

## БИОСОВМЕСТИМОСТЬ И ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИНЕРАЛ-ПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ, ЖЕЛАТИНА И ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ТРЕХМЕРНОЙ ПЕЧАТИ КОСТНОЗАМЕЩАЮЩИХ КОНСТРУКЦИЙ

П.А. Каралкин<sup>1</sup>, Н.С. Сергеева<sup>1</sup>, В.С. Комлев<sup>2</sup>, И.К. Свиридова<sup>1</sup>, В.А. Кирсанова<sup>1</sup>, С.А. Ахмедова<sup>1</sup>, Я.Д. Шанский<sup>1</sup>, Е.А. Кувшинова<sup>1</sup>, М.М. Филюшин<sup>1</sup>, А.Ю. Федотов<sup>2</sup>, А.Ю. Тетерина<sup>2</sup>, Ю.В. Зобков<sup>2</sup>, С.М. Баринов<sup>2</sup>, А.Д. Каприн<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

### Biocompatibility and osteoplastic properties of mineral polymer composite materials based on sodium alginate, gelatin, and calcium phosphates intended for 3D-printing of the constructions for bone replacement

P.A. Karalkin<sup>1</sup>, N.S. Sergeeva<sup>1</sup>, V.S. Komlev<sup>2</sup>, I.K. Sviridova<sup>1</sup>, V.A. Kirsanova<sup>1</sup>, S.A. Akhmedova<sup>1</sup>, Ya.D. Shanskiy<sup>1</sup>, E.A. Kuvshinova<sup>1</sup>, M.M. Filyushin<sup>1</sup>, Yu.A. Fedotov<sup>2</sup>, A.Yu. Teterina<sup>2</sup>, Yu.V. Zobkov<sup>2</sup>, S.M. Barinov<sup>2</sup>, A.D. Kaprin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>P.A. Herzen Moscow Research Institute of Oncology, Moscow, Russia

<sup>2</sup>A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science of RAS, Moscow, Russia

Внеклеточный матрикс костной ткани является уникальным «композиционным материалом», включающим минеральную и органическую составляющие. Поэтому использование биомиметического подхода к формированию тканеинженерных конструкций для замещения костных дефектов на основе композиционных материалов, содержащих биополимеры и фосфаты кальция, вполне ожидаемо способно улучшить их цито- и биосовместимость, а также остеопластические свойства. Цель работы – оценка структурных особенностей, биосовместимости и остеопластических свойств трехмерных конструкций на основе альгината натрия, желатина и двух видов фосфатов кальция (трикальцийфосфата и октакальциевого фосфата), полученных методом трехмерной печати.

Методика получения трехмерных конструкций включала струйную 3D-печать геля на основе альгината и желатина с добавлением гранул фосфатов кальция, с последующим замораживанием, лиофильной сушкой и стерилизацией  $\gamma$ -облучением. Изучена микроструктура 3D-конструкций, их пористость и прочностные характеристики. На модели подкожной имплантации мышам исследована биосовместимость изделий в динамике до 12 нед. Также *in vivo* на модели дефекта большеберцовой кости крыс оценены их остеопластические свойства. Полученные 3D-конструкции обладали нерегулярной пластинчатой структурой альгината натрия со сферическими вкраплениями гранул фосфатов кальция. Введение в состав композита желатина повышало пористость конструкций и достоверно увеличивало их прочность при сжатии, практически не влияя на значения предельной деформации. Напечатанные 3D-конструкции на основе композиционных материалов показали хорошую биосовместимость *in vivo*. Наибольшая скорость биодеградации выявлена у материалов, содержащих октакальциевый фосфат. Все исследованные трехмерные конструкции проявили остеокондуктивный потенциал, более выраженный, по данным гистологического анализа, у 3-компонентных композиционных изделий состава: альгинат натрия, желатин и октакальциевый фосфат.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности и перспективности использования трехкомпонентных минерал-полимерных композиционных материалов на основе альгината, желатина и октакальциевого фосфата в качестве «чернил» для 3D-печати остеопластических конструкций.

**Ключевые слова:** 3D-печать, альгинат натрия, желатин, трикальцийфосфат, октакальциевый фосфат, остеопластические материалы, замещение костных дефектов.

Bone extracellular matrix comprises a unique composite compound including the mineral and organic components. Therefore, use of biomimetic approach to the formation of tissue-engineered constructions for bone defects replacement based on composite materials containing biopolymers and calcium phosphates, as expected, can significantly improve their cyto-, biocompatibility and osteoplastic properties. The aim of the work was to study the structural features, biocompatibility and osteoplastic properties of 3D-constructions based on sodium alginate, gelatin, and two types of calcium phosphates (tricalcium phosphate and octacalcium phosphate) obtained by three-dimensional printing.

The method of 3D-constructions fabrication comprised ink-jet 3D-printing with hydrogel, consisted of alginate and gelatin with the addition of calcium phosphate granules, followed by freezing, freeze-drying and sterilization by  $\gamma$ -irradiation. The structure of 3D-constructions, porosity and strength characteristics were evaluated. After the subcutaneous implantation in mice we investigated the biocompatibility of 3D-constructions during the period of up to 12 weeks. Also the osteoplastic properties of the constructions were estimated *in vivo* in a rat model of tibial defects. 3D printed constructions had irregular lamellar structure of sodium alginate with inclusions of spherical calcium phosphates granules. Addition of gelatin to the composite increased the porosity of constructs and significantly increased the compressive strength meanwhile practically had no effect on the ultimate strain value. In results of subcutaneous *in vivo* tests 3D printed constructions demonstrated perfect prolonged biocompatibility. The highest rate of biodegradation was noticed for implants containing octacalcium phosphate. All of the studied 3D-scaffolds had osteoconductive potential, more pronounced according to the number of examined histological parameters in those, made from sodium alginate, gelatin and octacalcium phosphate.

