

## Биосовместимость полученного низкотемпературным синтезом и легированного катионами бария дикальцийфосфат дигидрата для применения в регенеративной медицине

П.В. Смирнова<sup>1</sup>, А.Ю. Тетерина<sup>1</sup>, И.В. Смирнов<sup>1</sup>, В.В. Минайчев<sup>1,2</sup>, П.С. Салынкин<sup>2</sup>,  
М.И. Кобякова<sup>1,2</sup>, К.В. Пятина<sup>1,2</sup>, Е.И. Мещерякова<sup>2</sup>, И.С. Фадеева<sup>1,2</sup>, С.М. Баринов<sup>1</sup>, В.С. Комлев<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия;  
<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

### АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Для стимуляции регенерации костной ткани в современной регенеративной медицине всё чаще используются синтетические материалы на основе кальций-фосфатных соединений (КФС). Преимуществами данных материалов являются отсутствие исходной иммуногенности, наличие osteoconductive свойств и частичный osteoinductive потенциал. Внедрение биоактивных ионов в кальций-фосфатную керамику в последнее время рассматривается как наиболее перспективная стратегия управления свойствами КФС. Такой подход обеспечивает контролируемую деградацию КФС, улучшает их биомеханические характеристики и увеличивает биоактивность, то есть позволяет получать специализированные материалы, предназначенные для различных типов травм, нозологий или возрастных групп пациентов.

**Цель** — оценить основные параметры биосовместимости, включая содержание кислотных компартментов и продукцию активных форм кислорода, *in vitro* при контакте макрофагов человека с порошком низкотемпературного дигидрата дикальцийфосфата, легированного катионами бария — в нормальных условиях и в условиях воспаления, индуцированного липополисахаридом (ЛПС).

**Методы.** С использованием методов сканирующей электронной микроскопии, инфракрасной спектроскопии, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и рентгенофазового анализа проведена оценка морфологии, а также качественного и количественного элементного состава порошка дикальцийфосфат дигидрата (ДКФД) и его формы, легированной катионами бария (ДКФД-Ва). Методом проточной цитометрии исследовали жизнеспособность клеток, а также оценивали содержание лизосом и уровень продукции активных форм кислорода при совместном культивировании первичной культуры макрофагов человека с образцами ДКФД и ДКФД-Ва в нормальных условиях и при ЛПС-активации макрофагов.

**Результаты.** Низкотемпературным методом синтеза получены образцы ДКФД, легированного катионами бария в концентрациях 1, 5 и 10% теоретически возможного уровня замещения (% теор.). Для каждого варианта рассчитан практически полученный % замещения, составивший 0,62, 1,43 и 6,43 атомных %, соответственно. Результаты рентгенофазового анализа показали полную трансформацию исходного альфа-трикальцийфосфата в ДКФД при всех вводимых концентрациях  $\text{Ba}^{2+}$ . Результаты инфракрасной спектроскопии также подтвердили полное соответствие ДКФД эталонной структуре при всех использованных концентрациях  $\text{Ba}^{2+}$ . Обнаружено, что легирование ионами  $\text{Ba}^{2+}$  усиливает гидратационную активность ДКФД и деформирует его кристаллическую структуру. Результаты *in vitro* исследований свидетельствуют о том, что замещение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Ba}^{2+}$  в структуре ДКФД не влияет на его цитотоксические свойства материала. Кроме того, ДКФД-Ва не подавляет биогенез лизосом в клетках, а также увеличивает продукцию активных форм кислорода в неактивированных макрофагах, но подавляет их продукцию в провоспалительных условиях, индуцированных ЛПС. Таким образом, как ДКФД, так и его Ва-замещённые варианты являются перспективными кандидатами для использования в составе материалов, предназначенных для нужд регенеративной медицины.

**Заключение.** На культуре макрофагов человека в нормальных условиях и в условиях ЛПС-индуцированной провоспалительной активации показано, что все полученные Ва-замещённые варианты ДКФД не обладают цитотоксическими свойствами в максимально приемлемой для имплантации дозе 1 мг/мл. При этом включение ионов  $\text{Ba}^{2+}$  в структуру ДКФД не только не оказывает негативного влияния на биосовместимость материала, но и способствует её повышению за счёт подавления продукции активных форм кислорода в условиях ЛПС-индуцированного воспаления. Таким образом, предложенный подход низкотемпературного синтеза  $\text{Ba}^{2+}$ -замещённых

вариантов ДКФД представляет значительный интерес для получения специализированных остеопластических КФС-материалов. Наиболее эффективный вариант ДКФД с максимальной степенью замещения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Ba}^{2+}$  (6,43 атомных %) обладает потенциальным регуляторным действием на активированные макрофаги (то есть в воспалительных условиях). Это свойство может быть крайне важным для регуляции иммунного ответа и эффективной остеоинтеграции материала в организме реципиента.

**Ключевые слова:** низкотемпературный синтез; кальций-фосфатные соединения; дикальцийфосфат дигидрат; легирование; ионы бария; регенеративная медицина.

**КАК ЦИТИРОВАТЬ:**

Смирнова П.В., Тетерина А.Ю., Смирнов И.В., Минайчев В.В., Салынкин П.С., Кобякова М.И., Пятина К.В., Мещерякова Е.И., Фадеева И.С., Баринов С.М., Комлев В.С. Биосовместимость полученного низкотемпературным синтезом и легированного катионами бария дикальцийфосфат дигидрата для применения в регенеративной медицине // Морфология. 2025. Т. 163, № 3. С. ~~XX~~  
~~XX~~ DOI: 10.17816/morph.642219 EDN: VDYDOJ

© Эко-Вектор, 2025

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International

Рукопись получена: 25.11.2024

Рукопись одобрена: 03.04.2025

Опубликована online: 19.06.2025

## Biocompatibility of dicalcium phosphate dihydrate obtained by low-temperature synthesis and doped with barium cations for application in regenerative medicine

Polina V. Smirnova<sup>1</sup>, Anastasia Yu. Teterina<sup>1</sup>, Igor V. Smirnov<sup>1</sup>, Vladislav V. Minaychev<sup>1,2</sup>, Pavel S. Salynkin<sup>2</sup>, Margarita I. Kobyakova<sup>1,2</sup>, Kira V. Pyatina<sup>1,2</sup>, Alexey A. Egorov<sup>1,2</sup>, Elena I. Meshcheriakova<sup>2</sup>, Irina S. Fadeeva<sup>1,2</sup>, Sergey M. Barinov<sup>1</sup>, Vladimir S. Komlev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

### ABSTRACT

**BACKGROUND:** Calcium phosphate based synthetic materials (CPs) are increasingly used in modern regenerative medicine to stimulate bone regeneration, both due to the lack of initial immunogenicity and due to proven osteoconductive properties and partial osteoinductive potential. In turn, the introduction of bioactive ions into calcium phosphate ceramics has recently been considered by regenerative medicine as the most promising strategy for managing the properties of CPs, ensuring their controlled degradation, improving biomechanical characteristics and increasing bioactivity in order to obtain specialized materials designed for various types of injuries, nosologies or age groups of patients.

**AIM:** The objective of this study is to evaluate the impact of barium cation doping on the morphology, physicochemical, and biological properties *in vitro* of dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) powder synthesized via a low-temperature method. This includes an assessment of biocompatibility, the content of acidic compartments, and the generation of reactive oxygen species by human macrophages in contact with DCPD and its barium-substituted variants (DCPD-Ba)

**METHODS:** The composition, morphology, qualitative and quantitative elemental composition of low-temperature DCPD and its barium-substituted variants (DCPD-Ba) were analyzed using scanning electron microscopy, infrared spectroscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy and X-ray phase analysis. Cell viability was investigated by flow cytometry, and the lysosome content and production of reactive oxygen species were evaluated during the joint cultivation of primary cells (human macrophages) with samples of DCPD and DCPD-Ba under normal conditions and conditions of LPS-induced inflammation *in vitro*.

**RESULTS:** Samples of dicalcium phosphate dihydrate doped with barium cations at concentrations of 1, 5 and 10% theor. were obtained by a low-temperature method. The practically obtained% substitution was calculated experimentally, amounting to 0.62, 1.43 and 6.43 at.%, respectively. At 10 theory at.% there is a significant increase in the amount of Ba<sup>2+</sup> in the composition of DCPD. The results of X-ray phase analysis showed a complete transformation of the initial  $\alpha$ -TCP into DCPD at all injected concentrations of Ba<sup>2+</sup>. The results of IR spectroscopy also confirmed the full compliance of the DCPD with the reference structure at all concentrations used. It was found that doping of DCPD with Ba<sup>2+</sup> ions enhances the hydration activity and deforms its crystal structure. The results of *in vitro* studies have shown that the substitution of Ca<sup>2+</sup> for Ba<sup>2+</sup> in the structure of DCPD does not affect its cytotoxic properties, does not suppress the biogenesis of lysosomes in cells, increases the production of reactive oxygen species (ROS) in inactive macrophages, but inhibits the production of ROS in these cells in LPS-induced (inflammatory) conditions. Thus, both DCPD and its Ba<sup>2+</sup>-substituted variants are promising candidates for use in materials for the needs of regenerative medicine.

