

**ФІЗІЧНА 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. Гайдаш<sup>1</sup>, А. И. Кулак<sup>1</sup>, В. К. Крутько<sup>1</sup>, О. Н. Мусская<sup>1</sup>, В. А. Кульчицкий<sup>2</sup>,  
К. В. Скроцкая<sup>3</sup>, Л. В. Кульбіцкая<sup>1</sup>, Е. Н. Крутько<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Інститут общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь<sup>2</sup>Інститут физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь<sup>3</sup>Научно-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 °C (пленчатый) и 6 °C (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 фибрill. 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. Фибрillлярный коллаген подвергается экстра- и интрафибрillлярной минерализации *in situ* со структурированием кальцийфосфатов по апатитовому направлению. Микромеханические свойства скаффолдов индуцируют экстрафибрillлярный синтез и определяют направление апатитогенеза: на жестких матрицах синтезируется стехиометрический гидроксиапатит, на рыхлых – карбонат-гидроксиапатиты. Интрафибрillлярный синтез в сочетании с температурой определяют степень кристалличности, состав катионных и анионных подрешеток гидроксиапатитов. На матрицах фибрillлярного коллагена с упрочненными связями пептидных и карбонатных групп формируется стехиометрический гидроксиапатит, степень кристалличности которого модерируется 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  $\text{CO}_3^{2-}$  группы замещают преимущественно  $\text{OH}^-$ , при пониженной –  $\text{PO}_4^{3-}$  группы.

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

**Для цитирования.** Влияние температуры, микроструктуры и внутримолекулярной динамики фибрillлярного коллагена на апатитогенез в скаффолдах / А. А. Гайдаш, А. И. Кулак, В. К. Крутько [и др.] // Весці 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>

**A. A. Gaidash<sup>1</sup>, A. I. Kulak<sup>1</sup>, V. K. Krut'ko<sup>1</sup>, O. N. Musskaya<sup>1</sup>, V. A. Kulchitsky<sup>2</sup>,  
K. V. Skrotskaya<sup>3</sup>, L. V. Kulbitskaya<sup>1</sup>, E. N. Krutsko<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus<sup>2</sup>Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus<sup>3</sup>Research 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,  $\text{CO}_3^{2-}$  groups predominantly replace  $\text{OH}^-$ , and at lower temperatures,  $\text{PO}_4^{3-}$  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 Natsyyan'ai 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 скваффолов является одним из ведущих направлений при получении жидких, мягких, твердых биомиметических материалов. Композиты допидают кальцийфосфатами одним из следующих способов: 1) механическое перемешивание фибрillлярного 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) экстрафибрillлярная 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 экстрафибрillлярном пространстве, ограничивает способность имитировать наноразмерную иерархическую структуру в минерализующихся коллагеновых фибриллах); 4) интрафибрillлярная минерализация – не классический, но наиболее близкий к биомиметическому путь кристаллизации [9]. Существенным недостатком этого подхода являются реципрокные отношения экстра/интрафибрillлярного синтеза: один подавляет другой. Кроме того, подход требует применения шаблонов, без которых нарушается неиерархичность внутрифибрillлярной 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 экстрафибрillлярном пространстве нанокомплексы аморфных кальцийфосфатов, например, с полиакриловой кислотой, карбоксиметилхитозаном, которые при содействии триполифосфата натрия направленно проводятся в интрафибрillлярное 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 интрафибрillлярном пространстве [13]. Шаблоны идентифицированы как карбоксильные, карбонильные и аминогруппы молекулы фибрillлярного 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 фибрillлярного 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 фибрillлярного коллагена с синтезом стехиометрического или карбонат-гидроксиапатит-

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 Ca/P определяются микроструктурой кости [14]. Периодическое напряжение сдвига жидкости и повышенная плотность микромезопор в каркасных материалах индуцируют интрафибрillлярную минерализацию коллагена [15], но не ясно, посредством какого типа гидроксиапатита.