The data showed the feasibility and prospect of using three-component mineral polymer composite materials based on alginate, gelatin and octacalcium phosphate as an “ink” for 3D printing of bone grafting constructions intended for implantation in bone defects.

**Keywords:** 3D printing, sodium alginate, gelatin, tricalcium phosphate, octacalcium phosphate, bone substitutes, bone defects replacement.

## Введение

Разработка биоматериалов, предназначенных для восстановления костных дефектов, остается актуальной медицинской и социально-значимой задачей, что обусловлено, с одной стороны, распространенностью патологических состояний костной ткани, возникающих в результате травм, опухолевого поражения, дегенеративных возрастных изменений, пороков развития, а с другой — старением населения в целом. Кроме того, эффективность лечения пациентов даже с переломами костей скелета некоторых локализаций остается не достаточно эффективной. В частности, не более 1/3 всех переломов костей голени у взрослого населения завершается полным выздоровлением с хорошим функциональным исходом [1].

Несмотря на тот факт, что спектр разрабатываемых остеопластических материалов довольно разнообразен (натуральные материалы, синтетические полимеры, кальцийфосфатная керамика, биоситаллы) [2,3], ведется непрерывный поиск как новых биоматериалов, так и способов формирования имплантатов для замещения костных дефектов.

Современные методы получения остеопластических материалов во многом базируются на фундаментальных представлениях о физиологии и композиционной структуре межклеточного вещества костной ткани, состоящего из коллагеновых фибрилл и биологического апатита. Исходя из этого, весьма перспективным представляется использование многокомпонентных композиционных материалов и, в частности, минерал-полимерных композитов [4]. Среди полимеров особый интерес представляют биосовместимые полисахариды — альгинат (Ал) и желатин (Жел) [5], из фосфатов кальция — керамика на основе трикальцийфосфата (ТКФ) и октакальциевого фосфата (ОКФ), в силу того обстоятельства, что эти материалы обладают относительно высокой растворимостью в жидкостях организма, а ОКФ, будучи предшественником биологического апатита, способствует процессу биоминерализации формирующейся костной ткани [6].

Сочетание уникальных свойств минерал-полимерных композитов с возможностями быстрого прототипирования (3D-печати) создает предпосылки для значительного улучшения технологий тканевой инженерии костей, а также открывает возможности персонализации имплантатов в соответствии с геометрией дефекта [7, 8]. Ранее нами были изучены микроструктура, фазовый состав, а также цитосовместимость конструкций на основе альгината натрия и различных типов фосфатов кальция, полученных методом 3D-печати [9]. Исследованные конструкции обладали слоистой структурой альгината натрия с вкраплениями гранул фосфатов кальция при сохранении их исходного фазового состава. Была продемонстрирована хорошая цитосовместимость изделий в сочетании с удовлетворительными адгезионными свойствами поверхности.

По совокупности ранее опубликованных данных, для дальнейших исследований *in vivo* мы отобрали композитные материалы с двумя видами фосфатов кальция — Ал-ТКФ и Ал-ОКФ, дополнив каждый из них желатином в целях улучшения механических свойств материалов.

## Материал и методы

### *Методика получения трехмерных конструкций*

Технология трехмерной струйной печати конструкций на лабораторной установке ИПЛИТ 50/01 была описана нами ранее [9]. В качестве «чернил» использовали композиционный гидрогель на основе 2% Ал (CAS 9005-38-3, Acros), 10% водного раствора Жел (Gelatine 80-100, 142060.1211, Blooms) с 10–30 масс. % гранулированных (100–200 мкм) фосфатов кальция: ТКФ и ОКФ, полученных по описанной ранее керамической технологии [10]. По завершении процесса печати трехмерные конструкции помещали на 1 ч. в морозильную камеру (-50°C), далее подвергали сублимационной сушке и затем обрабатывали сшивающим агентом (10% раствор хлорида кальция, 1 ч., 35–37°C). Образцы «сшитых» трехмерных конструкций помещали в термостат (37°C) до полного высыхания. Для повышения прочности конструкций проводили их дополнительную 2–3 кратную «принудительную усадку» путем обработки водно-спиртовым (3/7) раствором в течение 1 ч. с повторной сушкой в термостате (37°C). Стерилизацию образцов осуществляли  $\gamma$ -облучением (15 кГр).

### *Физические исследования трехмерных конструкций*

Физические исследования изделий включали оценку их микроструктуры на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Vega II SBU (Tescan, Чехия) и прочностных характеристик (прочность на сжатие, растяжение) на электродинамической испытательной системе ElectroPuls E3000 (Instron, США).

### *Исследование биосовместимости трехмерных конструкций *in vivo**

Биосовместимость трехмерных конструкций оценивали в модели подкожной имплантации мышам-самцам линии BDF<sub>1</sub> (Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России, филиал «Андреевка»). Все эксперименты с мелкими лабораторными животными проводили с соблюдением принципов гуманности и требований, сформулированных в Директивах Совета Европейского Сообщества 2010/63/EU «Об использовании животных для экспериментальных исследований». На протяжении всех исследований животных содержали в виварии в условиях стандартного светового, пищевого и водного режима. Непосредственно перед оперативным вмешательством образцы конструкций экспонировали в физиологическом растворе. Техника операции была описана нами ранее [11]. Мышам под наркозом (внутрибрюшинно по 0,1 мл смеси кетамина/реланиума в отношении 1:1) вводили по 1 образцу стерильного трехмерного изделия под кожу спины на уровне грудного отдела позвоночника. Было сформировано 4 группы по 10 животных по количеству составов имплантируемых образцов трехмерных конструкций. Через 2, 4, 8 и 12 нед. после операции мышей выводили из эксперимента (по два животных на каждый срок), образцы материалов извлекали, проводили их визуальную оценку (видеокомплекс на основе стереомикроскопа и цифровой видеокамеры Olympus, Япония), после чего фиксировали в 10% растворе формалина и изготавливали парафиновые блоки. Гистологические препараты окрашивали

гематоксилином и эозином. Фотографирование гистологических препаратов осуществляли при помощи микроскопа Axiovert 40С, оснащенного цифровой камерой AxioCam MR3 (Zeiss, Германия).

