

УДК 616-006.6-018.1

DOI: 10.34215/1609-1175-2025-1-66-69



# Оценка цитотоксичности биостекел, допированных бором или висмутом и полученных разными способами

И.Н. Черненко<sup>1</sup>, О.В. Шевченко<sup>1</sup>, Д.Н. Грищенко<sup>2</sup>, М.А. Медков<sup>2</sup>, Е.В. Маркелова<sup>1</sup><sup>1</sup> Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия<sup>2</sup> Институт химии ДВО РАН, Владивосток, Россия

**Цель:** оценка цитотоксических свойств полученных Bioglass 45S5, допированных 40 масс.%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  или 15 масс.%  $\text{V}_2\text{O}_5$ . **Материалы и методы.** На культуре клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха методом калориметрического МТТ-теста оценена метаболическая активность клеток в ячейках 96-луночного планшета при трехкратном повторении. **Результаты.** Подтверждено влияние способа получения материала на его токсические свойства. Метод пиролиза органических растворов определен оптимальным способом синтеза биоактивных стекол. Установлено, что целесообразной для дальнейших исследований является концентрация образцов 12,5 мг/мл. **Заключение.** На основании данных МТТ-теста показано повышение параметра цитотоксичности при добавлении ионов бора в состав биостекла. В то же время введение висмута демонстрирует высокие показатели жизнеспособности, что является основой для дальнейшей разработки биосовместимых материалов.

**Ключевые слова:** биостекла Bioglass 45S5, оксид висмута, оксид бора, цитотоксичность, МТТ-тест, асцитная аденокарцинома Эрлиха

Поступила в редакцию: 25.12.2024. Получена после доработки: 15.01.2025. Принята к публикации: 31.01.2025

**Для цитирования:** Черненко И.Н., Шевченко О.В., Грищенко Д.Н., Медков М.А., Маркелова Е.В. Оценка цитотоксичности биостекел, допированных бором или висмутом и полученных разными способами. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2025;1:66–69. doi: 10.34215/1609-1175-2025-1-66-69

**Для корреспонденции:** Шевченко Ольга Вячеславовна – научный сотрудник Междисциплинарного лабораторного центра Тихоокеанского государственного медицинского университета (690002, Приморский край, Владивосток, пр-т Острякова, 2); ORCID: 0000-0002-3113-3995; тел.: +7 (924) 428-17-91; e-mail: shevchenko.ov@tgmu.ru

## Cytotoxicity evaluation of bioglasses doped with boron or bismuth and synthesized by different methods

I.N. Chernenko<sup>1</sup>, O.V. Shevchenko<sup>1</sup>, D.N. Grishenko<sup>2</sup>, M.A. Medkov<sup>2</sup>, E.V. Markelova<sup>1</sup><sup>1</sup> Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia<sup>2</sup> Institute of Chemistry, FEB, RAS, Vladivostok, Russia

**Objective.** To evaluate the cytotoxic properties of the obtained Bioglass 45S5 doped with 40 wt %  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  or 15 wt %  $\text{V}_2\text{O}_5$ . **Materials and methods.** On cell culture of Ehrlich ascites adenocarcinoma, the metabolic activity of cells in a 96-well plate was evaluated by calorimetric MTT assay at threefold repetition. **Results.** The influence of the production methods of a material on its toxic properties is confirmed. The pyrolysis of organic solutions is considered the most effective method for the synthesis of bioactive glasses. The concentration of samples of 12.5 mg/mL is considered promising for further studies. **Conclusion.** The MTT assay shows an increase in the cytotoxicity parameter with the addition of boron ions to the composition of bioglass. At the same time, the introduction of bismuth demonstrates high viability parameters, which provides a basis for further development of biocompatible materials.

**Keywords:** bioglass 45S5, bismuth oxide, boron oxide, cytotoxicity, MTT assay, Ehrlich ascites adenocarcinoma

Received 25 December 2024; Revised 15 January 2025; Accepted 31 January 2025

**For citation:** Chernenko I.N., Shevchenko O.V., Grishenko D.N., Medkov M.A., Markelova E.V. Cytotoxicity evaluation of bioglasses doped with boron or bismuth and synthesized by different methods. *Pacific Medical Journal*. 2025;1:66–69. doi: 10.34215/1609-1175-2025-1-66-69

**Corresponding author:** Olga V. Shevchenko, researcher at the Multidisciplinary laboratory center of the Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave., Vladivostok, Primorsky Territory, 690002, Russia); ORCID: 0000-0002-3113-3995; tel.: +7 (924) 428-17-91; e-mail: shevchenko.ov@tgmu.ru