**CONCLUSION:** *In vitro* studies utilizing human macrophage cultures under both normal and LPS-induced inflammatory conditions demonstrated that all Ba<sup>2+</sup>-substituted versions of DCPD exhibit minimal cytotoxicity at a concentration of 1 mg/ml, which is the highest permissible dose for implantation. Simultaneously, it was conclusively demonstrated that the incorporation of Ba<sup>2+</sup> ions into the DCPD composition not only does not adversely impact the material's biocompatibility but also enhances it by inhibiting ROS production under inducible inflammatory circumstances. Consequently, it can be inferred that the suggested method of low-temperature synthesis for Ba<sup>2+</sup>-substituted versions of DCPD is promising and holds potential for the production of specific osteoplastic CFS materials. The most effective variant of DCPD, with a maximum Ca<sup>2+</sup> substitution by Ba<sup>2+</sup> at 6.43 at.%, exerts a

significant regulatory effect on activated macrophages under inflammatory conditions, a crucial property for modulating the immune response and osseointegration of the material within the recipient's body.

**Keywords:** low-temperature synthesis; calcium phosphate; dicalcium phosphate dihydrate; doping; barium cations; regenerative medicine.

**TO CITE THIS ARTICLE:**

Smirnova PV, Teterina AYu, Smirnov IV, Minaychev VV, Salynkin PS, Kobyakova MI, Pyatina KV, Egorov AA, Meshcheriakova EI, Fadeeva IS, Barinov SM, Komlev VS. Biocompatibility of dicalcium phosphate dihydrate obtained by low-temperature synthesis and doped with barium cations for application in regenerative medicine. *Morphology*. 2025;163(3):XX-XX. DOI: 10.17816/morph.642219

EDN: VDYDOJ

© Eco-Vector, 2025

Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License

Received: 25.11.2024

Accepted: 03.04.2025

Published online: 19.06.2025

## ОБОСНОВАНИЕ

В современной регенеративной медицине для устранения врождённых или приобретённых дефектов костей и стимуляции процессов регенерации всё чаще используются синтетические материалы на основе кальций-фосфатных соединений (КФС). При имплантации биоактивность синтетических материалов во многом зависит от взаимодействия составляющих их компонентов со стволовыми клетками и остеокластами-предшественниками на границе раздела фаз. В этой связи изменение химического состава имплантата может существенно повлиять на эффективность лечения [1].

Основной неорганический компонент костной ткани — гидроксиапатит (ГАп) — представляет собой неоднородный материал. В его структуре, помимо ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$ , содержатся также  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$  и другие микроэлементы. Они обеспечивают специфическую стехиометрию и физико-химические свойства, характерные для различных типов ГАп в зависимости от вида костной ткани (губчатой или компактной), и её участка (зона роста, основного осевого напряжения и др.). Особенно важную роль микроэлементы играют в процессе регенерации костной ткани [2, 3]. Исследования показали, что добавление микроэлементов в КФС обеспечивает контролируемую деградацию материалов, повышает их механическую прочность и положительно влияет на биологические свойства [4–6].

Несмотря на то, что барий ( $\text{Ba}^{2+}$ ) долго считался токсичным элементом, на сегодняшний день его катионы рассматриваются как перспективный компонент остеопластических материалов [7, 8]. Поглощённые ионы бария распределяются по кровотоку и откладываются преимущественно в костной ткани (примерно 90% общего количества в организме, от 0,5 до 10 мкг/г [9]), особенно в зонах роста и областях формирования костной мозоли [7]. Как и другие элементы, барий поступает в организм с пищей и питьевой водой. Однако в норме количество поступающего бария, как правило, безопасно: у взрослых суточное потребление бария с пищей составляет 0,4–1,8 мг в сутки, а токсичным является воздействие 3–4 г [8–11]. Кроме того, по данным Агентства по охране окружающей среды США (United States Environmental Protection Agency, EPA), барий, в отличие от других тяжёлых металлов, не оказывает канцерогенного воздействия на человека [12].

В клинической практике соединения бария используются для повышения контрастности рентгенопрозрачных материалов и тканей [6], а в последние годы интерес исследователей вызывает использование бария в составе различных материалов. Например, было показано, что барий-содержащие биостёкла усиливают пролиферацию клеток глиобластомы и гранулоцитарных клеток, не вызывая цитотоксичности. Кроме того, в том же исследовании описана способность ионов  $\text{Ba}^{2+}$  предотвращать вызванное липополисахаридом (ЛПС) усиление продукции интерлейкинов 6 и 10 (IL-6, IL-10), а также фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), что может свидетельствовать о противовоспалительном эффекте ионов бария [13].

H. Liu и соавт. [14] показали, что добавление  $\text{BaSO}_4$  улучшает механические свойства и рентгеноконтрастность инъекционного кальцийфосфатного цемента, смешанного с крахмалом. При этом биосовместимость, биоразлагаемость и остеоинтеграция материала не ухудшаются [14]. Кроме того, описана способность ионов бария стимулировать образование ГАп *in vitro*. С помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и рентгенофазового анализа было выявлено, что при погружении стёкол с интеркалированным барием в среду SBF (Simulated Body Fluid), имитирующую ионный состав плазмы крови, на них формируется слой гидроксикарбонатного апатита. Анализ гемолитической активности показал, что включение оксида бария в состав всех биоактивных стёкол улучшает их биосовместимость [15].

В некоторых исследованиях барий использовали как связывающий агент для улучшения общих свойств полимеров [16–18]. Установлено, что материалы, содержащие барий, создают благоприятную среду для роста клеток. Например, использование ионов бария значительно повышает пролиферацию инкапсулированных модельных стволовых клеток: микрокапсулы из альгинатно-желатиновой смеси, «сшитой» ионами бария, протестированные в качестве скаффолда для костной ткани, способствуют значительному увеличению количества остеобластов и отложению новообразованного костного матрикса [19]. Количество гемопоэтических стволовых клеток также увеличивается в 2 раза при культивировании в таких микрокапсулах без добавления каких-либо факторов роста [20].

Однако несмотря на значительное количество опубликованных данных, форма включения ионов  $\text{Ba}^{2+}$  и дозозависимое влияние бария до сих пор изучены недостаточно. Помимо этого, несмотря на высокий потенциал бария в качестве замены некоторых широко используемых ионов

металлов, у него есть определённые недостатки. Например, ионы  $Ba^{2+}$  могут оказывать токсическое воздействие на клетки и негативно влиять на их пролиферацию и дифференцировку [21], тогда как нерастворимые соединения бария, такие как титанат бария, напротив, улучшают остеогенную дифференциацию мезенхимальных стволовых клеток [22]. Кроме того, L. Mores и соавт. [23] наблюдали снижение жизнеспособности мононуклеарных фагоцитов под действием наночастиц бария. Представленные ими результаты показали, что барий усиливает продукцию супероксида, снижает высвобождение внутриклеточного кальция и повышает уровень клеточной гибели путём апоптоза [23]. Учитывая имеющиеся данные и потенциальную токсичность ионов бария, к его использованию в качестве сшивающего или легирующего агента по-прежнему относятся с осторожностью [10, 24].

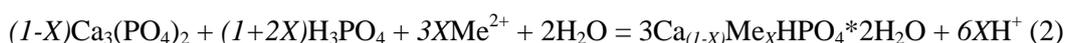
На основании вышесказанного можно заключить, что данных об общем биологическом воздействии бария по-прежнему недостаточно, а целесообразность его включения в состав синтетических кальций-фосфатных материалов требует дальнейших исследований.

**Цель данной работы** — оценить влияние легирования катионами бария порошка дигидрата дикальцийфосфата, полученного в результате низкотемпературного синтеза, на его физико-химические и биологические свойства.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### СИНТЕЗ ПОРОШКА ДИГИДРАТА ДИКАЛЬЦИЙФОСФАТА И ЕГО ФОРМЫ, ЛИГИРОВАННОЙ КАТИОНАМИ БАРИЯ

Порошки дигидрата дикальцийфосфата (ДКФД) получали путём фазового превращения исходного порошка альфа-трикальцийфосфата ( $\alpha$ -ТКФ) согласно реакции 1. Исходный порошок  $\alpha$ -ТКФ, с размером частиц до 100 мкм, помещали в раствор Ag 5,5: 1,5 М ацетата натрия; 0,15 М L-глутаминовой кислоты; pH доводили до значения 5,5 ортофосфорной кислотой. Соотношение массы образца к массе жидкости — 10 г исходного порошка на 1000 г раствора. Смесь инкубировали в течение 24 ч при температуре подогрева  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  и постоянном перемешивании 250 об./мин. По окончании процесса порошок отфильтровывали и пятикратно промывали дистиллированной водой, для чего порошок помещали в 1 литр воды и снова отфильтровывали. Далее порошок высушивали в термостате при температуре  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  в течение 2 суток. Внедрение катионов  $Ba^{2+}$  в структуру ДКФД проводили на этапе трансформации  $\alpha$ -ТКФ в ДКФД предполагаемой реакции 2. Для этого в раствор Ag 5,5 добавляли нитрат бария в количестве, рассчитанном на основе предполагаемой реакции (табл. 1).



### СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Морфологию исходного ДКФД и барий-замещённых образцов (ДКФД-Ба) изучали с использованием сканирующего электронного микроскопа Tescan VEGA III (Tescan, Чехия), оснащённого системой энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) для анализа химического состава (INCA Energy Oxford Instruments, Великобритания). Предварительно образцы покрывали золотом на установке Q150R Quorum Technologies (Великобритания). Изображения поверхности материалов получали при давлении  $7,3 \times 10^{-2}$  Па в колонке и  $1,5 \times 10^{-1}$  Па в камере. Для исследования наличия примесей на поверхности порошков использовали ЭДС.