*Исследование остеопластических свойств прототипов трехмерных конструкций в модели дефекта бедренной кости*

Ортопедическая имплантация выполнена на крысах-самцах линии Wistar, массой 180–200 г (Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России, филиал «Андреевка») с соблюдением перечисленных выше принципов и норм гуманного обращения с животными. Операцию с формированием «окончатого» дефекта большеберцовой кости осуществляли под наркозом. Ход операции был описан нами ранее [11]. Параметры костного дефекта: длина 6–8 мм, ширина 1,5–2,0 мм, глубина 1,5–2,0 мм с проникновением в костномозговой канал и эвакуацией костного мозга. В область дефекта вводили стерильные образцы трехмерных конструкций следующих составов: Ал-ТКФ, Ал-ОКФ, Ал-Жел-ТКФ и Ал-Жел-ОКФ. Всего было сформировано 4 группы животных ( $n = 10$ ).

Через 3, 6, 9 и 12 нед. по 2 животных выводили из эксперимента. Фрагменты тканей, включающие зону дефекта, фиксировали в 10% растворе формалина (7 сут.), далее декальцинировали в ЭДТА (0,3 М; 37°C; 25–30 сут.), регулярно обновляя декальцинирующую жидкость. После достижения материалом выраженной эластичности изготавливали парафиновые блоки, затем – срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином и осуществляли световую микроскопию.

*Статистическая обработка полученных результатов*

Обработку результатов проводили с использованием стандартных методов описательной статистики в программе «Microsoft Excel 2000». Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием непараметрического U-критерия Манна – Уитни с уровнем значимости  $p = 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

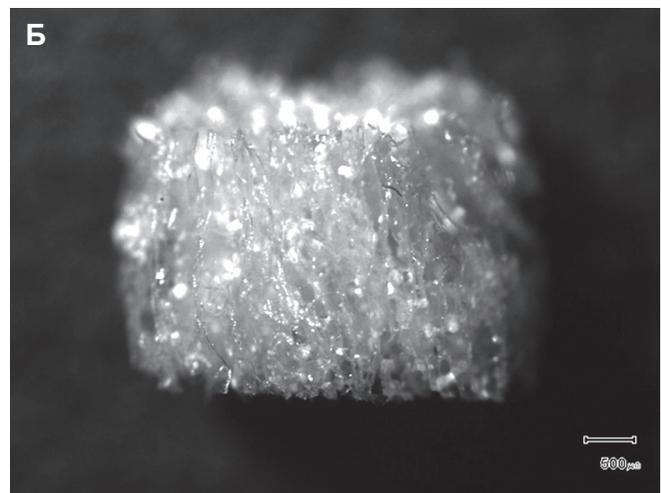
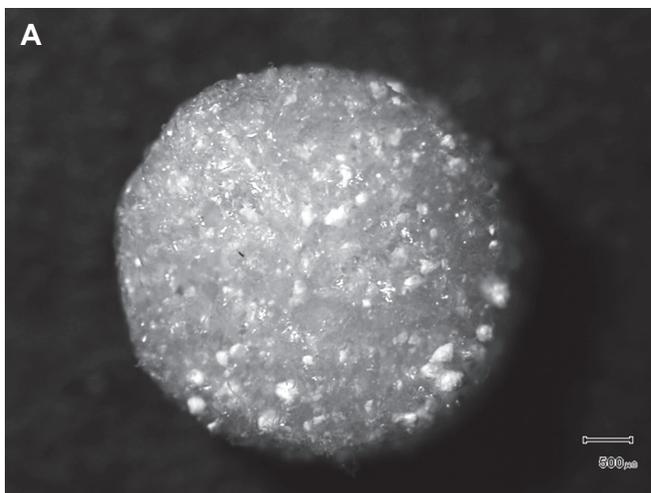
*Состав, структура и физические свойства изделий*

Методом струйной 3D-печати были получены прототипы трехмерных конструкций для замещения костных дефектов 4 различных составов: Ал-ТКФ, Ал-Жел-ТКФ, Ал-ОКФ, Ал-Жел-ОКФ. Изделия имели форму цилиндров с диаметром 4,0–4,5 мм, высотой 3–4 мм и весом 3,5–4,4 мг (рис. 1).

