

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

ФІЗИЧНАЯ ХІМІЯ
PHYSICAL CHEMISTRY

УДК 547.962.9:553.641

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-1-7-23>

Поступила в редакцию 25.09.2024

Received 25.09.2024

А. А. Гайдаш¹, А. И. Кулак¹, В. К. Крутько¹, О. Н. Мусская¹, **В. А. Кульчицкий²**,
К. В. Скроцкая³, Л. В. Кульбицкая¹, Е. Н. Крутько¹

¹Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь²Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь³Научно-исследовательский институт физико-химических проблем
Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ, МИКРОСТРУКТУРЫ
И ВНУТРИМОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ ФИБРИЛЛЯРНОГО КОЛЛАГЕНА
НА АПАТИТОГЕНЕЗ В СКАФФОЛДАХ**

Аннотация. Изучены структура и физико-химические свойства скаффолдов, полученных из коллагенового геля с использованием соединительнотканых оболочек паравертебральных сухожилий крыс Вистар. Скаффолды получали при 37 °С (пленчатый) и 6 °С (объемный). При отвердевании в каркасах формируются клубковая и внеклубковая фракции, что характерно для коллагеновых гелей, полученных из сухожильных мембран. Соотношение объемов фракций определяют структура пор и кинкинг коллагеновых фибрилл. В пленчатом скаффолде формируются поры закрытого типа с ослабленным кинкингом, что приводит к доминированию внеклубкового каркаса. В объемном скаффолде интенсифицируется кинкинг, формируются поры открытого типа, что определяет доминирование клубкового каркаса. Морфогенетическими факторами формирования доминантных фракций являются упорядочение и повышенная жесткость, субдоминантных – хаотизация и эластизация коллагеновых каркасов. Фибриллярный коллаген подвергается экстра- и интрафибриллярной минерализации *in situ* со структурированием кальцийфосфатов по апатитовому направлению. Микромеханические свойства скаффолдов индуцируют экстрафибриллярный синтез и определяют направление апатитогенеза: на жестких матрицах синтезируется стехиометрический гидроксиапатит, на рыхлых – карбонат-гидроксиапатиты. Интрафибриллярный синтез в сочетании с температурой определяют степень кристалличности, состав катионных и анионных подрешеток гидроксиапатитов. На матрицах фибриллярного коллагена с упрочненными связями пептидных и карбонатных групп формируется стехиометрический гидроксиапатит, степень кристалличности которого модулируется температурой: чем выше температура синтеза, тем выше степень кристалличности и насыщенность кальцием. На матрицах с ослабленными пептидными и С–О связями формируются карбонат-гидроксиапатиты, в которых замещения в анионной подрешетке регулируются температурой: при повышенной температуре CO_3^{2-} группы замещают преимущественно OH^- , при пониженной – PO_4^{3-} группы.

Ключевые слова: коллаген-апатитовые скаффолды, апатитогенез, стехиометрический гидроксиапатит, карбонат-гидроксиапатит, структурирование кальцийфосфатов, фибриллярный коллаген, минерализация *in situ*

Для цитирования. Влияние температуры, микроструктуры и внутримолекулярной динамики фибриллярного коллагена на апатитогенез в скаффолдах / А. А. Гайдаш, А. И. Кулак, В. К. Крутько [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2025. – Т. 61, № 1. – С. 7–23. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-1-7-23>

А. А. Gaidash¹, А. I. Kulak¹, V. K. Krut'ko¹, O. N. Musskaya¹, **V. A. Kulchitsky²**,
K. V. Skrotskaya³, L. V. Kulbitskaya¹, E. N. Krutsko¹

¹Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus²Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus³Research Institute of Physical and Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

**EFFECT OF TEMPERATURE, MICROSTRUCTURE AND INTRAMOLECULAR DYNAMICS
OF FIBRILLARY COLLAGEN ON APATITOGENESIS IN SCAFFOLDS**

Abstract. The structure and physicochemical properties of scaffolds obtained from collagen gel using connective tissue sheaths of paravertebral tendons of Wistar rats were studied. The scaffolds were obtained at 37 °C (filmy) and 6 °C (volumetric). During hardening, the scaffolds form globular and extraglomerular fractions, which is typical for collagen gels obtained from tendon membranes. The ratio of the fraction volumes is determined by the pore structure and kinking of collagen fibrils. In the filmy scaffold, closed-type pores with weakened kinking are formed, which leads to the dominance

of the extraglomerular scaffold. In the volumetric scaffold, kinking is intensified, open-type pores are formed, which determines the dominance of the globular scaffold. The morphogenetic factors of dominant fraction formation are ordering and increased rigidity, while the subdominant fractions are chaotization and elasticization of collagen frameworks. Fibrillar collagen undergoes extra- and intrafibrillar mineralization *in situ* with structuring of calcium phosphates along the apatite direction. The micromechanical properties of scaffolds induce extrafibrillar synthesis and determine the direction of apatitogenesis: stoichiometric hydroxyapatite is synthesized on rigid matrices, while carbonate-hydroxyapatites are synthesized on loose ones. Intrafibrillar synthesis in combination with temperature determines the degree of crystallinity and the composition of cationic and anionic sublattices of hydroxyapatites. On matrices of fibrillar collagen with strengthened bonds of peptide and carbonate groups, stoichiometric hydroxyapatite is formed, the degree of crystallinity of which is moderated by temperature – the higher the synthesis temperature, the higher the degree of crystallinity and saturation with calcium would be. On matrices with weakened peptide and C–O bonds, carbonate-hydroxyapatites are formed, in which substitutions in the anionic sublattice are regulated by temperature: at elevated temperatures, CO_3^{2-} groups predominantly replace OH^- , and at lower temperatures, PO_4^{3-} groups.

Keywords: collagen-apatite scaffolds, apatitogenesis, stoichiometric hydroxyapatite, carbonate-hydroxyapatite, structuring of calcium phosphates, fibrillar collagen, mineralization *in situ*

For citation. Gaidash A. A., Kulak A. I., Krut'ko V. K., Musskaya O. N., Kulchitsky V. A., Skrotskaya K. V., Kulbitskaya L. V., Krutsko E. N. Effect of temperature, microstructure and intramolecular dynamics of fibrillary collagen on apatitogenesis in scaffolds. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2025, vol. 61, no. 1, pp. 7–23 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-1-7-23>

Введение. Разработка коллаген-апатитовых скаффолдов является одним из ведущих направлений при получении жидких, мягких, твердых биомиметических материалов. Композиты допируют кальцийфосфатами одним из следующих способов: 1) механическое перемешивание фибриллярного коллагена с гидроксиапатитом стехиометрическим, карбонизированным, синтезированным или полученным из природных источников [1–3] (биомиметический потенциал подобных технологий минимален); 2) функционализация каркасов биоактивной керамикой, стекловолокном, хитозаном, покрытием коллагеновых фибрилл хондро- и остеоиндуктивными полимерами [4–6]; 3) экстрафибриллярная минерализация – синтез гидроксиапатита *in volume* по механизму гомогенной нуклеации химических предшественников (аморфных кальцийфосфатов), мигрирующих в каркас из биомиметических жидкостей [7, 8] (гомогенная нуклеация, являющаяся единственным механизмом синтеза гидроксиапатита в экстрафибриллярном пространстве, ограничивает способность имитировать наноразмерную иерархическую структуру в минерализующихся коллагеновых фибриллах); 4) интрафибриллярная минерализация – не классический, но наиболее близкий к биомиметическому путь кристаллизации [9]. Существенным недостатком этого подхода являются реципрокные отношения экстра/интрафибриллярного синтеза: один подавляет другой. Кроме того, подход требует применения шаблонов, без которых нарушается неиерархичность внутрифибриллярной минерализации с синтезом непрерывных, а не дискретных кристаллитов апатита [10].

В соответствии с избирательностью синтезируются различного вида химические проводники (разветвленные полимеры), которые стабилизируют аморфный кальцийфосфат [11]. Преобразователи формируют в экстрафибриллярном пространстве наноконплексы аморфных кальцийфосфатов, например, с полиакриловой кислотой, карбоксиметилхитозаном, которые при содействии триполифосфата натрия направленно проводятся в интрафибриллярное пространство [12]. В контексте статьи иерархичность – это технологическое воспроизведение шаблонной сборки апатита на всех уровнях структурной организации минерализующегося коллагена. В связи с этим воспроизведение сводится к использованию одно/мультимолекулярных шаблонов, инициирующих образование, продвижение и слияние зародышей фосфата кальция в интрафибриллярном пространстве [13]. Шаблоны идентифицированы как карбоксильные, карбонильные и аминоксильные группы молекулы фибриллярного коллагена, структурированные в пространственные сайты, которые обеспечивают эпитаксию и нуклеацию предшественников апатита. Структура сайтов подвижна, что снижает однозначность взаимоотношений химических реагентов в ходе матричного синтеза и делает их менее предсказуемыми. Содержание и степень коррелированности взаимосвязей между внутримолекулярной динамикой фибриллярного коллагена и типовой направленностью апатитогенеза на его матрице остаются во многом не ясными. Не известно, в частности, как соотносится динамика структурных характеристик первичных пептидных цепей фибриллярного коллагена с синтезом стехиометрического или карбонат-гидроксиапати-

тов, кристалличностью, составом катионной и анионной подрешеток и чувствительностью кристаллографических компартментов к воздействию температуры и других физических факторов. На мезо-микрометровом уровне подобные взаимосвязи обнаружены: кристалличность и размер кристаллитов гидроксиапатита, микротвердость и соотношение Са/Р определяются микроструктурой кости [14]. Периодическое напряжение сдвига жидкости и повышенная плотность микро-, мезопор в каркасных материалах индуцируют интрафибрилярную минерализацию коллагена [15], но не ясно, посредством какого типа гидроксиапатита.

В работе использована методология двухэтапного формирования скаффолдов с соблюдением следующих принципов: поддержание самосборки фибриллярного коллагена на всех технологических этапах, обеспечение миграции химических предшественников гидроксиапатита (кальцийфосфатов) в скаффолды из кристаллизующей среды, минерализация фибриллярного коллагена. Цель работы – определить взаимосвязь внутримолекулярной динамики фибриллярного коллагена с особенностями структурирования каркасов и кальцийфосфатов по апатитовому направлению.

