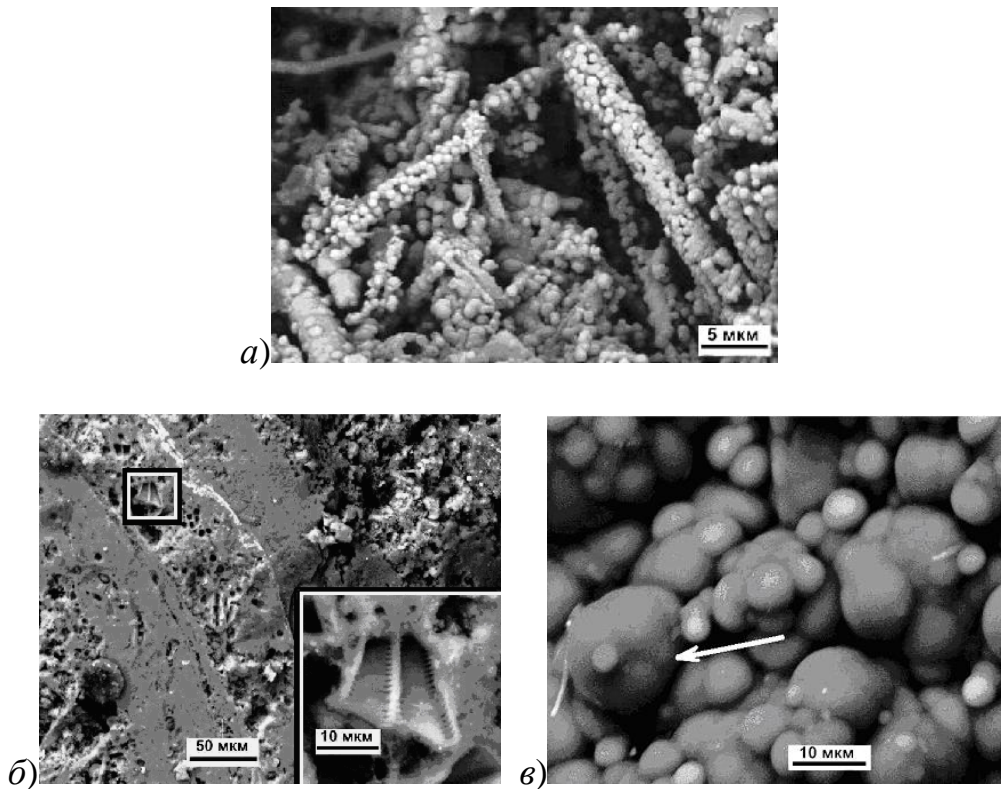


Рис. 3. РЭМ-изображение гейзеритов различных генетических типов.

На рентгеновских дифрактограммах ОМ, отожженных при температурах < 1470 К, дифракционных максимумов от SiO_2 не обнаружили из-за малого (< 1 нм) размера кристаллитов (областей когерентного рассеяния), что не позволяет их идентифицировать по причине размерного уширения в соответствии с уравнением Дебая-Шеррера. Рентгеновской дифрактометрией ОМ, отожженных на воздухе при 1470 К, установлено образование фазы SiO_2 -кristобалит ($P4_12_12$), имеющей размер кристаллитов ~ 20 нм (рис. 4; показаны кристаллографические индексы дифракционных максимумов). Отжиг ОМ при 1520 – 1570 К ведет к образованию кварцевого стекла.

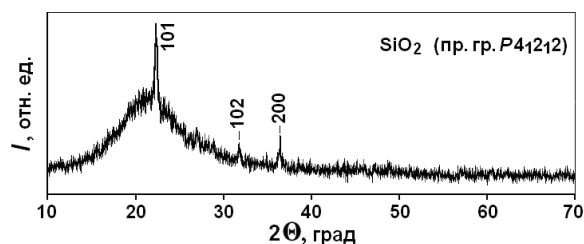


Рис. 4. Рентгеновская дифрактограмма порошка микрочастиц ОМ, отожженного на воздухе при 1470 К в течение 4 часов.

Фазы SiO_2 , которые не удается обнаружить с использованием рентгеновской дифрактометрии, устанавливали спектроскопией комбинационного рассеяния света. До температуры ~ 1170 К изменений в спектрах комбинационного рассеяния света ОМ не обнаружено. Для спектров комбинационного рассеяния света ОМ, состоящих из аморфного SiO_2 , характерны слабая полоса при сдвиге комбинационного рассеяния света $\Delta\nu$ равном ~ 1060 см^{-1} , полосы средней интенсивности вблизи $\Delta\nu \sim 600$ и ~ 800 см^{-1} и полосы при $\Delta\nu \sim 420$ и ~ 490 см^{-1} (рис. 5,а).

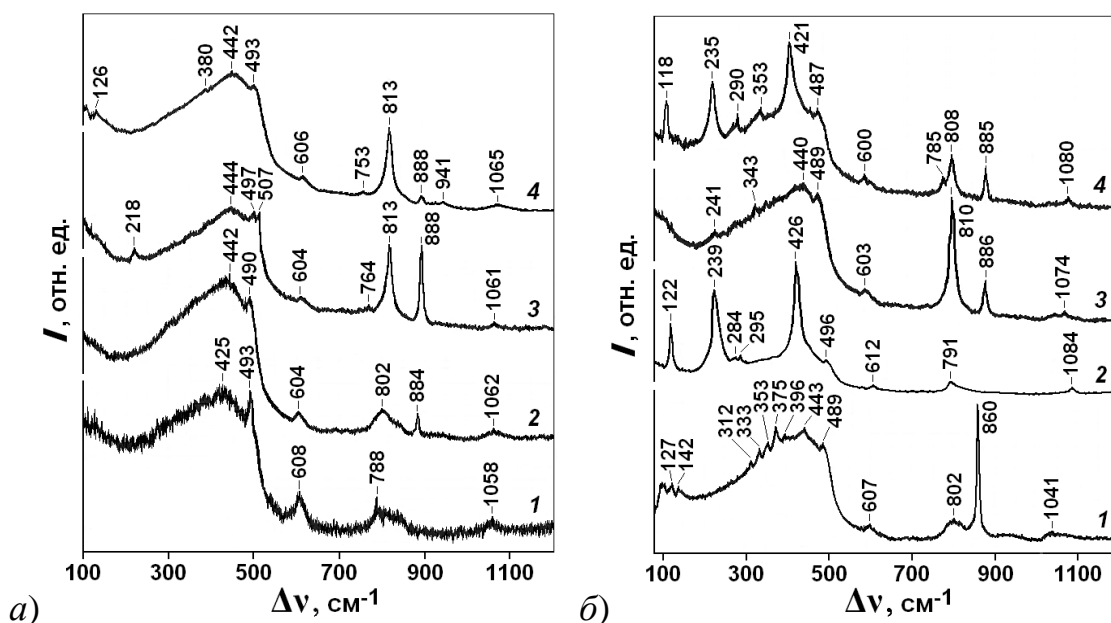


Рис. 5. Спектры комбинационного рассеяния света ОМ, отожженных при температурах:

- а) 1 – 1170 К (4 часа); 2 – 1270 К (4 часа); 3, 4 – 1320 К (3 – 12 часов; 4 – 24 часа);
 б) 1 – 1370 К (4 часа); 2 – 1420 К (12 часов); 3, 4 – 1470 К (3 – 3 часа; 4 – 8 часов)

При температурах > 1170 К начиналась кристаллизация аморфного SiO_2 в SiO_2 -кристобалит ($P4_12_12$), для которого характерны интенсивные полосы при $\Delta\nu$ 110, 228 и 413 см^{-1} , а также слабые полосы при $\Delta\nu$ 146, 271, 282, 771, 1068, 1185 и 1390 см^{-1} . На спектрах комбинационного рассеяния света ОМ, отождествленных при 1270 К присутствует слабая полоса при $\Delta\nu$ 884 см^{-1} , которую можно отнести к SiO_2 -кварц ($P3_221$). Также фазе SiO_2 -кварц соответствуют полосы при $\Delta\nu$ $802\text{--}813 \text{ см}^{-1}$. При 1470 К кристаллическая фаза SiO_2 -кварц переходит в SiO_2 -кристобалит (полосы при $\Delta\nu$ 118, 235, 290, 421, 785 и $1074\text{--}1080 \text{ см}^{-1}$) (рис. 5,б). Следует отметить зависимость образования кристаллических фаз SiO_2 при отжиге от условий формирования ОМ (рис. 5,б, кривые 3, 4).

Рентгеновская дифрактометрия и спектроскопия комбинационного рассеяния света порошков гейзерита показала наличие аморфной и рентгеноаморфной (размер кристаллитов < 1 нм) фаз SiO_2 . Спектры комбинационного рассеяния света выявили в добавление к аналогичным спектрам ОМ дополнительные полосы, относящиеся к легированным кристаллическим фазам SiO_2 и частично заполняющих структурную пористость кристаллическим фазами примесных минералов, например оксидов и сульфидов железа.

Условия термического воздействия в процессе изготовления и обработки объемных образцов и порошков микрочастиц ОМ и гейзерита не предусматривали нагрев образцов до температур > 1170 К, при которых происходит перекристаллизация рентгеноаморфных фаз. Таким образом, в проведенных экспериментах использовали образцы ОМ и гейзерита, содержащих только аморфные и рентгеноаморфные фазы SiO_2 . (концентрация примесных фаз не превышала 1%).

Взаимодействие клеточных структур с микрочастицами ОМ и гейзерита. Поведение нано- и микрочастиц порошков ОМ, а также микрочастиц порошков гейзерита в питательном растворе представлено на

рис. 6–9. На рис. 6 и рис. 7 стрелками показаны стенки кюветы; снимки сделаны с использованием оптического микроскопа).

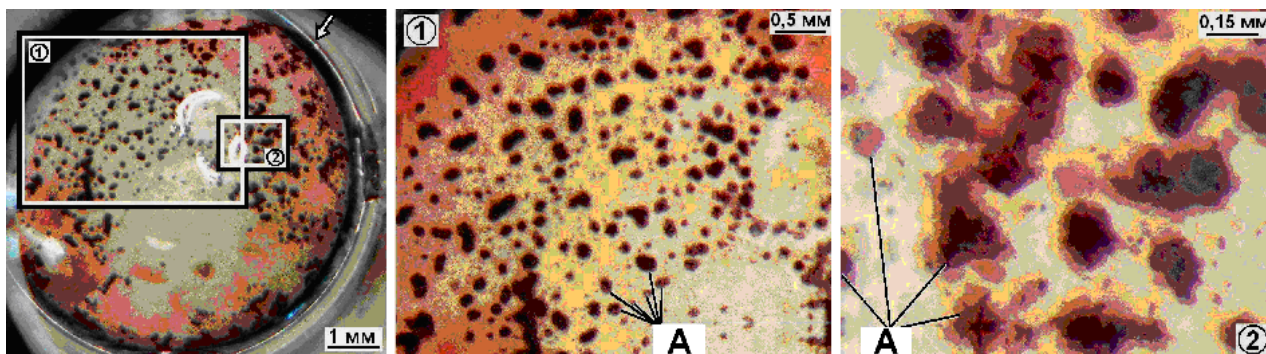


Рис. 6. Формирование двухфазной структуры “гейзерит – клеточная биологическая масса” (A); (1 сутки культивирования) (справа показаны увеличенные выделенные участки).

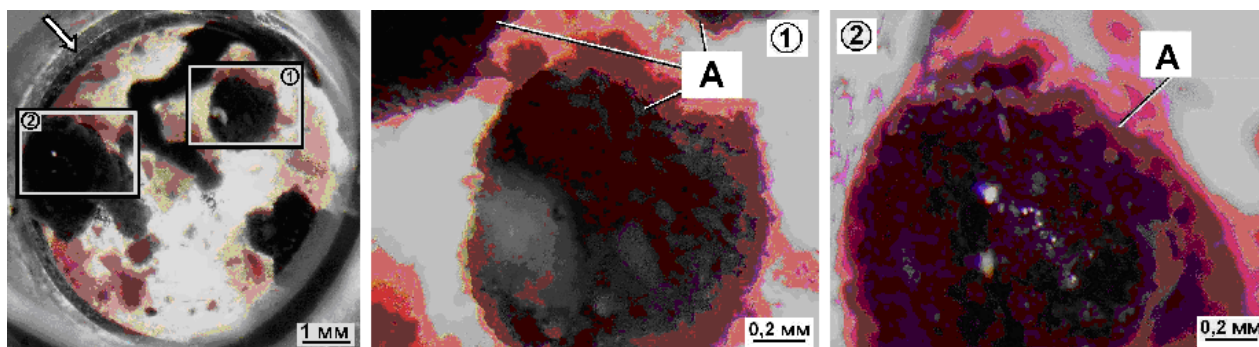


Рис. 7. Формирование двухфазной структуры “гейзерит – клеточная биологическая масса” (A); (14 сутки культивирования) (справа показаны увеличенные выделенные участки).

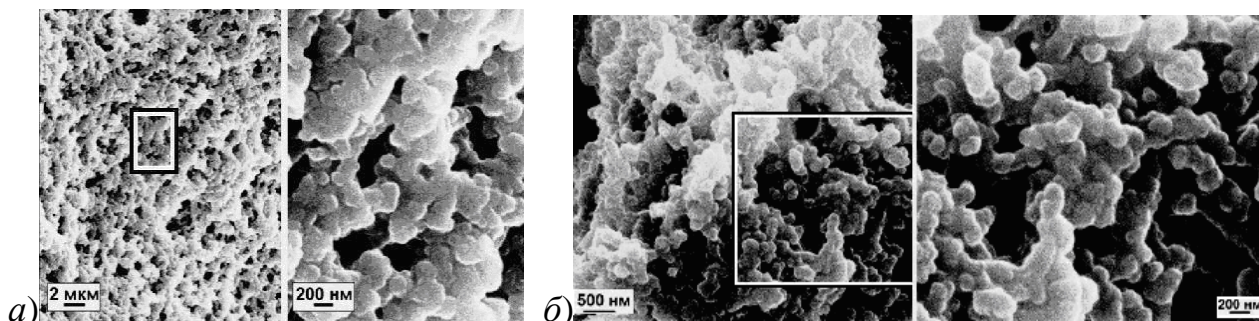


Рис. 8. РЭМ-изображение отдельных шаровых наночастиц SiO_2 в питательном растворе (справа показаны увеличенные выделенные участки).