В работе использована методология двухэтапного формирования скаффолдов с соблюдением следующих принципов: поддержание самосборки фибрillлярного коллагена на всех технологических этапах, обеспечение миграции химических предшественников гидроксиапатита (кальцийфосфатов) в скаффолды из кристаллизующей среды, минерализация фибрillлярного коллагена. Цель работы – определить взаимосвязь внутримолекулярной динамики фибрillлярного 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 °C в течение 3 сут, объемный скаффолд – охлаждением при 6 °C 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 фибрillлярных 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

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

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 фибрillы 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 5–70° в масштабе 2θ с шагом 0,02°. Анализы выполнены с использованием базы ICDD PDF-2c: карбонат-гидроксиапатит [00-035-0180], стехиометрический гидроксиапатит [01-084-1998]. Ориентацию коллагеновых фибрill оценивали с помощью индекса  $OI_{\text{XRD}}$  с использованием уравнения:

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

где АУ – азимутальный угол (в 2θ) дифракционного пика рентгеноаморфного гало, относимого к коллагеновой фракции каркаса [20]. Кристалличность гидроксиапатита оценивали полуколичественно с помощью индекса  $CI_{\text{XRD}}$ , основанного на измерении интенсивности пиков кристаллических плоскостей стехиометрического гидроксиапатита с плоскостями: (112), (300), (202), (211), расположенными в диапазоне 30–35° 2θ, 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) характеристического 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 600–4 000  $\text{cm}^{-1}$ .

**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) компактизованных коллагеновых волокон, избирательно усеянных кристаллитами кальцийфосфатов, многие из которых огранены (рис. 1, a). Каркас капсулы образует многослойную сеть коллагеновых волокон, которые в пограничных участках упакованы в широкие до 2 мкм ленты шириной до 2 мкм (рис. 1, b). 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, c). 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 застыванию тканевой жидкости и замедлению локальных процессов массообмена и испарения. Увеличение диаметра фибрillлярных узлов, а главное их численная плотность – свидетельство интенсивной самосборки фибрillлярного коллагена в сравнении с внеклубковым каркасом. Уменьшение связности (см. табл. 1) может быть обусловлено максимальным сближением и боковой агрегацией коллагеновых субфибрill – волокна при этом собираются в уширенные короткие

