

© Коллектив авторов, 2015

ОЦЕНКА КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ СОСТАВА АЛЬГИНАТ — ФОСФАТЫ КАЛЬЦИЯ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИЯХ ПРОТОТИПИРОВАНИЯ ПРИ ЗАМЕЩЕНИИ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ IN VITRO

Н.С. Сергеева, В.С. Комлев, И.К. Свиридова, В.А. Кирсанова, С.А. Ахмедова,
Е.А. Кувшинова, А.Ю. Федотов, А.Ю. Тетерина, С.М. Барinov

ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. П.А. Герцена» Минздрава России,
ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова» РАН, Москва, РФ

На модели двух адгезионных клеточных линий — immortalized human fibroblasts человека (ФЧ, штамм 1608 hTERT) и остеосаркомы человека (MG-63) in vitro в динамике культивирования (до 21 сут) с помощью МТТ-теста изучены цитосовместимость и матриксные (для клеток) свойства образцов гранулированных пористых композиционных биоматериалов состава альгинат натрия — фосфаты кальция и их составляющих, синтезированных и охарактеризованных в ИМЕТ РАН: 1 % альгината натрия; композита альгинат натрия/желатин (80/20); кальцийфосфатной керамики (КГА, ТКФ и ОКФ) и композиционных материалов составов альгинат/КГА, альгинат/ТКФ, альгинат/ОКФ, альгинат/желатин/ТКФ и альгинат/ТКФ/КГА/ОКФ. ОКФ оказался цитотоксичным, а композиты, в состав которых он входил, обладали слабыми матриксными свойствами. Для дальнейших исследований по разработке технологий прототипирования отобраны 3 образца композиционных материалов составов альгинат/КГА, альгинат/ТКФ, альгинат/желатин/ТКФ, характеризующиеся цитосовместимостью и наличием выраженных или умеренных матриксных для клеток свойств поверхности.

Ключевые слова: материалы для остеопластики, композиционные материалы состава альгинат — фосфаты кальция, исследования in vitro, цитосовместимость, матриксные свойства.

In Vitro Evaluation of the Composite Alginate — Calcium Phosphate Materials for Prototyping Technologies in Bone Defects Substitution

N.S. Sergeeva, V.S. Komlev, I.K. Sviridova, V.A. Kirsanova, S.A. Akhmedova,
E.A. Kuvshinova, A.Yu. Fedotov, A.Yu. Teterina, S.M. Barinov

P.A. Gertsen Moscow Research Oncology Institute; Pirogov Russian National Research Medical University; A. A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Moscow, Russia.

Porous granular composite biomaterials based on sodium alginate and calcium phosphate component: 1% sodium alginate; sodium alginate with gelatin (80/20); calcium phosphate ceramics (CHA, TCP and OCP) and composite materials alginate/CHA, alginate/TCP, alginate/OCP, alginate/gelatin (80/20)/TCP and alginate/TCP/CHA/OCP were investigated for cytotoxicity and matrix (for cells) properties in dynamics of cultivation (up to 21 days). Two adhesive cell lines — immortalized human fibroblasts (HF, strain 1608 hTERT) and human osteosarcoma (MG-63) were used for in vitro MTT assay. OCP material showed its cytotoxicity while all its composites possessed weak matrix properties. For further research on the development of prototyping technologies 3 samples of composite materials were selected: alginate/CHA, alginate/TCP and alginate/gelatin (80/20)/TCP that are characterized by cytocompatibility and the presence of either expressed or moderate matrix properties of the surface for cells.

Key words: osteoplastic materials, alginate — calcium phosphates composite materials, in vitro studies, cytocompatibility, matrix properties.

Восстановление костной ткани в области дефектов является актуальной медицинской и социальной проблемой, что обусловлено, с одной стороны, распространенностью патологических состояний костной ткани, возникающих, в частности, в результате травм, опухолевого поражения, дегенеративных возрастных изменений, пороков разви-

тия, а с другой — старением населения в целом [1]. Трудовая и социальная реабилитация этих категорий больных возможна лишь при достижении структурной и функциональной целостности костной ткани, что требует использования при хирургических вмешательствах адекватных остеопластических материалов.

Спектр разрабатываемых остеопластических материалов с каждым днем расширяется: натуральные материалы (скелет кораллов, коллаген, желатин, хитозан) [2–4] и синтетические полимеры (полиэфир, полилактиды, полигликолиды и их сополимеры) [5], кальцийфосфатная керамика [6] и биостекла [7, 8]. Сравнительно новым подходом является создание композиционных материалов, в частности на основе фосфатов кальция и биополимеров.