Рентгенофазовый анализ проводили для оценки кристаллографической структуры фосфатов кальция (ФК) с использованием рентгеновского дифрактометра Shimadzu XRD-600 Shimadzu Corporation, Япония). Дифрактограммы регистрировали 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).

Инфракрасные (ИК) спектры ДКФД регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре Avatar 330 (Nicolet, Англия) в диапазоне длин волн 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ . Для этого порошок ДКФД смешивали с бромидом калия спектроскопической чистоты в соотношении 1 мг порошка на 50 мг KBr и прессовали в таблетку. Осадок анализировали в режиме пропускания в основном боксе при комнатной температуре. Данные инфракрасного анализа ДКФД собраны в табл. 2 и сопоставлены

со спектрами, полученными [39] при 300 и 77 К. Полученные спектры практически совпадают с литературными данными для LRAL (Linear Regulator Analog Voltage).

Качественный и количественный анализ элементного состава образцов проводили на рентгенофлуоресцентном волнодисперсионном спектрометре последовательного типа BRUKER S8 Tiger (Bruker, Германия) (серии 2) в гелии, по нестандартной методике с использованием программы QUANT-EXPRESS (Bruker, Германия).

### **КУЛЬТУРА КЛЕТОК**

Моноциты периферической крови человека получены из CLS Cell Lines Service GmbH (Германия). Клетки культивировали в течение 24 часов в среде RPMI/F12 с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum — FBS; Gibco, США) и 40 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (температуре 37°C, содержании CO<sub>2</sub> в атмосфере 5%, влажность 95%).

Для получения макрофагов моноциты культивировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS и 40 мкг/мл гентамицина в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Замену культуральной среды на свежую проводили спустя три дня после посева клеток. На четвёртый день среду меняли на DMEM с добавлением 2% FBS. Спустя 7 дней культивирования в среде с низким содержанием FBS клетки использовали в экспериментах. Для открепления макрофагов от поверхности культурального пластика использовали коктейль аккутаз [25]. Макрофаги проверяли на наличие микоплазменной инфекции с помощью набора MycoFluor™ (Thermo Fisher Scientific, США). В культурах клеток микоплазменная инфекция не обнаружена.

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ОБРАЗЦОВ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

Клетки высевали в 96-луночные планшеты (SPL Life Science, Южная Корея) из расчёта  $15 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>. Через 24 ч среду заменяли на 100 мкл среды, содержащей 10, 3, 1, 0,3 или 0,1 мг/мл кальций-фосфатных соединений. Образцы КФС предварительно стерилизовали в 75% этаноле по методике Y. Chen и соавт. [26]. Клетки культивировали с КФС в течение 72 ч. Цитотоксичность оценивали с помощью проточного цитофлуориметра BD Accuri C6 (BD Bioscience, США), для чего клетки в суспензии окрашивали флуоресцентными красителями: Calcein AM (200 нМ; Sigma-Aldrich, США) и йодидом пропидия (1 мкг/мл; Sigma-Aldrich, США) [5, 27].

### **ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОТНЫХ КОМПАРТМЕНТОВ В КЛЕТКАХ**

После 96 ч инкубации с ДКФД или ДКФД-Ва клетки промывали три раза фосфатно-солевым буфером (Sigma-Aldrich, США) и окрашивали LysoTracker Green DND-26 (50 нМ; Thermo Fisher Scientific, США) в течение 30 мин в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. В качестве положительного контроля часть клеток предварительно инкубировали с хлорохином (50 мкМ; Sigma-Aldrich, США) в течение 4 ч. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре BD Accuri C6. Для каждого образца КФС проанализировано по  $3 \times 10^4$  клеток.

### **ОЦЕНКА ПРОДУКЦИИ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА**

Влияния ДКФД и ДКФД-Ва на продукцию активных форм кислорода (АФК) в макрофагах исследовали как в стандартных условиях культивирования, так и при моделировании воспалительной реакции. Для активации макрофаги инкубировали с 10 мкг/мл липополисахарида из *E. coli* O111:B4 в течение 24 ч. В обоих экспериментальных условиях клетки культивировали в среде с добавлением ДКФД или ДКФД-Ва в течение 72 ч, промывали фосфатно-солевым буфером и окрашивали 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом (DCFH-DA, 20 мкМ; Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе [28]. В качестве положительного контроля часть клеток предварительно инкубировали с перекисью водорода (1 мМ; Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин. Флуоресцентный сигнал анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri C6. Для каждого образца КФС проанализировано по  $3 \times 10^4$  клеток.

### **СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ**

Результаты исследования представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Во всех экспериментах использовали выборки с не менее чем 4 наблюдениями ( $n \geq 4$ ). Полученные данные 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 проверяли на соответствие нормальному распределению (критерий Шапиро–Уилка) и на равенство дисперсий (критерий Брауна–Форсайта).

Для выявления различий между группами применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим использованием теста Бонферрони для сравнения с контрольной группой. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные низкотемпературным синтезом порошки дигидрата дикальцийфосфата (ДКФД) и его производных форм, допированных катионами бария (ДКФД-Ва) в концентрации 1, 5 или 10% теоретически возможного уровня замещения.

### ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследований порошков ДКФД, синтезированных в присутствии катионов бария в трёх концентрациях, показали, что барий не препятствует формированию характерной структуры ДКФД. Рентгенофазный анализ продемонстрировал однофазный состав полученных соединений при всех выбранных концентрациях бария (рис. 1), согласно карточке №00-009-0077 по базе данных ICDD (International Center for Diffraction Data; Powder Diffraction File; 2 Campus Blvd: Newtown Square, PA, USA, 2007). Кристаллы ДКФД растут вдоль основных кристаллографических плоскостей (021), (041) и (020), преобладает рост вдоль плоскости (020), о чём свидетельствует пик при  $2\theta = 11,7^\circ$ ; структура кристаллов моноклинная. Результаты ИК-спектроскопии образцов (см. табл. 2, рис. 2) согласуются с литературными данными по ДКФД.

Рентгенофлуоресцентный анализ (табл. 3) показал, что барий присутствует в элементном составе всех образцов. Учитывая, что фазовый состав порошков соответствует 100% ДКФД, можно сделать вывод, что катионы бария встраиваются в кристаллическую структуру материала.

Рассчитано реальное (практическое) значение замещения кальция ионами бария: ДКФД-Ва 1% теоретически возможного уровня замещения (% теор.) — 0,62%; ДКФД-Ва 5% теор. — 1,43%; ДКФД-Ва 10% теор. — 6,43%.

Получены микрофотографии чистого порошка ДКФД и его замещённых вариантов ДКФД-Ва при всех использованных в синтезе концентрациях бария. Микроструктура образцов пластинчатая, размер отдельных частиц колеблется от 10 до 50 мкм и соответствует типичной микроструктуре ДКФД (рис. 3).

При исследовании жизнеспособности макрофагов в присутствии ДКФД и ДКФД-Ва выявлено, что исследуемые соединения обладают цитотоксическим эффектом в концентрациях 10 и 3 мг/мл (рис. 4). В концентрациях 1 мг/мл и ниже цитотоксического действия не наблюдали. При этом значимых различий в цитотоксичности между ДКФД и его Ва-замещёнными вариантами не выявлено, независимо от степени замещения. Таким образом, замещение  $\text{Ca}^{2+}$  на  $\text{Ba}^{2+}$  в структуре ДКФД не оказывает влияния на цитотоксические свойства материала. Для дальнейших исследований использовали максимальную нетоксическую концентрацию 1 мг/мл.

При оценке влияния кальций-фосфатов на содержание кислотных компартментов (лизосом и иных структур с низким pH) в клетках обнаружено, что ДКФД и его Ва-замещённые варианты не изменяют этот показатель независимо от уровня замещения (рис. 5).

Исследование продукции активных форм кислорода (АФК) после инкубации с ДКФД и ДКФД-Ва показало, что все синтезированные КФС увеличивают продукцию АФК в неактивированных макрофагах (рис. 6). В то же время в условиях ЛПС-индуцированного воспаления все исследуемые КФС снижали внутриклеточную продукцию АФК в макрофагах человека относительно контрольных клеток. При этом различий между ДКФД и его Ва-замещёнными вариантами как в неактивированных, так и в активированных макрофагах не выявлено. Таким образом, ДКФД и ДКФД-Ва способны снижать продукцию АФК в провоспалительных условиях *in vitro*.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы иммунная регуляция репаративного остеогенеза рассматривается как перспективный подход для современного материаловедения и как потенциальная терапевтическая стратегия [2, 3, 7]. Важно понимать, что костная ткань — это не только депо двух самых главных ионов в организме —  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$ , обеспечивающих передачу большинства сигналов и все процессы фосфорилирования, но и часть иммунной системы [29–31]. Внимание учёных привлекает взаимосвязь между иммунной системой, гомеостазом костной ткани и эффективностью её регенерации при повреждении [3]. При этом трудно переоценить важность ионов металлов в организме: они принимают участие в поддержании клеточной структуры, катализе,

ферментативной активности, передаче сигналов, а также в активации ионных каналов и сигнальных путей. Кроме того, в последние годы всё больше исследователей рассматривают ионы металлов как регенеративные агенты для восстановления костной ткани [2–7, 11–16]. Установлено, что высвобождение ионов металлов в биологически безопасных концентрациях способствует интеграции имплантатов в костную ткань за счёт их взаимодействия с иммунными клетками [3]. Другой важной парадигмой, которую переживает современное материаловедение, является отказ от высокотемпературного ( $>600^{\circ}\text{C}$ ) синтеза кальций-фосфатной керамики и переход в область физиологических температур ( $<40^{\circ}\text{C}$ ) для получения материалов. Перемены связаны с тем, что высокотемпературная керамика биоинертна и не может стимулировать остеогенез [32]. Кроме того, в норме в организме не может быть температуры свыше  $40^{\circ}\text{C}$ , а следовательно, высокотемпературные материалы не могут считаться гомологичными естественным компонентам, участвующим в биоминерализации костной ткани [33–35].