Материалы и методы. Образцы соединительнотканых оболочек сухожилий выделены из хвостов крыс Вистар; коллагеновый гель синтезирован в Институте цитологии РАН. Технология подготовки образцов соединительнотканых оболочек сухожилий разработана в Институте общей и неорганической химии НАН Беларуси на основании протоколов, утвержденных этическим комитетом Института физиологии НАН Беларуси. Согласно двухэтапной методологии на первом этапе осуществили ацетатную экстракцию коллагена из соединительнотканых оболочек сухожилий и гелеобразование раствора коллагена в концентрированной среде 199 (кристаллизующая среда), на втором этапе – отвердевание каркасов, сопряженное с синтезом гидроксиапатита *in situ* [16]. Коллагеновый гель, синтезированный на первом этапе, равными объемами разливали в пластиковые чашки Петри (диаметром 3 см) и получали коллагенсодержащие материалы: пленчатый скаффолд – прогреванием при 37 °С в течение 3 сут, объемный скаффолд – охлаждением при 6 °С в течение 3 суток. Изучено по 5–7 образцов из каждой группы с соответствующей пробоподготовкой.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) из скаффолдов вырезали пластинки, которые фиксировали в парах 1,5%-го водного раствора глутарового альдегида в течение суток, отмывали в деионизованной воде, обезвоживали в этаноле восходящей концентрации, напыляли золотом на установке Emitech K550X (Англия) и изучали на микроскопе LEO 420 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрические исследования выполнили в редакторе Photoshop с применением инструментов «Линейка», «Произвольная фигура», откалиброванных по масштабным отрезкам СЭМ-изображений. Удельную площадь поверхности (S_v) определяли по формуле:

$$S_v = 2n/l, \quad (1)$$

где n – среднее число точек пересечения микрообъекта с измерительной линейкой, l – длина измерительной линейки (мкм), с которой совместились объекты.

Численную плотность фибриллярных узлов определяли методом правила несмещенного подсчета с регистрацией количества двумерных топологических событий в нормированных по размеру полях [17]. Жесткость (Z) определяли согласно уравнению:

$$Z = H \cdot (V_v)^{-1} \cdot (l)^{-1}, \quad (2)$$

где H (мкм) – средняя хорда «несущей» компоненты: плотная фаза (коллагеновые волокна), V_v – объемная доля дискретной компоненты (пористые структуры), l (мкм) – средний линейный размер дискретного элемента – диаметр пор [18].

Ориентацию коллагеновых микрофибрилл в пространстве каркаса оценивали с помощью индекса $OI_{\text{стерео}}$, который определяли в диапазоне 0–180° с использованием соотношения

$$OI_{\text{стерео}} = \frac{180^\circ - OA}{180^\circ}, \quad (3)$$

где OA – аксиальные отклонения волокон в градусах геометрических углов от случайной секущей, проектированной на СЭМ-изображение [19]. Значения индексов $OI_{\text{стерео}}$, полученные по данным

морфометрии, варьируют в пределах 1–0: чем ближе к 1, тем фибриллы более параллельны. Индивидуальные значения морфометрических показателей объединяли и определяли групповые статистические параметры, имевшие нормальное распределение. Это позволило оценивать достоверность различий (для $P < 0,05$) по t -критерию Стьюдента.

Для рентгенофазового анализа (РФА) образцы массой 50 мг вносили в ячейку дифрактометра ADVANCE D8 (Bruker, Германия). Дифрактограммы сняты на $\text{CuK}_\alpha = 0,15405$ нм в диапазоне $5\text{--}70^\circ$ в масштабе 2θ с шагом $0,02^\circ$. Анализы выполнены с использованием базы ICDD PDF-2с: карбонат-гидроксиапатит [00-035-0180], стехиометрический гидроксиапатит [01-084-1998]. Ориентацию коллагеновых фибрилл оценивали с помощью индекса OI_{XRD} с использованием уравнения:

$$OI_{\text{XRD}} = (90^\circ - AY) / (90^\circ), \quad (4)$$

где AY – азимутальный угол (в 2θ) дифракционного пика рентгеноаморфного гало, относимого к коллагеновой фракции каркаса [20]. Кристалличность гидроксиапатита оценивали полуколичественно с помощью индекса CI_{XRD} , основанного на измерении интенсивности пиков кристаллических плоскостей стехиометрического гидроксиапатита с плоскостями: (112), (300), (202), (211), расположенными в диапазоне $30\text{--}35^\circ 2\theta$, согласно уравнению:

$$CI_{\text{XRD}} = \frac{a_{112} + b_{300} + c_{202}}{h_{211}}, \quad (5)$$

где коэффициенты a , b , c – экспериментальные значения интенсивностей высот вышеприведенных плоскостей, h – высота (интенсивность) характеристичного пика гидроксиапатита. Экспериментальные значения интенсивностей нормировали к относительной интенсивности инструментальных плоскостей по данным (JCPDS): $I_{202} = 27\%$, $I_{300} = 62\%$, $I_{112} = 61\%$ и $I_{211} = 100\%$ [21].

ИК-спектры записаны с образцов скаффолдов с помощью ИК-микроскопа Hyperion (Bruker, Германия) с морфологическим контролем точек съемки при 15-кратном увеличении (Gir-objective) в диапазоне $600\text{--}4\,000\text{ см}^{-1}$.

Результаты и их обсуждение. *Структура коллагеновых скаффолдов.* Пленчатый скаффолд структурирован в две фракции: внеклубковый каркас и клубковые образования. Клубки – субдоминантная фракция четко оформлены: довольно крупные, имеют мембрану и сетевидный коллагеновый каркас. Клубки не склонны к слиянию. Капсула клубков образована прослойкой (толщиной до 20 мкм) компактизированных коллагеновых волокон, избирательно усеянных кристаллитами кальцийфосфатов, многие из которых огранены (рис. 1, а). Каркас капсулы образует многослойную сеть коллагеновых волокон, которые в пограничных участках упакованы в широкие до 2 мкм ленты шириной до 2 мкм (рис. 1, б). Коллагеновые волокна утолщены и удлинены, численная плотность достоверно больше, чем во внеклубковом каркасе (табл. 1), что свидетельствует об усиленной самосборке, как боковой, так и аксиальной.

Удлинение коллагеновых волокон в ограниченном пространстве приводит к запутыванию, а это, в свою очередь, к увеличению удельной площади поверхности волокнистой фракции и падению индекса ориентации коллагеновых волокон (см. табл. 1). Клубковый каркас – это пористая ткань (рис. 1, с). В клубках диаметр пористых структур и их удельный объем больше, а удельная площадь поверхности пор меньше, чем во внеклубковом каркасе (см. табл. 1). Расширенные поры и повышенный удельный объем пористых структур не только способствуют накоплению тканевой жидкости, но и существенно уменьшают локальную жесткость несущей фазы клубковой фракции согласно уравнению (2). Удельная площадь поверхности пор почти в два раза меньше, чем во внеклубковом каркасе (см. табл. 1), что свидетельствует о том, что поры преимущественно однокамерные, закрытого типа. Указанные морфологические особенности способствуют заставанию тканевой жидкости и замедлению локальных процессов массообмена и испарения. Увеличение диаметра фибриллярных узлов, а главное их численная плотность – свидетельство интенсивной самосборки фибриллярного коллагена в сравнении с внеклубковым каркасом. Уменьшение связности (см. табл. 1) может быть обусловлено максимальным сближением и боковой агрегацией коллагеновых субфибрилл – волокна при этом собираются в уширенные короткие

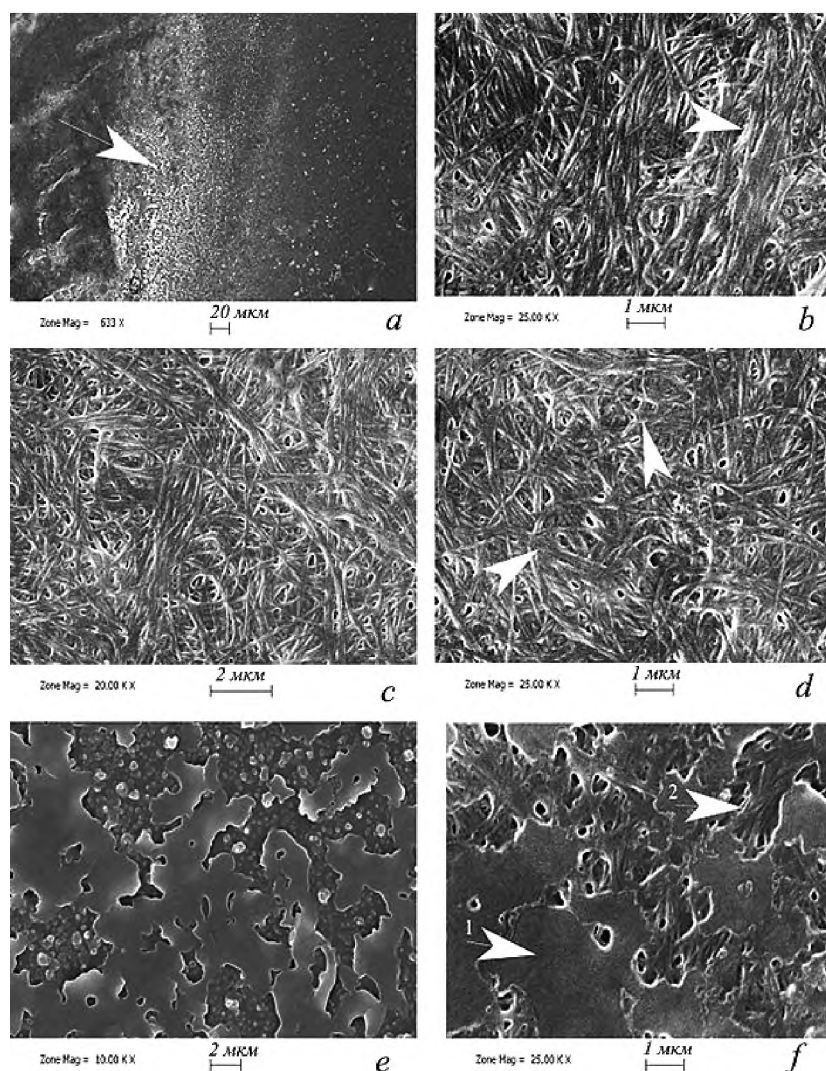


Рис. 1. СЭМ-изображения микроструктуры пленчатого скаффолда: *a* – капсула клубка с кальцийфосфатами; *b* – пограничный участок капсулы клубка с коллагеновыми волокнами, упакованными в ленты; *c* – поры закрытого типа в клубковом каркасе; *d* – пластинчатые структуры в области фибриллярных протоузлов клубка; *e* – внеклубковый каркас – слабо ветвящиеся компактизированные коллагеновые волокна с утраченной *D*-периодичностью; *f* – внеклубковый каркас, стрелка 1 – пласт компактизированных коллагеновых волокон на поверхности скаффолда, стрелка 2 – слой коллагеновых волокон с сохранившейся микроструктурой в глубине скаффолда