Исторически первым для заполнения дефектов костной ткани был предложен синтетический гидроксипатит (ГА ; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), мало растворимый в физиологических условиях и, вследствие этого, наименее используемый сегодня в клинике. Среди других фосфатов кальция наибольшее внимание привлекает керамика на основе трикальцевого фосфата (ТКФ), карбонатсодержащего ГА (КГА) и октакальцевого фосфата (ОКФ). Такой выбор обусловлен следующими причинами. Трикальцийфосфатная керамика обладает относительно высокой растворимостью в жидкостях организма и способствует процессу биоминерализации формирующейся костной ткани. Физиологически важным являются также анион- и катионные замещения (в частности, карбонат группами) в структуре фосфатов кальция с формированием КГА, поскольку минеральная основа костной ткани содержит 4–8 масс. % CO_3^{2-} . Карбонатные группы создают решеточные искажения в структуре апатита, что обеспечивает, в частности, большую скорость биодеградации [9]. И, наконец, установлено, что образование стабильной фазы — биологического апатита — происходит через стадию образования промежуточной неустойчивой фазы — ОКФ [10], который вследствие этого может рассматриваться как перспективный остеопластический материал.

С другой стороны, высокий потенциал применения в медицине имеют биополимеры. В частности, материалы на основе альгината — полисахарида, который обладает широким спектром полезных для человека свойств и может выполнять функцию эластичного каркаса [11].

В создании трехмерных композиционных конструкций на основе полимеров и фосфатов кальция особые надежды возлагают на методы быстрого прототипирования (или аддитивного производства) [12]. Трехмерная модель требуемого фрагмента ткани пациента может быть получена, например, на рентгеновском компьютерном томографе с высоким разрешением и затем оперативно изготовлена ее точная копия-конструкция из остеопластических материалов заданного состава, пригодная для имплантации. В процессе изготовления остеопластического изделия его можно дополнить определенными деталями, а также запрограммировать создание требуемой внутренней архитектоники. Среди наиболее разработанных на сегодняшний день методов быстрого прототипиро-

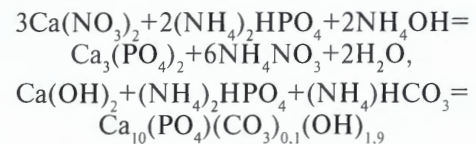
вания и технологий аддитивного производства, позволяющих использовать в качестве исходных материалов различные фосфаты кальция и полимеры, следует в первую очередь выделить трехмерную (3D) печать [12].

Целью настоящей работы было изучить *in vitro* цитосовместимость и матриксные для клеток свойства фосфатов кальция, альгината и композитов на их основе, предназначенных для использования в технологии 3D-печати.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве исходных компонентов для создания композиционных материалов методами быстрого прототипирования были взяты альгинат натрия и фосфаты кальция: ТКФ, КГА и ОКФ. Биологический желатин использовали для стабилизации композиционного геля.

Синтез порошка ТКФ и КГА осуществляли из водных растворов солей и методом механохимической активации согласно реакциям:



Керамический гранулят из синтезированных веществ получали по технологии несмешивающихся жидкостей [13] с последующей термической обработкой.

Для изготовления керамики на основе ОКФ использовали гранулы ТКФ. На первом этапе гранулы ТКФ переводили в дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД) в растворах солей ортофосфорной кислоты (40°C, pH 4,1–5,5, 7 сут). Затем проводили гидролиз ДКФД с образованием ОКФ в растворе ацетата натрия (37°C, pH ≥ 6,5, 7 сут) [14].

Далее керамические гранулы фосфатов кальция вводили в раствор полисахарида при непрерывном перемешивании. Раствор подогревали до 40°C на водяной бане, а затем присыпали в него керамические гранулы. Растворы с гранулами фосфатов кальция перемешивали для получения равномерных взвесей и фиксировали 1% раствором хлорида кальция. Затем в течение 12 ч проводили сублимационную сушку образцов при вакууме в рабочей камере ($6 \cdot 10^{-5}$ атм., температура конденсирующей поверхности -50°C).

Морфологию поверхности и микроструктуру образцов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью микроскопа Tescan VEGA II (Чехия).

Для исследований *in vitro* была синтезирована партия, насчитывающая 10 гранулированных образцов: образец 1 % альгината натрия; композит альгината натрия с желатином (80/20); 3 образца кальцийфосфатной керамики (КГА, ТКФ и ОКФ) и 5 образцов композиционных материалов (альгинат натрия — кальцийфосфатная керамика; табл. 1).