В данной работе предпринята попытка получения естественного предшественника ГАп — дикальцийфосфат дигидрата, в условиях низкотемпературной химической трансформации с одновременным легированием ДКФД ионами бария. Проведена оценка стабильности структуры полученных соединений и их безопасности при взаимодействии с макрофагами человека в условиях *in vitro*. Макрофаги являются центральным звеном иммунной системы и непосредственно контактируют с имплантатами, что во многом определяет тканевую реакцию на материал. Учитывая важность ответной воспалительной реакции в регенеративном процессе [36–38], мы смоделированы воспалительные условия *in vitro* путём ЛПС-активации макрофагов и оценили потенциальный провоспалительный эффект синтезированных вариантов ДКФД-Ва.

Полученные результаты свидетельствуют о состоятельности предложенного подхода низкотемпературного синтеза ДКФД и его Ва-замещённых вариантов. Установлено, что катионы бария не препятствуют формированию полноценной структуры ДКФД и непосредственно встраиваются в неё.

При оценке биосовместимости полученных материалов *in vitro* не обнаружено различий в цитотоксичности ДКФД и его Ва-замещённых вариантов независимо от степени замещения, что свидетельствует об отсутствии токсического действия на клетки ионов бария, содержащихся в структуре ДКФД.

Важной характеристикой полученных материалов является отсутствие негативного влияния ДКФД и ДКФД-Ва на содержание кислотных компартментов (лизосом и других структур с низким pH), что свидетельствует о физиологическом характере их возможной резорбции при имплантации в организм.

Ещё одним важным показателем, характеризующим полученные материалы, является их разное влияние на продукцию АФК макрофагами человека. Известно, что уровень воспаления играет значительную роль в материал-ассоциированном остеогенезе, определяя либо естественный переход от воспалительной к пролиферативной и далее ремоделирующей фазам, либо пролонгируя воспалительную фазу, переходящую в хроническое воспаление, заканчивающееся отторжением имплантата или фиброзной трансформацией [35–38]. Нами установлено, что после 72 часов инкубации с ДКФД и ДКФД-Ва в неактивированных макрофагах увеличивается продукция АФК, тогда как добавление материалов в культуру ЛПС-активированных клеток, наоборот, снижает в них продукцию АФК. Таким образом, полученные КФС в нормальных условиях обладают прооксидантным, а в воспалительных — антиоксидантным действием, что может быть крайне полезным свойством при разработке специализированных материалов, предназначенных для хирургического лечения воспалённых ран. Отсутствие влияния на данный процесс наличия ионов бария в структуре материалов дополнительно свидетельствует о безопасности использования бария в качестве легирующего компонента.

Таким образом, предложенный подход низкотемпературного синтеза ДКФД и его Ва-замещённых вариантов является перспективным и может быть положен в основу получения КФС-материалов с дополнительными биоактивными свойствами.

## РЕЗЮМЕ ОСНОВНОГО РЕЗУЛЬТАТА ИССЛЕДОВАНИЯ

Низкотемпературным методом синтеза получены образцы дикальцийфосфат дигидрата, допированного катионами бария в концентрациях 1, 5 и 10% теор. и рассчитаны практически полученные уровни замещения кальция на барий — 0,62, 1,43 и 6,43 ат.%, соответственно. Результаты рентгенофазового анализа свидетельствуют о полной трансформации исходного  $\alpha$ -ТКФ в ДКФД при всех выбранных концентрациях  $\text{Ba}^{2+}$ . Результаты ИК-спектроскопии и сканирующей электронной микроскопии также подтверждают полное соответствие синтезированных материалов

эталонному ДКФД. Допирование ионами  $Ba^{2+}$  усиливает гидратационную активность ДКФД и деформирует его кристаллическую структуру. При этом замещение кальция на барий не усиливает цитотоксические свойства синтезированного материала в физиологических концентрациях. Добавление ДКФД-Ва не препятствует биогенезу pH-зависимых кислотных компартментов в макрофагах человека, а также оказывает специфическое прооксидатное действие в нормальных условиях и антиоксидантное действие — при моделировании воспалительных условий. Перечисленные свойства делают синтезированный материал перспективным кандидатом для применения в регенеративной медицине.

### **ОБСУЖДЕНИЕ ОСНОВНОГО РЕЗУЛЬТАТА ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе предложен эффективный способ получения легированного барием ДКФД путём низкотемпературного фазового превращения  $\alpha$ -ТКФ. При теоретически рассчитанной концентрации бария 10% значительно увеличивается фактическое содержание  $Ba^{2+}$  в составе ДКФД до 6,43 ат.%, что указывает на эффективность ионного замещения кальция в составе ДКФД. Результаты комплексного физико-химического анализа подтвердили, что ДКФД соответствует эталонной структуре при всех использованных концентрациях  $Ba^{2+}$ . Установлено, что легирование ДКФД ионами бария позволяет управлять такими свойствами материала, как кристалличность и способность к гидратации, что крайне важно для придания ему необходимых свойств биосовместимости и эффективности. В условиях *in vitro* показано, что замещение  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$  в структуре ДКФД не влияет на его цитотоксичность. Кроме того, добавление ДКФД-Ва не подавляет биогенез лизосом в макрофагах человека, а также способствует продукции АФК в неактивированных макрофагах и подавляет её в ЛПС-активированных клетках. Таким образом, как сам низкотемпературный ДКФД, так и его варианты с различной степенью замещения  $Ca^{2+}$  на  $Ba^{2+}$  являются перспективными КФС для использования в составе специализированных остеопластических материалов.

### **ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для всесторонней оценки потенциала ДКФД и его Ва-замещённых вариантов необходимы дальнейшие исследования, учитывающие взаимодействие материалов с тканями периимплантного ложа, а также с различными остеогенными и иммунными клетками. Тем не менее, первые полученные нами результаты можно считать многообещающими. Проведённый анализ позволяет заключить, что ионы бария могут повышать биоактивность низкотемпературных КФС-материалов, что потенциально способствует регенерации костной ткани и снижает риск отторжения имплантатов. Тем не менее, несмотря на достигнутые положительные результаты, для выяснения истинного регенеративного потенциала и безопасности предложенных материалов необходимы исследования на моделях гетеротопической и ортотопической имплантации, соответствующие требованиям международного стандарта ISO 10993 и специализированным рекомендациям ASTM (American Society for Testing and Materials).

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Предложенный подход низкотемпературного синтеза Ва-замещённых вариантов ДКФД является перспективным и представляет интерес для получения специализированных остеопластических КФС-материалов. Синтезированные ДКФД-Ва не проявляют цитотоксических свойств в концентрации 1 мг/мл, то есть в максимально приемлемой для имплантации дозе. При этом наиболее эффективный вариант ДКФД-Ва с максимальной степенью замещения  $Ca^{2+}$ , равной 6,43 ат.%, обладает потенциальным регуляторным действием на активированные макрофаги, то есть в условиях воспаления. Это свойство может иметь большое значение для регуляции иммунного ответа на имплантат и обеспечения остеоинтеграции материала в организме реципиента.

### **ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ**

**Вклад авторов.** П.В. Смирнова — работа с данными, визуализация, написание черновика рукописи; А.Ю. Тетерина — определение концепции, разработка методологии, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; И.В. Смирнов — разработка методологии, проведение исследования; В.В. Минайчев, М.И. Кобякова, П.С. Салынкин, К.В. Пятина, Е.И. Мещерякова — проведение исследования, работа с данными, анализ данных, визуализация, пересмотр и редактирование рукописи; И.С. Фадеева — определение концепции,

работа с данными, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; С.М. Баринов, В.С. Комлев — определение концепции, разработка методологии, руководство исследованием, пересмотр и редактирование рукописи. Все одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

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

**Источники финансирования.** 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».

**Раскрытие интересов.** Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

## ADDITIONAL INFO

**Author contributions:** I.V. Smirnov — design of low-temperature chemical transformation technology, synthesis of materials, study of physical and chemical characteristics of materials; P.V. Smirnova — processing of primary data, visualization, writing the text of the article; collection and analysis of literary sources, preparation of the text and editing of the article; Teterina A.Yu. — development of the research concept, development of technology for doping materials, preparation and writing of the text of the article; V.V. Minaychev, M.I. Kobayakova, P.S. Salynkin, K.V. Pyatina, E.I. Meshcheriakova — in vitro research, data processing, visualization, statistical data processing, editing of the text of the article; I.S. Fadeeva — development of the research concept, data processing, collection and analysis of literary sources, writing and editing the text of the article; S.M. Barinov, V.S. Komlev — conceptualization, methodology, guidance, review and editing of the text of the article. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication).

**Acknowledgments:** The authors extend their appreciation to the Centers for the collective use of research equipment of ITEB RAS and IMET RAS.

**Funding sources:** This work was supported by the Russian Science Foundation, project #21-73-20251 «Influence of structural and phase transformations of calcium phosphate compounds on the mechanisms of biointegration or rejection of materials intended for bone tissue regeneration».