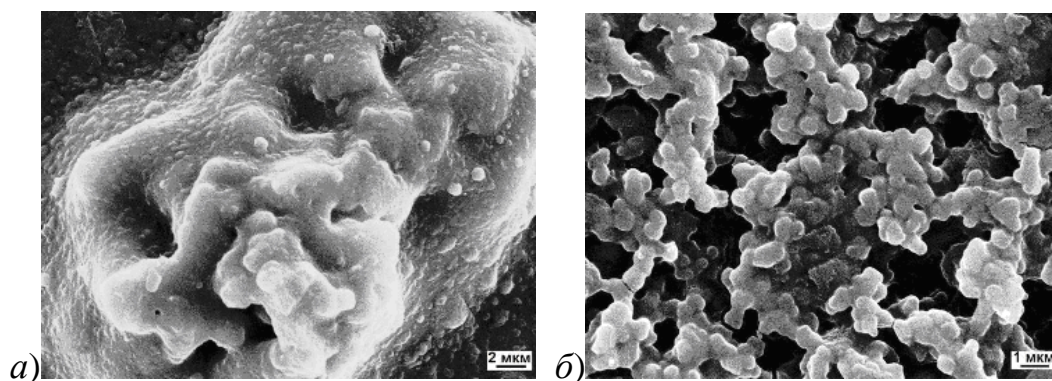


Рис. 9. РЭМ-изображение отдельных микрочастиц порошка гейзерита в питательном растворе (14 дней культивирования)

Показано, что размножение клеток (иммортиализованные ФЧ) происходит на поверхности микрочастиц порошка ОМ с поперечным размером от единиц до десятков микрометров (рис. 10), при этом, правильность упаковки шаровых наночастиц SiO_2 сохраняется (смотри увеличенные выделенные участки на рис. 10).

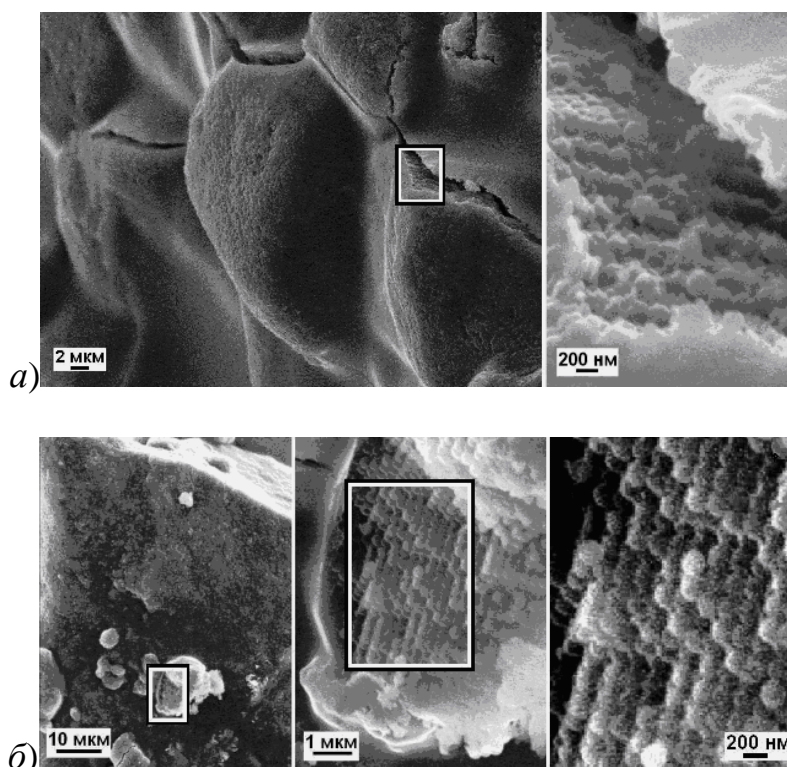


Рис. 10. РЭМ-изображение взаимодействия микрочастиц порошка ОМ и клеточной системы (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего)

На рис. 11 представлены свободные микрочастицы порошка ОМ, расположенные по границе двухфазной структуры (“ОМ – биологическая масса”). Таким образом, формируется двухфазная структура шарообразной формы, состоящая из биологической массы, армированной каркасом из микрочастиц порошка ОМ.

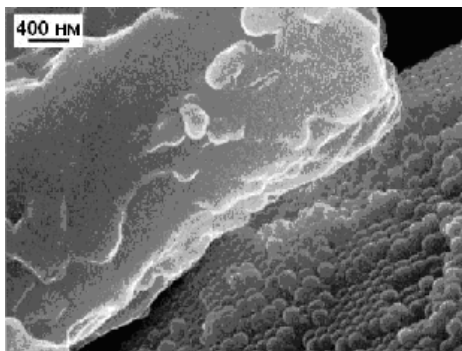


Рис. 11. РЭМ-изображение взаимодействия микрочастиц порошка ОМ и ФЧ.

При взаимодействии клеток с микрочастицами порошка ОМ или гейзерита наблюдалось появление характерных нитевидных отростков (рис. 12), а также в ряде случаев отделение и “захват” от микрочастиц порошка ОМ или гейзерита шаровых наночастиц SiO_2 или наночастиц гейзерита (рис. 13–19), используемых клеточной системой для увеличения объема биологической массы и последующего образования каркасной структуры.

В работе представлена обширная галерея иллюстраций строения областей контакта твердой фазы микрочастиц порошков ОМ и гейзерита. Представленные микроструктуры позволяют детально анализировать взаимодействие отдельных шаровых наночастиц SiO_2 и микрочастиц порошков ОМ и гейзерита. По указанной причине показаны не отдельные снимки, а многочисленные данные, иллюстрирующие весь спектр морфологических и физико-химических изменений, происходящих при формировании биоструктурного двухфазного материала.

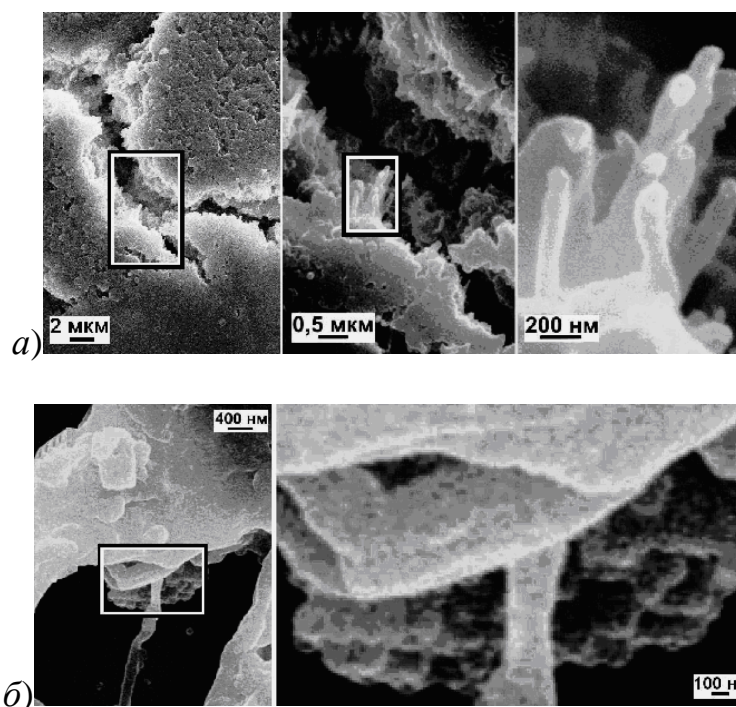


Рис. 12. РЭМ-изображение взаимодействия клеточной системы с микрочастицами порошка ОМ (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

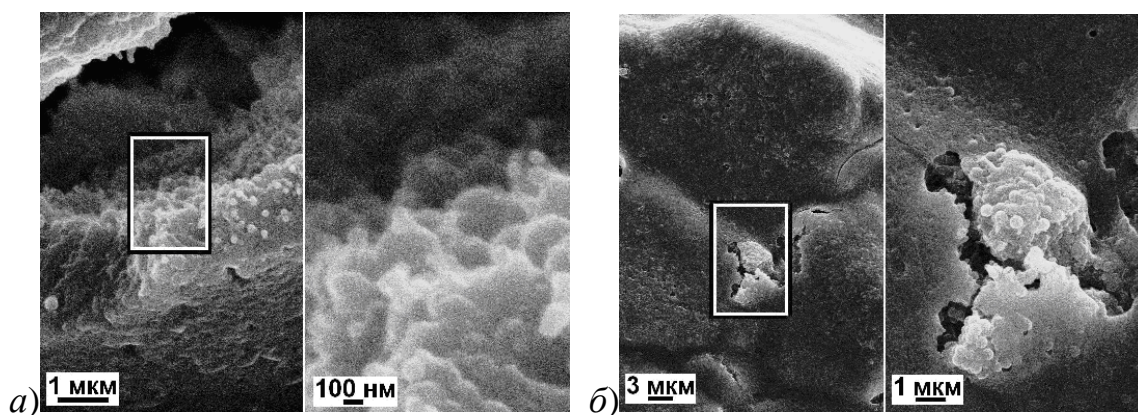


Рис. 13. РЭМ-изображение взаимодействия клеточной системы с микрочастицами порошка ОМ для решётчатых упаковок шаровых наночастиц SiO_2 (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

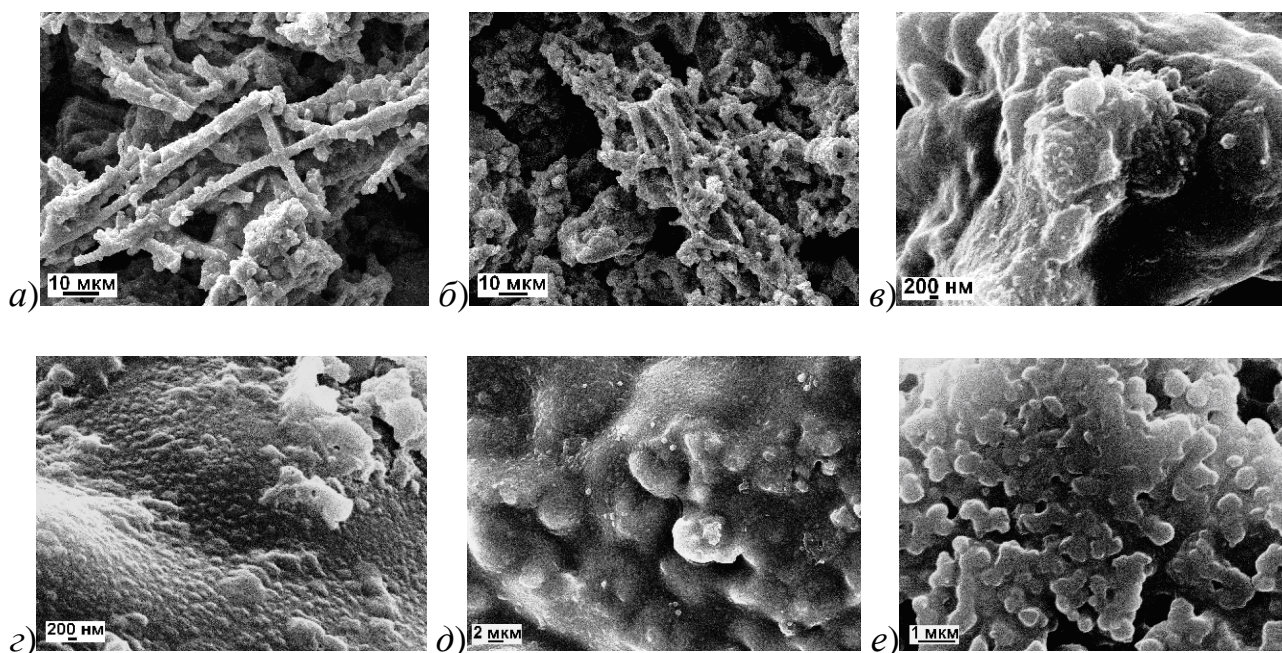


Рис. 14. РЭМ-изображение взаимодействия клеточной системы с микрочастицами порошка гейзерита (14 дней культивирования).