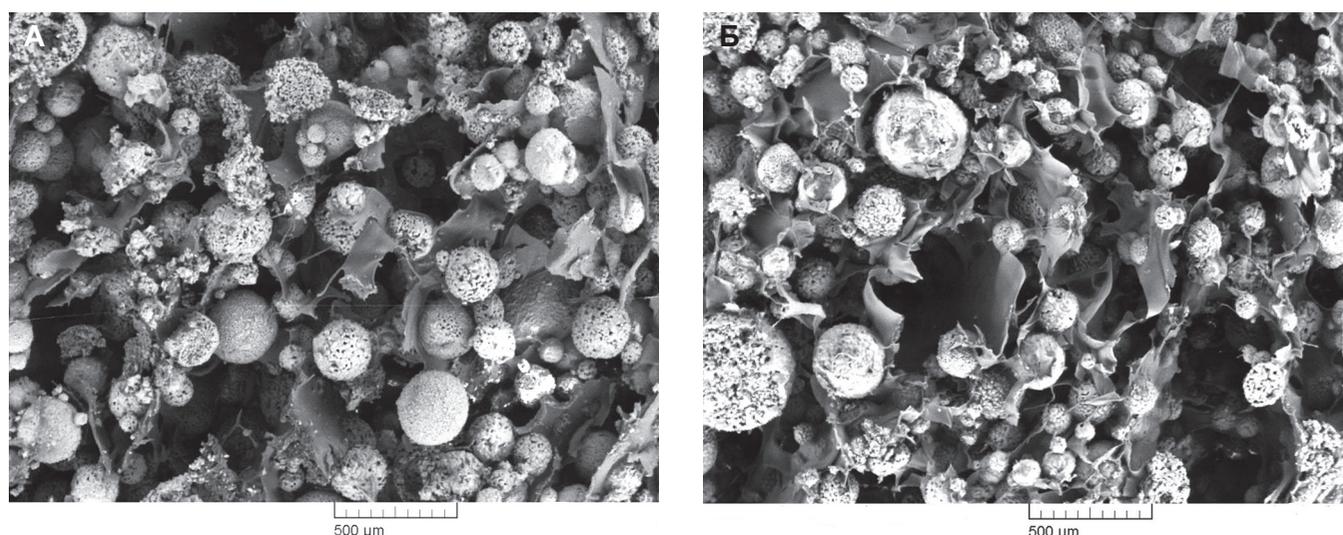
При анализе изображений СЭМ установлено, что трехмерные конструкции всех 4 составов, вне зависимости от вида фосфатов кальция, имели нерегулярную пластинчатую структуру альгинатной составляющей с толщиной пластин ~2–3 мкм, размером пор между ними около 500 мкм и близкую к сферической форму керамических гранул фосфатов кальция. Добавление Жел в состав «чернил» не влияло на микроструктуру конструкций и не вносило существенных изменений в размер и пространственную организацию внутренних пор (рис. 2).

Учитывая тот факт, что пористость биоматериалов во многом определяет эффективность их заселения клетками, доставку питательных веществ, газов и скорость прорастания кровеносными сосудами после их имплантации *in vivo*, мы более детально исследовали пористость композитов разных составов. Установлено, что общая пористость образцов трехмерных каркасов снижалась с увеличением доли фосфатов кальция в композите, составляя 81,98% и 63,92% – для 10 и 30 масс. % ТКФ в образцах, соответственно (табл. 1). Статистически значимое увеличение размера пор конструкций, напечатанных из Ал и 30 масс. % ТКФ, отмечалось при введении в состав композитов Жел.

При сравнительном исследовании механических свойств конструкций установлено, что прочность при сжатии монотонно возрастала, а прочность на растяжение снижалась с увеличением доли гранул ТКФ в композитах (табл. 2). Введение в состав композита Жел достоверно увеличивало его прочность при сжатии (с  $3,53 \pm 0,39$  до  $5,28 \pm 0,020$  МПа), практически не влияя на прочность при растяжении.



**Рис. 1.** Внешний вид прототипа трехмерной конструкции на основе Ал-ТКФ: А – вид сверху, Б – вид сбоку



**Рис. 2.** Трехмерные конструкции различных составов:  
А – Ал-ТКФ 30 масс. %; Б – Ал-Жел(90/10)-ТКФ 30 масс. %. Сканирующая электронная микроскопия. Ув.  $\times 100$

**Таблица 1.** Структура образцов трехмерных матриц на основе Ал-ТКФ с добавлением Жел

№ партии образцов	Состав образцов	Общая пористость образцов (%), $M \pm m$	Размер пор, ШД, мкм
1	Ал-ТКФ – 10 масс. %	81,98 $\pm$ 0,28	400 $\times$ 500
2	Ал-ТКФ – 20 масс. %	75,06 $\pm$ 0,62	400 $\times$ 500
3	Ал-ТКФ – 30 масс. %	63,92 $\pm$ 2,33	300 $\times$ 600
4	Ал-Жел-ТКФ – 30 масс. %	68,23 $\pm$ 0,94	600 $\times$ 800

**Таблица 2.** Прочностные характеристики трехмерных конструкций различных составов

№ партии образца	Состав образца	осж, МПа $M \pm m$	$\delta$ , % $M \pm m$
1	Ал-ТКФ – 10 масс. %	2,71 $\pm$ 0,12	15,4 $\pm$ 0,16
2	Ал-ТКФ – 20 масс. %	3,01 $\pm$ 0,13	13,8 $\pm$ 0,11
3	Ал-ТКФ – 30 масс. %	3,53 $\pm$ 0,39	12,4 $\pm$ 0,35
4	Ал-Жел-ТКФ – 30 масс. %	5,28 $\pm$ 0,020	12,2 $\pm$ 0,16