**Disclosure of interests:** The authors declare that they have no competing interests.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Navarro M, Aparicio C, Charles-Harris M, et al. Development of a biodegradable composite scaffold for bone tissue engineering: physicochemical, topographical, mechanical, degradation, and biological properties. In: Julius Vancso G, editor. *Ordered polymeric nanostructures at surfaces*. Heidelberg: Springer Berlin; 2006. P:209–231. doi: [10.1007/12\\_068](https://doi.org/10.1007/12_068)
2. Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends Biotechnol.* 2013;31(10):594–605. doi: [10.1016/j.tibtech.2013.06.005](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06.005)
3. Liu S, Lin Z, Qiao W, et al. Cross-talk between biometal ions and immune cells for bone repair. *Engineered Regeneration.* 2024;5:375–408. doi: [10.1016/j.engreg.2024.01.003](https://doi.org/10.1016/j.engreg.2024.01.003) EDN: [VJRRDN](https://www.edn.net/VJRRDN)
4. Goldberg MA, Krohicheva PA, Fomin AS, et al. In situ magnesium calcium phosphate cements formation: From one pot powders precursors synthesis to in vitro investigations. *Bioact Mater.* 2020;5(3):644–658. doi: [10.1016/j.bioactmat.2020.03.011](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.03.011) EDN: [CFYWUC](https://www.edn.net/CFYWUC)
5. Teterina AY, Smirnov IV, Fadeeva IS, et al. Octacalcium phosphate for bone tissue engineering: synthesis, modification, and in vitro biocompatibility assessment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23):12747. doi: [10.3390/ijms222312747](https://doi.org/10.3390/ijms222312747) EDN: [LUUCKM](https://www.edn.net/LUUCKM)
6. Golubchikov D, Evdokimov P, Zuev D, et al. Three-dimensional-printed molds from water-soluble sulfate ceramics for biocomposite formation through low-pressure injection molding. *Materials (Basel).* 2023;16(8):3077. doi: [10.3390/ma16083077](https://doi.org/10.3390/ma16083077) EDN: [JFVLIL](https://www.edn.net/JFVLIL)
7. Kovrlija I, Locs J, Loca D. Incorporation of barium ions into biomaterials: dangerous liaison or potential revolution? *Materials.* 2021;14(19):5772. doi: [10.3390/ma14195772](https://doi.org/10.3390/ma14195772) EDN: [YDFSQT](https://www.edn.net/YDFSQT)
8. Oskarsson A. Barium. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, editors. *Handbook on the toxicology of metals*. 4th edition. Academic Press (Elsevier); 2015. P:625–634. doi: [10.1016/B978-0-444-59453-2.00029-9](https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00029-9)
9. Kravchenko J, Darrach TH, Miller RK, et al. A review of the health impacts of barium from natural and anthropogenic

- exposure. *Environ Geochem Health*. 2014;36(4):797–814. doi: [10.1007/s10653-014-9622-7](https://doi.org/10.1007/s10653-014-9622-7) EDN: [YBTVCE](https://doi.org/10.1007/s10653-014-9622-7)
10. U.S. Environmental Protection Agency. *Toxicological review of barium and compounds* [Internet]. In: Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS); EPA: Washington: Integrated Risk Information System (IRIS), 1998 [cited 03 June 2025]. Available at: <https://iris.epa.gov/static/pdfs/0010tr.pdf>
  11. Emsley J. *Nature's building blocks: an A-Z guide to the elements*. Oxford: Oxford University Press; 2011. ISBN: 9780199605637
  12. Poddalgoda D, Macey K, Assad H, Krishnan K. Development of biomonitoring equivalents for barium in urine and plasma for interpreting human biomonitoring data. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017;86:303–311. doi: [10.1016/j.yrtph.2017.03.022](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.03.022)
  13. Majumdar S, Hira SK, Tripathi H, et al. Synthesis and characterization of barium-doped bioactive glass with potential anti-inflammatory activity. *Ceramics International*. 2021;47(5):7143–7158. doi: [10.1016/j.ceramint.2020.11.068](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.11.068) EDN: [RVTMIR](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.11.068)
  14. Liu H, Zhang Z, Gao C, et al. Enhancing effects of radiopaque agent BaSO<sub>4</sub> on mechanical and biocompatibility properties of injectable calcium phosphate composite cement. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;116:110904. doi: [10.1016/j.msec.2020.110904](https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110904) EDN: [JWQYPT](https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110904)
  15. Arepalli SK, Tripathi H, Vyas VK, et al. Influence of barium substitution on bioactivity, thermal and physico-mechanical properties of bioactive glass. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;49:549–559. doi: [10.1016/j.msec.2015.01.049](https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.049) EDN: [YFCBKH](https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.049)
  16. Li G, Zhang G, Sun R, Wong CP. Mechanical strengthened alginate/polyacrylamide hydrogel crosslinked by barium and ferric dual ions. *J Mater Sci*. 2017;52:8538–8545. doi: [10.1007/s10853-017-1066-x](https://doi.org/10.1007/s10853-017-1066-x) EDN: [FZUBOL](https://doi.org/10.1007/s10853-017-1066-x)
  17. Gasa JV, Weiss RA, Shaw MT. Ionic crosslinking of ionomer polymer electrolyte membranes using barium cations. *Journal of Membrane Science*. 2007;304(1–2):173–180. doi: [10.1016/j.memsci.2007.07.031](https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.07.031) EDN: [KKJQWR](https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.07.031)
  18. Zellermann AM, Bergmann D, Mayer C. Cation induced conformation changes in hyaluronate solution. *European Polymer Journal*. 2013;49(1):70–79. doi: [10.1016/j.eurpolymj.2012.09.025](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.09.025) EDN: [YDHPKP](https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.09.025)
  19. Alizadeh Sardroud H, Nemati S, Baradar Khoshfetrat A, et al. Barium-cross-linked alginate-gelatine microcapsule as a potential platform for stem cell production and modular tissue formation. *J Microencapsul*. 2017;34(5):488–497. doi: [10.1080/02652048.2017.1354940](https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1354940)
  20. Machida-Sano I, Hirakawa M, Namiki H. Cell compatibility of three-dimensional porous barium-cross-linked alginate hydrogels. *Journal of Scientific Research and Reports*. 2014;3(20):2611–2621. doi: [10.9734/JSRR/2014/12407](https://doi.org/10.9734/JSRR/2014/12407)
  21. Huang TY, Su WT, Chen PH. Comparing the Effects of chitosan scaffolds containing various divalent metal phosphates on osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Biol Trace Elem Res*. 2018;185(2):316–326. doi: [10.1007/s12011-018-1256-7](https://doi.org/10.1007/s12011-018-1256-7) EDN: [HUVVYH](https://doi.org/10.1007/s12011-018-1256-7)
  22. Rocca A, Marino A, Rocca V, et al. Barium titanate nanoparticles and hypergravity stimulation improve differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:433–445. doi: [10.2147/IJN.S76329](https://doi.org/10.2147/IJN.S76329) EDN: [URKZAH](https://doi.org/10.2147/IJN.S76329)
  23. Mores L, França EL, Silva NA, et al. Nanoparticles of barium induce apoptosis in human phagocytes. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:6021–6026. doi: [10.2147/IJN.S90382](https://doi.org/10.2147/IJN.S90382) EDN: [VGXKWR](https://doi.org/10.2147/IJN.S90382)
  24. Schroeder HA, Tipton IH, Nason AP. Trace metals in man: Strontium and barium. *J Chronic Dis*. 1972;25(9):491–517. doi: [10.1016/0021-9681\(72\)90150-6](https://doi.org/10.1016/0021-9681(72)90150-6)
  25. Lomovskaya YV, Kobayakova MI, Senotov AS, et al. 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*. 2022;12(2):150. doi: [10.3390/biom12020150](https://doi.org/10.3390/biom12020150) EDN: [YAYKAX](https://doi.org/10.3390/biom12020150)
  26. Chen Y, Liu Z, Jiang T, et al. Strontium-substituted biphasic calcium phosphate microspheres promoted degradation performance and enhanced bone regeneration. *J Biomed Mater Res*. 2020;108(4):895–905. doi: [10.1002/jbm.a.36867](https://doi.org/10.1002/jbm.a.36867)
  27. Minaychev VV, Smirnova PV, Kobayakova MI, et al. Low-temperature calcium phosphate ceramics can modulates monocytes and macrophages inflammatory response in vitro. *Biomedicines*. 2024;12(2):263. doi: [10.3390/biomedicines12020263](https://doi.org/10.3390/biomedicines12020263) EDN: [TQUFDT](https://doi.org/10.3390/biomedicines12020263)
  28. Sabido O, Figarol A, Klein JP, et al. 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 (Basel)*. 2020;10(2):319. doi: [10.3390/nano10020319](https://doi.org/10.3390/nano10020319) EDN: [HSJLCT](https://doi.org/10.3390/nano10020319)
  29. Okamoto K, Takayanagi H. Osteoimmunology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019;9(1):a031245. doi: [10.1101/cshperspect.a031245](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031245)
  30. Zhao T, Chu Z, Ma J, Ouyang L. Immunomodulation effect of biomaterials on bone formation. *J Funct Biomater*. 2022;13(3):103. doi: [10.3390/jfb13030103](https://doi.org/10.3390/jfb13030103) EDN: [XGMGIY](https://doi.org/10.3390/jfb13030103)
  31. Yang Y, Chu C, Xiao W, et al. Strategies for advanced particulate bone substitutes regulating the osteo-immune microenvironment. *Biomed Mater*. 2022;17(2). doi: [10.1088/1748-605X/ac5572](https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac5572) EDN: [AWKWKK](https://doi.org/10.1088/1748-605X/ac5572)
  32. Volkov AV. *Morphology of reparative osteogenesis and osseointegration in maxillofacial surgery* [dissertation]. Moscow; 2019. Available at: <https://www.dissercat.com/content/morfologiya-reparativnogo-osteogeneza-i-osteointegratsii-v-chelyustno-litsevoi-khirurgii> (In Russ.)
  33. Minaychev VV. *Cellular and tissue aspects of the biocompatibility of calcium-phosphate compounds obtained through by*