Табл. 1. Физико-химическая характеристика материалов, синтезированных для оценки цитосовместимости *in vitro*

Материал	Тип	pH
Альгинат 1%	Полимер	6,2–6,3
Альгинат/желатин (80/20)	Полимер	6,6
ОКФ	Керамика	7,2
КГА	Керамика	7,4
ТКФ	Керамика	7,3
Альгинат/ОКФ 7,5 масс.%	Композиционный материал	7,1
Альгинат/КГА 7,5 масс.%	Композиционный материал	7,1
Альгинат/ТКФ 7,5 масс.%	Композиционный материал	7,2
Альгинат/желатин/ТКФ 7,5 масс.%	Композиционный материал	7,3
Альгинат/ТКФ/КГА/ОКФ (3/3/1,5 масс.%)	Композиционный материал	7,2–7,3

Примечание. pH полной ростовой среды с гранулами материала (1:10 по объему). Размеры гранул всех исследованных материалов составляли 500–750 мкм.

В соответствии с разработанным ранее алгоритмом исследования новых биоматериалов, предназначенных для реконструкции костных дефектов, на первом этапе провели оценку их цитосовместимости *in vitro* (с целью исключения токсичных образцов материалов), а также изучение матричных (для клеток) свойств при длительном (до 3 нед) совместном культивировании и отбор наиболее перспективных образцов.

Эксперименты *in vitro* выполнены на модели двух адгезионных клеточных линий: иммортализованных фибробластов человека (ФЧ), штамм 1608 hTERT, любезно предоставленный проф. Е.Е. Егоровым (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва) и остеосаркомы человека линии MG-63 (Институт цитологии РАН, Российская коллекция клеточных культур, Санкт-Петербург).

Перед началом экспериментов стерильные (γ -облучение 15 кГр) образцы раскладывали в 96-луночные планшеты для культивирования («Costar», США): на каждый срок инкубации — 1 планшет (каждая проба — в триплетах) и заливали полной ростовой средой (ПРС): среда ДМЕМ (Пан-Эко, Москва), 10% эмбриональная телячья сыворотка (РАА, Австрия), глютамин (0,65 мг/мл), гентамицин (50 мкг/мл). После установления нейтральных значений pH (1–3 сут экспозиции образцов в ПРС со сменой среды) в платы с исследуемыми образцами (опыт) и без них (контроль — культуральный пластик полистирен) вносили клеточную суспензию (культуру ФЧ в плотности 20 тыс. клеток на лунку или MG-63 — 15 тыс. клеток на лунку) в объеме 200 мкл ПРС и инкубировали в течение 1–21 сут с регулярной заменой ПРС. Все операции осуществляли в стерильных условиях в атмосфере влажного воздуха, содержащего 5% CO₂, при 37°C.

Жизнеспособность клеточных линий ФЧ и MG-63 в динамике оценивали с помощью МТТ-теста, который основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиа-золил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый (МТТ, «Sigma», США) в формазан. Количество образовавшегося формазана характеризует пролиферативную активность (жизнеспособность/количество) различных клеток человека и животных [15].

На каждом сроке эксперимента рассчитывали величину пула жизнеспособных клеток (ПЖК) по отношению к контролю. Материал считали нетоксичным в отношении клеточной линии при значениях ПЖК через 24 ч культивирования $\geq 60\%$. Материал считали цитосовместимым при отсутствии цитотоксичности и наличии матричных свойств поверхности (способности опытного образца материала длительно, не менее трех недель, поддерживать клеточную экспансию по крайней мере на уровне контрольных значений). На этапах экспериментов осуществляли визуальный контроль за процессами экспансии клетками поверхности биоматериалов и фотоархивирование.