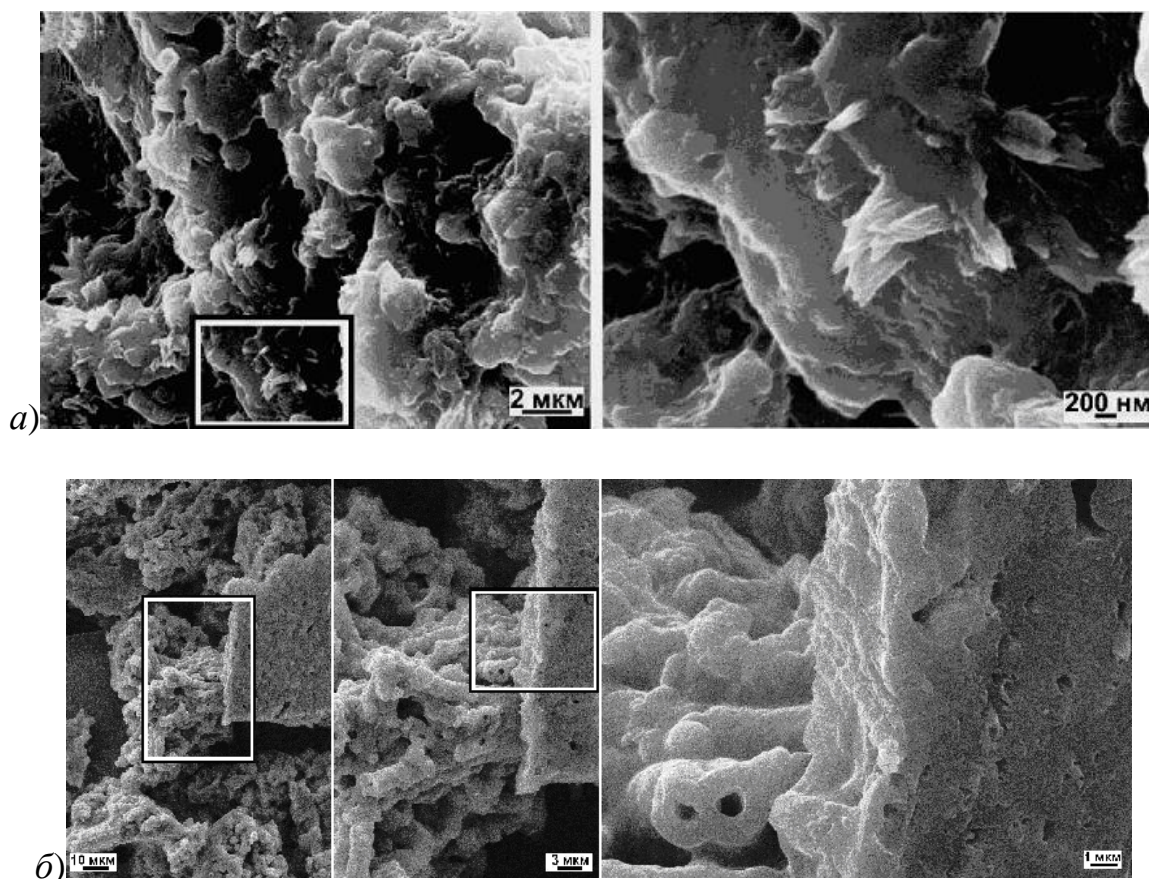


Рис. 15. РЭМ-изображение взаимодействия клеточной системы с микрочастицами порошка гейзерита (14 дней культивирования) (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

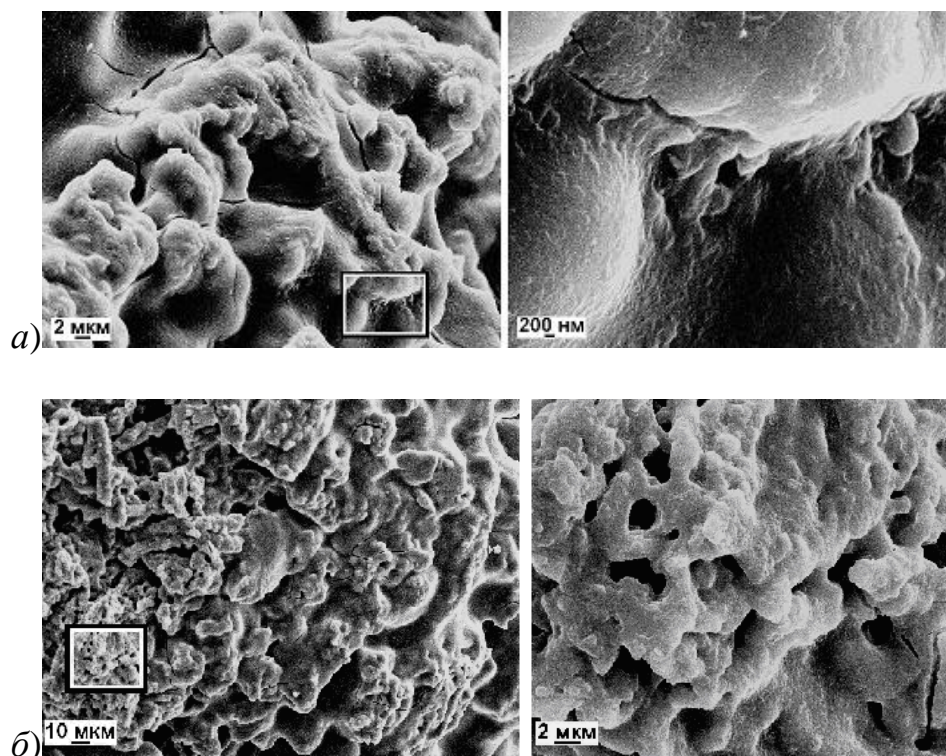


Рис. 16. РЭМ-изображение взаимодействие клеточной системы с микрочастицами порошка гейзерита (28 дней культивирования) (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

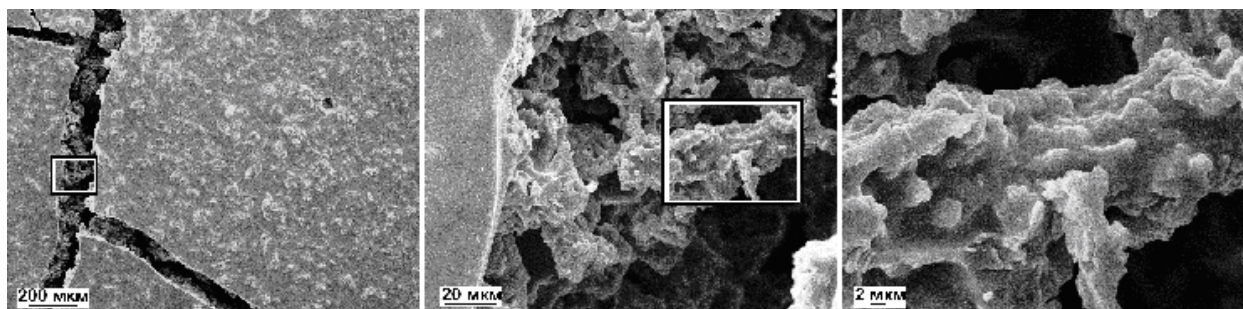


Рис. 17. РЭМ-изображение взаимодействия ростовой среды с микрочастицами порошка гейзерита (30 дней культивирования) (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

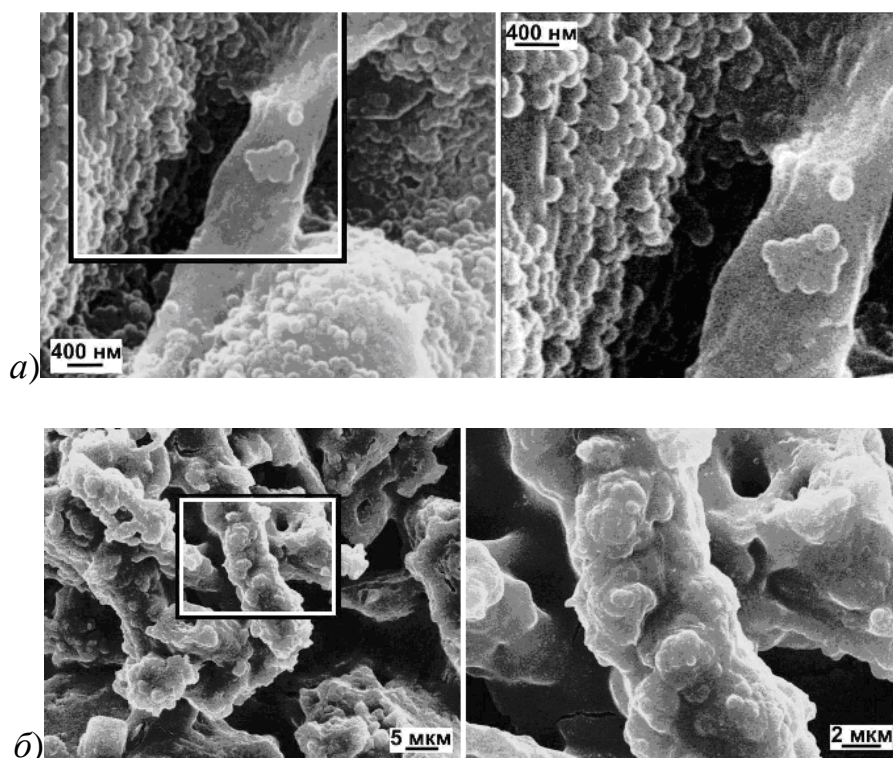


Рис. 18. РЭМ-изображение взаимодействия ФЧ: *а)* с объемными микрочастицами порошка ОМ и отдельными шаровыми наночастицами SiO₂; *б)* с микрочастицами порошка гейзерита (60 дней культивирования) (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

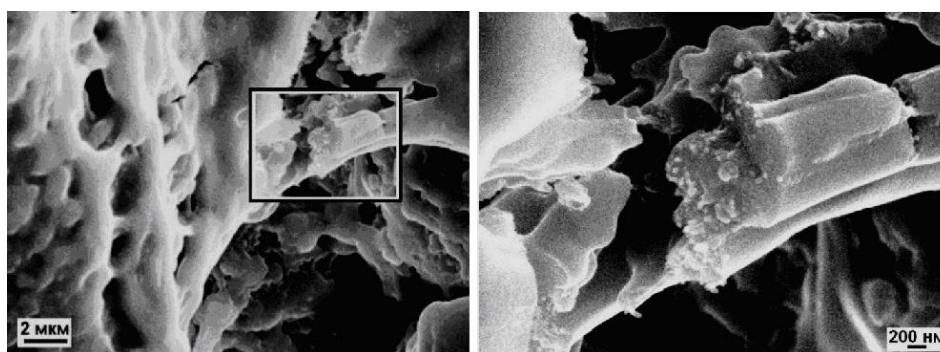


Рис. 19. РЭМ-изображение взаимодействия ФЧ с отдельными шаровыми наночастицами SiO₂ (справа показан увеличенный выделенный участок).

В трещинах и на вскрытых участках просматриваются крупные микрочастицы порошка ОМ, при этом их поверхность соответствует плоскости {111} плотнейшей кубической упаковки (рис. 20). Редкое присутствие других плоскостей, например, {100}, вероятно, связано с их более низкой ретикулярной плотностью и, как следствие, меньшим сцеплением шаровых наночастиц SiO₂ с микрочастицей ОМ. С использованием электронного

микроскопа можно наблюдать отделение шаровых наночастиц SiO_2 от ОМ, ограниченных по таким плоскостям (рис. 21).

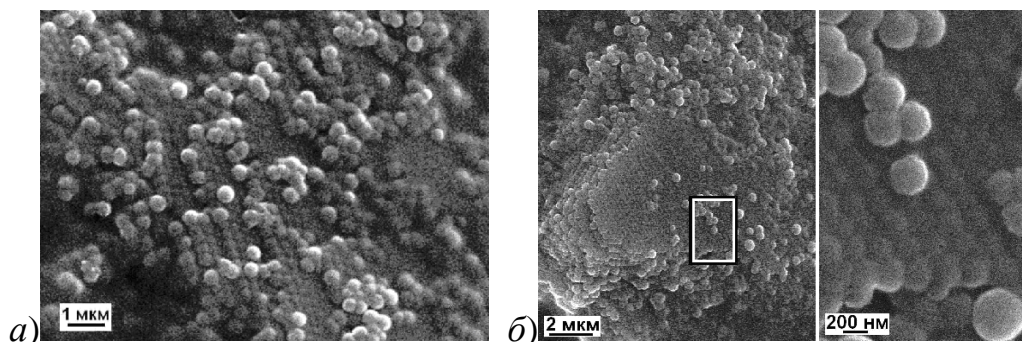


Рис. 20. РЭМ-изображение поверхности микрочастиц порошка ОМ до (а) и после (б) взаимодействия с ФЧ (на рис. б справа показан увеличенный выделенный участок)

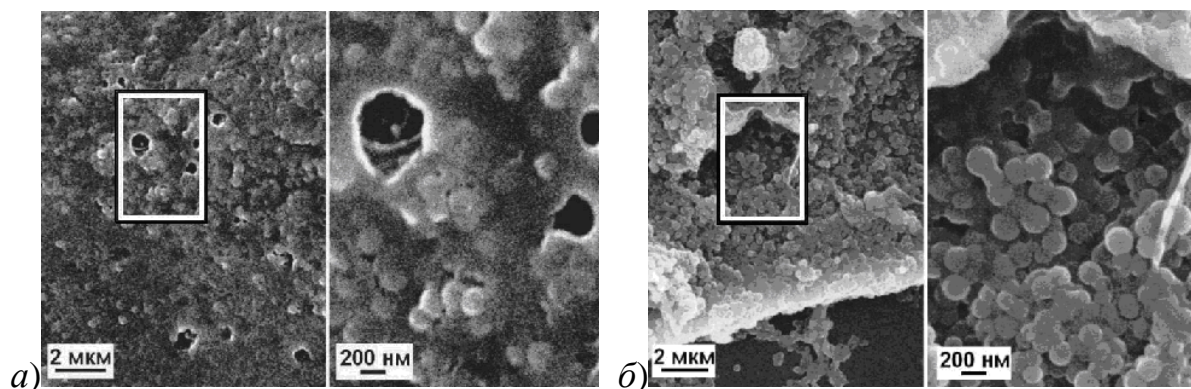


Рис. 21. РЭМ-изображение пористого строения отдельных областей двухфазной структуры “ОМ – клеточная биологическая масса”. а) В структуре содержатся отдельные шаровые наночастицы SiO_2 ; б) отделение шаровых наночастиц SiO_2 от микрочастиц порошка ОМ, ограниченных по плоскостям, отличным от $\{111\}$ (справа показаны увеличенные выделенные участки)

Когда в ростовой среде недостаточно микрочастиц порошка ОМ или гейзерита формируется пористая структура (рис. 21 и рис. 23). Поскольку, в процессе взаимодействия изучаемых систем с микрочастицами порошка ОМ или гейзерита имеет место разрыхление и разрушение последних, шаровые наночастицы SiO_2 или наночастицы порошка гейзерита попадают в биомассу. В случае гейзеритов пористость биоструктуры сохраняется на всем протяжении взаимодействия микрочастиц порошка гейзерита с ФЧ (рис. 22–24), что приводит, как ниже будет показано, к образованию структур фрактального

типа. Объемная структура двухфазной системы (“ОМ – биологическая масса”) устойчива, так как твердая фаза (микрочастицы порошка ОМ) армирует мягкую фазу (биологическая масса), создавая возможность объемного формирования последней.