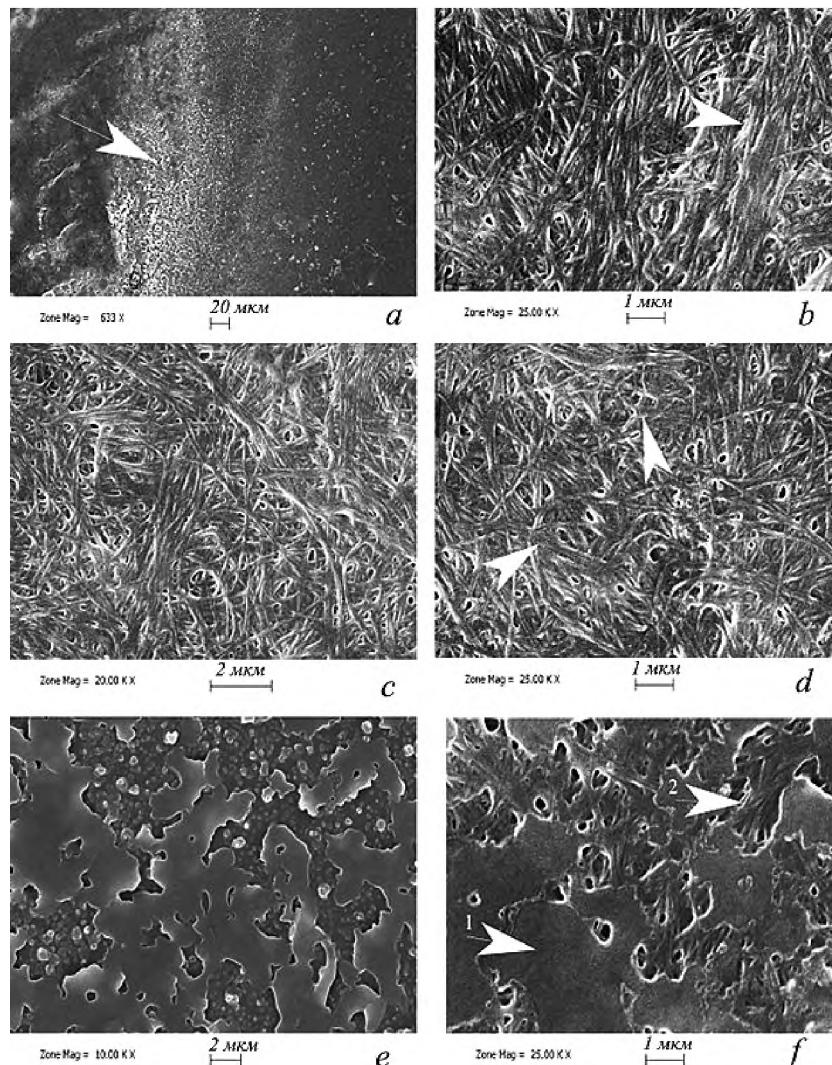


Рис. 1. СЭМ-изображения микроструктуры пленчатого скаффолда: *a* – капсула клубка с кальцийфосфатами; *b* – пограничный участок капсулы клубка с коллагеновыми волокнами, упакованными в ленты; *c* – поры закрытого типа в клубковом каркасе; *d* – пластинчатые структуры в области фибрillлярныхprotoузлов 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 filamentous 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). Фибрillлярные 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 субфибрill свидетельствуют о гомогенизации и уплотнении, очаговой утрате *D*-периодичности (рис. 1, *e*), что характерно для деспирализации. Столь значимая гипертрофия волокон указывает на ослабление процессов самосборки коллагеновых фибрill. 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 скаффолов