В последнее время перспективными становятся исследования остеогенных, остеоиндуктивных и остеокондуктивных материалов, одним из представителей которых являются биоактивные стекла (биостекла) [1]. Биостекла представляют собой универсальный,

совместимый с организмом материал, находящий активное применение в современной науке. Область их применения лежит в сфере костной трансплантологии, разработке способов замещения костной ткани и стимуляции остеогенеза, регенерации костной ткани,

а также в качестве систем доставки лекарств или противомикробных препаратов [2]. Наиболее известный состав был разработан Ларри Хенчем и получил название Bioglass 45S5 [3]. Образец проявил способность к связыванию с тканями организма и стимулированию остеогенеза путем высвобождения биоактивных ионов [4]. Исследователями разных научных групп предложены варианты модификации биостекла [5]. Показано, что допирование биостекла «терапевтическими» ионами влияет на изменение структуры биостекла и его свойств [5]. Добавление ионов металлов, таких как магний, стронций, марганец, железо, цинк, повышает биоактивные свойства стекла, что способствует заживлению и регенерации тканей [5].

В рамках настоящего исследования на базе лаборатории переработки минерального сырья Института химии ДВО РАН (зав. д-р хим. наук, профессор М.А. Медков) были получены Bioglass 45S5, допированные ионами бора и висмута. Введение бора обусловлено его влиянием на усиление остеогенных, антибактериальных и ангиогенных свойств [6–8]. Допирование висмутом, согласно литературным данным, придает биостеклу радиопротективные свойства, а также благотворно влияет на остеогенный потенциал [9, 10]. С целью первоначальной оценки безопасности применения полученных материалов на базе Междисциплинарного лабораторного центра ТГМУ (зав. д-р мед. наук, профессор Е.В. Маркелова) проведена оценка цитотоксичности на культуре клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха (АКЭ).

---

#### Материалы и методы

---

Для получения исходных образцов биостекла использовали методы твердофазного синтеза (далее Bioglass 45S5 (окс.)) и пиролиза органических растворов (далее Bioglass 45S5 (орг.)). Bioglass 45S5 (окс.) получен из компонентов  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{NaCO}_3$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  путем изготовления гомогенной шихты и плавления массы при температуре 1300 °С. Стекло Bioglass 45S5 (орг.) получено из прекурсоров  $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2\text{Na}$ ,  $\text{C}_{36}\text{H}_{66}\text{O}_4\text{Ca}$ ,  $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Si}$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{P}$ , растворенных в толуоле. Растворитель удаляли при 150 °С, массу подвергали пиролизу при температуре 1300 °С. Квалификация использованных реактивов – не ниже ХЧ. Допирование предварительно измельченного стекла проведено твердофазным методом при температуре спекания 1300 °С. Получены образцы, допированные 40 масс.%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  и 15 масс.%  $\text{V}_2\text{O}_5$ .

Для исследований цитотоксичности использовали следующие образцы стекла: Bioglass 45S5 (окс.), Bioglass 45S5 (орг.), Bioglass 45S5 (орг.) + 40%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , Bioglass 45S5 (орг.) + 15%  $\text{V}_2\text{O}_5$ . А также образец стеклокерамики Bioglass 45S5 (окс.) + 40%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , в котором присутствуют кристаллы  $\text{Na}_2\text{CaSi}_3\text{O}_8$  и  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ . Bioglass 45S5 (окс.) и Bioglass 45S5 (орг.) рассматривали как образцы сравнения. Образцы были подготовлены для исследований в виде порошков и внесены отдельными

навесками по 100; 50; 25; 12,5 мг и простерилизованы в сухожаровом шкафу Thermo Scientific Heraterm (Thermo Fisher, США) при 160 °С в течение 2 часов. В качестве модели для проведения теста на цитотоксичность выбрана культура асцитной аденокарциномы Эрлиха. Клетки АКЭ вносили в 12-луночные планшеты по 1000 мкл в концентрации  $2 \times 10^6$  кл/мл питательной среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM, Lonza, Verviers, Бельгия), с 10% фетальной бычьей сыворотки (Life Technologies Inc., США) и 0,05% гентамицина (Sigma Aldrich, США). Подготовленные культуральные планшеты оставляли в инкубаторе Thermo Scientific 8000WJ (Thermo Fisher, США) при поддержании условий 5%  $\text{CO}_2$ , 37 °С. Через 24 часа осуществляли замену питательной среды до конечного объема 1000 мкл в ячейке. Еще через 1 сутки вносили навески исследуемых веществ. Изучение цитотоксичности материалов проводили через 2 сут контакта методом теста с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромидом (МТТ, ПанЭко, Россия) на метаболическую активность клеток. Интенсивность оптической плотности после восстановления формазна определяли спектрофотометрически при  $\lambda = 570$  нм на планшетном ридере FlexA-200 НТ (Allsheng, Китай), референсная  $\lambda = 800$  нм. Измерения проводили в трехкратной повторности. В качестве положительного контроля ( $K^+$ ) выбраны клетки с добавлением 20% диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия), отрицательного контроля ( $K^-$ ) – интактные клетки.