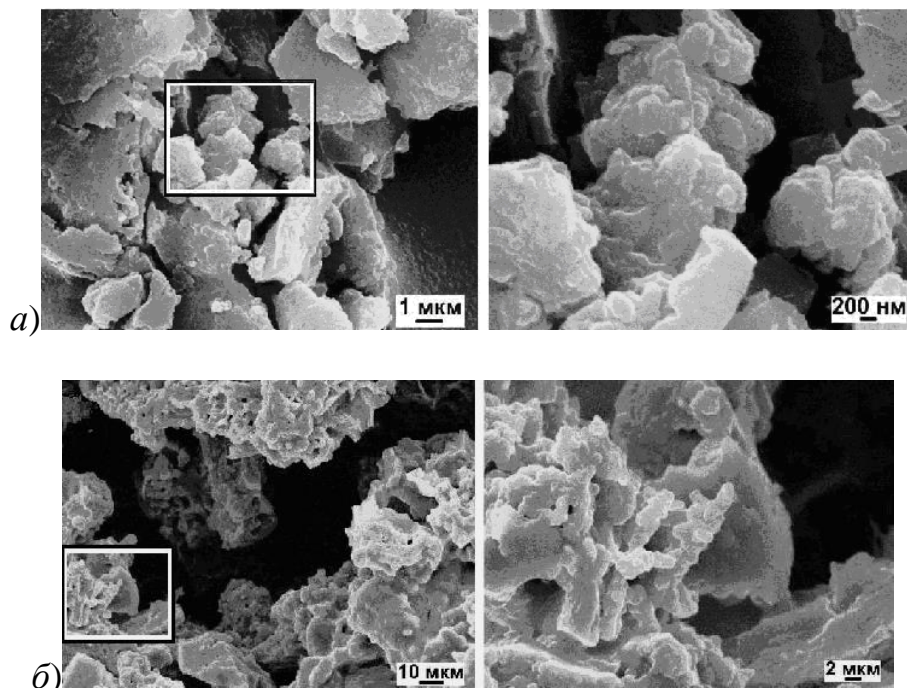


Рис. 22. РЭМ-изображение взаимодействия ростовой среды с микрочастицами порошка гейзерита (60 дней культивирования) (справа показаны увеличенные выделенные участки).

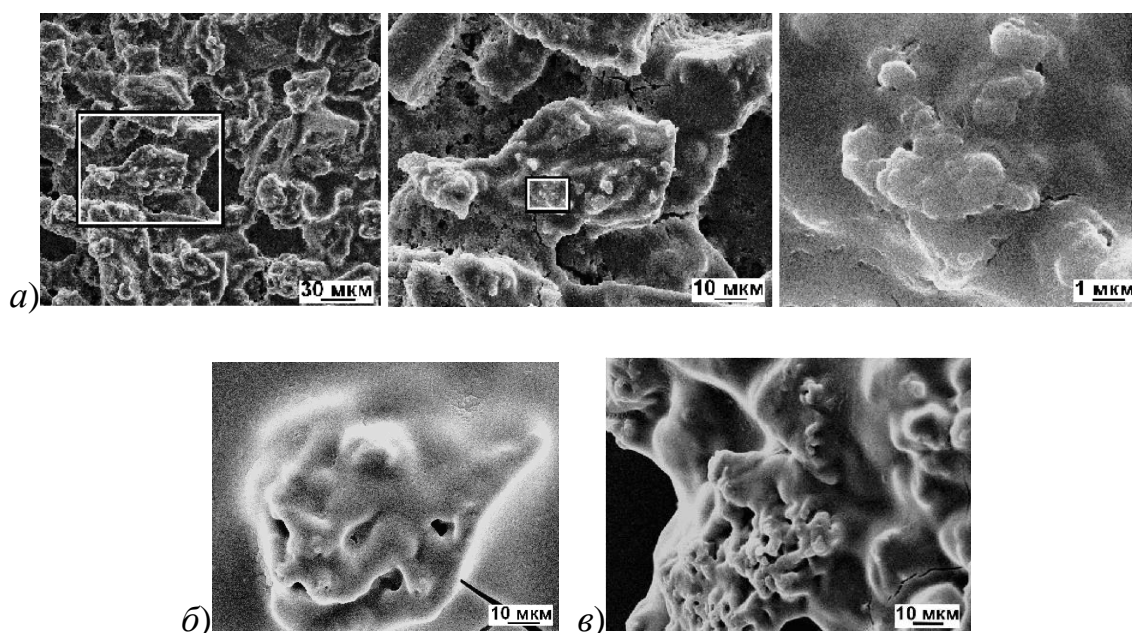


Рис. 23. РЭМ-изображение пористого строения двухфазной структуры “гейзерит – клеточная биологическая масса” (60 дней культивирования). На рис. *a* – справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего.

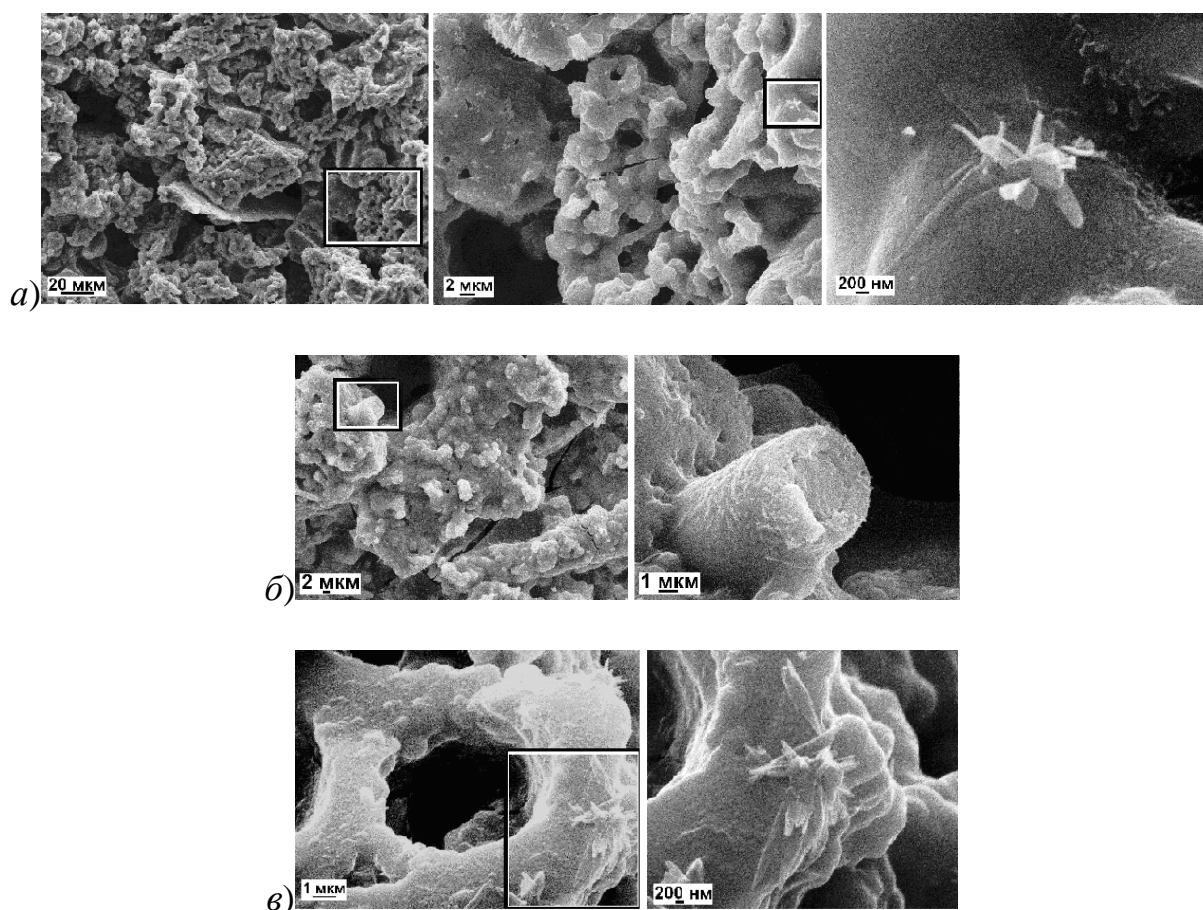


Рис. 24. РЭМ-изображение двухфазной структуры “гейзерит – клеточная биологическая масса” (60 дней культивирования) (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

В ряде случаев формируется оболочка толщиной $\sim 0,3d$ вокруг шаровых наночастиц SiO_2 , при этом единой структуры типа “шарообразных комплексов” (объемных структур двухфазной системы: “ОМ – клеточная биологическая масса”) не наблюдалось (рис. 25,а). Устойчивая структура образуется только при формировании биомассы вокруг шаровых наночастиц SiO_2 (рис. 25,а,б). При отсутствии строительного материала (вне контакта с единичными шаровыми наночастицами SiO_2 или объемными микрочастицами порошка ОМ) биологическая масса разрастается планарно и имеет ячеистую структуру (рис. 26).

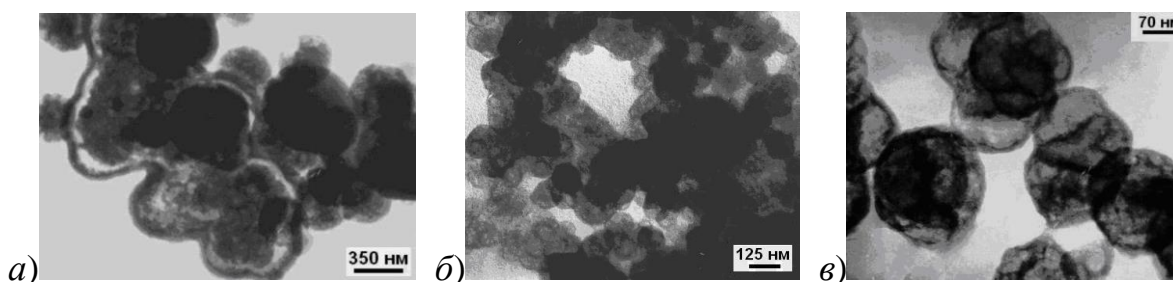


Рис. 25. ПЭМ-изображение клеточной системы, показывающее взаимодействие биомассы с отдельными шаровыми наночастицами SiO_2 (а); с отдельными микрочастицами порошка ОМ (б); с микрочастицами порошка ОМ, содержащими 2–5 шаровых наночастиц SiO_2 (в).

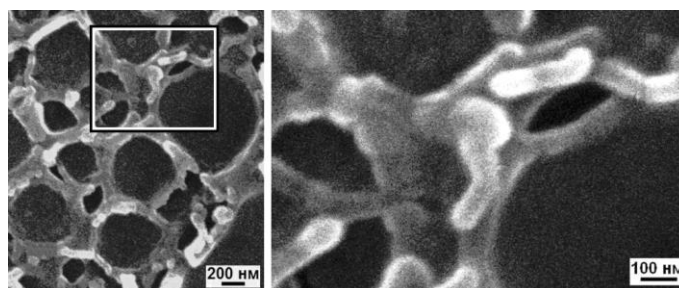


Рис. 26. РЭМ-изображение, характеризующее поведение ФЧ вне контакта с шаровыми наночастицами SiO_2 (справа показан увеличенный выделенный участок).

Строение трехмерной каркасной структуры “ОМ (гейзерит) – клеточная масса”. Фибробласты – культура клеток, которые на поверхностях с выраженными матричными свойствами распластываются, иммобилизуются на ней и затем начинают пролиферировать. Установлено, что ФЧ, как правило, не распластываются на поверхности микрочастиц порошков ОМ и гейзерита, а формируют, начиная со 2 дня эксперимента, вокруг отдельных микрочастиц порошка ОМ шарообразные структуры концентрического типа, которые увеличиваются в объеме как за счет нарастания количества клеток, так и за счет вовлечения новых микрочастиц порошка ОМ в структуру каркасного типа (матрикс) (рис. 27–29). Размножение клеток происходило на поверхности микрочастиц порошка ОМ, имеющих поперечный размер от единиц до десятков микрометров.