Fig. 1. SEM images of the microstructure of the filmy scaffold: *a* – the capsule of the tangle with calcium phosphates; *b* – the border region of the capsule of the tangle with collagen fibers packed into ribbons; *c* – closed-type pores in the tangle framework; *d* – lamellar structures in the region of fibrillar proto-nodes of the tangle; *e* – the extra-tangle framework – weakly branching compacted collagen fibers with lost *D*-periodicity; *f* – the extra-tangle framework, arrow 1 – a layer of compacted collagen fibers on the surface of the scaffold, arrow 2 – a layer of collagen fibers with preserved microstructure in the depth of the scaffold

пластинки со слегка ребристой поверхностью (рис. 1, *d*). В связи с агрегацией количество обособленных волокон, формирующих связность, уменьшается (см. табл. 1). Фибриллярные узлы с подобной структурой усиливают гидродинамические потоки в клубковом каркасе.

Внеклубковый каркас образован сетью коллагеновых волокон, толщина и длина которых на 15–20 % меньше, чем в каркасе клубковых образований (см. табл. 1). В связи с этим приведенные размерные вариации коллагеновых субфибрилл свидетельствуют о гомогенизации и уплощении, очаговой утрате *D*-периодичности (рис. 1, *e*), что характерно для деспирализации. Столь значимая гипотрофия волокон указывает на ослабление процессов самосборки коллагеновых фибрилл. Волокна слабо ветвятся, что в сочетании с укорочением приводит к почти

двукратному уменьшению показателя удельной площади поверхности фибрилл относительно соответствующего параметра клубковых образований (см. табл. 1). Экстрафибриллярный матрикс образован тонкими прослойками бесструктурного вещества, пропитанного тканевой жидкостью и усеянного частицами кальцийфосфатов (рис. 1, *e*). Матрикс при этом сжат, о чем свидетельствует достоверное уменьшение диаметра и относительного объема пористых образований (см. табл. 1). Соотношение этих показателей обусловило двукратное увеличение показателя жесткости несущей фазы (см. табл. 1), чему способствует и упорядочивание пространственной структуры – повышен индекс ориентации $OI_{\text{стерео}}$ микрофибрилл. Повышенный индекс $OI_{\text{стерео}}$ означает, что основная часть микрофибрилл расположена в одной плоскости с меньшим количеством пересечений и переплетений между слоями (каркасы с подобной структурой отличаются более высокой прочностью на разрыв). На СЭМ это подтверждается пластованием поверхностных слоев внеклубкового каркаса (рис. 1, *f*). Вследствие ретракции каркаса поры деформируются, усложняется структура их внутренней поверхности: удельная площадь поверхности пор становится существенно большей, чем в клубках (см. табл. 1), а поры – многокамерными, открытыми, что ускоряет массообмен и испарение. Достоверно меньшие, чем в клубках, диаметр и численная плотность фибриллярных узлов свидетельствуют об ослаблении процессов самосборки коллагеновых волокон. Вследствие высыхания и боковой агрегации в узлообразовании участвуют утолщенные волокна, что приводит к уменьшению связности фибриллярных узлов.

Таблица 1. Морфометрические показатели скаффолдов

Table 1. Morphometric characteristics of scaffolds

Параметры	Пленчатый скаффолд		Объемный скаффолд	
	Клубки	Внеклубковый каркас	Клубки	Внеклубковый каркас
V_v – относительный объем фракции, %	$35 \pm 1,4$	$75 \pm 2,9$	$80 \pm 2,9^*$	$20 \pm 1,4^*$
D_{gl} – диаметр клубков, мкм	$85,2 \pm 3,1$	–	$58,1 \pm 2,4^*$	–
D_f – толщина волокна, мкм	$0,194 \pm 0,02$	$0,165 \pm 0,02$	$0,154 \pm 0,02^*$	$0,232 \pm 0,02^*$
l – длина волокна, мкм	$0,796 \pm 0,03$	$0,599 \pm 0,03$	$0,828 \pm 0,04^*$	$0,868 \pm 0,04^*$
N_{if} – численная плотность коллагеновых фибрилл, мкм ²	$0,218 \pm 0,01$	$0,156 \pm 0,01^*$	$0,325 \pm 0,01$	$0,225 \pm 0,01^*$
S_{vf} – удельная площадь поверхности коллагеновых волокон, мкм ² /мкм ³	$10,3 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,3^*$	$5,9 \pm 0,3^*$
Z – жесткость	$4,1 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,4$	$8,3 \pm 0,3^*$	$4,6 \pm 0,2^*$
D_p – диаметр пор, мкм	$0,349 \pm 0,02$	$0,241 \pm 0,02$	$0,276 \pm 0,02^*$	$0,323 \pm 0,02^*$
V_{vp} – относительный объем пор, %	$18,1 \pm 1,2$	$11,0 \pm 1,2$	$9,1 \pm 1,2^*$	$19,1 \pm 1,2^*$
S_{vp} – удельная площадь поверхности пор, мкм ² /мкм ³	$5,7 \pm 0,2$	$9,8 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,4^*$	$6,2 \pm 0,2^*$
D – диаметр узлов, мкм	$0,447 \pm 0,01$	$0,346 \pm 0,01$	$0,361 \pm 0,01^*$	$0,398 \pm 0,01^*$
R – связность узлов	$4,7 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2^*$	$4,5 \pm 0,2^*$
N_{ip} – численная плотность узлов, 1/мкм ²	$0,67 \pm 0,1$	$0,42 \pm 0,1$	$0,62 \pm 0,1^*$	$0,13 \pm 0,1^*$
$OI_{\text{стерео}}$ – ориентация коллагеновых фибрилл	0,10	0,33	0,20	0,28

Примечание. * – достоверно для $P < 0,05$ относительно аналогичного показателя в референтной группе.

Note. * – reliable for $P < 0.05$ relative to the same indicator in the reference group.

В объемном скаффолде коллагеновая сеть также структурирована в клубковые образования и внеклубковый каркас, причем соотношения структурных фракций обратные – доминируют клубковые образования, но размеры этих структур меньше, чем в пленчатом скаффолде (см. табл. 1). Структурный механизм образования доминирующей фракции очевиден – увеличение количества клубков сопровождается интенсивной самосборкой и запутыванием фибриллярного коллагена, ростом, формированием перетяжек и разделением сфероидных образований. Об этом свидетельствуют морфологические особенности клубковых образований: повышен показатель чис-

ленной плотности волокон, между клубками имеются комиссуры, образованные коллагеновыми волокнами различной степени плотности упаковки, между некоторыми клубками проходит линия разделения, по которой они расходятся (см. табл. 1, рис. 2, *a*). Капсула клубков плотная, шероховатая, со множественными складками размером 1–5 мкм и сквозными порами (рис. 2, *b*). Межклубковые комиссуры образованы плотной фиброзной тканью, обсыпанной мелкими гранулами кальцийфосфатов, в толще оболочки располагаются мелкие (3–7 мкм) клубки запутанных коллагеновых волокон (рис. 2, *c*). Волокна укорочены и демонстрируют ослабленный кинкинг – значение показателя удельной площади коллагеновых волокон наименьшее среди изученных образцов (см. табл. 1). Уменьшение диаметра и удельного объема пор на фоне существенного индекса ориентации коллагеновых фибрилл способствует росту жесткости несущей фазы клубков, а повышенная удельная площадь поверхности свидетельствует о трансформации в многока-