Статистическую обработку выполняли в программном комплексе MS Excell 365. Для оценки характера распределения применяли критерий Шапиро – Уилка. В случае нормального распределения данных значимость полученных различий оценивали с применением критерия Стьюдента, уровень значимости принимали за  $p < 0,05$ . В случае распределения, отличного от нормального, значимость наблюдаемых различий оценивали с применением критерия Манна – Уитни.

---

#### Результаты исследования

---

Результаты МТТ-теста свидетельствуют о том, что после 2-суточного контакта с 12,5–100 мг/мл образца стеклокерамики Bioglass 45S5 (окс.) + 40%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  жизнеспособность клеток АКЭ составляет от  $16,41 \pm 0,82$  до  $93,64 \pm 4,68\%$ . Для образца стекла Bioglass 45S5 (орг.) + 40%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  во всем диапазоне количество метаболически активных клеток составляет от  $92,36 \pm 4,62$  до  $93,93 \pm 4,70\%$ . При этом для образца сравнения Bioglass 45S5 (окс.) определен больший токсический эффект, чем для материалов, полученных органическим способом, что полностью соотносится с вышеуказанными результатами (рис. 1).

Для образца Bioglass 45S5 (орг.), допированного 15%  $\text{V}_2\text{O}_5$ , по данным МТТ-теста нетоксичной является только концентрация 12,5 мг/мл, в то время как для 12,5–100 мг/мл варьирует от  $95,11 \pm 4,76$  до  $11,52 \pm 0,58\%$  (рис. 2).

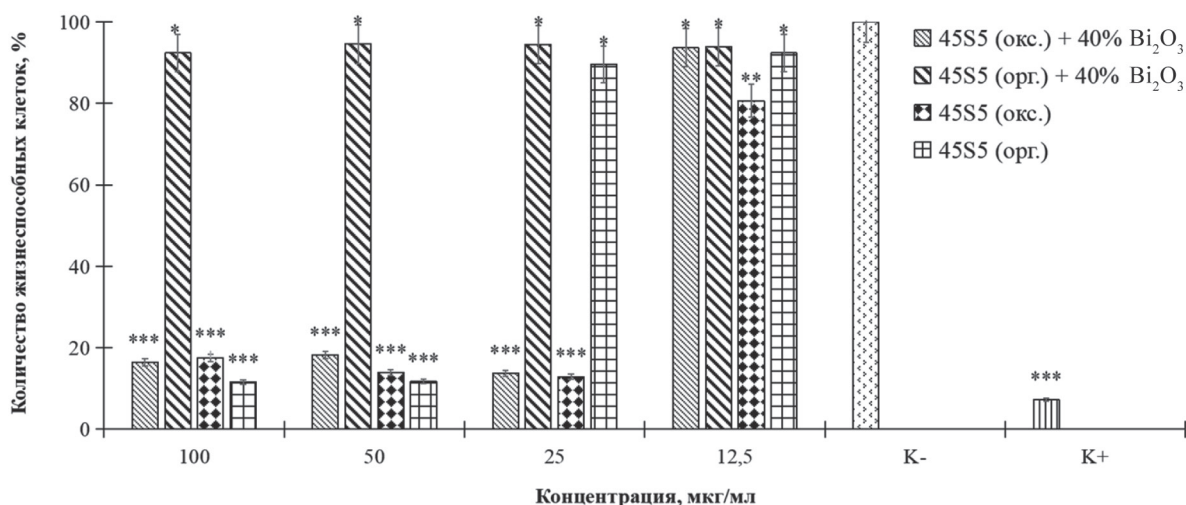


Рис. 1. Количество метаболически активных клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха через 2 сут контакта с контрольными образцами биостекла и допированными оксидом висмута, по данным МТТ-теста ( $p < 0,05$ ).