Table 1. Morphometric characteristics of scaffolds

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

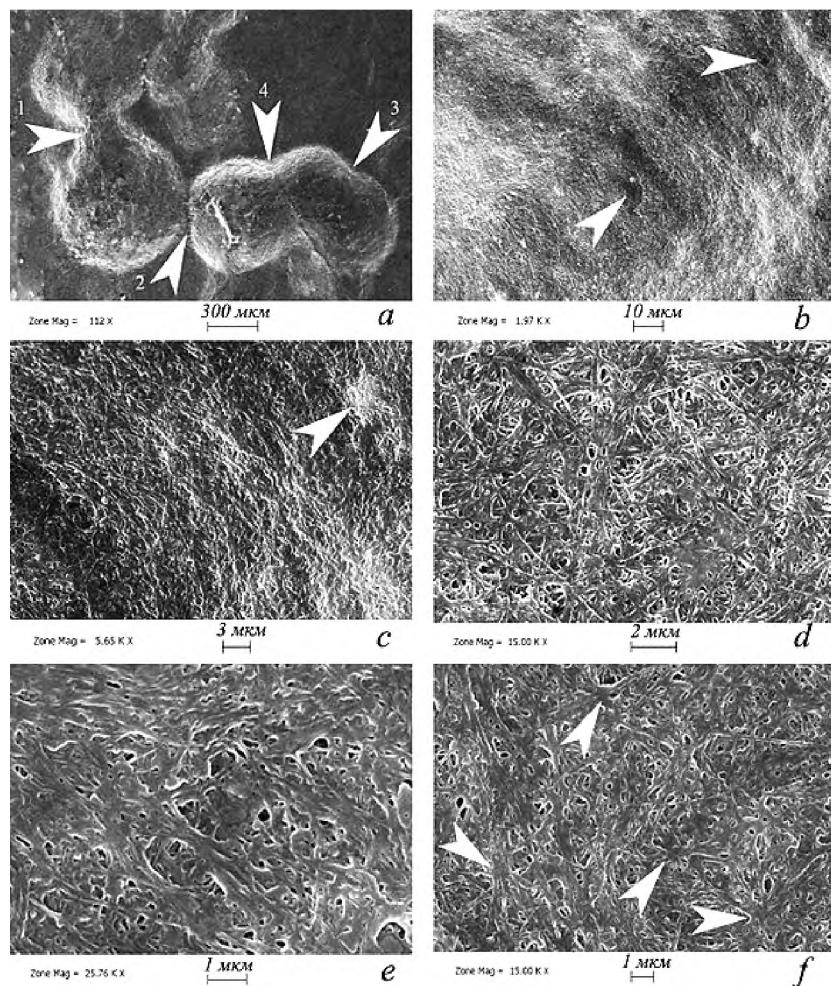


Рис. 2. СЭМ-изображения микроструктуры объемного скаффолда: *a* – клубковые образования, стрелка 1 – перетяжка между клубками, стрелка 2 – рыхлая перемычка между клубками, стрелка 3 – готовящиеся к разделению клубки, стрелка 4 – граница разделения клубков; *b* – складчатая поверхность клубка, стрелки – 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 гомогенизованными коллагеновыми волокнами; *f* – внеклубковый каркас с укрупненными фибрillярными узлами пониженной связности

Fig. 2. SEM images of the microstructure of the volumetric scaffold: *a* – glomerular formations, arrow 1 – constriction between glomeruli, arrow 2 – loose bridge between glomeruli, arrow 3 – glomeruli preparing to separate, arrow 4 – boundary of glomerular separation; *b* – folded surface of the glomerulus, arrows – pores; *c* – microstructure of the glomerulus surface formed by orderly oriented densely packed collagen fibers, arrow – nascent microglomerulus; *d* – porous structure of the glomerular framework; *e* – extraglomerular framework with swollen homogenized collagen fibers; *f* – extraglomerular framework with enlarged fibrillar nodes of reduced connectivity

мерные пористые структуры (см. табл. 1, рис. 2, *d*). Повышенные значения связности и численной плотности фибрillлярных 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 фибрillл 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 фибрillлярных 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 близкие 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 коллагенсодержащих материалов (табл. 2).

Близкие/ дальние сдвиги модальных пиков и сужение/расширение подполос органических фаз свидетельствуют об разупорядочении/упорядочении и увеличении/уменьшении размеров ячеек квазикристаллической решетки фибрillлярного коллагена. Укладка фибрillлярного 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  $\text{Ca}_{1,5}\text{HP}_2\text{O}_7\cdot2\text{H}_2\text{O}$  и трикальцийфосфата  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . В пленчатом скаффолде

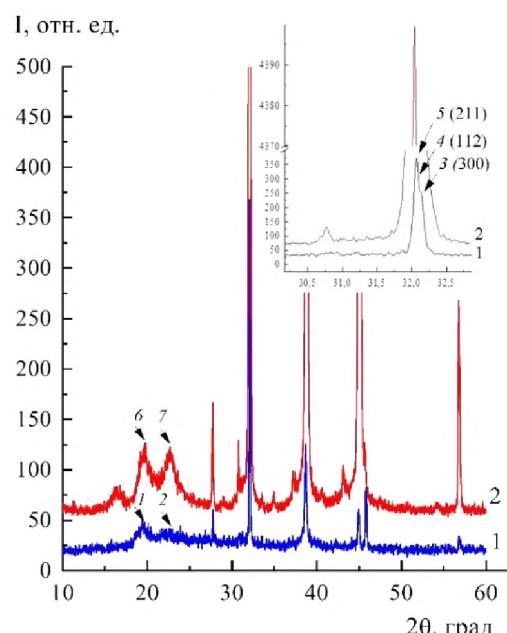


Рис. 3. Дифрактограммы скаффолдов: 1 – пленчатый, стрелки: 1 – доминантная фракция гало, 2 – субдоминантная фракция гало, 3 – пик плоскости (300), 4 – пик плоскости (112), 5 – пик плоскости (211); 2 – объемный, стрелки: 6 – доминантная фракция гало, 7 – субдоминантная фракция гало

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° 2θ соответственно (см. рис. 3, стрелки 3, 4). Это признаки гидроксиапатита, агрегированного в укрупненные частицы, кристалличность ( $CI_{XRD}$ ) которого намного больше, чем в объемном скафволде (см. табл. 2).