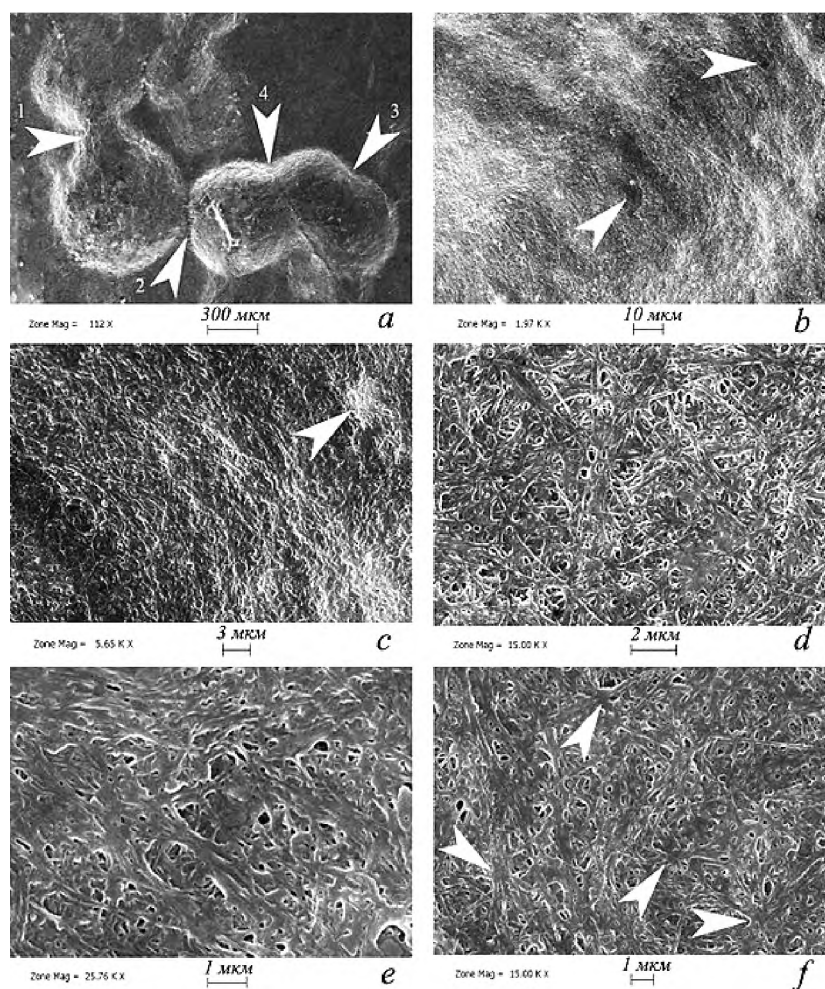


Рис. 2. СЭМ-изображения микроструктуры объемного скаффолда: *a* – клубковые образования, стрелка 1 – перетяжка между клубками, стрелка 2 – рыхлая перемычка между клубками, стрелка 3 – готовящиеся к разделению клубки, стрелка 4 – граница разделения клубков; *b* – складчатая поверхность клубка, стрелки – поры; *c* – микроструктура поверхности клубка, образованная упорядоченно ориентированными, плотно упакованными коллагеновыми волокнами, стрелка – зарождающийся микроклубок; *d* – пористая структура клубкового каркаса; *e* – внеклубковый каркас с набухшими гомогенизированными коллагеновыми волокнами; *f* – внеклубковый каркас с укрупненными фибриллярными узлами пониженной связности

мерные пористые структуры (см. табл. 1, рис. 2, *d*). Повышенные значения связности и численной плотности фибриллярных узлов свидетельствуют о том, что процессы самосборки в клубках более активны в сравнении с внеклубковым каркасом.

Внеклубковый каркас образован сетью утолщенных и удлиненных (относительно клубков) коллагеновых волокон. С учетом уменьшения численной плотности (свидетельство снижения интенсивности самосборки) наиболее вероятным механизмом утолщения коллагеновых волокон является гидратация, набухание и агрегация (рис. 2, *e*). Коллагеновые волокна относительно пленчатого скаффолда значительно удлинены, что приведет к повышенному запутыванию, при этом набухание волокон явно сдерживает, но полностью не подавляет способность к кинкингу – тренды к завышению удельной площади поверхности и индекса ориентации коллагеновых фибрилл во внеклубковом каркасе статистически очевидны (см. табл. 1). Поры укрупнены, относительный объем в два раза больше, чем в клубках, что снижает жесткость несущей фазы (см. табл. 1). Наружная поверхность пор в сравнении с порами в клубках менее развита за счет упрощения формы и преобразования в однокамерные структуры закрытого типа. Диаметр фибриллярных узлов больше (рис. 2, *f*), а связность и численная плотность меньше, чем в клубках, что вызвано трансформациями, обусловленными набуханием коллагеновых волокон на фоне подавления интенсивности самосборки.

Рентгенофазовый анализ. На дифрактограммах образцов пленчатого и объемного скаффолдов наблюдаются паттерны аморфного рассеяния (гало) органической фазы и упругого рассеяния минеральной фазы (рис. 3). Дифрактограммы органической фазы имеют вид полос, расщепленных на доминантные и субдоминантные фракции. Доминантным фракциям (ДФ) характерны ближние сдвиги модальных пиков, а субдоминантным (СДФ) – дальние сдвиги как в пленчатом, так и объемном скаффолде. Соотношения численных значений площадей ДФ / СДФ (в пленчатом скаффолде 0,77 / 0,23, в объемном – 0,66 / 0,34) коррелируют с соотношениями объемных долей структурных фракций в обоих видах коллагеносодержащих материалов (табл. 2).

Ближние/дальние сдвиги модальных пиков и сужение/расширение подполос органических фаз свидетельствуют об разупорядочении/упорядочении и увеличении/уменьшении размеров ячеек квазикристаллической решетки фибриллярного коллагена. Укладка фибриллярного коллагена в доминантных фракциях (внеклубковый каркас пленчатого скаффолда и клубковая фракция объемного скаффолда) находится в более упорядоченном состоянии, чем в субдоминантных (см. табл. 2). Минеральная фаза коллагеновых каркасов на дифрактограммах (рис. 3, см. табл. 2) представлена характеристичными паттернами гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, пирофосфатов кальция $\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ и $\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и трикальцийфосфата $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. В пленчатом скаффолде

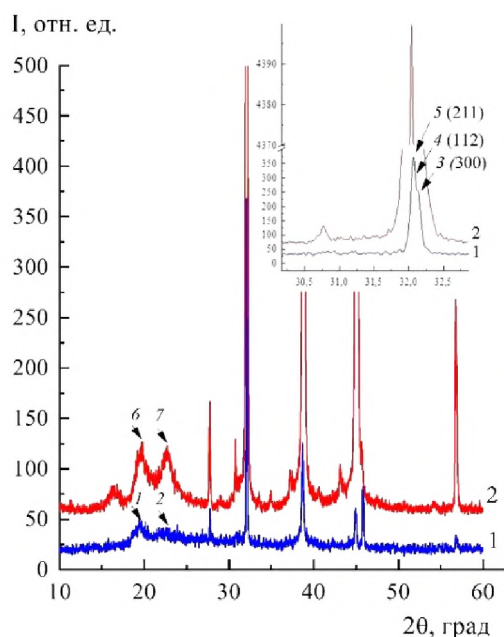


Рис. 3. Дифрактограммы скаффолдов: 1 – пленчатый, стрелки: 1 – доминантная фракция гало, 2 – субдоминантная фракция гало, 3 – пик плоскости (300), 4 – пик плоскости (112), 5 – пик плоскости (211); 2 – объемный, стрелки: 6 – доминантная фракция гало, 7 – субдоминантная фракция гало

Fig. 3. Diffraction patterns of scaffolds: 1 – filmy, arrows: 1 – dominant halo fraction, 2 – subdominant halo fraction, 3 – peak of plane (300), 4 – peak of plane (112), 5 – peak of plane (211); 2 – volumetric, arrows: 6 – dominant halo fraction, 7 – subdominant halo fraction

характеристичные для гидроксиапатита РФА-пики узкие на полувысотах с четко оформленными полосами из пула кристаллических плоскостей (112) и (300) в диапазонах 32,07 и 32,13° 2 θ соответственно (см. рис. 3, стрелки 3, 4). Это признаки гидроксиапатита, агрегированного в укрупненные частицы, кристалличность (CI_{XRD}) которого намного больше, чем в объемном скаффолде (см. табл. 2).

Таблица 2. Параметры дифрактограмм скаффолдов
Table 2. Parameters of X-ray diffraction patterns of scaffolds

Параметры (2 θ)	Пленчатый скаффолд		Объемный скаффолд	
Органическая фаза				
	Доминантная фракция	Субдоминантная фракция	Доминантная фракция	Субдоминантная фракция
Пик рефлекса гало	22,6	19,4	22,7	19,8
β гало – ширина рефлекса гало	2,5	2,4	3,9	3,4
OI_{XRD} – ориентация фибрилл	0,58	0,49	0,42	0,54
Неорганическая фаза				
Пик рефлекса α -Ca ₂ P ₂ O ₇	27,7		27,7	
β рефлекса α -Ca ₂ P ₂ O ₇	0,63		1,6	
Пик рефлекса Ca ₁₅ HP ₂ O ₇ ·2H ₂ O	29,0		28,8	
β рефлекса Ca ₁₅ HP ₂ O ₇ ·2H ₂ O	0,63		1,50	
Пик рефлекса Ca ₃ (PO ₄) ₂	30,8		30,8	
β рефлекса Ca ₃ (PO ₄) ₂	0,7		0,8	
Пик рефлекса Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	32,0		32,0	
β рефлекса Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	0,90		1,10	
CI_{XRD} – кристалличность, %	52,2		37,1	

Гидроксиапатит в полученных коллагеновых скаффолдах в сравнении со зрелыми формами биоапатитов костной ткани окристаллизован предельно слабо. В скаффолдах обоих типов пирофосфаты кальция присутствуют в рентгеноаморфном состоянии, возможно, в форме моноклинных фенотипов, известных тем, что активируют синтез гидроксиапатита [22].

Зондовая ИК-Фурье спектроскопия. Во внеклубковом каркасе пленчатого скаффолда регистрируются высокочастотные сдвиги полос амидов I, II, III (рис. 4). Высокочастотные сдвиги в комплексе амида I свидетельствуют об упрочнении связей, обусловленном уменьшением расхода карбонильных групп трипептидных центров фибриллярного коллагена на образование водородных связей с ОН-группами молекул воды внутренней гидратной оболочки. Высокочастотный сдвиг амида II указывает на сжатие углов деформационных колебаний N–H, что отражает упрочнение пептидных связей во вторичных цепях. Высокочастотный сдвиг амида III показывает упрочнение пептидных водородных связей между первичными цепями, что делает более жесткой конформационную структуру фибриллярного коллагена. Полосы связей растяжения PO₄ (ν^1), изгибных колебаний PO₄ (ν^3) и колебаний CO₃ групповых (ν^3) находятся в диапазонах, близких к стехиометрическому гидроксиапатиту. Полосы связей CO₃ групповых (ν^3) сдвинуты в высокочастотную область, что в сочетании с доминированием площади подполосы карбонатного пика А-типа замещения свидетельствует о стремлении CO₃²⁻ ионов к замещениям ОН-групп. Соотношения ИК-показателей свидетельствуют о структурировании кальцийфосфатов во внеклубковом каркасе преимущественно по направлению стехиометрического гидроксиапатита повышенной кристалличности с интенсивным замещением CO₃²⁻ ионами ОН-групп (табл. 3).