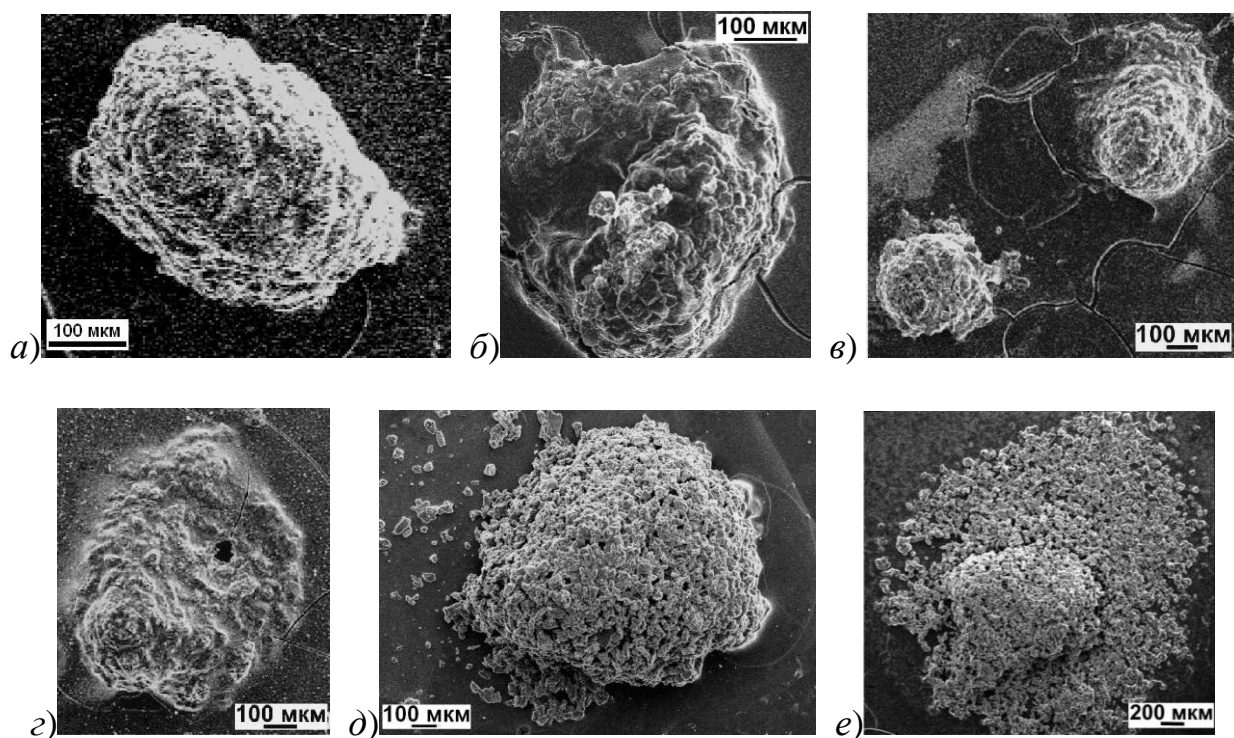


Рис. 27. РЭМ-изображение отдельных объемных структур двухфазной системы: *a-в*) “ОМ – клеточная биологическая масса” (21 день культивирования); *e-з*) “гейзерит – клеточная биологическая масса”: *з*) 14 дней; *д*) 28 дней; *е*) 60 дней культивирования.

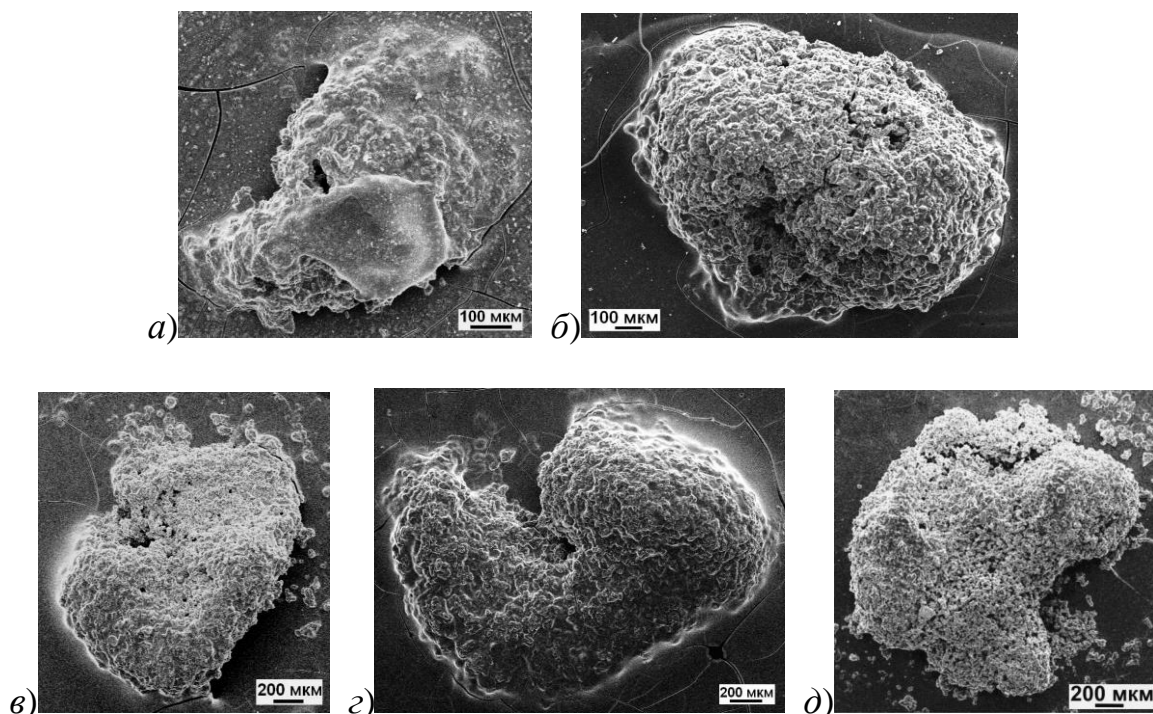


Рис. 28. РЭМ-изображение сросшихся объемных структур двухфазной системы “гейзерит – клеточная биологическая масса”: *a*) 14 дней; *б*) 28 дней; *в-д*) 60 дней культивирования.

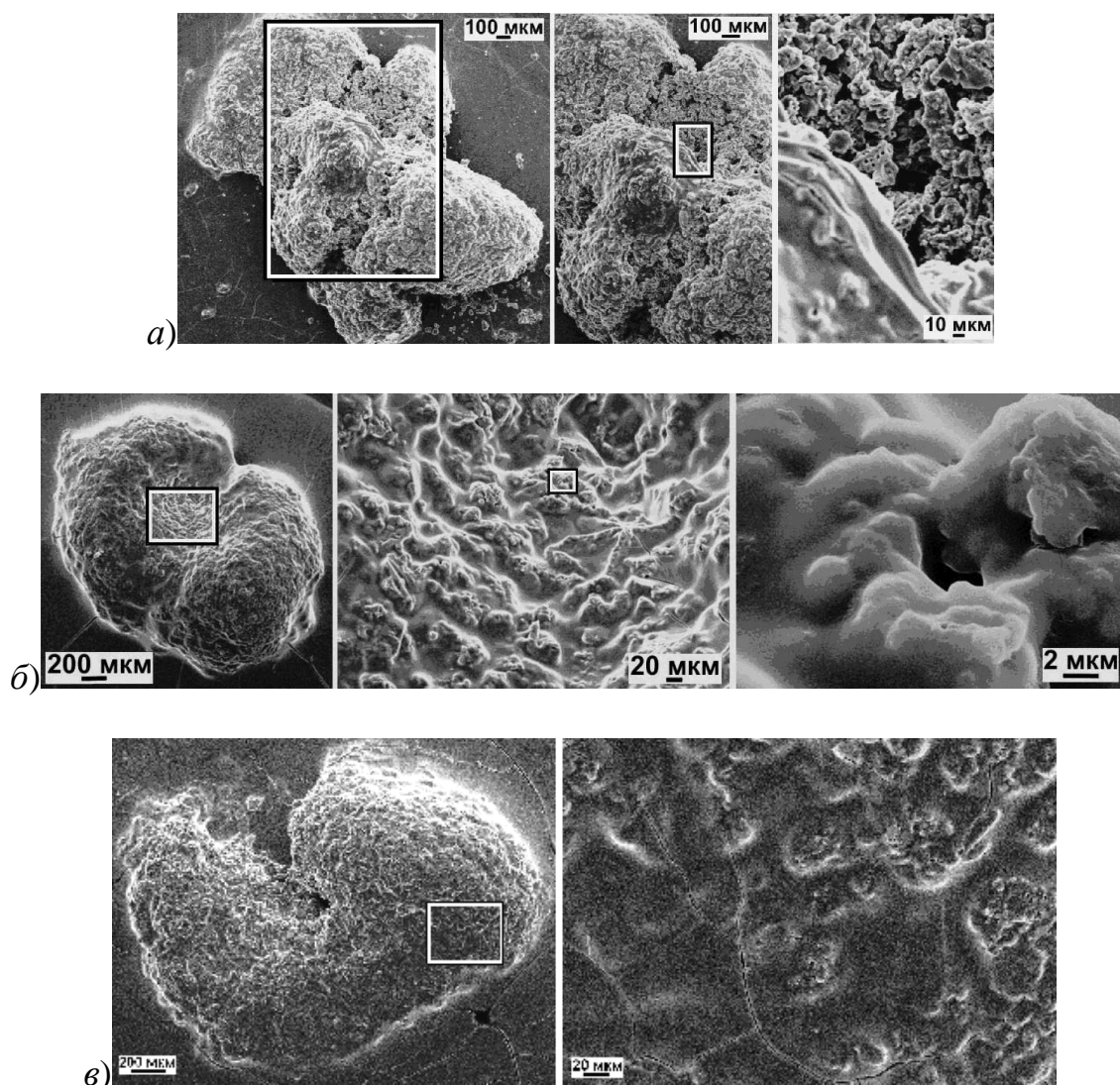


Рис. 29. РЭМ-изображение сростков объемных структур двухфазной системы “гейзерит – клеточная биологическая масса”: а) 14 дней; б) 28 дней; в) 60 дней культивирования (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

Объемная структура двухфазной системы (“ОМ – биологическая масса”) устойчива, так как твердая фаза (микрочастицы порошка ОМ или гейзерита) армирует “мягкую” биологическую массу (рис. 30), создавая возможность объемного формирования биокompозита.

На первом этапе размножение клеток происходит на многочисленных микрочастицах порошка ОМ до определенных размеров (50–100 мкм), после чего размножающиеся клетки продолжают захватывать из окружающей их питательной среды микрочастицы порошка ОМ. Клетки прикрепляются к микрочастицам порошка, при этом формируется каркас за счет объединения

наночастиц небольшого размера и рост шарообразных биоконплексов продолжается (рис. 31). Строение объемных структур наблюдали при анализе слоев последовательных срезов толщиной ~ 14 мкм (рис. 32). Фотографии, представленные на рис. 31 и рис. 32, сделаны с использованием оптического микроскопа; для окрашивания образцов применялся гематоксилин-эозином.

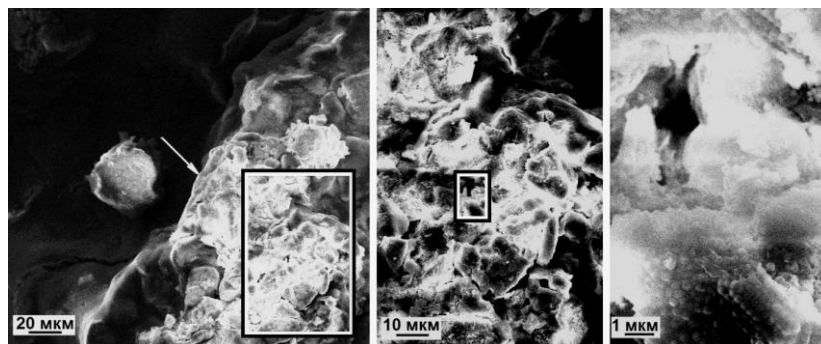


Рис. 30. РЭМ-изображение поверхности объемной структуры двухфазной системы “ОМ – клеточная биологическая масса” (справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего, стрелкой показана внешняя граница объемной структуры).

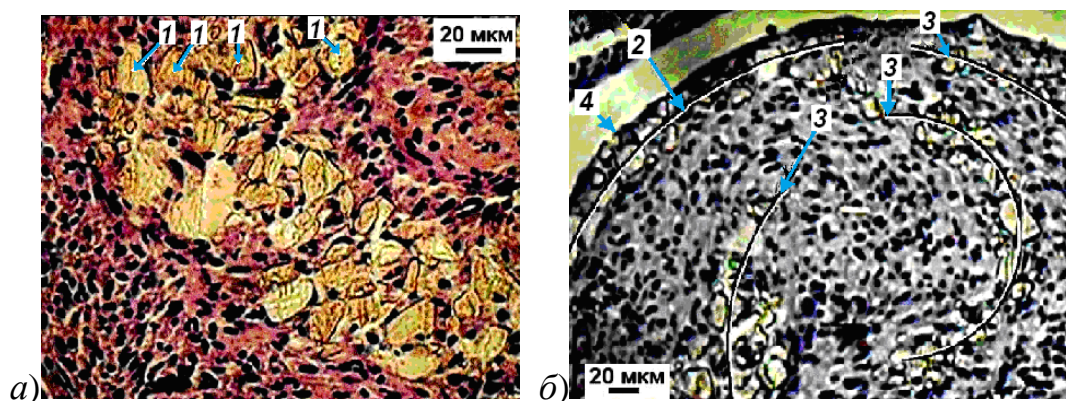


Рис. 31. Взаимное положение микрочастиц порошка ОМ и клеток ФЧ в шарообразной двухфазной структуре в экспериментах “*in vitro*” (21 день культивирования): а) центральная область (1 – фрагменты ОМ); б) край (2 – элемент внешнего каркаса из микрочастиц порошка ОМ; 3 – элементы внутреннего каркаса из микрочастиц порошка ОМ; 4 – граница двухфазной структуры).