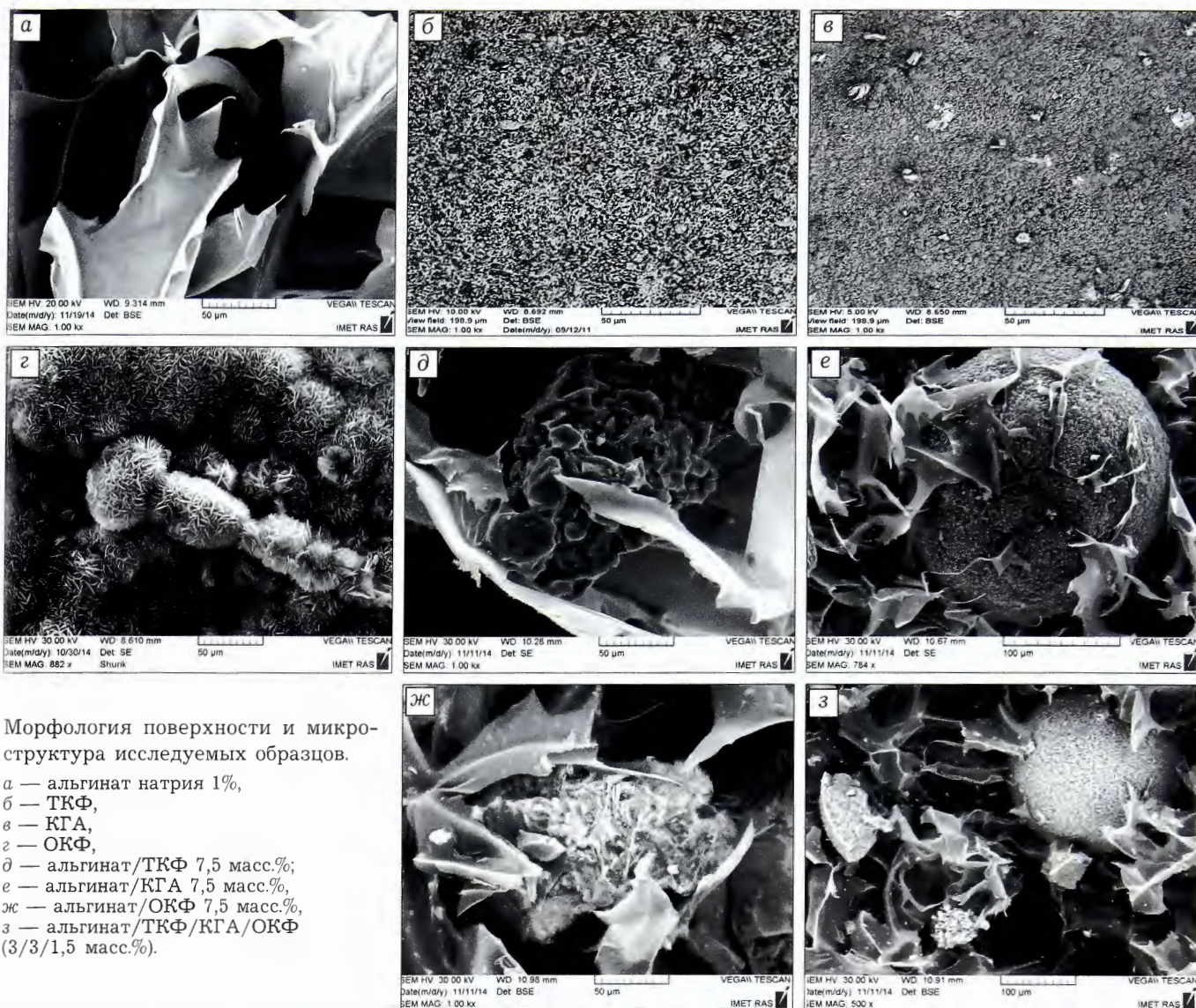
Обработку полученных результатов проводили стандартными методами вариационной статистики с использованием пакета программ Microsoft Excel 2000. Достоверность различий оценивали с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента; статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рентгенофазовый анализ показал, что изготовленные образцы соответствуют заданным составам. Морфология поверхности и микроструктура исследуемых образцов представлены на рисунке.

На модели линии ФЧ показано, что в контроле (при культивировании фибробластов на полистирене) происходит нарастание величины оптической плотности раствора формазана до 14 сут наблюдения с формированием плотного монослоя и далее — снижение величины данного показателя в последнюю неделю культивирования, что связано с торможением роста культуры вследствие дефицита поверхности для клеточной экспансии (табл. 2).

При изучении роста культуры ФЧ на гранулированных образцах альгината натрия 1% и композитном образце альгината с желатином установлено, что, несмотря на то, что величина оптической плотности раствора формазана в этих опытных группах практически на всех сроках наблюдения была достоверно ниже, чем в контроле, популяция фибробластов на них, начиная с 3-х суток культивирования, неуклонно возрастала и достигала значений, близких к контрольным на 21-е сутки (см. табл. 2). Таким образом, образцы альгината 1% и его композита с желатином нетоксичны в отношении культуры ФЧ и обладают удовлетворительными для клеток матричными свойствами.



поверхности (способностью поддерживать длительную пролиферацию клеток), т.е. являются цитосовместимыми.

Оценка цитосовместимости пяти образцов композиционных материалов в системе альгинат — фосфаты кальция в сопоставлении с их составляющими показала, что наименее удачными из этих материалов оказались композиты с ОКФ, вероятно, в силу собственной цитотоксичности последнего: величина ПЖК для ОКФ составляла 39,3% через 1 сут, 14,6 % — через 2 нед и 27,8% — через 3 нед культивирования. Несмотря на то что композит альгината с ОКФ не проявлял токсичности в отношении культуры фибробластов на первых сроках наблюдения, он продемонстрировал неудовлетворительные матричные свойства: популяция ФЧ на данном образце крайне медленно нарастала до 10 сут культивирования с последующим выходом на плато (см. табл. 2). Близкие результаты были получены и для образца альгинат/ТКФ/ КГА/ ОКФ (см. табл. 2).