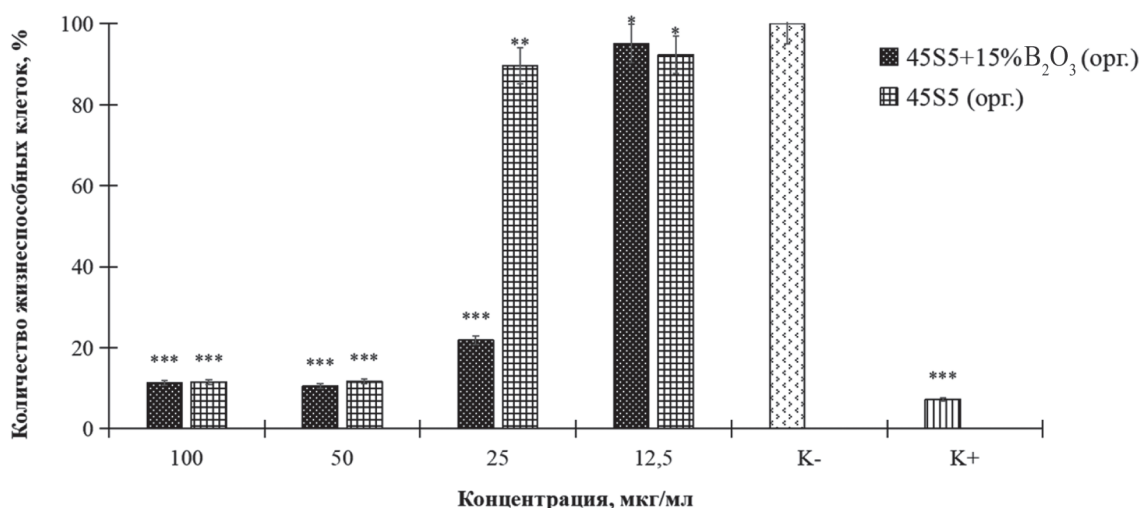


Рис. 2. Количество метаболически активных клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха через 2 сут контакта с 45S5 + 15% B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (орг.) по данным МТТ-теста ( $p < 0,05$ ).

#### Обсуждение полученных данных

Основываясь на полученных данных, следует отметить, что материалы, полученные методом пиролиза органических растворов, являются наиболее перспективными для дальнейших исследований в концентрациях 12,5 и 25 мг/мл. Применение стекла, допированного 15% B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, в концентрации 12,5 мг/мл также представляет интерес, поскольку, согласно литературным данным, боросиликатные стекла обладают более высокой скоростью образования гидроксиапатита и формирования новой костной ткани в сравнении с недопированным Bioglass 45S5 [10, 11]. Такой материал более термостабилен, что необходимо нам в дальнейшем с целью создания 3D-каркасов для замещения и регенерации костных эффектов [12].

Известно, что висмут-содержащие биостекла могут применяться для регенерации костей [9, 10], а также

в терапии онкологических патологий костной ткани [13], дополнительно обладая антибактериальным эффектом [14]. Согласно данным МТТ-теста, потенциалом для будущего применения в большей степени обладают стекла с добавлением 40% Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> методом пиролиза органических растворов.

#### Заключение

Методом калориметрического МТТ-теста проведена оценка цитотоксических свойств разрабатываемых образцов биостекла на модели культуры клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха. Показано, что добавление ионов бора в состав биостекла повышает параметр цитотоксичности, в то время как введение висмута в состав органического биостекла, в отличие от полученного оксидным способом, сохраняет клетки жизнеспособными. Согласно полученным данным, для дальнейших исследований будут применяться

материалы Bioglass 45S5 (окс.) + 40%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ , Bioglass 45S5 (орг.) + 15%  $\text{B}_2\text{O}_3$ , Bioglass 45S5 (орг.) + 40%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  в концентрации 12,5 мг/мл.

**Конфликт интересов:** авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования:** работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» (ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России) и государственного задания ФГБУН «Институт химии ДВО РАН», тема «Направленный синтез и исследование строения и свойств новых веществ, материалов и покрытий (включая наноразмерные) для морских технологий и техники и различного функционального назначения» (FWFN(0205)-2022-0003).