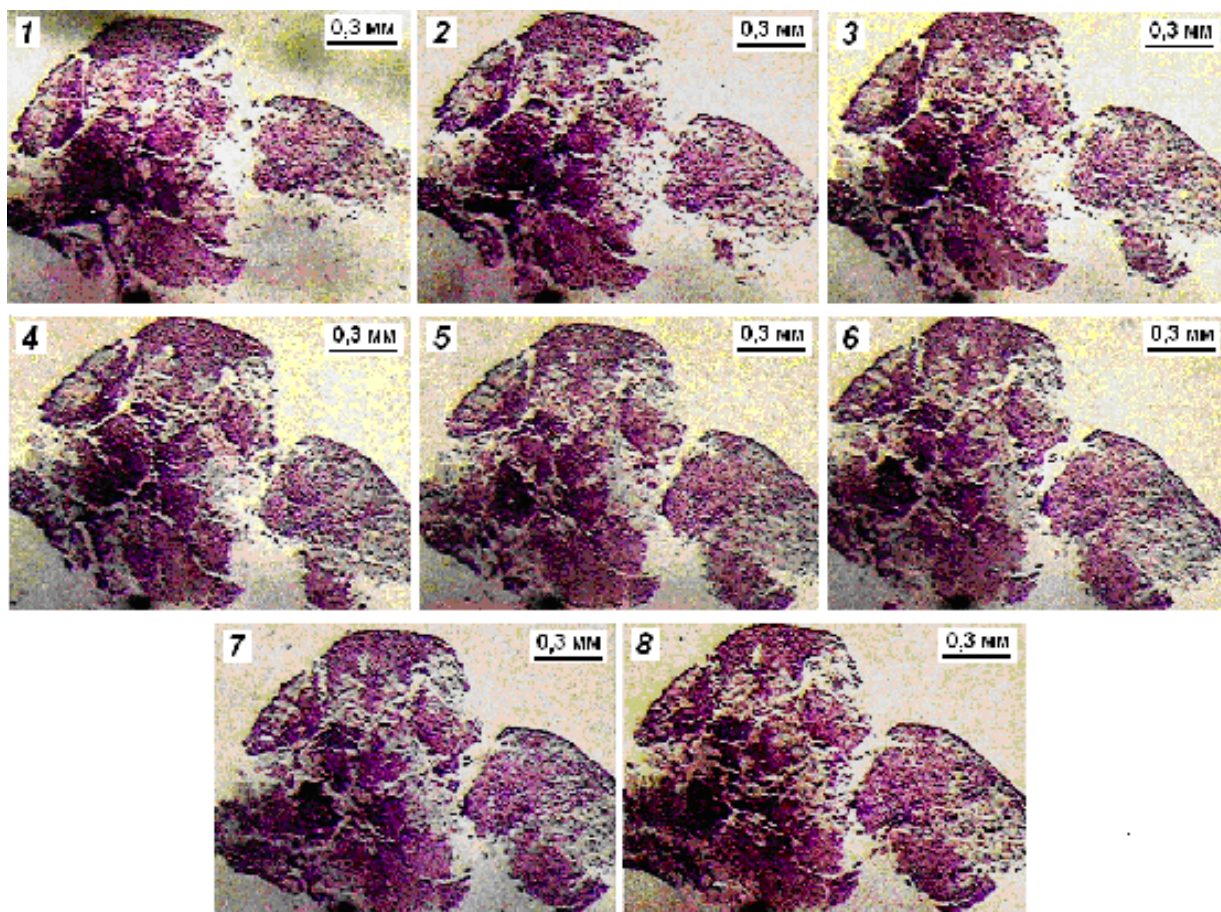


Рис. 32. Взаимное положение микрочастиц порошка ОМ и ФЧ в шаровой двухфазной структуре в экспериментах “*in vitro*” (21 день культивирования): 1-8 – последовательность срезов.

Приведенные данные свидетельствуют о реальных возможностях создания трехмерных матриц для клеточных систем с использованием микрочастиц порошков ОМ или гейзерита. Наблюдаемый эффект специфического биораспознавания и, как следствие, наличие биосовместимости микрочастиц порошков ОМ или гейзерита эволюционно обусловлены тем, что древние организмы палеозоя и мезозоя (белемиты и аммониты) и некоторые современные организмы (солнечники) имеют опалоподобное строение.

Испытания биокомплексов. В данном разделе приведены результаты исследования “*in vitro*” острой цитотоксичности и матричных (адгезивных) свойств ОМ и гейзерита, а также “*in vivo*” – биосовместимости ОМ. Для первичного испытания биокомплексов были использованы 4 серии образцов, различающихся размерами микрочастиц порошка ОМ и температурой их

обработки (табл. 1). В опытах по оценке острой цитотоксичности (4, 24 часа культивирования ФЧ на указанных материалах), было установлено, что данная партия образцов не токсична в отношении культуры ФЧ: через 4 ч культивирования фракция выживших клеток в опытных сериях составила 85–97%, а через 24 часа – показатель снизился (до 70–78%) в отдельных сериях (табл. 2).

Таблица 1. Характеристика микрочастиц порошков ОМ

Характеристики порошков	Серии порошков ОМ			
	1	2	3	4
Размер микрочастиц порошка, мм	0,2–0,3	0,3–0,5	0,52–1,0	0,1–1,0
Температура обработки, К	390	570	1060	1060

Таблица 2. Оценка острой цитотоксичности микрочастиц порошка ОМ (серии № 1–4) в отношении культуры ФЧ на полистирене (контроль) (время культивирования 4 и 24 ч, МТТ-тест)

Измеряемые параметры биоконструкций		Серии образцов				
		Контроль	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
4 часа	Оптическая плотность раствора формазана (усл. ед.)	0,205	0,198	0,188*	0,189*	0,175*
	Фракция выживших клеток (%)	100	97	92	92	85
24 часа	Оптическая плотность раствора формазана (усл. ед.)	0,366	0,287*	0,270*	0,255*	0,276*
	Фракция выживших клеток (%)	100	78	74	70	75

* фактически достоверная разница по сравнению с контролем $< 0,05$.

При исследованиях динамики популяции ФЧ при культивировании данных клеток в течение 1–14 суток на полистирене (контроль) и разных микрочастицах порошков ОМ было выявлено отставание во всех опытных сериях (от контроля) по величине оптической плотности раствора формазана в сроки до 3 суток эксперимента, увеличение пула ФЧ во всех сериях в период с 3 по 7 дней опыта с достоверным превышением над контролем величины оптической плотности раствора формазана для образцов серий № 3 и № 4 и снижение величины оптической плотности во всех сериях к 14 дню наблюдения, что связано с ограниченным объемом культурального планшета и нарастанием дефицита питательных веществ (рис. 33).

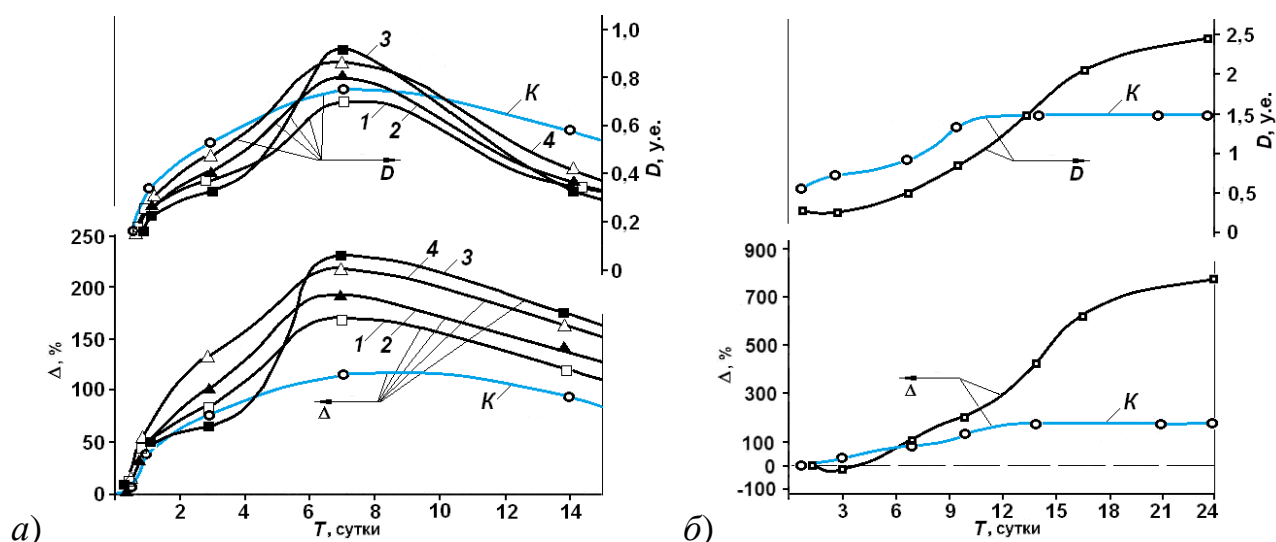


Рис. 33. Динамика (сроки культивирования, T) величины оптической плотности (D) раствора формазана (МТТ-теста) и динамика прироста пула (Δ) при культивировании ФЧ на полистирене (контроль – K) и микрочастицах порошков: а) ОМ (№ 1–4); б) гейзерита

При сравнении величины прироста пула ФЧ в указанные временные интервалы обнаружено, что в контроле указанный показатель на протяжении эксперимента практически не менялся и составил 32–43% на 1–7 сутки. Для образцов серий № 1–4 величина прироста пула ФЧ возрастала к 7 суткам наблюдения и составила 83% (серия № 1), 89% (серия № 2), 152% (серия № 3) и 79% (серия № 4), и была, таким образом, максимальной в образце серии № 3 (рис. 33). Для гейзерита эта величина возрастала от 111 до 195% к 7–14 суткам

В целом за неделю роста культуры ФЧ на полистирене и образце серии № 1 общий пул клеток увеличился в 3,7 раза, на образце серии № 2 в 4,3 раза, на образце серии № 3 в 4,8 раза и на образце серии № 4 в 5 раз. Таким образом, при испытаниях указанных материалов выявлено, что лучшими матричными (для клеток) качествами обладают микрочастицы порошков ОМ серий № 3 и № 4 (размер микрочастиц порошков до 1 мм, температура обработки 1060 К), которые обеспечивали наиболее благоприятные условия для эффективной экспансии клеток на их поверхности. Следует отметить, что увеличение оптической плотности раствора формазана и пула ФЧ при использовании гейзеритов в качестве матриц не прекращался даже после 90 дней

культивирования, когда общий пул клеток увеличился в десятки раз. При этом, в объемной двухфазной структуре “гейзерит – клеточная биомасса”, достигающей сантиметровых размеров, формировалась пористость в виде пустот и каналов (рис. 34 и рис. 35).

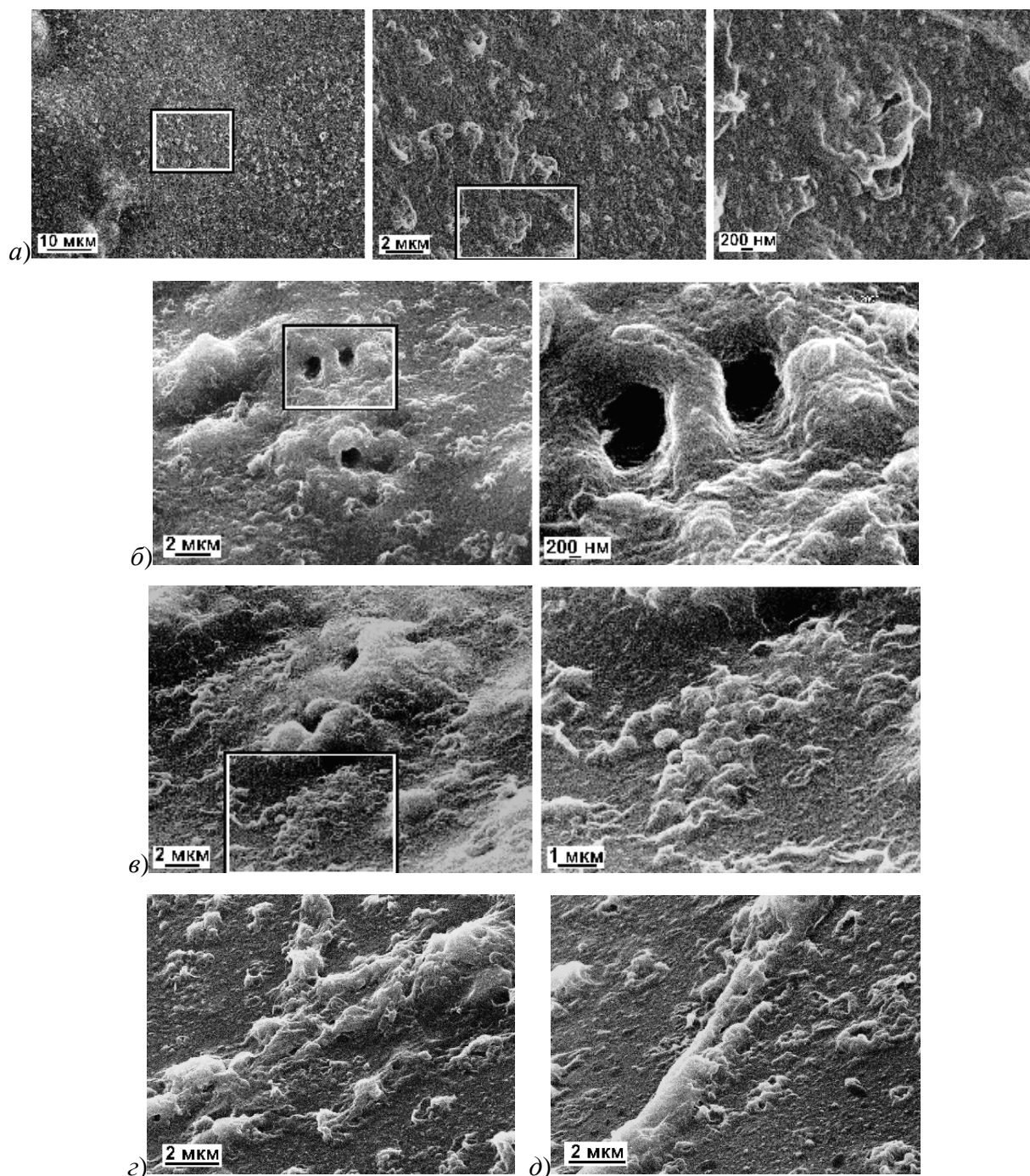


Рис. 34. РЭМ-изображение пористого строения двухфазной структуры “гейзерит – клеточная биологическая масса” (90 дней культивирования) (на рисунках *a-в* справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