Таблица 2. Параметры дифрактограмм скафволдов

Table 2. Parameters of X-ray diffraction patterns of scaffolds

Параметры (2θ)	Пленчатый скафволд		Объемный скафволд	
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 фибрill	0,58	0,49	0,42	0,54
Неорганическая фаза				
Пик рефлекса $\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$		27,7		27,7
β рефлекса $\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$		0,63		1,6
Пик рефлекса $\text{Ca}_{1,5}\text{HP}_2\text{O}_7\text{-}2\text{H}_2\text{O}$		29,0		28,8
β рефлекса $\text{Ca}_{1,5}\text{HP}_2\text{O}_7\text{-}2\text{H}_2\text{O}$		0,63		1,50
Пик рефлекса $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		30,8		30,8
β рефлекса $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		0,7		0,8
Пик рефлекса $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$		32,0		32,0
β рефлекса $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$		0,90		1,10
$CI_{XRD}$ – кристалличность, %		52,2		37,1

Гидроксиапатит в полученных коллагеновых скафволдах в сравнении со зрелыми формами биоапатитов костной ткани окристаллизован предельно слабо. В скафволдах 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 скафволда 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 фибрillярного коллагена на образование водородных связей с OH-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 фибрillярного коллагена. Полосы связей растяжения  $\text{PO}_4$  ( $v^1$ ), изгибных колебаний  $\text{PO}_4$  ( $v^3$ ) и колебаний  $\text{CO}_3$  групповых ( $v^3$ ) находятся в диапазонах, близких к стехиометрическому гидроксиапатиту. Полосы связей  $\text{CO}_3$  групповых ( $v^3$ ) сдвинуты в высокочастотную область, что в сочетании с доминированием площади подполосы карбонатного пика А-типа замещения свидетельствует о стремлении  $\text{CO}_3^{2-}$  ионов к замещениям OH-групп. Соотношения ИК-показателей свидетельствуют о структурировании кальцийфосфатов во внеклубковом каркасе преимущественно по направлению стехиометрического гидроксиапатита повышенной кристалличности с интенсивным замещением  $\text{CO}_3^{2-}$  ионами OH-групп (табл. 3).

В клубках пленчатого скафволда регистрируются низкочастотные сдвиги в амидных комплексах, что свидетельствует о гидратации первичных пептидных цепей и разупрочнении конформационной структуры фибрillярного коллагена. Значительное падение индекса  $\text{InCO}_3 / \text{InA}$  I

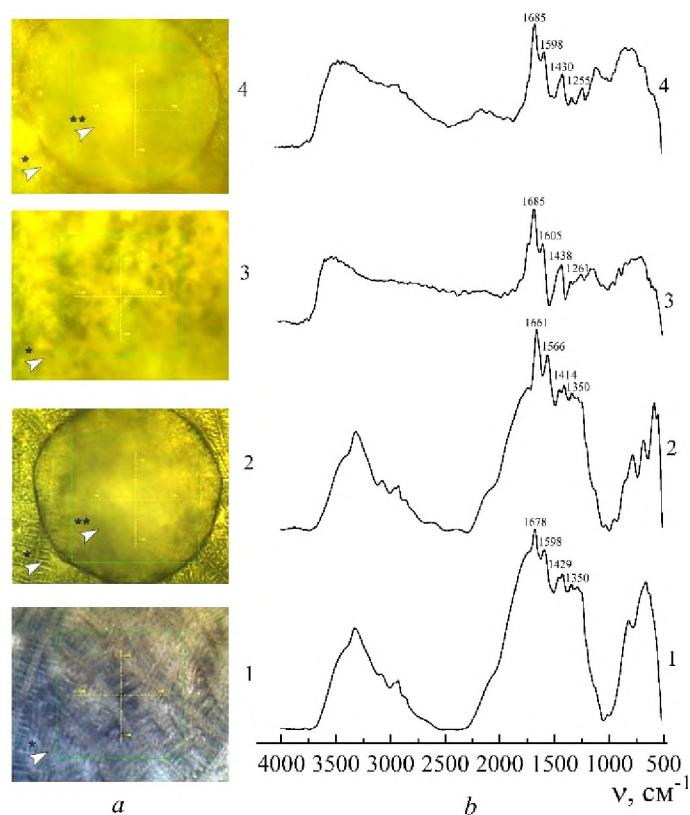


Рис. 4. Зондовая ИК-спектроскопия: изображения точек съемки (а) и ИК-спектры (б) скаффолов: 1 – каркас\* и 2 – клубок\*\* пленчатого скаффолда, 3 – каркас\* и 4 – клубок\*\* объемного скаффолда