- low-temperature synthesis* [dissertation]. Pushchino; 2024. Available at: <https://www.dissercat.com/content/kletochnye-i-tkanevye-aspekty-biosovmestimosti-kaltsii-fosfatnykh-soedinenii-poluchennykh> (In Russ.) EDN: [HGMSQR](#)
34. Pankratov AS, Fadeeva Is, Minaychev VV, et al. A biointegration of microand nanocrystalline hydroxyapatite: problems and perspectives. *Genes & Cells*. 2018;13(3):46–51. doi: [10.23868/201811032](#) EDN: [VUGEKS](#)
  35. Minaychev VV, Teleshev AT, Gorshenev VN, et al. Limitation of biocompatibility of hydrated nanocrystalline hydroxyapatite. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng*. 2018;347:012045. doi: [10.1088/1757-899X/347/1/012045](#) EDN: [RYGMEL](#)
  36. Terkawi MA, Matsumae G, Shimizu T, et al. Interplay between inflammation and pathological bone resorption: insights into recent mechanisms and pathways in related diseases for future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1786. doi: [10.3390/ijms23031786](#) EDN: [DKWORK](#)
  37. Ponzetti M, Rucci N. Updates on osteoimmunology: What’s new on the cross-talk between bone and immune system. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10:236. doi: [10.3389/fendo.2019.00236](#) EDN: [GOFNBJ](#)
  38. Takayanagi H. Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(4):292–304. doi: [10.1038/nri2062](#)
  39. Petrov I. et al. Infra-red investigation of dicalcium phosphates //Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy. – 1967; – №. 10: – 2637-2646. doi: 10.1016/0584-8539(67)80155-7

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

### AUTHORS INFO

*Автор, ответственный за переписку:	
* <b>Фадеева Ирина Сергеевна</b> , канд. биол. наук; адрес: Россия, 142290, Пушкино, ул. Институтская, д. 3; ORCID: 0000-0002-1709-9970; eLibrary SPIN: 6475-1023; e-mail: fadeeva.iteb@gmail.com	* <b>Irina S. Fadeeva</b> , Cand. Sci. (Biology); address: 3 Institutskaya st, 142290, Pushchino, Russia; ORCID: 0000-0002-1709-9970; eLibrary SPIN: 6475-1023; e-mail: fadeeva.iteb@gmail.com
Соавторы:	
<b>Смирнова Полина Викторовна</b> ; ORCID: 0000-0002-5437-7052; eLibrary SPIN: 5022-2890; e-mail: smirnova-imet@mail.ru	<b>Polina V. Smirnova</b> ; ORCID: 0000-0002-5437-7052; eLibrary SPIN: 5022-2890; e-mail: smirnova-imet@mail.ru
<b>Тетерина Анастасия Юрьевна</b> , канд. техн. наук; ORCID: 0009-0005-1405-2607; eLibrary SPIN: 5514-8643; e-mail: teterina_imet@mail.ru	<b>Anastasia Yu. Teterina</b> , Cand. Sci. (Engineering); ORCID: 0009-0005-1405-2607; eLibrary SPIN: 5514-8643; e-mail: teterina_imet@mail.ru
<b>Смирнов Игорь Валерьевич</b> ; ORCID: 0000-0003-3602-0276; eLibrary SPIN: 3680-5330; e-mail: baldyriz@gmail.com	<b>Igor V. Smirnov</b> ; ORCID: 0000-0003-3602-0276; eLibrary SPIN: 3680-5330; e-mail: baldyriz@gmail.com
<b>Минайчев Владислав Валентинович</b> , канд. биол. наук; ORCID: 0000-0002-8498-4566; eLibrary SPIN: 9217-1374; e-mail: vminaychev@gmail.com	<b>Vladislav V. Minaychev</b> , Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0002-8498-4566; eLibrary SPIN: 9217-1374; e-mail: vminaychev@gmail.com
<b>Салынкин Павел Сергеевич</b> ; ORCID: 0009-0002-0959-8072; eLibrary SPIN: 2594-8099; e-mail: salynkin.p.s@gmail.com	<b>Pavel S. Salynkin</b> ; ORCID: 0009-0002-0959-8072; eLibrary SPIN: 2594-8099; e-mail: salynkin.p.s@gmail.com

## Морфология / Morphology

Оригинальные исследования / Original Study Articles

DOI <https://doi.org/10.17816/morph.642219>

<p><b>Кобякова Маргарита Игоревна</b>, канд. биол. наук; ORCID: 0000-0002-6846-9994; eLibrary SPIN: 5611-8437; e-mail: kobyakovami@gmail.com</p>	<p><b>Margarita I. Kobyakova</b>, Cand. Sci (Biology); ORCID: 0000-0002-6846-9994; eLibrary SPIN: 5611-8437; e-mail: kobyakovami@gmail.com</p>
<p><b>Пятина Кира Вадимовна</b>; ORCID: 0009-0003-0194-6922; eLibrary SPIN: 2935-4432; e-mail: kirapyatina01@gmail.com</p>	<p><b>Kira V. Pyatina</b>; ORCID: 0009-0003-0194-6922; eLibrary SPIN: 2935-4432; e-mail: kirapyatina01@gmail.com</p>
<p><b>Мещерякова Елена Ивановна</b>; ORCID: 0009-0001-6148-5211; eLibrary SPIN: 6332-6772; e-mail: elena.mesh2311@gmail.com</p>	<p><b>Elena I. Meshcheriakova</b>; ORCID: 0009-0001-6148-5211; eLibrary SPIN: 6332-6772; e-mail: elena.mesh2311@gmail.com</p>
<p><b>Баринов Сергей Миронович</b>, д-р техн. наук, профессор; ORCID: 0000-0003-4544-2817; SPIN: 5876-1906; e-mail: barinov_s@mail.ru</p>	<p><b>Sergey M. Barinov</b>, Dr. Sci. (Engineering), Professor; ORCID: 0000-0003-4544-2817; SPIN: 5876-1906; e-mail: barinov_s@mail.ru</p>
<p><b>Комлев Владимир Сергеевич</b>, д-р техн. наук, профессор; ORCID: 0000-0003-2068-7746; eLibrary SPIN: 2668-0066; e-mail: komlev@mail.ru</p>	<p><b>Vladimir S. Komlev</b>, Dr. Sci. (Engineering), Professor; ORCID: 0000-0003-2068-7746; eLibrary SPIN: 2668-0066; e-mail: komlev@mail.ru</p>

## ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Расчётные массы добавок допирующего элемента на 10 г исходного порошка

Table 1. Calculated masses of doping element additives per 10g of initial powder

Название	% теоретического замещения	Масса Ва(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
ДКФД, допированный 1% Ва	1	0,253
ДКФД, допированный 5% Ва	5	1,265
ДКФД, допированный 10% Ва	10	2,529

Таблица 2. Основные колебательные моды дикальцийфосфат дигидрата — инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

Table 2. The main vibrational modes of dicalcium phosphate dihydrate (FTIR)

Волновое число, см <sup>-1</sup>	Режим колебаний
3541–3480	О—Н растяжение молекул воды в решётке
2385, 1600–1720	Комбинация Н—О—Н изгиба и вращения остаточной свободной воды
1649 (тонкий)	Н—О—Н изгиб молекул воды в решётке
1219	Р—О—Н изгиб в плоскости
1135, 1059, 987	Р—О растяжение
875	Р—О(Н) растяжение
791	Р—О—Н внеплоскостной изгиб
662	Либрации воды
576, 525	О—Р—О(Н) изгиб

Таблица 3. Результаты рентгенофлуоресцентного элементного анализа дикальцийфосфат дигидрата, лигированного катионами бария

Table 3. Results of X-ray fluorescence elemental analysis of DCPD and DCPD-Ba, at. %

Образец	Кальций, атомные %	Фосфор, атомные %	Барий, атомные %	Кальций/Фосфор	Кальций + Барий/Фосфор
ДКФД-Ва 1%	52,46	47,21	0,33	1,11	1,12
ДКФД-Ва 5%	52,99	46,24	0,77	1,15	1,16
ДКФД-Ва 10%	48,34	48,34	3,32	1,00	1,07

Примечание. ДКФД-Ва — дикальцийфосфат, лигированный катионами бария в концентрации 1, 5 и 10% теоретически возможного уровня замещения.