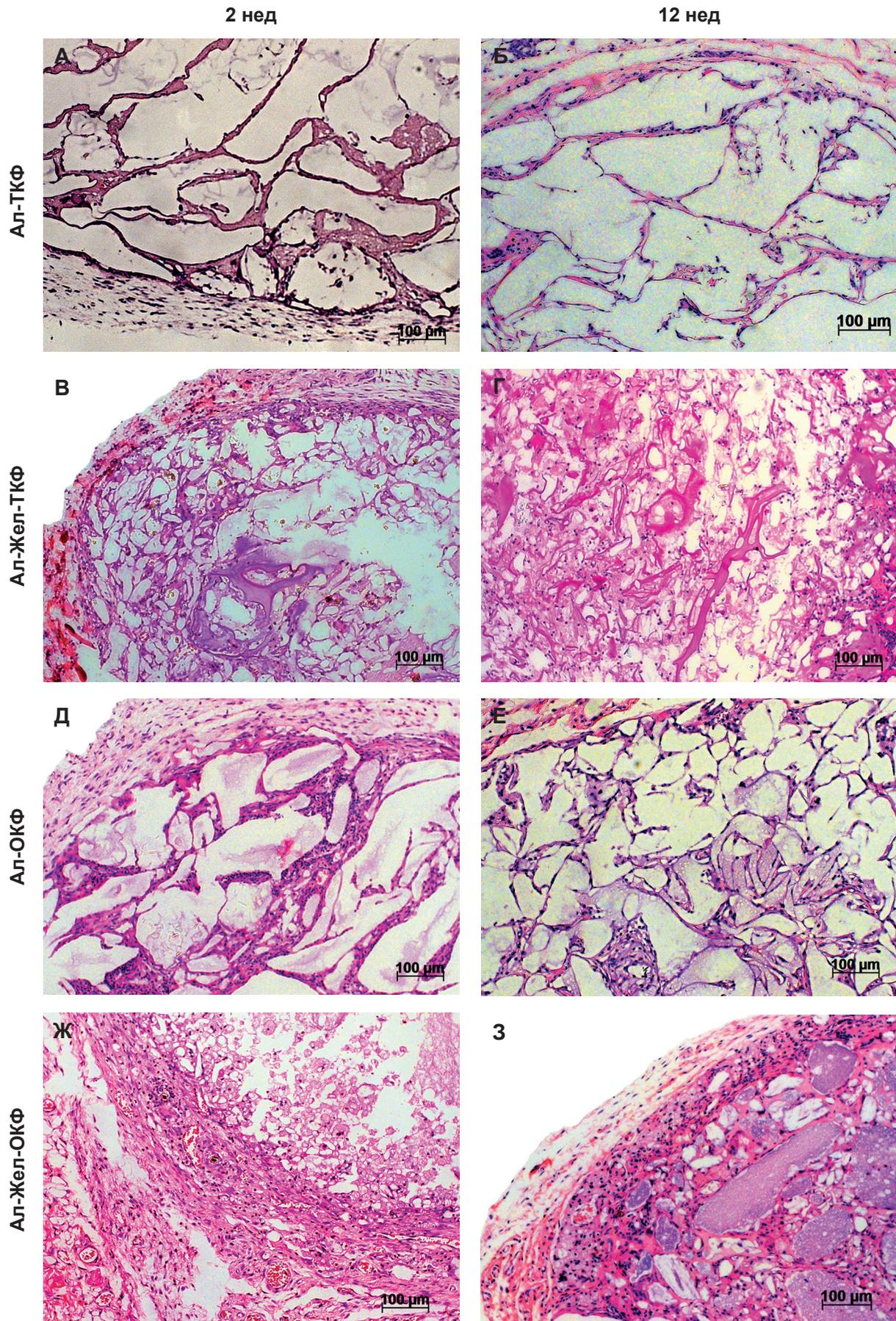
*Примечание:* осж – прочность при сжатии, МПа;  $\delta$  – прочность при растяжении, %.

#### Биосовместимость в гетеротопических условиях

При анализе биологической совместимости конструкций в модели их подкожной имплантации мы исходили из того, что выраженность тканевой реакции организма и ее морфологические особенности напрямую зависят от природы и химического состава имплантированных материалов, а также их токсичности и иммуногенности для организма. Основными признаками, учитываемыми в ходе гистологического анализа, являлись степень интеграции с окружающими тканями, особенности соединительнотканной капсулы и ее васкуляризация, а также наличие/отсутствие воспаления [12]. Дополнительными характеристиками степени биосовместимости стали количество клеточных слоев в капсуле, признаки биодеградации имплантата и характеристика ткани, замещающей имплантат.

В зоне имплантации трехмерных конструкций состава Ал-ТКФ на ранних (2 нед.) сроках выявлена достаточно тонкая (до 8–10 слоев клеток)

фиброзная капсула с концентрически ориентированными волокнами соединительной ткани, прорастающая кровеносными сосудами (рис. 3А). С первых недель после имплантации отмечен активный процесс фрагментации альгинатной составляющей композита, миграция в зону, занятую конструкцией, фибробластов и заполнение пространств между гранулами ТКФ и фрагментами альгината реактивно измененной рыхлой волокнистой соединительной тканью (рис. 3А). Через 8–12 нед. количество соединительной ткани внутри имплантата заметно увеличивалось (рис. 3Б). Отмечалось появление в новообразованной соединительной ткани гигантских клеток инородных тел в сочетании с уменьшением размеров гранул ТКФ, что указывало на начало процесса биодеградации образцов. Добавление в состав композита Жел ускоряло процесс его биодеградации и замещения имплантата соединительной тканью, что было заметно уже на ранних (2 нед.) сроках наблюдения и четко вырисовывалось к 12 нед. (рис. 3В, Г).