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 OH-группами молекул интерстициальной воды. Полосы связей растяжения  $\text{PO}_4$  ( $\nu^1$ ), изгибных колебаний  $\text{PO}_4$  ( $\nu^3$ ) и колебания  $\text{CO}_3$  групп варьируют в диапазонах, относимых к карбонат-гидроксиапатиту. Колебания  $\text{CO}_3$  групповых ( $\nu^3$ ) представлены широкой полосой, с доминированием по площади низкочастотной подполосы карбонатных замещений по В-типу. Уровень индекса  $\text{InCO}_3 / \text{InPO}_4$  ( $\nu^3$ ) – 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  $1\ 033\ \text{cm}^{-1}$ ,  $1\ 121\ \text{cm}^{-1}$ , 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 фибрillлярного коллагена. Полосы связей растяжения  $\text{PO}_4$  ( $\nu^1$ ), изгибных колебаний  $\text{PO}_4$  ( $\nu^3$ ) дислоцированы в диапазоне полос, относимых к карбонат-гидроксиапатиту. Полоса колебаний  $\text{CO}_3$  групповых ( $\nu^3$ ) представлена широкой полосой с остроконечной верхушкой, смещенной в низкочастотную область, что говорит о карбонатных замещениях по В-типу. Уровень индекса  $\text{InCO}_3 / \text{InPO}_4$  ( $\nu^3$ ) максимальен (см. табл. 3), что указывает на интенсивные процессы замещений фосфат-ионов карбонатами в гидроксиапатите. Индексы  $\text{InCO}_3 / \text{InA I}$  и  $\text{InPO}_4(\nu^3) / \text{InA I}$  повышенны (см. табл. 3) в сравнении с таковыми в клубковой фракции, что свидетельствует о карбоксилировании фибрillлярного коллагена и фосфатизации гидроксиапатита, ассоциированного с коллагеновыми волокнами. Полоса при  $3\ 768\ \text{cm}^{-1}$  (см. рис. 4), относимая к валентным колебаниям гидроксиль-

ных групп  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , свидетельствует о структурном «известковании» формирующегося гидроксиапатита. Установлено, что во внеклубковом каркасе объемного скаффолда кальцийфосфаты структурируются преимущественно по направлению карбонат-гидроксиапатита с  $\text{CO}_3$  замещениями по В-типу и склонного к структурному «известкованию».

Т а б л и ц а 3. Пиковые значения волновых чисел ( $\text{cm}^{-1}$ ) и соотношения интенсивностей полос ИК-спектров скаффолов