В клубках пленчатого скаффолда регистрируются низкочастотные сдвиги в амидных комплексах, что свидетельствует о гидратации первичных пептидных цепей и разупрочнении конформационной структуры фибриллярного коллагена. Значительное падение индекса InCO₃ / InA I

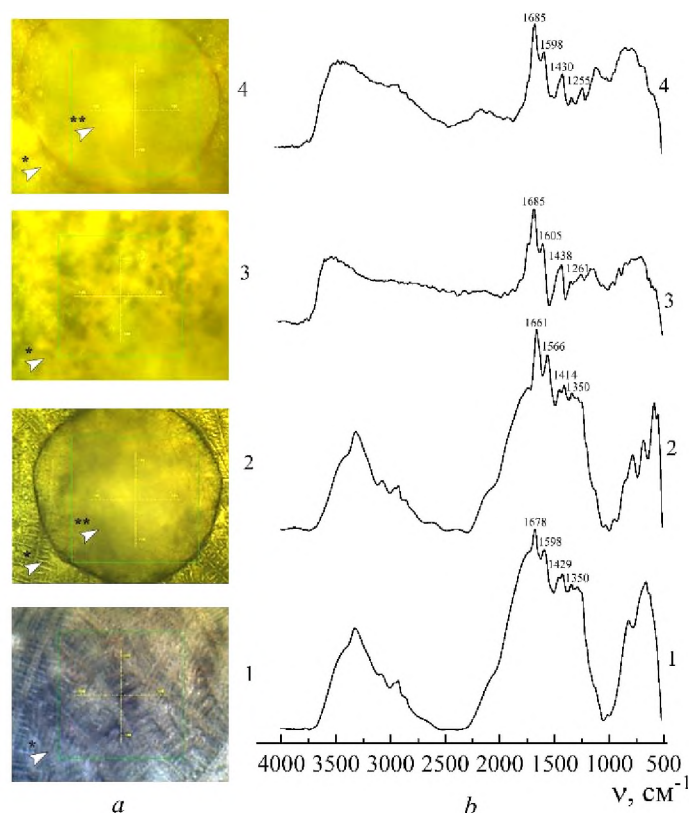


Рис. 4. Зондовая ИК-спектроскопия: изображения точек съемки (a) и ИК-спектры (b) скаффолдов: 1 – каркас* и 2 – клубок** пленчатого скаффолда, 3 – каркас* и 4 – клубок** объемного скаффолда

Fig. 4. Probe IR spectroscopy: images of survey points (a) and IR spectra (b) of scaffolds: 1 – framework* and 2 – globule ** of filmy scaffold, 3 – framework* and 4 – globule ** of volumetric scaffold

(см. табл. 3) может быть обусловлено декарбоксилированием первичных пептидных цепей в связи с повышенным расходом карбоксильных групп на образование водородных связей с ОН-группами молекул интерстициальной воды. Полосы связей растяжения PO_4 (ν^1), изгибных колебаний PO_4 (ν^3) и колебания CO_3 групп варьируют в диапазонах, относимых к карбонат-гидроксиапатиту. Колебания CO_3 групповых (ν^3) представлены широкой полосой, с доминированием по площади низкочастотной подполосы карбонатных замещений по В-типу. Уровень индекса $\text{InCO}_3 / \text{InPO}_4$ (ν^3) – второй по величине во всех фракциях (см. табл. 3) – свидетельствует о высоком содержании карбоната в фосфатных центрах решетки гидроксиапатита [23]. В спектрах клубков (см. рис. 4) присутствуют пики $1\,033\text{ см}^{-1}$, $1\,121\text{ см}^{-1}$, свидетельствующие о нестехиометричности и структурной незрелости гидроксиапатита на ранних стадиях синтеза [24]. Параметры ИК-спектров подтверждают, что в клубках пленчатого скаффолда формируется карбонат-гидроксиапатит с интенсивными замещениями фосфатов (В-тип).

Во внеклубковом каркасе объемного скаффолда полосы амидов I, II и III, сдвинутые в высокочастотную область, свидетельствуют об упрочнении первичных пептидных цепей фибриллярного коллагена. Полосы связей растяжения PO_4 (ν^1), изгибных колебаний PO_4 (ν^3) дислоцированы в диапазоне полос, относимых к карбонат-гидроксиапатиту. Полоса колебаний CO_3 групповых (ν^3) представлена широкой полосой с остроконечной верхушкой, смещенной в низкочастотную область, что говорит о карбонатных замещениях по В-типу. Уровень индекса $\text{InCO}_3 / \text{InPO}_4$ (ν^3) максимален (см. табл. 3), что указывает на интенсивные процессы замещений фосфат-ионов карбонатами в гидроксиапатите. Индексы $\text{InCO}_3 / \text{InA I}$ и $\text{InPO}_4(\nu^3) / \text{InA I}$ повышены (см. табл. 3) в сравнении с таковыми в клубковой фракции, что свидетельствует о карбоксилировании фибриллярного коллагена и фосфатизации гидроксиапатита, ассоциированного с коллагеновыми волокнами. Полоса при $3\,768\text{ см}^{-1}$ (см. рис. 4), относимая к валентным колебаниям гидроксиль-

ных групп $\text{Ca}(\text{OH})_2$, свидетельствует о структурном «известковании» формирующегося гидроксипатита. Установлено, что во внеклубковом каркасе объемного скаффолда кальцийфосфаты структурируются преимущественно по направлению карбонат-гидроксипатита с CO_3 замещениями по В-типу и склонного к структурному «известкованию».

Таблица 3. Пиковые значения волновых чисел (см^{-1}) и соотношения интенсивностей полос ИК-спектров скаффолдов

Table 3. Peak values of wave numbers (cm^{-1}) and the ratio of intensities of bands in the IR spectra of scaffolds

Молекулярные группы	Пленчатый скаффолд		Объемный скаффолд	
	Клубки	Внеклубковый каркас	Клубки	Внеклубковый каркас
Кальцийфосфаты				
PO_4 растяжения (ν^1)	952	1 013	1 025	966
PO_4 изгиба (ν^3)	1 033	1 122	1 120	1 022
CO_3 групповые	1 409	1 429	1 427	1 435
Фибриллярный коллаген I типа				
Амид I	1 664	1 700	1 682	1 688
Амид II	1 565	1 594	1 599	1 606
Амид III	1 342	1 352	1 248	1 258
Индексы относительных интенсивностей характеристичных полос				
$\text{InCO}_3 / \text{InA I}$	0,21	0,46	0,56	0,93
$\text{InCO}_3 / \text{In PO}_4(\nu^3)$	3,16	2,01	3,41	9,71
$\text{InPO}_4(\nu^3) / \text{InA I}$	0,07	0,23	0,02	0,10

В клубках объемного скаффолда полосы амидного комплекса демонстрируют сдвиг в низкочастотную область, что подтверждает тенденцию к разупрочнению и гидратации пептидных цепей и межцепочечных пространств фибриллярного коллагена. Регистрируются падения индексов $\text{InCO}_3 / \text{InA I}$, свидетельствующие о декарбоксилировании коллагена, и $\text{InPO}_4(\nu^3) / \text{InA I}$, указывающие на дефосфатизацию гидроксипатита, ассоциированного с фибриллярным коллагеном (см. табл. 3). Полосы связей растяжения PO_4 (ν^1) и изгибных колебаний PO_4 (ν^3) находятся в диапазонах стехиометрического гидроксипатита, но при этом они более (чем во внеклубковом каркасе пленчатого скаффолда) сдвинуты в высокочастотную область. Тренд к упрочнению и укорочению связей $\text{P}-\text{O}$, относимых к вакансионным дефектам для ионов Ca^{2+} [25], ослабляет связи $\text{Ca}-\text{O}$, способствуя «уходу» кальция. В итоге уменьшается степень кристалличности, подтверждаемая данными РФА, в виде повышенной пиковой интенсивности в паттернах аморфизированных гидроксипатитов, дефицитных по кальцию. Полоса валентных колебаний гидроксильных групп $\text{Ca}(\text{OH})_2$ регистрируется в характеристичном положении, но смещена в низкочастотную область, что обусловлено большей, чем во внеклубковом каркасе, нестабильностью связей $\text{Ca}-\text{O}$ в «известковом» молекулярном комплексе. Выход Ca^{2+} из гидроксипатита создает его локальный избыток в интерстиции, в котором находится каркасный коллаген. Последствием является усиление минерализации фибриллярного коллагена, обусловленное электростатическим связыванием ионами Ca^{2+} отрицательно заряженных соседних карбонильных и карбоксильных групп $\alpha\text{I}(\text{II})$ -цепей коллагена с образованием сшивающих «ионных мостиков» [26]. Об этом свидетельствует снижение интенсивности и низкочастотный сдвиг полосы амида I (см. рис. 4, табл. 3), что согласуется с данными о «красном» сдвиге амидных полос при хелатировании ионами Ca^{2+} карбоксильных сайтов, генерирующих зарождение и развитие гидроксипатита [26]. Имеются и структурные последствия минерализации апатитовой природы в виде деформирующего сжатия доменов и увеличения модуля упругости фибриллярного коллагена, что применительно к коллагеновым волокнам клубковых образований объемного скаффолда, согласуется с данными об укорочении волокон и повышении жесткости каркаса (см. табл. 3). Колебания CO_3 групповых (ν^3) представлены широкой мономорфной полосой, пик которой смещен в низкочастотную область карбонатных замещений В-типа. Полоса растяжения OH -групп

«жидкой» воды состоит из четырех субполос с пиками при 3 523, 3 481, 3 438, 3 400 см⁻¹ (см. рис. 4). Первые две подполосы отнесены к связанной, остальные – к свободной воде; доля связанной воды – 0,81, свободной – 0,19. Соотношения водных долей свидетельствуют о том, что в интерфейсе гидроксиапатит–вода–коллаген клубковых образований объемного скаффолда увеличивается количество кристаллизационной воды, что может быть связано с формированием клатратных структур. Уменьшение доли свободной воды обусловлено интенсивным испарением. На матрицах фибриллярного коллагена в клубковом каркасе при пониженной температуре в среде кристаллизационной воды с уплотненными водородными связями синтезируется гидроксиапатит, склонный к карбонизации и известкованию.