При анализе поведения ФЧ на образцах ТКФ, композиционных материалах состава альгинат/

ТКФ и альгинат/желатин/ТКФ выявлено отсутствие токсичности и наличие выраженных матричных свойств поверхности. Так, начиная с 3-х суток культивирования и до конца эксперимента, величина оптической плотности раствора формазана в образцах ТКФ статистически значимо превышала контрольные значения (см. табл. 2). Указанные выше композиционные материалы также были нетоксичны, при этом на композите альгинат/желатин/ТКФ ФЧ пролиферировали достоверно активнее, чем на образце состава альгинат/ТКФ (см. табл. 2).

Положительные результаты были получены и для КГА и его композита с альгинатом. Как видно из табл. 2, КГА нетоксичен для клеток, а нарастающая оптическая плотность раствора формазана в динамике эксперимента свидетельствует о наличии умеренных матричных (для культуры ФЧ) свойств его поверхности. В то же время фибробласты более эффективно колонизировали поверхность композита альгинат/КГА по сравнению с его составляющими. Так, после посева ФЧ на данный композит значения опти-

Табл. 2. Величины оптической плотности раствора формазана (МТТ-тест) и пула жизнеспособных ФЧ (ПЖК) в динамике культивирования

Образец	Срок эксперимента, сутки						
	1-е	3-и	7-е	10-е	14-е	17-е	21-е
Полистирен (контроль)	0,211±0,008	0,334±0,022	0,630±0,008	0,759±0,030	1,098±0,014	1,006±0,015	0,906±0,000
Альгинат 1%	0,140±0,003* 66,4	0,199±0,006* 59,6	0,448±0,006* 71,1	0,583±0,030* 76,8	0,715±0,007* 65,1	0,897±0,043* 89,2	0,910±0,034 100,4
Альгинат/желатин (80/20)	0,143±0,005* 67,7	0,179±0,001* 53,6	0,449±0,008* 71,3	0,523±0,031* 68,9	0,854±0,022* 77,8	0,672±0,015* 66,8	0,822±0,036 90,7
ОКФ	0,083±0,003* 39,3	0,033±0,002* 9,9	0,053±0,009* 8,4	0,048±0,006* 6,3	0,160±0,003* 14,6	0,122±0,036* 12,1	0,252±0,013* 27,8
КГА	0,133±0,000* 63,0	0,287±0,016 85,9	0,518±0,014* 80,2	0,638±0,031 84,1	0,798±0,049* 72,7	0,801±0,014* 79,6	—
ТКФ	0,173±0,006* 82,0	0,415±0,005* 124,3	0,898±0,018* 142,5	0,990±0,007* 130,4	1,245±0,029* 113,4	1,192±0,026* 118,5	1,402±0,007* 154,7
Альгинат/ОКФ	0,144±0,001* 68,2	0,231±0,007* 69,2	0,422±0,015* 67,0	0,503±0,011* 66,3	0,478±0,032* 43,5	0,437±0,005* 43,4	0,520±0,014* 57,4
Альгинат/КГА	0,185±0,008 87,7	0,363±0,009 108,7	0,792±0,015* 125,7	1,117±0,014* 147,2	1,227±0,031* 111,7	1,286±0,166 127,8	1,292±0,049* 142,6
Альгинат/ТКФ	0,161±0,002* 76,3	0,254±0,003* 76,0	0,534±0,017* 84,8	0,670±0,017 88,3	0,835±0,008* 76,0	0,814±0,023* 80,9	0,804±0,003* 88,7
Альгинат/желатин/ТКФ	0,175±0,004* 82,9	0,289±0,009 86,5	0,654±0,011 103,8	0,665±0,004 87,6	0,866±0,018* 78,9	0,734±0,034* 73,0	0,962±0,033 106,2
Альгинат/ТКФ/КГА/ОКФ	0,151±0,002* 71,5	0,220±0,003* 65,9	0,488±0,003* 77,5	0,598±0,050 78,8	0,613±0,008* 55,8	0,627±0,026* 62,3	0,576±0,016* 63,6

Примечание. Здесь и в табл. 4: в числителе — оптическая плотность (в усл. ед.), в знаменателе — ПЖК (в % относительно контроля). * — статистически значимая разница с контролем ($p < 0,05$).