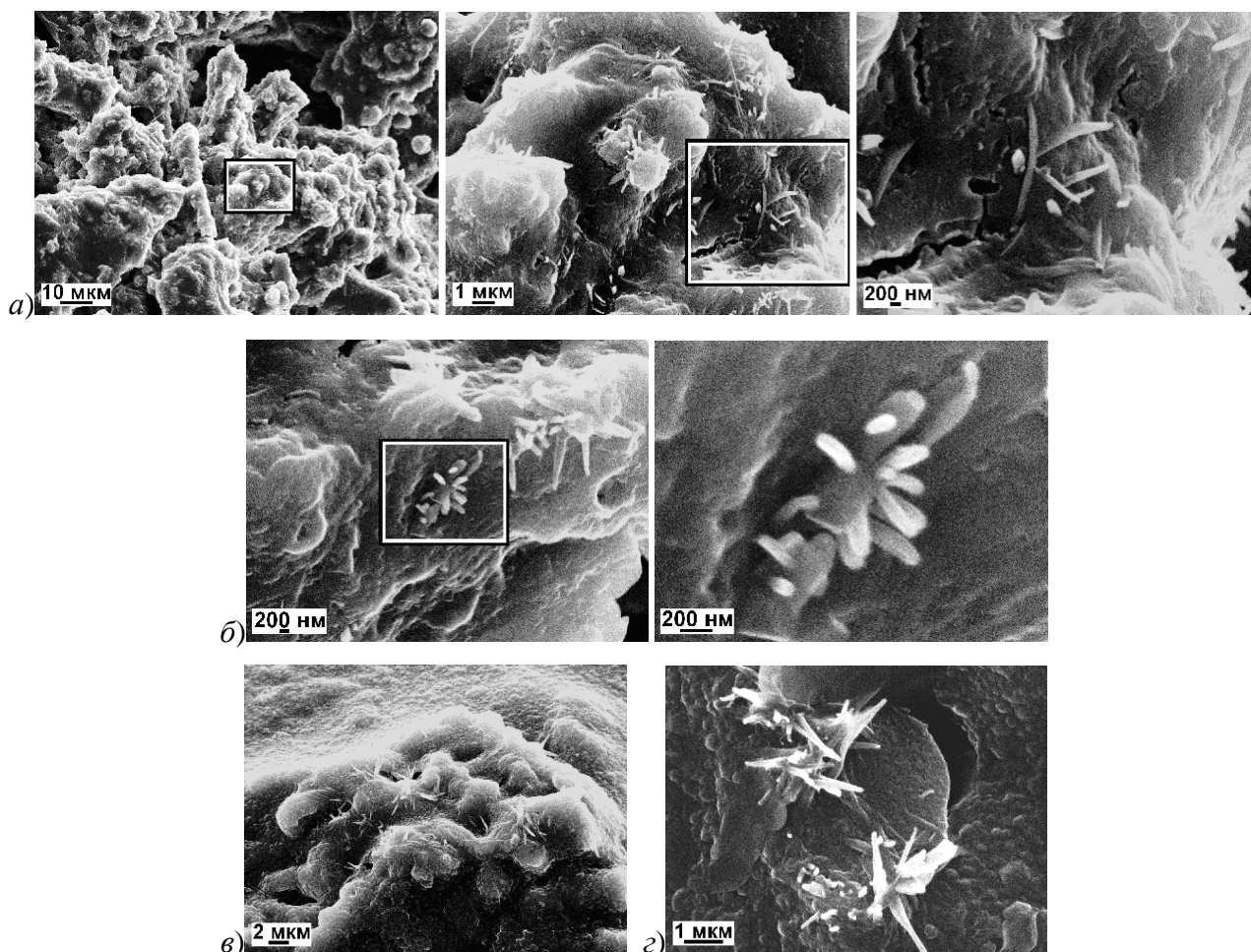


Рис. 35. РЭМ-изображение двухфазной структуры “гейзерит – клеточная биологическая масса” (120 дней культивирования) (на рисунках *а, б* справа на каждом последующем снимке показан увеличенный выделенный участок предыдущего).

Опыты показали, что ФЧ не расплываются на поверхности использованных опаловых материалов, а формируют (начиная со 2 дня эксперимента) структуру с концентрическим типом роста вокруг единичных микрочастиц порошка ОМ. Биоконпозиты увеличиваются в объеме как за счет нарастания количества клеток, так и за счет вовлечения новых микрочастицами порошка ОМ (гейзерита) и шаровых наночастиц SiO_2 в такую структуру. Показанное поведение изучаемой системы немаловажно, поскольку, как известно, одиночные клетки дифференцируются плохо, а в ряде случаев спектр дифференцировки расширяется при возрастании общего объема клеточной системы. Можно утверждать, что наблюдаемая пористость, обеспечивает возможности значительного увеличения клеточной системы.

Оценка биосовместимости микрочастиц порошка ОМ в

экспериментах “in vivo”. Исследование биосовместимости микрочастиц порошка ОМ в экспериментах “in vivo” проведено для образцов серии № 3 (фракция микрочастиц порошка ОМ < 40 мкм, температура обработки 1060 К), которые продемонстрировали в экспериментах “in vitro” наилучшие матричные свойства. Установлено, что на ранних сроках наблюдения (1 и 2 недели после подкожной имплантации мышам микрочастиц порошка ОМ) развивались микропризнаки воспалительной реакции в имплантате: массивная лейкоцитарная инфильтрация практически во всех полях зрения вокруг микрочастиц порошка ОМ и наличие единичных макрофагов (рис. 36,*а*; снимки сделаны с использованием оптического микроскопа). Через месяц после операции, вокруг имплантата отмечалось формирование многослойной соединительнотканной капсулы с выраженным рисунком неоангиогенеза (обширной капиллярной сетью по поверхности) и отсутствие клеточных элементов воспаления внутри нее (рис. 36,*б*).

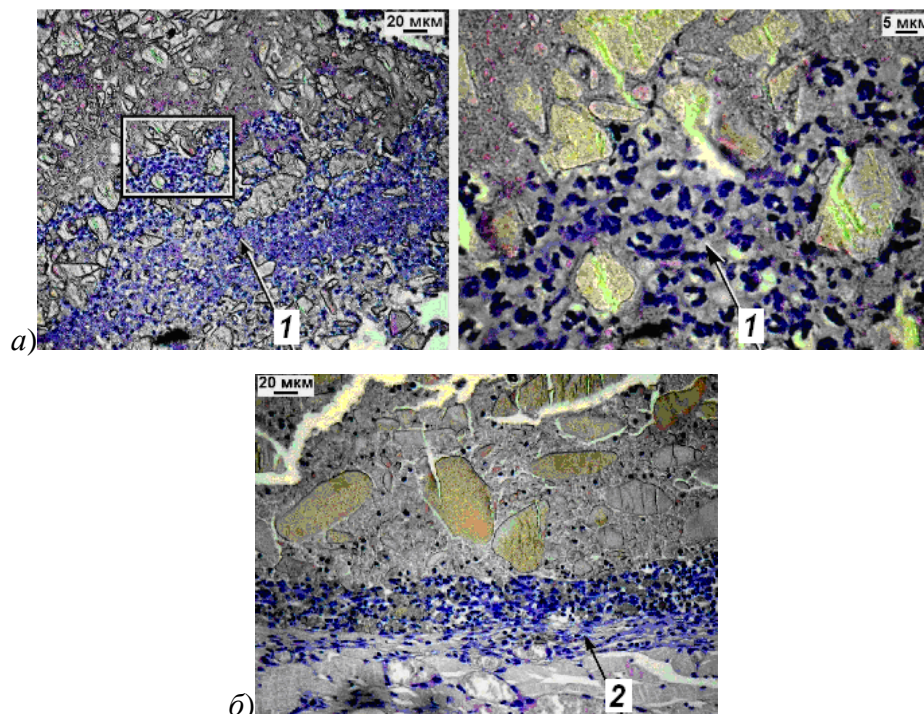


Рис. 36. Микрочастицы порошка ОМ при подкожной трансплантации мышам (окраска гематоксилин-эозином): *а*) 7 сутки (справа увеличенный выделенный участок; 1 – лейкоцитарная инфильтрация); *б*) соединительнотканная капсула (2) вокруг микрочастиц порошка ОМ под кожей мыши (28 сутки).

Результаты настоящего раздела работы свидетельствуют о том, что микрочастицы порошка ОМ (образец серии № 4) при подкожном введении вызывают первичную асептическую воспалительную реакцию как инородное тело с последующим затиханием и прекращением воспалительного процесса. Таким образом, учитывая очевидность формирования колоний ФЧ “in vitro” (с микрочастицами порошка ОМ) с быстрым концентрическим ростом, перспективы дальнейшего исследования в области практического применения ОМ могут быть связаны с их использованием для быстрого наращивания клеточной массы в объеме за счет формирования 3-х мерных структур. В частности, открываются возможности замещения костных дефектов как самостоятельно, так и в клеточной терапии.

Подобные композиции могут быть эффективны для культивирования клеток различных типов, в том числе стволовых, а также для поддержки их дифференцирования в разных направлениях в соответствии с особенностями мест трансплантации. Соответственно, главное достоинство биоматериалов нового поколения будет заключаться в воспроизводстве свойств живых биологических тканей таким образом, чтобы при необходимости они могли полностью или частично, временно или постоянно заместить структурно-функциональные дефекты тех или иных органов.

Приведенные выше данные позволяют рассматривать образование изученными клеточными системами своеобразного скелета – трехмерного матрикса – как существенный элемент самоорганизации. При этом проявляются составные части указанного процесса, а именно, специфическое биораспознавание как в “конструкционных требованиях” к составу, размерам и плотности микрочастиц порошка, используемых при формировании указанных структур, так и в виде особенностей биологического взаимодействия элементов живого организма с неорганической составляющей.

Имеются определенные аналогии в формировании специализации для элементов клеточных структур и в особенностях развития зародыша (эмбриогенеза), как процесса деления, при котором, клетки специализируются,

а именно, приобретают различные функциональные свойства. Действительно, возникающая в клеточных структурах специализация клеток, в зависимости от их положения в объединенной системе, соотносится с особенностями формирования, например, бластомеров, при которых возникает пространственная организация бластулы. Каждое деление бластомеров является дихотомическим обособлением различных функциональных значений, изначально скрытых в зиготе. Для возникновения такого рода структур необходимо пространственное разделение ее отдельных частей материалом, создающим границы, но не нарушающим, при этом, целостности системы, в том смысле, что материал должен обладать определенными свойствами биологической инертности и совместимости. Именно такие процессы наблюдаются при образовании *3D*-структур, построенных из микрочастиц ОМ и клеток, когда при размножении после стадии радиального и геликоидального деления происходит формирование шароподобной системы. Указанный процесс соответствует минимизации взаимодействия сформированного биокомпозита с окружающей средой и своеобразной физиологической инертности.

Следует учитывать, что процессы упорядочения и фазовых превращений, протекающие в биологических системах, существенно отличаются от аналогичных для твердотельных (неживых) структур отсутствием процессов кристаллизации. С формальной, точнее симметричной точки зрения, биологические структуры относятся к локально-периодическим и на атомарном (молекулярном) уровне описываются, во многих случаях, как геликоидальные системы, характеризующиеся нецелочисленными осями (иррациональные углы поворотов) определенного типа. Подобное строение не дает рассмотренным биокомпозитам преобразовываться в решетки кристаллического типа, характеризующиеся небольшим набором целочисленных осей (элементов симметрии). Сказанное относится к особенностям строения материальных носителей генома, присутствующих в клетках.

Что касается сложных систем нано- и микро размеров, можно полагать, что подобные структуры должны относиться к фрактальным, поскольку в них происходят процессы самоорганизации, инвариантные относительно группы масштабных преобразований. Существенно, что фрактальные системы не только нелинейны, но и, в отличие от твердотельных систем, связаны не столько с топологическими характеристиками, сколько с метрикой или, проще говоря, со способом построения системы, так что сама фрактальность структуры и характеризующая ее размерность являются основными свойствами такой системы. Как результат, наблюдается несколько эффектов, из которых наиболее значимыми будут нижеперечисленные. Во-первых, определяющая роль (в поведении и свойствах отдельных подсистем, например, в развитии специализации) типа локальной упорядоченности, а во вторых, недавно обнаруженное (ранее известное для сложных колебательных систем) свойство сложных стохастических систем с неоднородностями (фрактальностью) определенного типа – резонансное возрастание чувствительности к подпороговым периодическим воздействиям.

Порождаемая фрактальным развитием системы, пористость изучаемых клеточных структур, обеспечивает поступление питательных веществ для всех локальных областей биомассы. Последнее, в свою очередь, позволяет предполагать, что подобный тип роста, сопровождается появлением возможностей для полидифференцирования клеточной системы, благодаря наличию “разделенных областей”, что, по-видимому, является необходимым условием развития сложных органов и организмов.