Результаты и их обсуждение. Коллагеновые материалы в ходе синтеза скаффолдов структурируются на две фракции: клубковый и внеклубковый каркасы. В пленчатом скаффолде, полученном при температуре тела млекопитающих, доминирует внеклубковый каркас. В объемном скаффолде, полученном при температуре в 6 раз ниже физиологической, доминируют клубковые образования. Механизм формирования доминантных и субдоминантных фракций не ясен. Основой этих процессов, возможно, являются особенности термостабильности тройных цепей фибриллярного коллагена при повышенной и пониженной температурах. Скорость повторного свертывания (спирализации) фибриллярного коллагена резко увеличивается (в течение нескольких минут) при температуре ниже 10 °С и, наоборот, замедляется, вплоть до полной остановки, при повышении температуры [27]. Это обстоятельство позволяет предположить, что структурирование коллагеновых каркасов происходит при разных локальных температурах: во фракциях с хорошо развитой удельной площадью поверхности пористых структур за счет интенсивного испарения понижается температура и может оказаться ниже, чем в сопряженной фракции. К таким фракциям в пленчатом скаффолде относится внеклубковый каркас, а в объемном – клубковые образования. Повышенную температуру, при которой формируется пленчатый скаффолд, нивелирует пониженная температура его внеклубкового каркаса, а в объемном скаффолде пониженная температура клубковых образований усилит действие общей гипотермии. В результате спирализация и интенсивность сборки фибриллярного коллагена в этих фракциях будет выше, чем в сопряженных. Именно этим объясняется агрессивный рост объема доминирующих фракций.

Морфогенетическими факторами структурных преобразований внеклубкового каркаса в пленчатом скаффолде и клубкового каркаса в объемном скаффолде являются увеличение плотности упаковки фибриллярного коллагена, компрессия и деформация пористых структур экстрафибрилярного матрикса. Увеличению плотности упаковки способствуют истончение коллагеновых волокон, стремящихся укладываться в плотные пласты, при этом волокна не сливаются. Коллагеновые каркасы стремятся к упорядочению: уменьшается площадь поверхностей коллагеновых волокон за счет ослабления кинкинга, пористые структуры экстрафибрилярного матрикса спадаются и уменьшаются удельные объемы. В связи со сжатием экстрафибрилярного матрикса усложняется форма пор, они трансформируются в многокамерные структуры с хорошо развитой площадью поверхности, что создает предпосылки для ускорения испарения. Коллагеновые волокна в пространстве каркасов укладываются в параллельные или почти параллельные слои, что их упрочняет. Отметим, что природные материалы с параллельной укладкой коллагеновых волокон, например стареющая кожа и перикард, отличаются хрупкостью [28]. Увеличение жесткости несущих фаз каркасов поддерживается ростом связности фибриллярных узлов. Структурно-механические риски, возникающие в жестких каркасах, обусловлены интенсивным высыханием коллагеновых волокон, которое приведет к некомпенсированной усадке фибрилл, поэтому укорочение фибрилл – рискованный, деструктивный процесс: на СЭМ обнаруживаются микропереломы коллагеновых волокон с хрупкими, заостренными верхушками.

Морфогенез клубков пленчатого скаффолда и внеклубкового каркаса объемного скаффолда определяет хаотизация: утолщаются коллагеновые волокна, усиливается способность к кинкингу, растут удельные площади поверхностей, расширяются поры, увеличиваются удельные объемы, снижается связность фибриллярных узлов. Каркасы разрыхляются и уменьшается жесткость несущих фаз. Стенки пор разглаживаются, они преобразуются в однокамерные формы. В итоге каркасы разрыхляются, в них формируются водоудерживающие структуры, сдерживающие испарение тканевой жидкости.

Несмотря на внешнюю неоднозначность микро- и мезоструктурных взаимосвязей, в динамике преобразований имеются единые механизмы. При повышенной температуре в условиях интенсивного испарения в связи с обезвоживанием разрушается структура водородных связей между молекулами тропоколлагена, межцепочечные пространства спадаются, первичные цепи сближаются, более плотно упаковываются, что может ограничить внутрифбрилярное скольжение. При пониженной температуре из-за формирования в каркасе клубков водоудерживающих структур и накопления воды в межцепочечных пространствах возрастает плотность водородных связей карбоксильных групп с водородными мостиками интерстициальной воды. Это стабилизирует и упрочнит структуру фбрилярного коллагена, но повысит риски чрезмерного расширения гидратной оболочки вплоть до расслоения и ограничит скольжение молекул тропоколлагена, что уплотнит фбриллы. Структурным последствием уплотнения является уменьшение диаметров и длины коллагеновых фбрилл, что ослабит кинкинг: волокна выравниваются, повышается жесткость при растяжении. На тканевом уровне это сдержит запутывание волокон и упорядочит структуру каркаса. Уменьшение извилистости увеличит скорость диффузии воды, но замедлит минерализацию коллагеновых волокон [29]. Однозначной взаимосвязи формы фбрилярного коллагена со степенью его минерализации, по-видимому, нет – вмешивается фактор тонкой структуры водородных связей молекул воды, длины которых в обеих фракциях пленчатого скаффолда увеличены, с возбуждением обертонов, возникновением дальнего порядка и кластеризацией воды. В связи с этим в упорядоченных, высыхающих каркасах, образованных короткими, относительно прямолинейными коллагеновыми волокнами с расширенной гидратной оболочкой и плотной сетью водородных связей с интерстициальной и подвижной водой, темпы минерализации будут снижаться. Механизмы разупрочнения каркасов можно объяснить обратной динамикой структурно-молекулярных преобразований фбрилярного коллагена.

Интегральным направлением структурирования кальцийфосфатов в коллагенсодержащих материалах обоих видов является гидроксиапатит. Локальные особенности внутримолекулярной динамики фбрилярного коллагена определяют направленность структурирования кальцийфосфатов и нюансируют свойства синтезированных продуктов. Известно, что в водных средах повышенная температура замедляет, а пониженная, наоборот, ускоряет синтез гидроксиапатита [30, 31]. В скаффолдах гидроксиапатиты синтезируются в доминирующих фракциях, на матрицах с упрочненными пептидными связями (во внеклубковом каркасе пленчатого скаффолда) и с ослабленными пептидными связями (в клубковом каркасе объемного скаффолда). Температура синтеза скаффолда оказывает определяющее воздействие на кристалличность гидроксиапатита. При повышенной температуре медленно формируется более кристаллический гидроксиапатит с расширенной решеткой. Повышение CI_{XRD} коррелирует с ИК-признаками растяжения связей полносимметричных колебаний $P-O$ (ν^1), что свидетельствует о метастабильном состоянии апатитовой решетки. В условиях пониженной температуры на матрицах с разупрочненным фбрилярным коллагеном (клубковый каркас пленчатого скаффолда) формируется гидроксиапатит пониженной кристалличности, дефицитный по кальцию, с более сжатой решеткой, при этом связи полносимметричных колебаний $P-O$ (ν^1) укорочены, что придает большую термодинамическую устойчивость. Матрицы фбрилярного коллагена с ослабленными пептидными и карбоксильными связями повышают подвижность CO_3^{2-} анионов, но маршруты перемещений в анионной подрешетке гидроксиапатита регулируются температурой. Если разупрочнение сочетается с действием повышенной температуры, то карбонатные замещения осуществляются преимущественно по А-типу, что наблюдается в клубках пленчатого скаффолда. При тренде в сторону относительного упрочнения фбрилярного коллагена в сочетании с действием пониженной температуры более предпочтительны замещения по В-типу, что регистрируется во внеклубковом каркасе объемного скаффолда. В динамике карбонатных замещений, осуществляемых на матрицах фбрилярного коллагена, маршруты CO_3^{2-} перемещений в решетке гидроксиапатита в большей мере, чем прочность пептидных связей, определяются температурой. При повышенной температуре энергетически предпочтительны CO_3^{2-} замещения OH^- -групп, а при пониженной – преимущественно PO_4^{3-} групп, что свойственно карбонатным замещениям и в водной среде [31, 32].

Заключение. Коллагеновые скаффолды, полученные из соединительнотканых оболочек сухожилий, структурируются на клубковые и внеклубковые фракции. Объемные соотношения фракций определяются температурой синтеза скаффолдов и динамикой транспирирующих структур, регулирующих локальный водообмен – интенсивность испарения тканевой жидкости. К эффективным факторам транспирации отнесены форма пор и способность коллагеновых фибрилл к кинкингу. При повышенной температуре поры трансформируются в закрытые формы и ослабевает кинкинг – доминируют процессы упорядочения и упрочняется внеклубковый каркас в пленчатом скаффолде. При пониженной температуре поры трансформируются в открытые формы и усиливается кинкинг, что хаотизирует каркас и ускоряет рост коллагеновых волокон за счет усиления самосборки и запутывания, что свойственно клубковым образованиям объемного скаффолда. Основным направлением структурирования кальцийфосфатов, мигрирующих в каркас из кристаллизационной среды, является апатитогенез. Микромеханические свойства каркасов определяют векторы экстрафибрилярного структурирования кальцийфосфатов: жесткие матрицы доминирующих фракций индуцируют формирование стехиометрического гидроксиапатита, рыхлые матрицы субдоминантных фракций – карбонат-гидроксиапатитов. В интрафибрилярных пространствах направленность апатитогенеза определяется динамикой структурно-механических свойств пептидных связей, но не столь однозначно – усиливается фактор разнонаправленной чувствительности катионных и анионных подрешеток к действию температуры. На упрочненных матрицах в условиях повышенной температуры во внеклубковом каркасе пленчатого скаффолда синтезируются гидроксиапатиты с прочными связями в катионной подрешетке, а в условиях пониженной температуры во внеклубковом каркасе объемного скаффолда синтезируются карбонат-гидроксиапатиты, склонные к структурному «известкованию». На матрицах фибриллярного коллагена с ослабленными пептидными и С–О-связями формируются как стехиометрический, так и карбонат-гидроксиапатиты. Особенностью гидроксиапатитов является подвижность катионных и анионных подрешеток. Стехиометрический гидроксиапатит с подвижной катионной подрешеткой синтезируется на разупрочненных коллагеновых матрицах при пониженной температуре (в клубковом каркасе объемного скаффолда) и характеризуется как менее кристаллический. Карбонат-гидроксиапатиты с подвижной анионной подрешеткой формируются на разупрочненных коллагеновых матрицах как при повышенной, так и при пониженной температуре синтеза скаффолдов. При сочетании разупрочнения с повышенной температурой в клубковом каркасе пленчатого скаффолда синтезируется карбонат-гидроксиапатит, в котором CO_3^{2-} анионы замещают преимущественно OH^- группы. При сочетании разупрочнения с пониженной температурой во внеклубковом каркасе объемного скаффолда синтезируется карбонат-гидроксиапатит, CO_3^{2-} анионы которого замещают PO_4^{3-} группы. В пределах одного типа скаффолда кальцийфосфаты структурируются *in situ* в гидроксиапатиты, которые могут отличаться структурой, кристаллическостью, составами катионной и анионной подрешеток. Ключевым фактором многообразия гидроксиапатитов является температурное воздействие при синтезе скаффолдов. Полученные результаты углубляют понимание механизмов структурирования кальцийфосфатов на матрицах фибриллярного коллагена при проектировании коллаген-апатитовых каркасов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук, руководителю группы тканевых технологий Института цитологии РАН Ю. А. Нащеккиной за содействие в получении коллагенового геля. Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганхимия» (задание 2.1.04.7).