ческой плотности раствора формазана стабильно нарастали в течение всего периода наблюдения, а величина ПЖК, начиная с третьих суток культивирования, превышала контрольные значения (см. табл. 2).

Далее для трех образцов композиционных материалов и их составляющих были рассчитаны величины прироста пула ФЧ в динамике культивирования. Показано, что к исходу 2-й недели

Табл. 3. Величины прироста популяции клеток ФЧ (в % относительно первых суток) на этапах культивирования

Образец	Этап культивирования, сутки			
	3-и	7-е	10-е	14-е
Полистирен (контроль)	58,3	198,5	259,7	420,4
Альгинат 1%	42,1	165,1	245,0	323,1
Альгинат/желатин (80/20)	25,2	214,0	265,7	497,2
КГА	115,8	289,5	379,7	500
ТКФ	139,9	419,1	472,3	620,0
Альгинат/КГА	96,2	328,1	503,6	563,2
Альгинат/ТКФ	57,8	231,6	316,1	418,6
Альгинат/желатин/ТКФ	65,1	273,7	280,0	394,9

культивирования минимальным данный показатель был для альгината натрия, составив 323,1%, максимальным — для ТКФ: прирост популяции фибробластов в указанные сроки составил 620% (табл. 3).

Второй тест-моделью для исследования цитосовместимости композиционных материалов состава полисахарид — фосфаты кальция явилась линия остеосаркомы человека MG-63. Следует отметить, что в контроле (полистирен) эта клеточная популяция более активно, чем ФЧ нарастала в течение 3 нед, о чем свидетельствовали показатели оптической плотности раствора формазана на этапах эксперимента (табл. 4).

Анализ результатов культивирования MG-63 на образце альгината натрия 1% позволил расценить его как цитосовместимый, несмотря на то, что через сутки к его поверхности прикрепились лишь 59% клеток. Однако далее оптическая плотность раствора формазана активно нарастала, что являлось подтверждением существенного увеличения численности пула клеток. Этот показатель, а также ПЖК на разных сроках культивирования свидетельствовали о наличии умеренных матричных свойств поверхности данного образца материала в отношении линии MG-63 (см. табл. 4).

Табл. 4. Величины оптической плотности раствора формазана (МТТ-тест) и пула жизнеспособных клеток (ПЖК) линии остеосаркомы человека MG-63 в динамике культивирования

Образец	Срок эксперимента, сутки						
	1-е	3-и	7-е	10-е	14-е	17-е	21-е
Полистирен (контроль)	0,395±0,015	0,510±0,010	0,995±0,026	1,345±0,021	1,629±0,010	1,843±0,049	2,675±0,037
Альгинат 1%	0,233±0,000* 59,0	0,364±0,016* 71,4	0,889±0,057 89,3	1,007±0,010* 74,9	1,015±0,022* 62,3	1,159±0,000* 62,9	1,606±0,000* 60,0
Альгинат/желатин (80/20)	0,196±0,005* 49,6	0,349±0,002* 68,4	1,098±0,047 110,4	1,105±0,047* 82,2	1,264±0,031* 77,6	1,198±0,063* 65,0	1,694±0,000* 63,3
ОКФ	0,267±0,009* 67,6	0,226±0,014* 44,3	0,273±0,039* 27,4	0,160±0,025* 11,9	0,126±0,017* 7,7	0,378±0,000* 20,5	—
КГА	0,317±0,012* 80,3	0,514±0,008 100,8	1,294±0,062* 130,0	1,691±0,013* 125,7	1,811±0,023* 111,2	2,241±0,046* 121,6	3,084±0,130* 115,3
ТКФ	0,395±0,008 100,0	0,761±0,009* 149,2	1,773±0,068* 178,2	1,965±0,033* 146,1	2,260±0,095* 138,7	2,653±0,168* 144,0	2,868±0,167 107,2
Альгинат/ОКФ	0,232±0,004* 58,7	0,326±0,007* 63,9	0,600±0,043* 60,3	0,798±0,026* 59,3	1,037±0,016* 78,0	1,093±0,007* 59,3	1,626±0,068* 60,8
Альгинат/КГА	0,304±0,008* 77,0	0,581±0,016* 113,9	1,562±0,059* 157,0	1,805±0,056* 134,2	1,818±0,049* 111,6	1,858±0,060 100,8	2,725±0,110 101,9
Альгинат/ТКФ	0,232±0,011* 58,7	0,356±0,012* 69,8	0,765±0,045* 76,9	0,944±0,016* 70,2	1,248±0,019* 76,6	1,349±0,079* 73,2	1,918±0,120* 71,7
Альгинат/желатин/ТКФ	0,262±0,003* 66,3	0,426±0,003* 83,5	0,861±0,018* 86,5	1,021±0,030* 75,9	1,339±0,057* 82,2	1,630±0,077 88,4	2,320±0,037* 86,7
Альгинат/ТКФ/КГА/ОКФ	0,218±0,004* 55,2	0,365±0,006* 71,6	0,747±0,033* 75,1	0,863±0,054* 64,2	0,835±0,034* 51,3	1,161±0,083* 63,0	1,454±0,142* 54,4