Наноструктурированность и локальная периодичность, по крайней мере, предполагают возможность сохранения индивидуальности для отдельных малых областей, при общем нарушении данного условия для всей системы. Клеточные системы не относятся к так называемым многообразиям Ли, к которым принадлежит большая часть твердотельных структур. Однако, не касаясь проблем математического описания, отметим, что наличие локальной упорядоченности позволяет сохранять индивидуальные свойства ее отдельных

элементов, а фрактальность – соотнести определенные свойства малых областей с целым. Такие структуры относительно устойчивы, а их чувствительность при определенных условиях к внешним подпороговым (а именно, ниже уровня шумов) воздействиям создает основу необходимого для развития системы динамического поведения. Изученная в настоящей работе сложная биоминеральная структура проявляет некоторые общие закономерности для различных типов упорядочения подобных систем, что должно стать задачей дальнейших исследований.

Заключение

Способ формирования биокomпозитов, в перспективе, должен обеспечивать замещение структурных дефектов, возникающих при оперативных вмешательствах. Конструирование и реализация биоискусственных органов и тканей во многом зависит от разработки каркасных носителей для клеток с использованием микро- и наночастиц неорганических материалов, размеры и особенности строения которых могут оказаться совместимыми с культивируемыми клеточными структурами. Известны различные физико-химические методы формирования гетерогенных структур, позволяющие имитировать структурно-морфологические свойства поверхности биологических объектов. Для создания гетерогенных структур перспективны неорганические синтетические (ОМ) и минеральные (гейзерит – природный аналог ОМ) материалы на основе кремнезема (аморфного SiO_2). Возможно применения ОМ и гейзерита для культивирования на них клеток различных типов, в том числе стволовых, а также поддержка их дифференцирования в разных направлениях в соответствии с особенностями мест трансплантации. По указанной причине представляется важным изучение взаимодействия ОМ и гейзерита с клеточными системами для создания композитных структур биосовместимых материалов.

Основное требование к биоматериалам нового поколения – воспроизводство свойств биологических тканей для обеспечения репродуктивного успеха в отношении структурно-функциональных дефектов

различных органов. В работе исследовано физическое и биохимическое взаимодействие биологических тканей и наночастиц неорганических веществ на основе аморфного SiO_2 . OM представляют собой правильную 3D-упаковку одинаковых по диаметру шаровых наночастиц SiO_2 . Использовали наночастицы порошка OM с диаметром шаровых наночастиц SiO_2 $d \approx 200\text{--}260$ нм ($\Delta d < 4\%$). Упаковка шаровых наночастиц SiO_2 образует упорядоченную 3D-систему структурных пустот, занимающих 26% объема OM. Гейзериты – отложения аморфного кремнезема, образующиеся из термальных вод горячих источников, важной особенностью которых является участие микроорганизмов в их формировании. Гейзериты имеют как нанопустоты, аналогичные по размерам пустотам OM, так и микропустоты размером несколько микрон.

Исследовано взаимодействие микрочастиц порошков OM и гейзерита с клеточными системами с целью создания биосовместимых материалов для реконструктивной пластической хирургии. Проведена оценка биосовместимости в системе “OM – размножающиеся клетки”, указанных материалов и динамики нарастания на них клеток на модели иммортализованных диплоидных ФЧ. Показано строение трехмерной каркасной структуры “OM (гейзерит) – клеточная масса”. Объемная структура двухфазной системы (“OM – биологическая масса”) устойчива, так как твердая фаза (микрочастицы порошка OM или гейзерита) армирует мягкую фазу (биологическую массу), создавая возможность объемного формирования последней. Показано, что размножение клеток (иммортализованных ФЧ) происходит на поверхности микрочастиц порошка OM (гейзерита) с поперечным размером от единиц до десятков микрометров. Приведенные результаты исследования “in vitro” острой цитотоксичности и матриксных (адгезивных) свойств микрочастиц OM и гейзерита, а также “in vivo” – их биосовместимости, позволяют рассматривать образование клеточными системами и микрочастицами трехмерного композита как элемента самоорганизации.

Таким образом, в представленной работе:

1. Проведена оценка биосовместимости ОМ (гейзерита) и динамики нарастания на них клеток на модели иммортализованных ФЧ. Рассмотрены особенности формирования и строения биокомпозиционного материала “ОМ (гейзерит) – культура клеток”.

2. Изучены возможности формирования и применения биосовместимых ОМ для культивирования клеточных систем.

3. Проведен анализ особенностей роста и строения объемной структуры “ОМ – клеточная система”. Изучена возможность применения ОМ и нанокompозитов на их основе для воспроизводства свойств живых биологических тканей для полного или частичного замещения структурно-функциональных дефектов тех или иных органов.

4. Определены условия для получения ОМ и нанокompозитов на их основе, обладающих высокой биосовместимостью, способностью выполнять функции каркаса для имплантируемых клеточных культур. Рассмотрены особенности биологического взаимодействия элементов живого организма с неорганической составляющей и специфическое биораспознавание по отношению к составу, размерам и плотности микрочастиц порошка ОМ или гейзерита, используемых при формировании биокомпозитов.

Предполагается, что представленные результаты исследования морфологических и биохимических особенностей биокомпозитов будут полезны исследователям, специализирующимся в области структурной биологии. Работа требует продолжения в части практической медицины, так как остаются нерешенными ряд вопросов, например, роль структурной нано- и микропористости ОМ и гейзеритов в процессе формирования и выживаемости биокомпозитов. Ранее установлено, что без учета биоспецифического распознавания, характерного для стволовых клеток, невозможно создание биоматериалов – матриксов для искусственных биоорганов. По указанной причине, особенность получения биоматериалов с требуемыми функциональными характеристиками, нередко уникальными, заключается в

моделировании свойств, определяющих совместимость минеральных и клеточных материалов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 18-29-02076 мк).

Литература

1. Урусов В.С., Самойлович М.И., Сергеева Н.С., Белянин А.Ф., Шванская Л.В., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Бычков А.Ю., Ахмедова С.А., Клещева С.М. Образование биокompозитов на основе природных гейзеритов и синтетических опалов // Доклады Академии наук. 2008. Т. 423. № 6. С. 841–845.

2. Белянин А.Ф., Багдасарян А.С., Гуляев Ю.В., Сергеева Н.С., Багдасарян С.А., Павлюкова Е.Р. Биосовместимые наноматериалы на основе опаловых матриц // Журнал радиоэлектроники [электронный журнал]. 2019. № 5. Режим доступа: <http://jre.cplire.ru/jre/may19/3/text.pdf> DOI [10.30898/1684-1719.2019.5.3](https://doi.org/10.30898/1684-1719.2019.5.3)

3. Урусов В.С., Шванская Л.В., Бычков А.Ю., Мохов А.В., Лабутова Е.А. Микроструктуры отложений кремнезема из термальных источников Камчатки // Доклады Академии наук. 2008. Т. 418. № 2. С. 262–266.

4. Урусов В.С., Шванская Л.В., Бычков А.Ю., Мохов А.В., Лабутова Е.А. Микроструктурные исследования гейзеритов Камчатки // Вестник Московского университета. Серия 4: Геология. 2008. № 5. С. 19–26.

5. Inagaki F., Motomura Y., Ogata S. Microbial silica deposition in geothermal hot waters // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. Vol. 60. P. 605–611.

6. Armstrong E., O'Dwyer C. Artificial opal photonic crystals and inverse opal structures – fundamentals and applications from optics to energy storage // Journal of Materials Chemistry C. 2015. Vol. 3. № 24. P. 6109–6143.

7. Tuyen L.D., Wu C.Y., Anh T.K., Minh L.Q., Kan H.-C., Hsu C.C. Fabrication and optical characterization of SiO₂ opal and SU-8 inverse opal photonic crystals // Journal of Experimental Nanoscience. 2012. Vol. 7. № 2. P. 198–204.

8. Rinkevich A.B., Burkhanov A.M., Samoilovich M.I., Belyanin A.F., Kleshcheva S.M., Kuznetsov E.A. Three-dimensional nanocomposite metal dielectric

materials on the basis of opal matrices // Russian Journal of General Chemistry. 2013. Vol. 83. № 11. P. 2148–2158.

9. Miguez H., Blanco A., Lopez C., Meseguer F., Yates H.M., Pemble M.E., Lopez-Tejiera F., Garcia-Vidal F.J., Sanchez-Dehesa J. Face centered cubic photonic bandgap materials based on opal-semiconductor composite // Journal of Lightwave Technology. 1999. Vol. 17. № 11. P. 1975–1981.

10. Nishijima Y., Ueno K., Juodkazis S., Mizeikis V., Misawa H., Tanimura T., Maeda K. Inverse silica opal photonic crystals for optical sensing applications // Optics Express. 2007. Vol. 15. № 20. P. 12979–12988.

11. Самойлович М.И., Беянин А.Ф., Багдасарян А.С., Бовтун В. Структура и диэлектрические свойства нанокмполитов: опаловые матрицы – оксиды титана и титанаты редкоземельных элементов // Тонкие химические технологии. 2016. Т. 11. № 2. С. 66–73

12. Belyanin A.F., Bagdasaryan A.S., Bagdasaryan S.A., Pavlyukova E.R. Nanostructured materials based on opal matrixes and magnetic oxides Ni(Co)-Zn-Fe // Zhurnal Radioelektroniki - Journal of Radio Electronics. 2020. № 3. Available at <http://jre.cplire.ru/jre/mar20/15/text.pdf>. DOI [10.30898/1684-1719.2020.3.15](https://doi.org/10.30898/1684-1719.2020.3.15)

13. Pakhomov Y.A., Rinkevich A.B., Perov D.V., Kuznetsov E.A., Belyanin A.F. Dielectric permittivity of artificial crystals based on opal matrices with ZnO particles in millimeter waveband // Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves. 2019. Vol. 40. № 3. P. 348–356.

14. Ринкевич А.Б., Перов Д.В., Самойлович М.И., Беянин А.Ф., Пащенко П.В., Тимофеев М.А. Опаловые матрицы со слоистой структурой Co/Ir и 3D-нанокмполиты опаловая матрица – соединения Co // Инженерная физика. 2009. № 10. С. 18–24.

15. Samoilovich M.I., Belyanin A.F., Tsvetkov M.Y., Kleshcheva S.M., Rinkevich A.B., Bovtun V., Kempa M., Nuzhnyy D. Optical, magnetic, and dielectric properties of opal matrices with intersphere nanocavities filled with crystalline multiferroic, piezoelectric, and segnetoelectric materials // Russian Journal of General Chemistry. 2013. Vol. 83. № 11. P. 2132–2147.

16. Sarychev A.K., Shalaev V.M. *Electrodynamics of metamaterials*. World Scientific and Imperial College Press, 2007. 200 p.
17. Kong J.A. *Electromagnetic wave interaction with stratified negative isotropic media // Progress in Electromagnetics Research, PIER*. 2002. Vol. 35. P. 1–52.
18. Kimura T., Goto T., Shintani H., Ishizaka K., Amira T., Tokura Y. *Magnetic control of ferroelectric polarization // Nature*. 2003. Vol. 426. P. 55–58.
19. Hill N.A. *Why are there so few magnetic ferroelectrics? // The Journal of Physical Chemistry B*. 2000. Vol. 104 (29). P. 6694–6709.
20. Inomata A., Kohn K. *Pyroelectric effect and possible ferroelectric transition of helimagnetic $GdMn_2O_5$, $TbMn_2O_5$ and YMn_2O_5 // Journal of Physics: Condensed Matter*. 1996. Vol. 8. № 15. P. 2673–2678.
21. Bramwell S.T., Field M.N., Harris M.J., Ivan M.J. *Bulk magnetization of the heavy rare earth titanate pyrochlores – a Series of model frustrated magnets // Journal of Physics: Condensed Matter*. 1999. 12(4):483. DOI: [10.1088/0953-8984/12/4/308](https://doi.org/10.1088/0953-8984/12/4/308).
22. Белянин А.Ф., Багдасарян А.С., Гуляев Ю.В., Юрин А.И., Павлюкова Е.Р. *Строение, диэлектрические и магнитные свойства нанокompозитов на основе опаловых матриц, фосфатов и ванадатов металлов // Журнал радиоэлектроники [электронный журнал]*. 2019. № 5. Режим доступа: <http://jre.cplire.ru/jre/may19/4/text.pdf>. DOI [10.30898/1689-1719.2019.5.4](https://doi.org/10.30898/1689-1719.2019.5.4)
23. Белянин А.Ф., Багдасарян А.С., Багдасарян С.А., Борисов В.В., Павлюкова Е.Р. *Рентгеновское излучение при лазерном воздействии на опаловые матрицы // Журнал радиоэлектроники [электронный журнал]*. 2019. № 6. Режим доступа: <http://jre.cplire.ru/jre/jun19/12/text.pdf> DOI [10.30898/1684-1719.2019.6.12](https://doi.org/10.30898/1684-1719.2019.6.12)
24. Белянин А.Ф., Самойлович М.И., Житковский В.Д., Пащенко П.В., Тимофеев М.А., Ковальский К.А., Клещева С.М., Борисов В.В., Петухов К.Ю. *Слоистые ненакаливаемые катоды // Нано- и микросистемная техника*. 2005. № 8. С. 39–48.

25. Беянин А.Ф., Борисов В.В., Багдасарян А.С. Наноструктурированные углеродные материалы в эмиссионной электронике // Российский технологический журнал. 2017. Т. 5. № 3 (17). С. 22–40.

26. Гоулдстейн Дж., Ньюбери Д., Эчлин П., Д.Джой, Фиори Ч., Лифшин Э. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ. М.: Мир. 1984. Т. 2. 348 с.

Для цитирования:

Беянин А.Ф., Багдасарян А.С., Сергеева Н.С., Багдасарян С.А., Павлюкова Е.Р. Изучение строения биосовместимых наноматериалов на основе диоксида кремния. Журнал радиоэлектроники [электронный журнал]. 2020. №4. Режим доступа <http://jre.cplire.ru/jre/apr20/14/text.pdf>. DOI 10.30898/1684-1719.2020.4.14