Table 3. Peak values of wave numbers ( $\text{cm}^{-1}$ ) 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				
$\text{PO}_4$ растяжения ( $\nu^1$ )	952	1 013	1 025	966
$\text{PO}_4$ изгиба ( $\nu^3$ )	1 033	1 122	1 120	1 022
$\text{CO}_3$ 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 характеристических 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 гидроксиапатита, ассоциированного с фибриллярным коллагеном (см. табл. 3). Полосы связей растяжения  $\text{PO}_4$  ( $\nu^1$ ) и изгибных колебаний  $\text{PO}_4$  ( $\nu^3$ ) находятся в диапазонах стехиометрического гидроксиапатита, но при этом они более (чем во внеклубковом каркасе пленчатого скаффолда) сдвинуты в высокочастотную область. Тренд к упрочнению и укорочению связей Р–О, относимых к вакансиям дефектам для ионов  $\text{Ca}^{2+}$  [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 гидроксиапатитов, дефицитных по кальцию. Полоса валентных колебаний гидроксильных групп  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  регистрируется в характеристическом положении, но смещена в низкочастотную область, что обусловлено большей, чем во внеклубковом каркасе, нестабильностью связей  $\text{Ca}–\text{O}$  в «известковом» молекулярном комплексе. Выход  $\text{Ca}^{2+}$  из гидроксиапатита создает его локальный избыток в интерстиции, в котором находится каркасный коллаген. Последствием является усиление минерализации фибриллярного коллагена, обусловленное электростатическим связыванием ионами  $\text{Ca}^{2+}$  отрицательно заряженных соседних карбонильных и карбоксильных групп  $\alpha\text{l}(\text{II})$ -цепей коллагена с образованием сшивящих «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  $\text{Ca}^{2+}$  карбоксильных сайтов, генерирующих зарождение и развитие гидроксиапатита [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  $\text{CO}_3$  групповых ( $\nu^3$ ) представлены широкой мономорфной полосой, пик которой смещен в низкочастотную область карбонатных замещений В-типа. Полоса растяжения ОН-групп

«жидкой» воды состоит из четырех субполос с пиками при 3 523, 3 481, 3 438, 3 400  $\text{см}^{-1}$  (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 кратратных 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  $^{\circ}\text{C}$  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 экстрафибриллярного матрикса. Увеличению плотности упаковки способствуют истончение коллагеновых волокон, стремящихся укладываться в плотные пласти, при этом волокна не сливаются. Коллагеновые каркасы стремятся к упорядочению: уменьшается площадь поверхностей коллагеновых волокон за счет ослабления кинкинга, пористые структуры экстрафибриллярного матрикса спадаются и уменьшаются удельные объемы. В связи со сжатием экстрафибриллярного 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 – рисковый, 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 внутрифибриллярное 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 упрочняет структуру фибриллярного коллагена, но повышает риски чрезмерного расширения гидратной оболочки вплоть до расслоения и ограничит скольжение молекул тропоколлагена, что уплотняет фибриллы. Структурным последствием уплотнения является уменьшение диаметров и длины коллагеновых фибрилл, что ослабляет кинкинг: волокна выравниваются, повышается жесткость при растяжении. На тканевом уровне это сдерживает запутывание волокон и упорядочивает структуру каркаса. Уменьшение извилистости увеличивает скорость диффузии воды, но замедляет минерализацию коллагеновых волокон [29]. Однозначной взаимосвязи формы фибриллярного коллагена со степенью его минерализации, по-видимому, нет – вмешивается фактор тонкой структуры водородных связей молекул воды, длины которых в обеих фракциях пленчатого скафполда 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 фибриллярного коллагена.