**Рис. 3.** 3D-конструкции различного состава, имплантированные подкожно: А, Б – Ал-ТКФ; В, Г – Ал-Жел-ТКФ; Д, Е – Ал-ОКФ; Ж, З – Ал-Жел-ОКФ. А, В, Д, Ж – 2 нед.; Б, Г, Е, З – 12 нед. после подкожной имплантации. Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.  $\times 100$

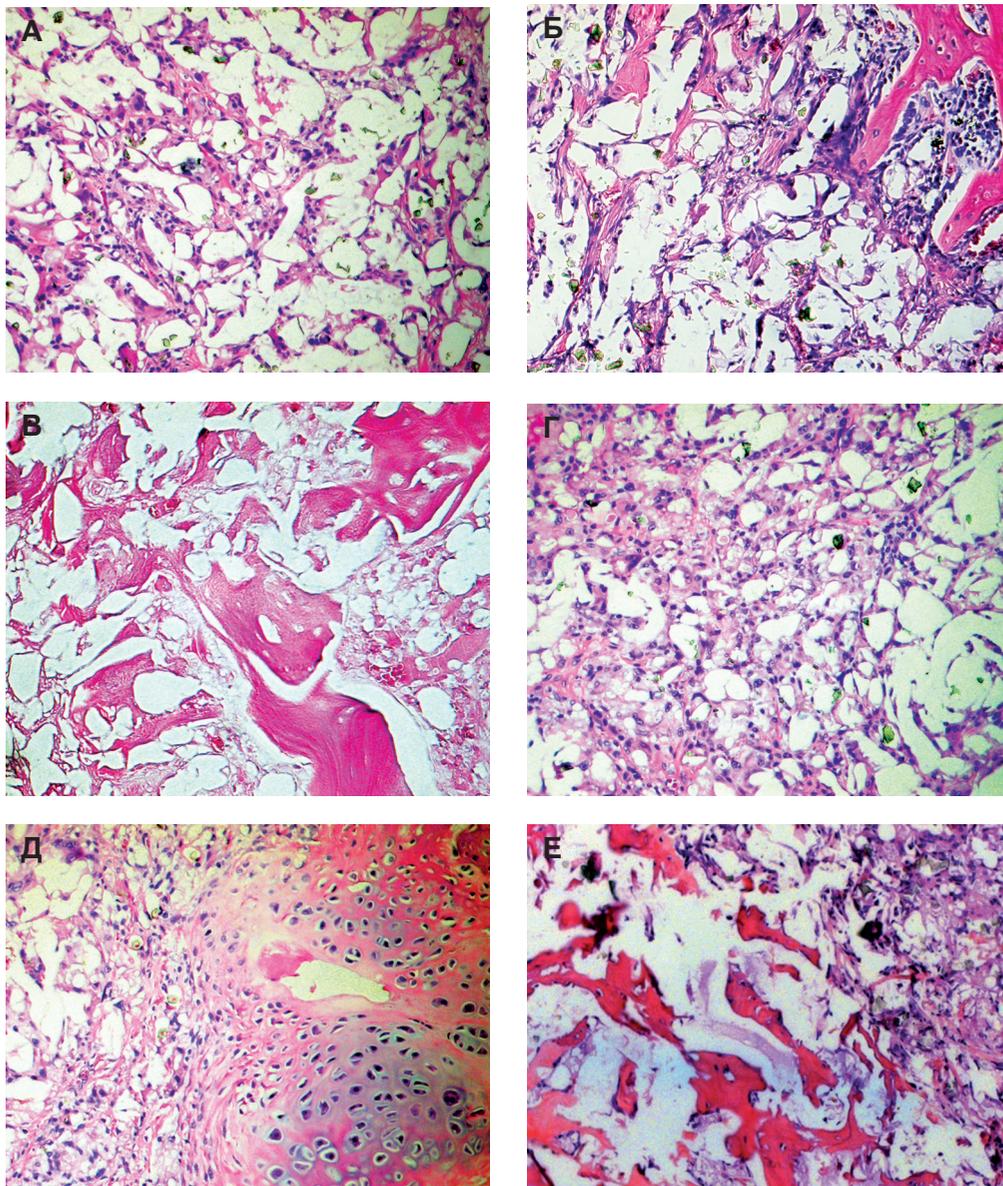
Несколько иная картина прослеживалась при исследовании биосовместимости конструкций, в которых фосфаты кальция были представлены ОКФ. Капсула вокруг такого типа изделий на ранних сроках была представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью с правильной ориентацией волокон, нейтрофильной инфильтрацией и активной васкуляризацией (рис. 3Д). Через 12 нед. после операции асептическое воспаление в зоне имплантации стихало (рис. 3Е). Прослеживалась постепенная «инволюция» конструкции, выражающаяся в активном замещении его компонентов — как Ал, так и ОКФ — соединительной тканью с фибробластоподобными клетками и гигантскими многоядерными клетками инородных тел и сравнительно небольшим количеством сосудов. Необходимо отметить, что скорость замещения имплантата соединительной тканью была максимальной для конструкций тройного состава — Ал-Жел-ОКФ (рис. 3Ж, 3).

Таким образом, в эксперименте *in vivo* на модели подкожной имплантации все 4 типа конструкций

«продемонстрировали» биосовместимость. При этом была отмечена более высокая скорость деградации ОКФ по сравнению с ТКФ, а также ускоренная фрагментация пластин Ал в присутствии Жел, что приводило к более интенсивному замещению имплантатов соединительной тканью. Признаков остеогенеза не наблюдалось.

#### *Биологическое действие в ортотопических условиях*

Оценку остеозамещающих потенциалов композиционных 3D-конструкций осуществляли в модели дефекта большеберцовой кости крыс. Через 3 нед. после имплантации изделия из Ал и ТКФ уже выявлялось начало резорбции пластин Ал с замещением их волокнистой соединительной тканью с фибробластоподобными клетками и формированием ячеистой структуры. На границе со здоровой костью в эти сроки визуализировались отдельные очаги периостального остеогенеза, а по всей площади среза — многочисленные кровеносные сосуды (рис. 4А).