Acknowledgements. The authors express their gratitude to PhD, Head of the Tissue Technologies Group of the Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Yu. A. Nashchekina for assistance in obtaining collagen gel. The work was supported by the SPSR «Chemical processes, reagents and technologies, bioregulators and bioorganic chemistry» (task 2.1.04.7).

Список использованных источников

1. Sherman, S. *In vitro* and *in vivo* evaluation of carbonate apatite-collagen scaffolds with some cytokines for bone tissue engineering / S. Sherman, D. A. Maretaningtias // Journal of Indian Prosthodontic Society. – 2015. – Vol. 15, № 4. – P. 349–355. <https://doi.org/10.4103/0972-4052.171821>
2. Bone formation ability of carbonate apatite-collagen scaffolds with different carbonate contents / A. Matsuura, T. Kubo, K. Doi [et al.] // Dental Materials Journal. – 2009. – Vol. 28, № 2. – P. 234–242. <https://doi.org/10.4012/dmj.28.234>

3. Marine Collagen/Apatite Composite Scaffolds Envisaging Hard Tissue Applications / G. S. Diogo, E. López-Senra, R. Pirraco [et al.] // *Marine Drugs*. – 2018. – Vol. 16, № 8. – P. 269. <https://doi.org/10.3390/md16080269>
4. Kuttappan, S. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen / gelatin for bone tissue engineering – A mini review / S. Kuttappan, D. Mathew, M. B. Nair // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2016. – Vol. 93 (Pt. B). – P. 1390–1401. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.043>
5. Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin / collagen and bioactive glass fibers for bone tissue engineering / E. Sharifi, M. Azami, A.-M. Kajbafzadeh [et al.] // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – Vol. 59. – P. 533–541. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.037>
6. Toughening and functionalization of bioactive ceramic and glass bone scaffolds by biopolymer coatings and infiltration: a review of the last 5 years / A. Philippart, A. R. Boccaccini, C. Fleck [et al.] // *Expert Review of Medical Devices*. – 2015. – Vol. 12, № 1. – P. 93–111. <https://doi.org/10.1586/17434440.2015.958075>
7. Hu, C. Fabrication of intrafibrillar and extrafibrillar mineralized collagen / apatite scaffolds with a hierarchical structure / C. Hu, M. Zilm, M. Wei // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2016. – Vol. 104, № 5. – P. 1153–1161. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35649>
8. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique / A. A. Al-Munajjed, N. A. Plunkett, J. P. Gleeson [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2009. – Vol. 90, № 2. – P. 584–591. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31320>
9. Niederberger, M. Oriented attachment and mesocrystals: non-classical crystallization mechanisms based on nanoparticle assembly / M. Niederberger, H. Cölfen // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2006. – Vol. 8. – P. 3271–3287. <https://doi.org/10.1039/b604589h>
10. Hierarchical and non-hierarchical mineralisation of collagen / Y. Liu, Y.-K. Kim, L. Dai [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 1291–1300. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.018>
11. Enhanced Intrafibrillar Mineralization of Collagen Fibrils Induced by Brushlike Polymers / L. Yu, I. J. Martin, R. M. Kasi, M. Wei // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2018. – Vol. 10, № 34. – P. 28440–28449. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b10234>
12. Synergistic intrafibrillar / extrafibrillar mineralization of collagen scaffolds based on a biomimetic strategy to promote the regeneration of bone defects / X. Zhang, Y. Wang, N. Manh, H. Wang [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2016. – Vol. 11. – P. 2053–2067. <https://doi.org/10.2147/IJN.S102844>
13. Ma, J. Biomimetic self-assembly of apatite hybrid materials: from a single molecular template to bi-/multi-molecular templates / J. Ma, J. Wang, X. Ai, S. Zhang // *Biotechnology Advances*. – 2014. – Vol. 32, № 4. – P. 744–760. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.014>
14. Assessment of Trabecular Bones Microarchitectures and Crystal Structure of Hydroxyapatite in Bone Osteoporosis with Application of the Rietveld Method / J. M. D. A. Rollo, R. S. Boffa, R. Cesar [et al.] // *Procedia Engineering*. – 2015. – Vol. 110. – P. 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.07.003>
15. Physical and Chemical Characterization of Biomineralized Collagen with Different Microstructures / T. Du, Y. Niu, Y. Liu [et al.] // *Journal of Functional Biomaterials*. – 2022. – Vol. 13, № 2. – P. 57. <https://doi.org/10.3390/jfb13020057>
16. Fabrication and characterization of biomimetic collagen–apatite scaffolds with tunable structures for bone tissue engineering / Z. Xia, X. Yu, X. Jiang [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2013. – Vol. 9, № 7. – P. 7308–7319. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.038>
17. Glaser, J. R. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts / J. R. Glaser, E. M. Glaser // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2000. – Vol. 20, № 1. – P. 115–126. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(00\)00073-9](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(00)00073-9)
18. Пантелеев, В. Г. Компьютерная микроскопия / В. Г. Пантелеев, О. В. Егорова, Е. И. Клыкова. – М.: Техносфера, 2005. – 303 с.
19. Collagen fibril orientation in ovine and bovine leather affects strength: A small angle X-ray scattering (SAXS) study / M. M. Basil-Jones, R. L. Edmonds, S. M. Cooper, R. G. Haverkamp // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2011. – Vol. 59, № 18. – P. 9972–9979. <https://doi.org/10.1021/jf202579b>
20. Sacks, M. S. A small angle light scattering device for planar connective tissue microstructural analysis / M. S. Sacks, D. B. Smith, E. D. Hiester // *Annals of Biomedical Engineering*. – 1997. – Vol. 25, № 4. – P. 678–689. <https://doi.org/10.1007/BF02684845>
21. Person, A. Early Diagenetic Evolution of Bone Phosphate: An X-ray Diffractometry Analysis / A. Person, H. Bocherens, J.-F. Saliège // *Journal of Archaeological Science*. – 1995. – Vol. 22, № 2. – P. 211–221. <https://doi.org/10.1006/jasc.1995.0023>
22. Cheng, P. T. Pyrophosphate, phosphate ion interaction: effects on calcium pyrophosphate and calcium hydroxyapatite crystal formation in aqueous solutions / P. T. Cheng, K. Pritzker // *Journal of Rheumatology*. – 1983. – Vol. 10, № 5. – P. 769–777.
23. Barralet, J. Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: an investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration / J. Barralet, S. Best, W. Bonfield // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1998. – Vol. 41, № 1. – P. 79–86. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199807\)41:1<79::aid-jbm10>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199807)41:1<79::aid-jbm10>3.0.co;2-c)
24. Greish, Y. E. Phase evolution during the formation of stoichiometric hydroxyapatite at 37.4 degrees C / Y. E. Greish, P. W. Brown // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2003. – Vol. 67, № 1. – P. 632–637. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10056>
25. Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite / R. M. Wilson, J. C. Elliott, S. E. P. Dowker, L. M. Rodriguez-Lorenzo // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26, № 11. – P. 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.038>
26. Rhee, S. H. Nucleation of hydroxyapatite crystal through chemical interaction with collagen / S. H. Rhee, J. D. Lee, J. Tanaka // *Journal of the American Ceramic Society*. – 2000. – Vol. 83, № 11. – P. 2890–2892. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2000.tb01656.x>
27. Leikina, E. Type I collagen is thermally unstable at body temperature / E. Leikina, M. V. Merts, N. V. Kuznetsova, S. Leikin // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – Vol. 99, № 3. – P. 1314–1318. <https://doi.org/10.1073/pnas.032307099>
28. Collagen orientation and leather strength for selected mammals / K. H. Sizeland, M. M. Basil-Jones, R. L. Edmonds [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2013. – Vol. 61, № 4. – P. 887–892. <https://doi.org/10.1021/jf3043067>

29. 3D Tortuosity and Diffusion Characterization in the Human Mineralized Collagen Fibril Using a Random Walk Model / F. Bini, A. Pica, A. Marinozzi, F. Marinozzi // *Bioengineering (Basel)*. – 2023. – Vol. 10, № 5. – P. 558 (1–12). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10050558>
30. TenHuisen, K. S. Variations in solution chemistry during calcium-deficient and stoichiometric hydroxyapatite formation from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ / K. S. TenHuisen, P. W. Brown // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1997. – Vol. 36, № 2. – P. 233–241. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199708\)36:2<233::aid-jbm12>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199708)36:2<233::aid-jbm12>3.0.co;2-h)
31. Fulmer, M. T. Effects of temperature on the formation of hydroxyapatite / M. T. Fulmer, P. W. Brown // *Journal of Materials Research*. – 1993. – Vol. 8, № 7. – P. 1687–1696. <https://doi.org/10.1557/JMR.1993.1687>
32. The effect of chemical potential on the thermodynamic stability of carbonate ions in hydroxyapatite / T. Kubota, A. Nakamura, K. Toyoura, K. Matsunaga // *Acta Biomaterialia*. – 2014. – Vol. 10, № 8. – P. 3716–3722. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.007>