РИСУНКИ

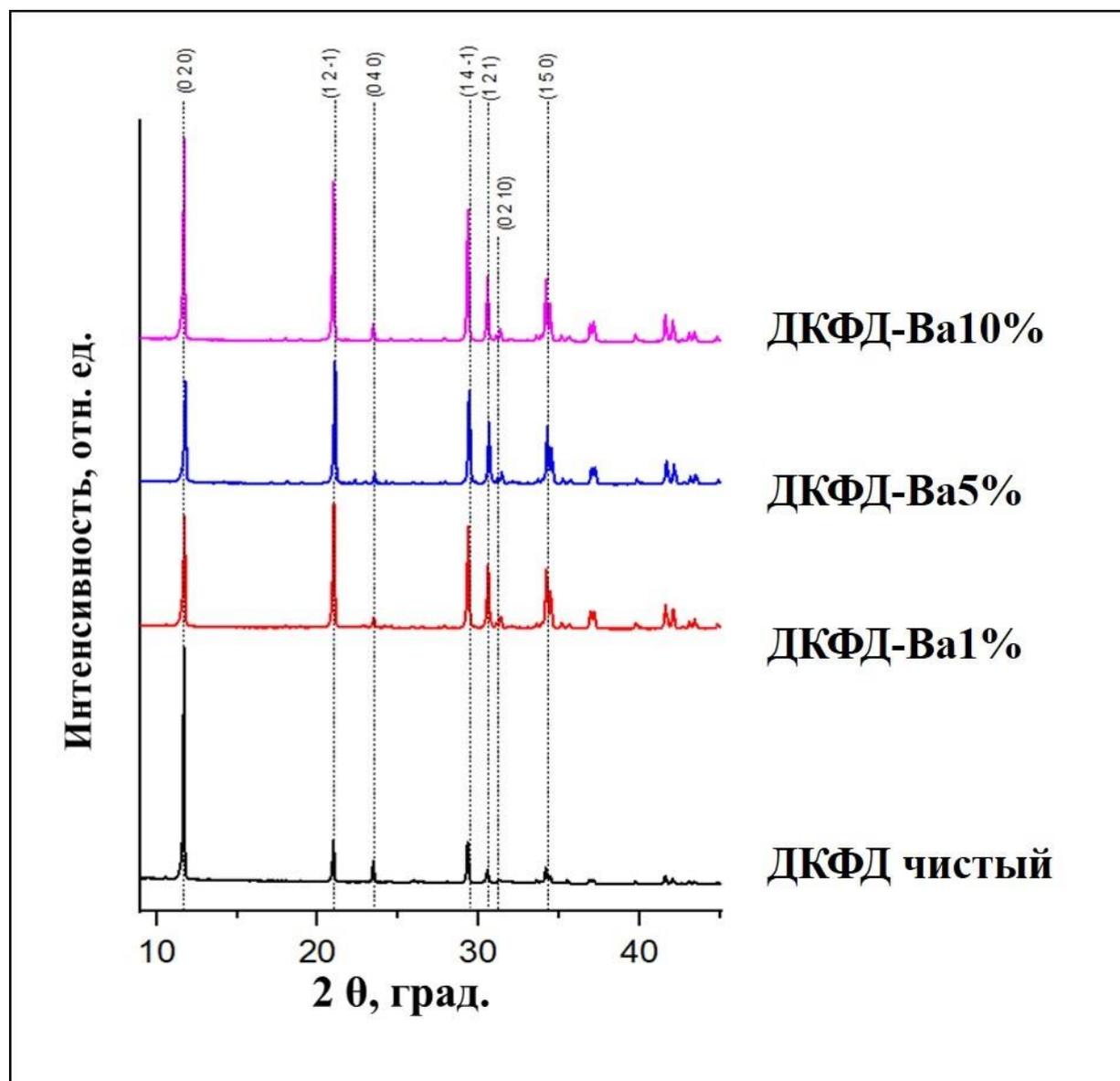


Рис. 1. Рентгенофазовый анализ порошков дикальцийфосфат дигидрата, допированного ионами бария в концентрации 1, 5 или 10 % теоретически возможного уровня замещения: ДКФД — дикальцийфосфат дигидрат, ДКФД-Ва — барий-замещённый дикальцийфосфат дигидрат; по оси X —  $2\theta$  (градусы), по оси Y — интенсивность (относительные единицы).

Fig. 1. XRD of dicalcium phosphate dihydrate powders doped with barium ions in concentrations of 1, 5, 10% teor.

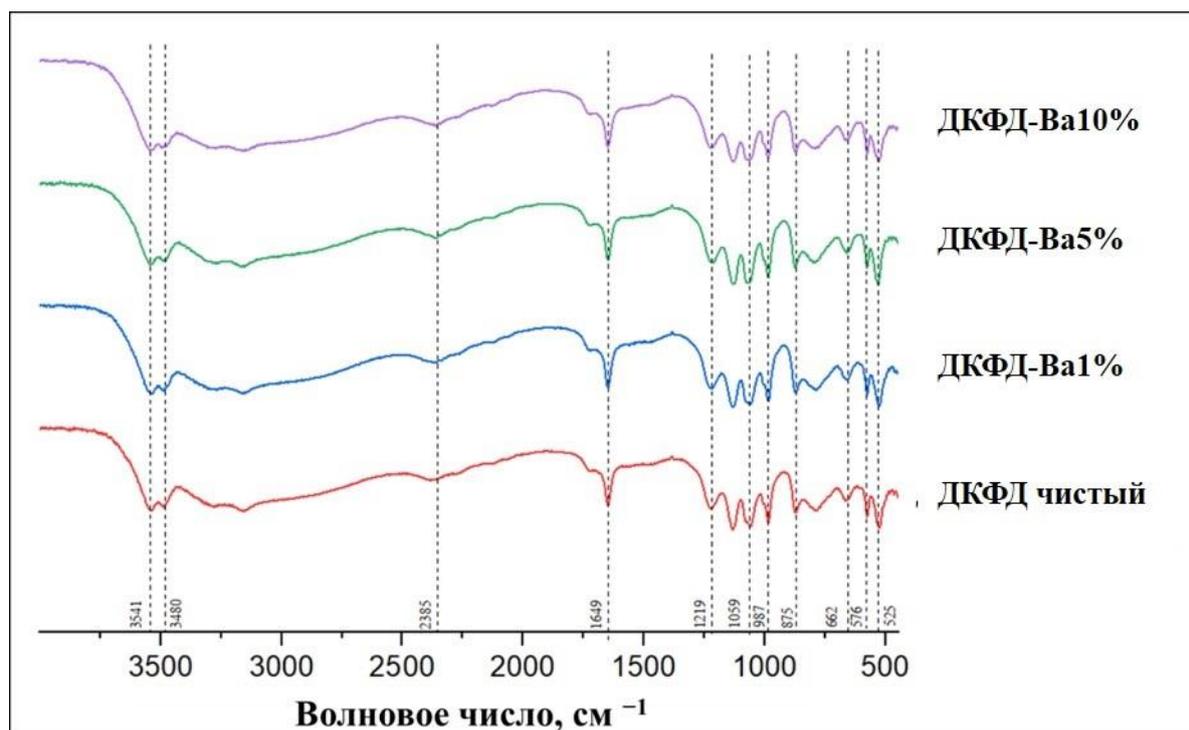


Рис. 2. Инфракрасная спектроскопия порошков дикальцийфосфат дигидрата, допированного ионами бария в концентрации 1, 5 или 10% теоретически возможного уровня замещения: ДКФД — дикальцийфосфат дигидрат, ДКФД-Ва — барий-замещённый дикальцийфосфат дигидрат.

Fig. 2. FTIR spectroscopy of dicalcium phosphate dihydrate powders doped with barium ions at concentrations of 1, 5, 10% teor.