При исследовании поведения культуры MG-63 на гранулах ОКФ обнаружено, что при сравнительно высоких показателях оптической плотности раствора формазана (0,267 усл. ед. против 0,395 усл. ед. в контроле) и удовлетворительной величине ПЖК через 24 ч культивирования далее этот материал проявил токсичность, так как с увеличением срока инкубации, несмотря на периодическую смену ПРС, ПЖК неуклонно снижался. В композите с альгинатом натрия токсичность для линии MG-63 ОКФ не проявлял, демонстрируя умеренные матриксные свойства, равно как и образец альгинат/ТКФ/КГА/ОКФ, матриксные свойства которого также, вероятно, определялись составляющей на основе полисахарида (см. табл. 4).

Выраженные матриксные свойства поверхности в отношении культуры MG-63 продемонстрировали КГА и композит состава альгинат/КГА. Так, на гранулах КГА через 24 ч культивирования оказалось 80,4% пула высевных клеток, а далее популяция MG-63 прогрессивно нарастала, о чем свидетельствовало увеличение оптической плотности раствора формазана и ПЖК на этапах наблюдения. На композите состава альгинат/КГА активная экспансия поверхности происходила с 3-х суток и до завершения культивирования (см. табл. 4). Полученные для линии MG-63 данные подтверждают цитосовместимость и удовлетвори-

тельные матриксные свойства как композита в целом, так и его составляющих.

Популяция MG-63 активно прикреплялась к гранулам ТКФ и пролиферировала: через сутки после посева на поверхности данного матрикса был выявлен практически весь пул клеток, а к 17-м суткам популяция клеток значительно превышала контрольные значения (см. табл. 4).

Композиционный материал состава альгинат/ТКФ, несмотря на невысокие значения ПЖК в 1-е сутки эксперимента, далее проявил себя как цитосовместимый с удовлетворительными матриксными свойствами, которые обеспечивались, вероятно, в значительной мере наличием ТКФ в его составе. Так, оптическая плотность раствора формазана для этого образца увеличивалась на протяжении всего периода культивирования, а величина ПЖК на всех этапах оставалась стабильно высокой (см. табл. 4).

При культивировании клеток MG-63 на гранулах образца состава альгинат/желатин после посева к поверхности прикрепилось лишь 49,6% клеточного пула, однако потом они начали активно пролиферировать, в результате чего величина оптической плотности раствора формазана и ПЖК на 7-е сутки эксперимента даже несколько превысила контрольные значения. Далее скорость пролиферации несколько снизилась. На образце со-

става альгинат/желатин/ТКФ популяция MG-63 прогрессивно нарастала в течение всего периода наблюдения со сравнительно высокими значениями ПЖК (см. табл. 4). Полученные результаты позволили сделать заключение о цитосовместимости и наличии удовлетворительных свойств поверхности композиционного материала состава альгинат/желатин/ТКФ и альгинат/ТКФ.

Динамика прироста пула клеток MG-63 оказалась сходной с таковой для ФЧ: пул клеток MG-63, прикрепившихся к поверхности разных материалов, был разным (см. табл. 4), однако далее шла активная пролиферация клеток, причем скорость прироста популяции во всех опытных группах превосходила контроль (табл. 5).

Таким образом, на основании анализа полученных данных по оценке токсичности, наличия матриксных (для клеток) свойств поверхности и расчета величины прироста популяции двух клеточных линий для дальнейшей работы отобраны альгинат 1%, композит альгинат/желатин (80/20), КГА, ТКФ и композиты альгинат/КГА, альгинат/ТКФ и альгинат/желатин/ТКФ как нетоксичные, с удовлетворительными матриксными свойствами поверхности.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства образования и науки РФ
(Соглашение № 14.604.21.0132).*