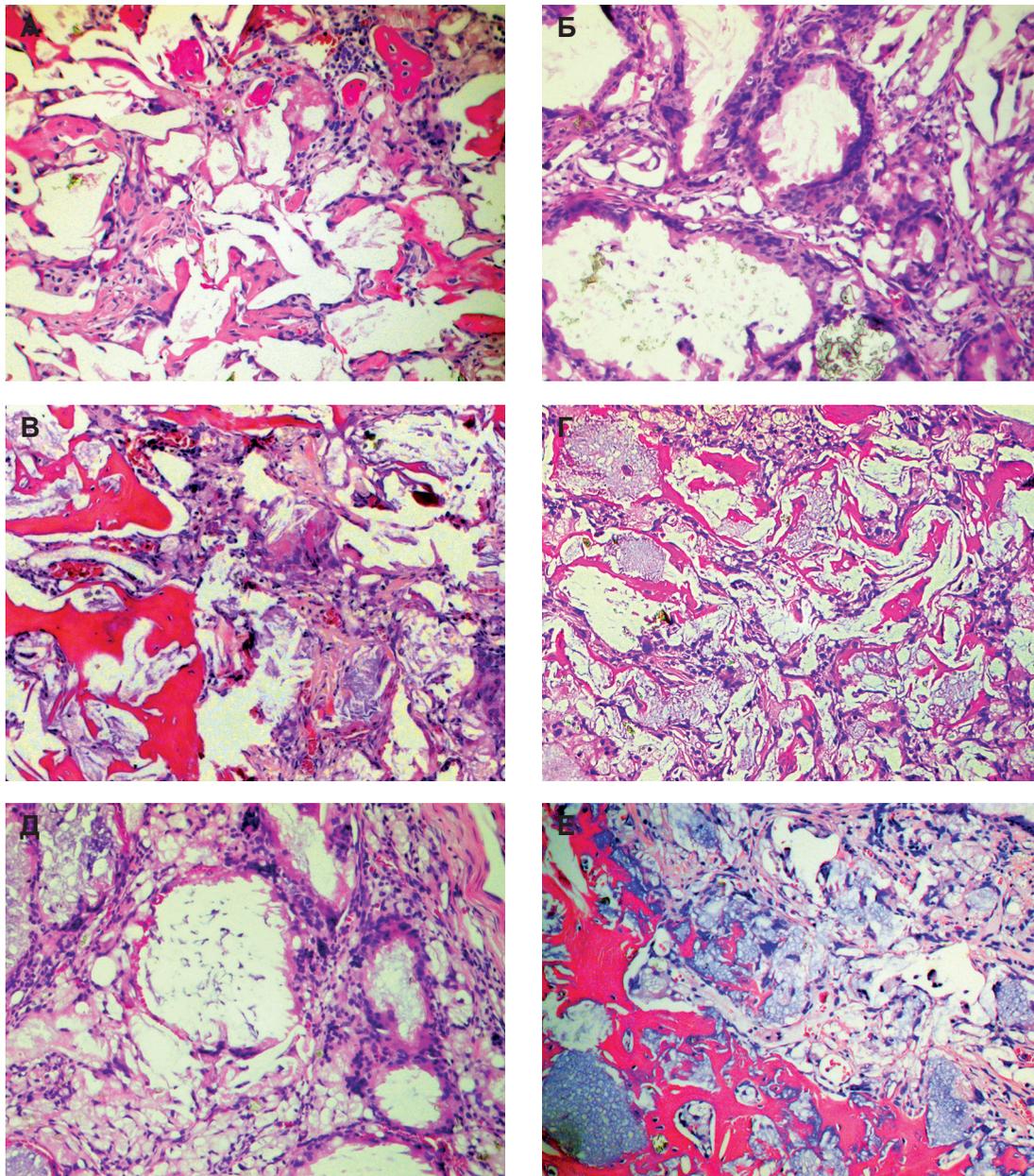
**Рис. 4.** Регенерат в зоне имплантации конструкций из Ал-ТКФ (А, Б, В) и Ал-Жел-ТКФ (Г, Д, Е) в дефект большеберцовой кости крысы: А, Г, Д — 3 нед., Б — 6 нед., В — 9 нед., Е — 12 нед. после операции. Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.  $\times 100$

Через 6 нед. на периферии дефекта отмечено формирование волокнистой гиперплазированной, богатой фибробластоподобными клетками соединительнотканной капсулы, переходящей в надкостницу. В толще имплантата к периостальному добавлялся энхондральный остеогенез, а в интермедиарной зоне выявлялись новообразованные костные трабекулы (рис. 4Б).

При более длительном наблюдении (9 и 12 нед. после операции) процесс репаративной регенерации продолжался. С одной стороны, место дефекта оставалось заполненным волокнистой соединительной тканью, в которой определялись участки новообразованной пластинчатой костной ткани. С другой стороны, на границе между компактным и губчатым веществом костной ткани гранулы ТКФ постепенно замещались костными балками с отдельными очагами гемопоэза между ними (рис. 4В).

Введение Жел в состав композита (Ал-Жел(80/20)-ТКФ) существенно не изменяло характер и сроки репаративного остеогенеза в зоне костного дефекта. Из особенностей можно отметить, что все регенеративные процессы, а именно энхондральный остеогенез, васкуляризация надкостницы, формирование костных балок в зоне материнского ложа и скопление остеокластов на границе с надкостницей, были заметно активнее (рис. 4Г–Е).

При использовании в качестве имплантатов 3D-конструкций состава Ал и ОКФ процессы репаративного остеогенеза были сходными, но еще более интенсивными: уже через 3 нед. в зоне дефекта была сформирована гипертрофированная многоклеточная волокнистая надкостница, область имплантации была заполнена волокнистой соединительной тканью, а на границе с костным опилом (край дефекта) визуализировались трабекулы формирующейся костной ткани (рис. 5А).