Интегральным направлением структурирования кальцийфосфатов в коллагенсодержащих материалах обоих видов является гидроксиапатит. Локальные особенности внутримолекулярной динамики фибриллярного 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 скафполдах гидроксиапатиты синтезируются в доминирующих фракциях, на матрицах с упрочненными пептидными связями (во внеклубковом каркасе пленчатого скафполда) и с ослабленными пептидными связями (в клубковом каркасе объемного скафполда). Температура синтеза скафполда оказывает определяющее воздействие на кристалличность гидроксиапатита. При повышенной температуре медленно формируется более кристаллический гидроксиапатит с расширенной решеткой. Повышение  $CJ_{XRD}$  коррелирует с ИК-признаками растяжения связей полносимметричных колебаний Р–О ( $v^1$ ), что свидетельствует о метастабильном состоянии апатитовой решетки. В условиях пониженной температуры на матрицах с разупрочненным фибриллярным коллагеном (клубковый каркас пленчатого скафполда) формируется гидроксиапатит пониженной кристалличности, дефицитный по кальцию, с более сжатой решеткой, при этом связи полносимметричных колебаний Р–О ( $v^1$ ) укорочены, что придает большую термодинамическую устойчивость. Матрицы фибриллярного 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 скафполда. При тренде в сторону относительного упрочнения фибриллярного коллагена в сочетании с действием пониженной температуры более предпочтительны замещения по В-типу, что регистрируется во внеклубковом каркасе объемного скафполда. В динамике карбонатных замещений, осуществляемых на матрицах фибриллярного 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 скаффолов и динамикой транспирирующих структур, регулирующих локальный водообмен – интенсивность испарения тканевой жидкости. К эффективным факторам транспирации отнесены форма пор и способность коллагеновых фибрill 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 экстрафибрillярного структурирования кальцийфосфатов: жесткие матрицы доминирующих фракций индуцируют формирование стехиометрического гидроксиапатита, рыхлые матрицы субдоминантных фракций – карбонат-гидроксиапатитов. В интрафибрillярных 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 фибрillярного 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 скаффолов. При сочетании разупрочнения с повышенной температурой в клубковом каркасе пленчатого скаффолда синтезируется карбонат-гидроксиапатит, в котором  $\text{CO}_3^{2-}$  анионы замещают преимущественно  $\text{OH}$  –группы. При сочетании разупрочнения с пониженной температурой во внеклубковом каркасе объемного скаффолда синтезируется карбонат-гидроксиапатит,  $\text{CO}_3^{2-}$  анионы которого замещают  $\text{PO}_4^{3-}$  группы. В пределах одного типа скаффолда кальцийфосфаты структурируются *in situ* в гидроксиапатиты, которые могут отличаться структурой, кристалличностью, составами катионной и анионной подрешеток. Ключевым фактором многообразия гидроксиапатитов является температурное воздействие при синтезе скаффолов. Полученные результаты углубляют понимание механизмов структурирования кальцийфосфатов на матрицах фибрillярного коллагена при проектировании коллаген-апатитовых каркасов.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность кандидату биологических наук, руководителю группы тканевых технологий Института цитологии РАН Ю. А. Нашекиной за содействие в получении коллагенового геля. Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» (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. Mertts, 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> 29C

29. 3D Tortuosity and Diffusion Characterization in the Human Mineralized Collagen Fibril Using a Random Walk Model / F. Bini, A. Pica, A. Marrazzi, F. Marrazzi // *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., Maretanigntas 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. Matsura 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.ijbiomac.2016.06.043>
5. Sharifi E., Azami M., Kajbafzadeh A. M., Moztarzadeh 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., Boccaccini 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., Mertts 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 29C](https://doi.org/10.1021/jf3043067)
29. Bini F., Pica A., Maranozzi A., Maranozzi 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>

## Інформація об авторах

*Гайдаш* **Александр Александрович** – доктор медичніських наук, професор, ведучий науковий сотрудник. Інститут общей и неорганической химии НАН Беларусь (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республіка Беларусь). E-mail: aljack880@gmail.com

*Кулак* **Анатолій Йосифович** – академік, доктор хіміческих наук, професор, директор. Інститут общей и неорганической химии НАН Беларусь (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республіка Беларусь). E-mail: kulak@igic.bas-net.by

*Крутько* **Валентина Константиновна** – кандидат хіміческих наук, доцент, заведуючий лабораторією. Інститут общей и неорганической химии НАН Беларусь НАН Беларусь (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республіка Беларусь). E-mail: tsuber@igic.bas-net.by

*Мусская* **Ольга Николаевна** – кандидат хіміческих наук, доцент, ведучий науковий сотрудник. Інститут общей и неорганической химии НАН Беларусь НАН Беларусь (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республіка Беларусь). E-mail: musskaja@igic.bas-net.by

*Кульчицкий* **Владимир Адамович** – академік, доктор медичніських наук, професор

*Скроцкая* **Катарина Владимировна** – інженер. Науково-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республіка Беларусь). E-mail: Katarinaskr@gmail.com

*Кульбіцкая* **Людмила Вікторовна** – старший науковий сотрудник. Інститут общей и неорганической химии НАН Беларусь (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республіка Беларусь). E-mail: lyu1401@yandex.by

*Крутько* **Евгеній Ніколаевич** – старший науковий сотрудник. Інститут общей и неорганической химии НАН Беларусь НАН Беларусь (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республіка 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

*Kruti'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