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Rodriguez Garcia M., Naves Diaz M., Cannata Andia J.B. Bone metabolism, vascular calcifications and mortality: Associations beyond mere coincidence. *J. Nephrol.* 2005; 18 (4): 458–63.
2. Fu K., Xu Q., Czernuszka J., Triffitt J.T., Xia Z. Characterization of a biodegradable coralline hydroxyapatite/calcium carbonate composite and its clinical implementation. *Biomed. Mater.* 2013; 8 (6): 065007.
3. Venkatesan J., Kim Se-K. Marine Biomaterials. In: Kim Se.-K. ed. Springer Handbook of Marine Biotechnology. Heidelberg–Berlin: Springer; 2015: 3–19.
4. Gelinsky M. Mineralised collagen as biomaterial and matrix for bone tissue engineering. In: Meyer U., Meyer Th., Handschel J., Wiesmann H.-P., eds. Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine. Heidelberg–Berlin: Springer; 2009: 485–93.
5. Serino G., Rao W., Iezzi G., Piattelli A. Polylactide and polyglycolide sponge used in human extraction sockets: bone formation following 3 months after its application. *Clin. Oral. Implants Res.* 2008; 19 (1): 26–31.
6. Samavedi S., Whittington A.R., Goldstein A.S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomater.* 2013; 9 (9): 8037–45.

Сведения об авторах: Сергеева Н.С. — доктор биол. наук, проф., рук. отделения прогноза эффективности консервативного лечения ФМИЦ им. П.А. Герцена, проф. каф. биологии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова; Комлев В.С. — доктор техн. наук, вед. науч. сотр. лаборатории керамических и композиционных материалов ИМЕТ РАН; Свиридова И.К. — канд. биол. наук, старший науч. сотр. отделения прогноза эффективности консервативного лечения ФМИЦ им. П.А. Герцена; Кирсанова В.А., Ахмедова С.А. — кандидаты биол. наук, науч. сотр. отделения прогноза эффективности консервативного лечения ФМИЦ им. П.А. Герцена; Кувшинова Е.А. — мл. науч. сотр. отделения прогноза эффективности консервативного лечения ФМИЦ им. П.А. Герцена; Федотов А.Ю. — канд. техн. наук, старший науч. сотр. лаборатории керамических и композиционных материалов ИМЕТ РАН, Тетерина А.Ю. — аспирант лаборатории керамических и композиционных материалов ИМЕТ РАН; Баринов С.М. — доктор техн. наук, проф., член-корр. РАН, зам. директора по науке ИМЕТ РАН.

Для контактов: Сергеева Наталья Сергеевна. 125284, Москва, 2-й Боткинский пр., 3, ФМИЦ им. П.А. Герцена, отделение прогноза эффективности консервативного лечения. Тел. +7 (495) 945-74-15. E-mail: prognos.06@mail.ru.

Табл. 5. Величины прироста популяции клеток остеосаркомы человека MG-63 (в % относительно первых суток) на этапах культивирования

Образец	Этап культивирования, сутки			
	3-и	7-е	10-е	14-е
Полистирен (контроль)	29,1	151,9	240,5	312,4
Альгинат 1%	56,2	281,5	322,2	325,6
Альгинат/желатин (80/20)	78,1	460,2	463,8	544,9
КГА	62,1	308,2	433,4	471,3
ТКФ	92,7	348,9	397,5	472,2
Альгинат/ОКФ	40,5	158,6	244,0	347,0
Альгинат/КГА	91,1	413,8	493,7	498,0
Альгинат/ТКФ	53,4	229,1	306,9	437,9
Альгинат/желатин/ТКФ	62,6	228,6	289,7	411,1

7. Hench L.L. Bioceramics: From concept to clinic. *J. Am. Ceram.* 1991; 74: 1487–1510.
8. Саркисов П.Д., Михайленко Н.Ю., Хавала В.М. Биологическая активность материалов на основе стекла и систаллов. *Стекло и керамика.* 1993; 9: 10 [Sarkisov P.D., Mikhailenko N.Yu., Khalava V.M. Biological activity of materials based on glass and sitalls. *Steklo i keramika.* 1993; 9: 10 (in Russian)].
9. Sariibrahimoglu K., Leeuwenburgh S.C., Wolke J.G., Yubao L., Jansen J.A. Effect of calcium carbonate on hardening, physicochemical properties, and in vitro degradation of injectable calcium phosphate cements. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2012; 3: 712–9.
10. Suzuki O. Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials. *Japanese Dental Science Review.* 2013; 49: 58–71.
11. Sun J., Tan H.. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials.* 2013; 6: 1285–1309.
12. Kundu J., Pati F., Shim J.-H., Cho D.-W. Rapid prototyping technology for bone regeneration. Principles and Applications. Sawston, Cambridge: Woodhead Publ.; 2014: 254–84.
13. Komlev V.S., Barinov S.M., Koplik E.V. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. *Biomaterials.* 2002; 23: 3449–54.
14. Komlev V.S., Barinov S.M., Bozo I.I., Deev R.V., Eremin I.I., Fedotov A.Y. et al. Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behaviour. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2014; 6 (19): 16610–20.
15. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65: 55–63.