**Рис. 5.** Регенерат в зоне имплантации конструкций из Ал-ОКФ (А, Б, В) и Ал-Жел-ОКФ (Г, Д, Е) в дефект большеберцовой кости крысы: А, Г – 3 нед., Б, Д – 6 нед., В, Е – 12 нед. после операции. Окр.: гематоксилин и эозин. Ув.  $\times 100$

В последующие сроки наблюдения продолжалось формирование костного регенерата в сочетании с активной биорезорбцией гранул ОКФ и вовлечением в этот процесс остеокластов (рис. 5Б). Основным механизмом формирования костной ткани являлся энхондральный, что характерно для длинных трубчатых костей (рис. 5В).

Наиболее активно репаративный остеогенез протекал в группе животных с имплантацией трёхкомпонентного композита (Ал-Жел-ОКФ). Так, через 3 нед. наблюдения часть биорезорбированной полимерной составляющей (Ал и Жел) постепенно замещалась новообразованной волокнистой соединительной тканью. Гранулы ОКФ также начинали подвергаться биодеградации, на что косвенно указывало наличие многоядерных клеток инородных тел (остеокластов), число которых постепенно нарастало (рис. 5Г–Е). К концу наблюдения (12 нед.) в зоне дефекта нарастало количество крупных и мелких костных балок (как в толще, так и по периферии имплантата), формировались очаги гемопоэза; остеогенез шел, главным образом, по энхондральному механизму в интермедиарной и периостальной зонах.

### Заключение

Костный межклеточный матрикс является уникальным «композитом», включающим минеральную и органическую составляющие. В этой связи, изготовление тканеинженерных конструкций для замещения костных дефектов на основе композиционных материалов, содержащих биополимеры и фосфаты кальция, вполне обосновано и способно улучшить их цито- и биосовместимость, а также остеопластические свойства. С другой стороны, использование 3D-печати для изготовления таких конструкций позволяет персонализировать имплантаты в соответствии с геометрией дефекта, придавая им заданную пористость и механические свойства.

В настоящей работе были исследованы биосовместимость и остеозамещающие потенциалы 2- или

3-компонентных прототипов имплантатов, полученных методом 3D печати. Двухкомпонентные композиты содержали в качестве органической составляющей полисахарид Ал, а в качестве минеральной — ТКФ или ОКФ. В состав трехкомпонентных композитов дополнительно входил белок Жел, добавление которого способствовало повышению механической прочности и увеличению пористости изделий.

В модели подкожной имплантации мышам было показано, что все исследованные материалы являются биосовместимыми. Наибольшей биоактивностью по скорости биодеградации кальцийфосфатного компонента и замещения образца правильно организованной соединительной тканью, обладали 3D-конструкции, содержащие ОКФ.

При имплантации изделий в дефект бедренной кости крыс установлено, что наиболее активно остеогенез протекал в дефектах, замещенных 3-х компонентными имплантатами состава Ал-Жел-ОКФ. На гистологическом уровне это подтверждалось более ранним началом формирования трабекул костного регенерата в зоне дефекта, большим объемом новообразованной костной ткани в одни и те же сроки наблюдения, большим количеством остеокластов в зоне дефекта, более ранней консолидацией имплантата с краями костного дефекта.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о целесообразности и перспективности использования трехкомпонентных минерал-полимерных композитов на основе Ал, Жел и ОКФ в качестве остеопластических материалов при 3D-печати конструкций, предназначенных для замещения костных дефектов.

### Благодарности

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства образования и науки (Соглашение № 14.604.21.0132 от 21 октября 2014 г. ID: RFMEFI60414X0132).*

### ЛИТЕРАТУРА:

1. Yeung M., Bhandari M. Uneven global distribution of randomized trials in hip fracture surgery. *Acta Orthop.* 2012; 83(4): 328-33.
2. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A. et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J. Orthop. Surg. Res.* 2014; 9(1): 18-42.
3. Kolk A., Handschel J., Drescher W. et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 2012; 40(8): 706-18.
4. Pertici G., Carinci F., Carusi G. et al. Composite polymer-coated mineral scaffolds for bone regeneration: from material characterization to human studies. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2015; 29(3 Suppl. 1): 136-48.
5. Tozzi G., De Mori A., Oliveira A. et al. Composite hydrogels for bone regeneration. *Materials* 2016; 9: 267-91.
6. Komlev V.S., Barinov S.M., Bozo I.I. et al. Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behavior. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014; 6(19): 16610-20.
7. Bergmann C., Lindner M., Zhang W. et al. 3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2010; 12: 2563-7.
8. Stoppato M., Vahabzadeh S., Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Bioact. Compat. Polym.* 2013; 28: 16-32.
9. Сергеева Н.С., Комлев В.С., Свиридова И.К. и др. Некоторые физико-химические и биологические характеристики трехмерных конструкций на основе альгината натрия и фосфатов кальция, полученных методом 3D-печати и предназначенных для реконструкции костных дефектов. *Гены и Клетки* 2015; 2: 39-45.
10. Баринков С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005.
11. Чиссов В.И., Свиридова И.К., Сергеева Н.С. и др. Исследование in vivo биосовместимости и динамики замещения дефекта голени крыс пористыми гранулированными биокерамическими материалами. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2008; 3: 151-7.
12. Butler K., Benuzzi H., Puckett A. Cytological evaluation of the tissue-implant reaction associated with S/C and I/P implantation of ALCAP and HA bioceramics in vivo. *Pathol. Res. Pract.* 2001; 197(1): 29-39.

*Поступила: 21.06.2016*