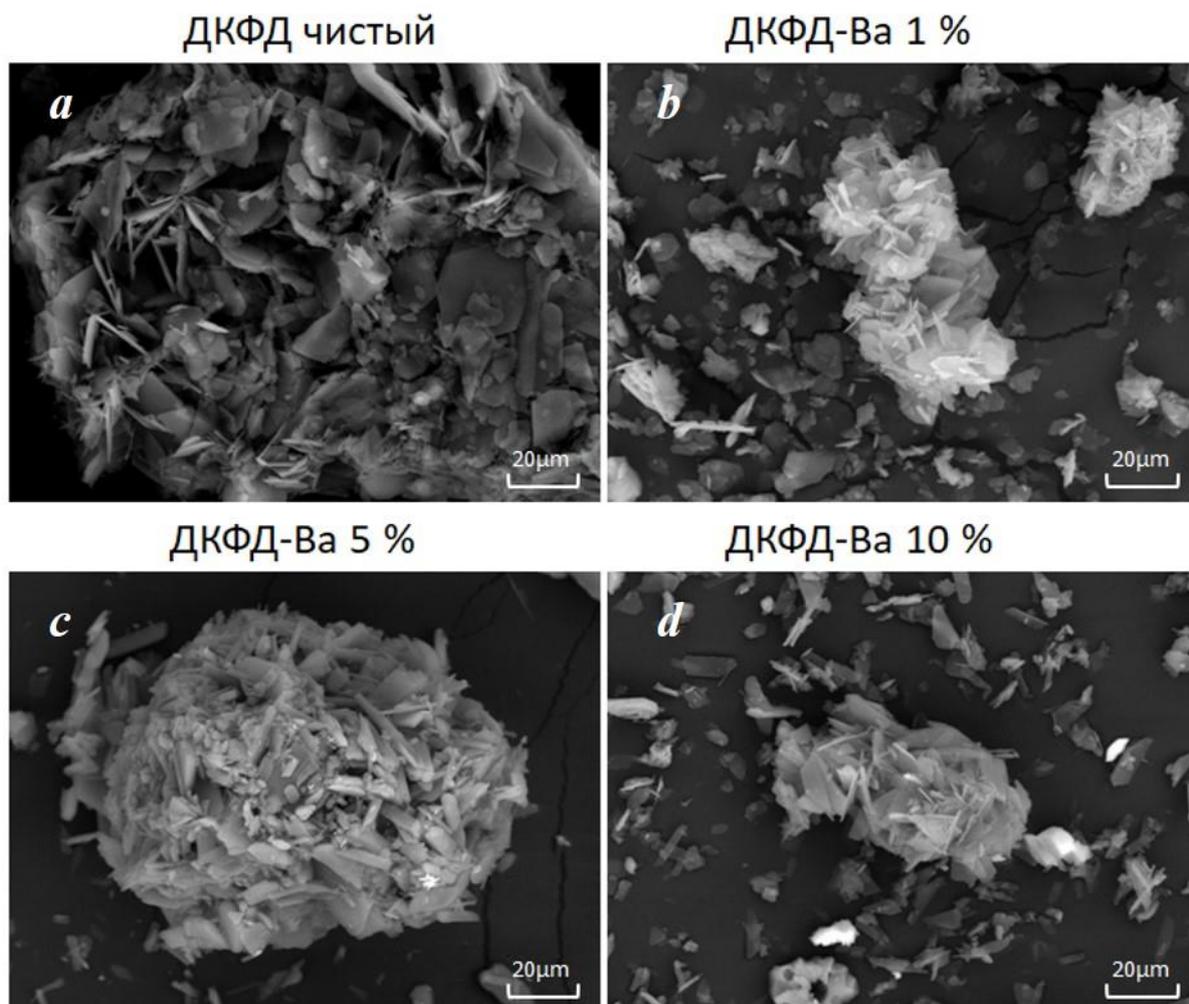


Рис. 3. Сканирующая электронная микроскопия — анализ порошков дикальцийфосфат дигидрата: *a* — исходный (чистый) дикальцийфосфат дигидрат; *b* — дикальцийфосфат дигидрат, допированный ионами бария в концентрации 1% теоретически возможного уровня замещения; *c* — дикальцийфосфат дигидрат, допированный ионами бария в концентрации 5%; *d* — дикальцийфосфат дигидрат, допированный ионами бария в концентрации 10%.

Fig. 3. SEM analysis of dicalcium phosphate dihydrate powders doped with barium ions at concentrations of 1, 5, 10% teor.

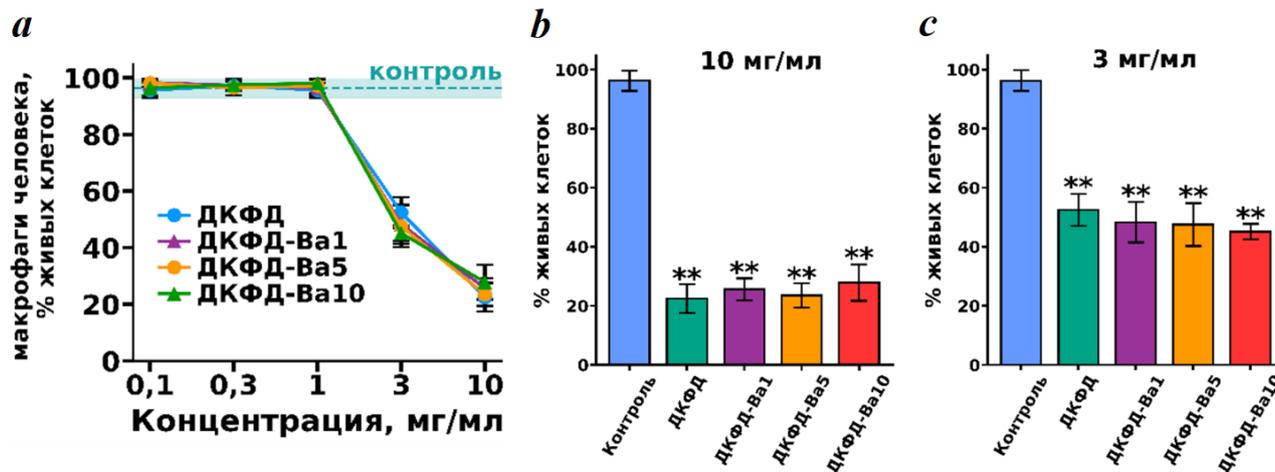


Рис. 4. Цитотоксический эффект кальций-фосфатных соединений в отношении макрофагов человека: ДКФД — дикальцийфосфат дигидрат, ДКФД-Ва — дикальцийфосфат дигидрат, допированный ионами бария в концентрации 1, 5 или 10% теоретически возможного уровня замещения; а — % живых клеток относительно контроля после 72 ч инкубации с различными концентрациями (10, 3, 1, 0.3, 0.1 мг/мл) исследуемых кальций-фосфатных соединений; б — % живых клеток относительно контроля после 72 ч инкубации с 10 мг/мл ДКФД или ДКФД-Ва; с — % живых клеток относительно контроля после 72 ч инкубации с 3 мг/мл ДКФД или ДКФД-Ва; \*\*  $p < 0,01$  при сравнении с контролем.

Fig. 4. Cytotoxic effect of DCPD and DCPD-Ba with different degree of substitution after 72 hours of cultivation with human macrophages. \*\* - comparison of experimental groups relative to the control using ANOVA with Bonferroni correction; \*\* -  $p < 0.01$

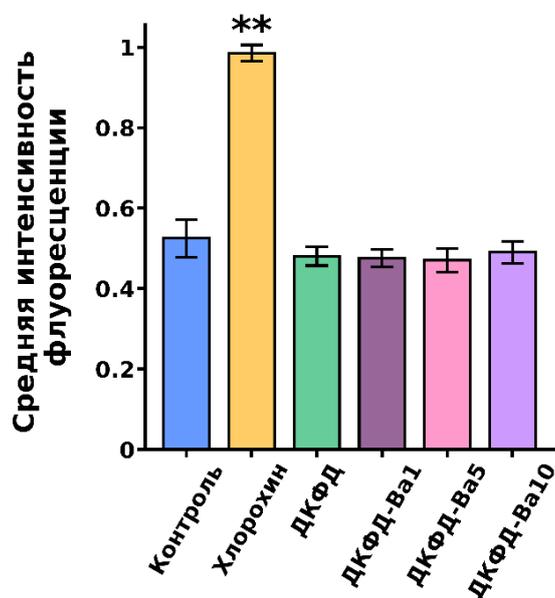
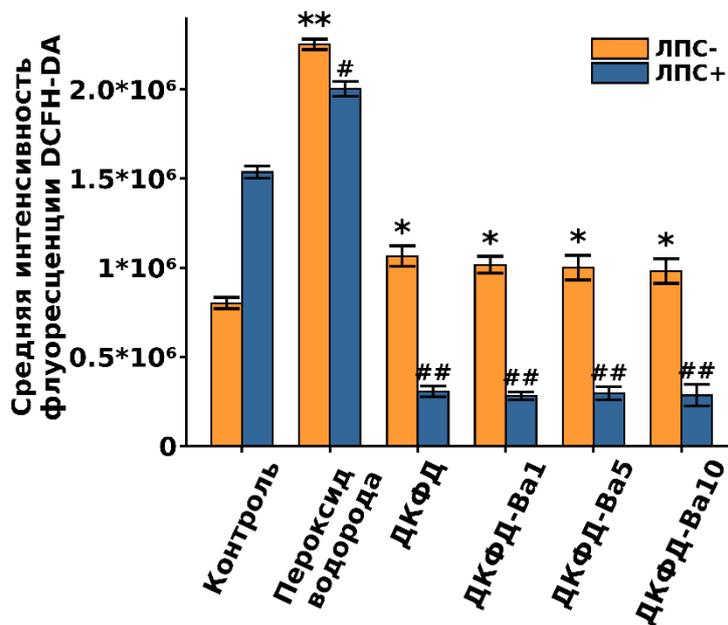


Рис. 5. Содержание кислых компартментов в макрофагах человека после инкубации с кальций-фосфатными соединениями: ДКФД — дикальцийфосфат дигидрат, ДКФД-Ва — дикальцийфосфат дигидраты, допированный ионами бария в концентрации 1, 5 или 10% теоретически возможного уровня замещения. По оси ОУ приведены значения средней интенсивности флуоресценции LysoTracker Green в клетках, размерность шкалы  $10^6$ ; \*\*  $p < 0,01$  при сравнение с контрольной группой.

**Fig. 5. Content of acidic compartments in human macrophages after 72 hours of incubation with DCPD and DCPD-Ba with different degrees of substitution. \*\* - comparison of experimental groups relative to the control using ANOVA with Bonferroni correction; \* - p<0.01.**



**Рис. 6. Продукция активных форм кислорода в макрофагах человека после инкубации с кальций-фосфатными соединениями: ДКФД — дикальцийфосфат дигидрат, ДКФД-Ва — дикальцийфосфат дигидрат, допированный ионами бария в концентрации 1, 5 или 10% теоретически возможного уровня замещения; ЛПС- — макрофаги в стандартных условиях культивирования (неактивированные), ЛПС+ — макрофаги после предварительной инкубации с липополисахаридом (активированные); \* p<0,05, \*\* p<0,01 при сравнении с контрольной группой без добавления липополисахарида; # p<0,05, ## p<0,01 при сравнении с контрольной группой с добавлением липополисахарида.**

**Fig. 6. Production of reactive oxygen species by non-activated (LPS-) and activated (LPS+) macrophages after 72 h of incubation with DCPD and DCPD-Ba with different degrees of substitution. \*\* or \* - comparison of experimental groups relative to the control without the addition of LPS using ANOVA with Bonferroni correction; ## or # - comparison of experimental groups relative to the control with the addition of LPS using ANOVA with Bonferroni correction; \* - p<0.05; # - p<0.05; \*\* - p<0.01; ## - p<0.01.**