**Участие авторов:**

Концепция и дизайн исследования – ЧИН, ШОВ, ГДН, ММА, МЕВ

Сбор и обработка материала – ЧИН, ШОВ

Статистическая обработка – ЧИН

Написание текста – ШОВ, ЧИН

Редактирование – ГДН, ММА, МЕВ

**Литература / References**

1. Костив РЕ., Матвеева Н.Ю., Калиниченко С.Г. Биоактивные покрытия на металлических сплавах и стимуляция восстановления кости после перелома. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2021;(2):31–36. [Kostiv RYe, Matveeva NYu, Kalinichenko SG. Bioactive coatings on metallic alloys and stimulation of bone repair after fracture. *Pacific Medical Journal*. 2021;(2):31–36. (In Russ.)]. doi: 10.34215/1609-1175-2021-2-31-36
2. Khalid MD, Khurshid Z, Zafar MS, Farooq I, Khan RS, Najmi A Bioactive Glasses and their Applications in Dentistry. *J. Pak. Dent. Assoc.* 2017;26:32–38. doi: 10.25301/JPDA.261.32
3. Hench LL, Hench J., Greenspan DC Bioglass: A short history and bibliography. *J. Aust. Ceram. Soc.* 2004;40:1–42;2. doi: 10.1007/978-94-011-0541-5\_1
4. Baino F, Hamzehlou S, Kargozar S Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *J. Funct. Biomater.* 2018;9:25. doi: 10.3390/jfb9010025
5. Nandi SK, Mahato A, Kundu B, Mukherjee P Doped Bioactive Glass Materials in Bone Regeneration. In: Zorzi A.R., de Miranda J.B., editors. *Advanced Techniques in Bone Regeneration*. IntechOpen; London, UK: 2016. doi: 10.5772/63266
6. Houaoui A, Lyyra I, Agniel R, Pauthe E, Massera J, Boissière M. Dissolution, bioactivity and osteogenic properties of composites based on polymer and silicate or borosilicate bioactive glass. *Mater Sci Eng C*. 2020;107:110340. doi: 10.1016/j.msec.2019.110340
7. Xia L, Ma W, Zhou Y, Gui Z, Yao A, Wang D, Takemura A, Uemura M, Lin K, Xu Y. Stimulatory effects of boron containing bioactive glass on osteogenesis and angiogenesis of polycaprolactone: in vitro study. *Biomed Res Int*. 2019;2019:8961409. doi: 10.1155/2019/8961409
8. Chen S, Michálek M, Galusková D, Michálková M, Švancárek P, Talimian A, Kaňková H, Kraxner J, Zheng K, Liverani L, Galusek D, R. Boccaccini A. Multi-targeted B and Co co-doped 45S5 bioactive glasses with angiogenic potential for bone regeneration. *Mater Sci Eng C*. 2020;112:110909. doi: 10.1016/j.msec.2020.110909
9. Divina R, Naseer KA, Marimuthu K, Alajerami YSM, Al-Buriah MS. Effect of different modifier oxides on the synthesis, structural, optical, and gamma/beta shielding properties of bismuth lead borate glasses doped with europium. *J Mater Sci Mater Electron*. 2020;31:21486–501. doi: 10.1007/s10854-020-04662-3
10. Tekin HO, Abouhaswa AS, Kilicoglu O, Issa SAM, Akkurt I, Rammah YS. Fabrication, physical characteristic, and gamma-photon attenuation parameters of newly developed molybdenum reinforced bismuth borate glasses. *Phys Scr*. 2020;95:115703. doi: 10.1088/1402-4896/abbf6e
11. Huang W, Day DE, Kittiratanapiboon K, Rahaman MN. Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. *J Mater Sci: Mater Med*. 2006;17:583–96. doi: 10.1007/s10856-006-9220-z
12. Fabert M, Ojha N, Erasmus EP, Hannula M, Hokka M, Hyttinen J, Rocherullé J, Sigalasc I, Massera J. Crystallization and sintering of borosilicate bioactive glasses for application in tissue engineering. *J Mater Chem B*. 2017;5:4514–25. doi: 10.1039/c7tb00106a
13. Wang L, Long NJ, Li L, Lu Y, Li M, Cao J, Zhang Y, Xu S, Yang Z, Mao C, Peng M. Multi-functional bismuth-doped bioglasses: combining bioactivity and photothermal response for bone tumor treatment and tissue repair. *Light Sci Appl*. 2018;7:1. doi: 10.1038/s41377-018-0007-z
14. Prasad SS, Ratha I, Adarsh T, Anand A, Sinha PK, Diwan P, Annapurna K, Biswas K. In vitro bioactivity and antibacterial properties of bismuth oxide modified bioactive glasses. *J Mater Res*. 2018;33:178–90. doi: 10.1557/jmr.2017.442