References

1. Sherman S., Maretaningtias D. A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of carbonate apatite-collagen scaffolds with some cytokines for bone tissue engineering. *Journal of Indian Prosthodontic Society*, 2015, vol. 15, no. 4, pp. 349–355. <https://doi.org/10.4103/0972-4052.171821>
2. Matsuura A., Kubo T., Doi K., Hayashi K., Morita K., Yokota R., Hayashi H., Hirata I., Okazaki M., Akagawa Y. Bone formation ability of carbonate apatite-collagen scaffolds with different carbonate contents. *Dental Materials Journal*, 2009, vol. 28, no. 2, pp. 234–242. <https://doi.org/10.4012/dmj.28.234>
3. Diogo G. S., Senra E. L., Pirraco R. P., Canadas R. F., Fernandes E. M., Serra J., Pérez-Martín R. I., Sotelo C. G., Marques A. P., González P., Moreira-Silva J., Silva T. H., Reis R. L. Marine Collagen / Apatite Composite Scaffolds Envisaging Hard Tissue Applications. *Marine Drugs*, 2018, vol. 16, no. 8, pp. 269 (1–14). <https://doi.org/10.3390/md16080269>
4. Kuttappan S., Mathew D., Nair M. B. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen / gelatin for bone tissue engineering – a mini review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, vol. 93(Pt B), pp. 1390–1401. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2016.06.043>
5. Sharifi E., Azami M., Kajbafzadeh A. M., Moztafzadeh F., Majidi F., Shamousi A., Karimi R., Ai J. Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin / collagen and bioactive glass fibers for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, vol. 59, pp. 533–541. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.037>
6. Philippart A., Boccacini A. R., Fleck C., Schubert D. W. Toughening and functionalization of bioactive ceramic and glass bone scaffolds by biopolymer coatings and infiltration: a review of the last 5 years. *Expert Review of Medical Devices*, 2015, vol. 12, no. 1, pp. 93–111. <https://doi.org/10.1586/17434440.2015.958075>
7. Hu C., Zilm M., Wei M. Fabrication of intrafibrillar and extrafibrillar mineralized collagen / apatite scaffolds with a hierarchical structure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016, vol. 104, no. 5, pp. 1153–1161. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35649>
8. Al-Munajjed A. A., Plunkett N. A., Gleeson J. P., Weber T., Jungreuthmayer C., Levingstone T., Hammer J., O'Brien F. J. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2009, vol. 90, no. 2, pp. 584–591. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31320>
9. Niederberger M., Cölfen H. Oriented attachment and mesocrystals: non-classical crystallization mechanisms based on nanoparticle assembly. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2006, vol. 8, pp. 3271–3287. <https://doi.org/10.1039/b604589h>
10. Liu Y., Kim Y. K., Dai L., Li N., Khan S. O., Pashley D. H., Tay F. R. Hierarchical and non-hierarchical mineralisation of collagen. *Biomaterials*, 2011, vol. 32, pp. 1291–1300. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.018>
11. Yu L., Martin I. J., Kasi R. M., Wei M. Enhanced Intrafibrillar Mineralization of Collagen Fibrils Induced by Brushlike Polymers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2018, vol. 10, no. 34, pp. 28440–28449. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b10234>
12. Wang Y., Manh N. V., Wang H., Zhong X., Zhang X., Li C. Synergistic intrafibrillar / extrafibrillar mineralization of collagen scaffolds based on a biomimetic strategy to promote the regeneration of bone defects. *International Journal of Nanomedicine*, 2016, vol. 11, pp. 2053–2067. <https://doi.org/10.2147/IJN.S102844>
13. Ma J., Wang J., Ai X., Zhang S. Biomimetic self-assembly of apatite hybrid materials: from a single molecular template to bi-/multi-molecular templates. *Biotechnology Advances*, 2014, vol. 32, no. 4, pp. 744–760. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.014>
14. Rollo J. M. D. A., Boffa R. S., Cesar R., Schwab D. C., Leivas T. P. Assessment of Trabecular Bones Microarchitectures and Crystal Structure of Hydroxyapatite in Bone Osteoporosis with Application of the Rietveld Method. *Procedia Engineering*, 2015, vol. 110, pp. 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.07.003>
15. Du T., Niu Y., Liu Y., Yang H., Qiao A., Niu X. Physical and Chemical Characterization of Biomineralized Collagen with Different Microstructures. *Journal of Functional Biomaterials*, 2022, vol. 13, pp. 57 (1–11). <https://doi.org/10.3390/jfb13020057>
16. Xia Z., Yu X., Jiang X., Brody H. D., Rowe D. W., Wei M. Fabrication and characterization of biomimetic collagen-apatite scaffolds with tunable structures for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 2013, vol. 9, no. 7, pp. 7308–7319. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.038>
17. Glaser J. R., Glaser E. M. Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts. *Journal of chemical neuroanatomy*, 2000, vol. 20, no. 1, pp. 115–126. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(00\)00073-9](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(00)00073-9)
18. Panteleev V. G., Egorova O. V., Klykova E. I. *Computer microscopy*. Moscow, Tekhnosfera Publ., 2005. 303 p. (in Russian).
19. Basil-Jones M. M., Edmonds R. L., Cooper S. M., Haverkamp R. G. Collagen fibril orientation in ovine and bovine leather affects strength: A small angle X-ray scattering (SAXS) study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, vol. 59, no. 18, pp. 9972–9979. <https://doi.org/10.1021/jf202579b>
20. Sacks M. S., Smith D. B., Hiester E. D. A small angle light scattering device for planar connective tissue microstructural analysis. *Annals of Biomedical Engineering*, 1997, vol. 25, no. 4, pp. 678–689. <https://doi.org/10.1007/BF02684845>
21. Person A., Bocherens H., Saliège J.-F. Early diagenetic evolution of bone phosphate: an X-ray diffractometry analysis. *Journal of Archaeological Science*, 1995, vol. 22, no. 2, pp. 211–221. <https://doi.org/10.1006/jasc.1995.0023>

22. Cheng P. T., Pritzker K. P. Pyrophosphate, phosphate ion interaction: effects on calcium pyrophosphate and calcium hydroxyapatite crystal formation in aqueous solutions. *Journal of Rheumatology*, 1983, vol. 10, no. 5, pp. 769–777.
23. Barralet J., Best S., Bonfield W. Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: an investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, vol. 41, no. 1, pp. 79–86. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199807\)41:1<79::aid-jbm10>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199807)41:1<79::aid-jbm10>3.0.co;2-c)
24. Greish Y. E., Brown P. W. Phase evolution during the formation of stoichiometric hydroxyapatite at 37.4 degrees C. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2003, vol. 67, no. 1, pp. 632–637. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10056>
25. Wilson R. M., Elliott J. C., Dowker S. E. P., Rodriguez-Lorenzo L. M. Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite. *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 11, pp. 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.038>
26. Rhee S. H., Lee J. D., Tanaka J. Nucleation of hydroxyapatite crystal through chemical interaction with collagen. *Journal of the American Ceramic Society*, 2000, vol. 83, no. 11, pp. 2890–2892. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2000.tb01656.x>
27. Leikina E., Meritts M. V., Kuznetsova N. V., Leikin S. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no. 3, pp. 1314–1318. <https://doi.org/10.1073/pnas.032307099>
28. Sizeland K. H., Basil-Jones M. M., Edmonds R. L., Cooper S. M., Kirby N., Hawley A., Haverkamp R. G. Collagen orientation and leather strength for selected mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, vol. 61, no. 4, pp. 887–892. <https://doi.org/10.1021/jf3043067>
29. Bini F., Pica A., Marinozzi A., Marinozzi F. 3D Tortuosity and Diffusion Characterization in the Human Mineralized Collagen Fibril Using a Random Walk Model. *Bioengineering (Basel)*, 2023, vol. 10, no. 5, pp. 558 (1–12). <https://doi.org/10.3390/bioengineering10050558>
30. TenHuisen K. S., Brown P. W. Variations in solution chemistry during calcium-deficient and stoichiometric hydroxyapatite formation from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997, vol. 36, no. 2, pp. 233–241. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199708\)36:2<233::aid-jbm12>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199708)36:2<233::aid-jbm12>3.0.co;2-h)
31. Fulmer M. T., Brown P. W. Effects of temperature on the formation of hydroxyapatite. *Journal of Materials Research*, 1993, vol. 8, no. 7, pp. 1687–1696. <https://doi.org/10.1557/JMR.1993.1687>
32. Kubota T., Nakamura A., Toyoura K., Matsunaga K. The effect of chemical potential on the thermodynamic stability of carbonate ions in hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 2014, vol. 10, no. 8, pp. 3716–3722. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.007>

Інфармацыя аб аўтарах

Гайдаш Александр Александрович – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aljack880@gmail.com

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

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

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

Кульчицкий Владимир Адамович – академик, доктор медицинских наук, профессор

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

Кульбицкая Людмила Викторовна – старший научный сотрудник. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lyu1401@yandex.by

Крутько Евгений Николаевич – старший научный сотрудник. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ev_krutsko@igic.bas-net.by

Information about the authors

Gaidash Alexander A. – D. Sc. (Medicine), Professor, Leading Researcher. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aljack880@gmail.com

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

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

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

Kulchitsky Vladimir A. – Academician, D. Sc. (Medicine), Professor

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

Kulbitskaya Lyudmila V. – Senior Researcher. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lyu1401@yandex.by

Krutsko Evgeny N. – Senior Researcher. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1 Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ev_krutsko@igic.bas-net.by