

УДК 54.139 + 617.3 + 617-089.844

СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА КСЕНОГЕННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА В ПРОЦЕССЕ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИМПЛАНТАТОВ ДЛЯ ОСТЕОСИНТЕЗА

©2019 г. ¹Л. В. Эрхова, ¹Ю. М. Панов, ²Н. С. Гаврюшенко,
²В. В. Зайцев*, ^{2,3}Ю. С. Лукина, ²Д. В. Смоленцев, ²К. А. Воробьёв,
¹Д. П. Крутько, ¹Д. А. Леменовский**

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
Москва, Россия

²Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия

³Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

*zaitsev-cito@mail.ru
**dali@org.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 10.06.2019 г. Прошла рецензирование 25.06.2019 г.
Принята к публикации 25.06.2019 г.

Предложен способ получения высокочистых ксеногенных биоматриц нового поколения, пригодных для имплантации в живой организм. Особая биосовместимость может быть достигнута путем дополнительной обработки сверхкритическим диоксидом углерода и введения дозированных количеств полилактидов с молекулярной массой 20 и 40 кДа в пористое пространство матрицы. Испытания *in vivo* полученных материалов показали их высокую биосовместимость с различной степенью интеграции с окружающими тканями.

Ключевые слова: сверхкритический диоксид углерода, биологический матрикс, ксеногенная костная ткань, резорбируемость, полилактид.

ВВЕДЕНИЕ

Имплантаты, изготовленные из ксеногенного костного матрикса, полученного от сельскохозяйственных животных, предназначенные для замещения пораженных участков костной ткани, широко представлены на мировом рынке остеопластических материалов. Общим для всех имплантатов данного вида является различие времени резорбции (рассасывания в биологических средах) и формирования новой костной ткани. Это может привести либо к неполному восстановлению костной ткани реципиента, если рост кости не успевает за скоростью резорбции материала, либо к замедлению восстановления, если материал резорбируется медленнее, чем регенерируется костная ткань [1–3]. При нестабильности стыка имплантат — кость и различиях в биофизических и биомеханических характеристиках материала и костной ткани может возникать межповерхностное разрушение и клиническая дисфункция имплантата [4]. Недостатком известных вариантов остеоиндуктивных биологических матриксов является пониженная биосовместимость и неконтролируемая ускоренная резорбция в условиях организма [5–6].

Структура имплантационного материала должна копировать открытую бимодальную пористую структуру костной ткани, способствующую аngиогенезу, адсорбции протеинов и фиксации остеогенных клеток на контактных поверхностях имплантата [7–8].

Близким по структуре к естественной костной ткани материалом с аналогичной микроструктурой является ксеногенный костный матрикс (ККМ), состоящий из коллагена 1-го типа (органическая составляющая) и фосфатов кальция (минеральная составляющая). Важной технологической операцией при создании имплантатов на основе ККМ является химическая очистка межфибрillярного пространства от клеток жирового и белкового компонента исходного организма, что позволяет добиться биосовместимости и функционирования имплантата после операции. Кроме того, остеогенная активность костного матрикса возрастает при удалении минерального компонента костной ткани за счет «вскрытия» целого комплекса белковых факторов регенерации [9–10].

Существующие способы физико-химической обработки костной ткани преследуют цель повышения биосовместимости и остеоиндуктивности. Они предполагают применение различных химических реагентов: этилового спирта, диэтилового эфира, соляной кислоты, мочевины, ферментов, антибиотиков и др. Недостатком применения химических реагентов является присутствие остаточных примесей растворителей, что снижает биосовместимость и сохранность регенераторного потенциала имплантата.

Применение сверхкритических (СК) сред на заключительном этапе обработки создает значительные преимущества в сравнении с традиционным методом химической очистки исходного матрикса. Это обусловлено быстрым массопереносом в СК-средах благодаря низкой вязкости и высокому коэффициенту диффузии. В результате этого достигается приемлемая очистка самых труднодоступных участков матрикса.

Настоящая работа направлена на создание нового семейства остеозамещающих матриксов, имеющих повышенную биосовместимость и остеоиндуктивность, с использованием сверхкритических технологий.

Кроме того, мы предполагаем, что введение в межволоконное пространство комплекса антибиотик—полилактид способно пролонгировать антибактериальный эффект антибиотиков после имплантации матрикса в организм реципиента. По этой причине важным представляется исследование влияния полилактида на биосовместимость костного материала.

Цель данного этапа настоящего исследования — разработка методики получения высококостных матриксов с повышенной биологической совместимостью за счет дополнительной обработки частично деминерализованных предшественников в среде СК- CO_2 и введения в структуру матриксов лактидных полимеров различной молекулярной массы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика деминерализации ксеногенных костных блоков

Деминерализацию блоков ККМ размером $10 \times 10 \times 10$ мм (с отклонением $\pm 1,2$ мм по одной стороне, но не более $\pm 1,5$ мм по трем сторонам) и массой 0,25–1,05 г проводили в растворе соляной кислоты различной нормальности при пониженном давлении (200 торр) и интенсивном перемешивании (скорость вращения мешалки 100 об./мин) в течение 3–90 минут.

По истечении заданного времени раствор соляной кислоты сливали, блоки трижды промывали дистиллированной водой и высушивали лиофилизацией. На 1 г образца ККМ брали 50 мл раствора HCl.

Определение остаточного кальция в деминерализованных блоках

Определение остаточного кальция проводили весовым методом по массе фосфатов кальция, присутствующих в образцах до и после деминерализации. Массу

фосфатов кальция, оставшихся в образце после деминерализации, определяли взвешиванием образцов после термообработки при 850 °C в течение 3 ч для удаления органической составляющей. Количество фосфатов кальция, удаленных в ходе деминерализации, определяли по разности масс образцов до и после обработки. При вычислениях использовали следующие соотношения:

$$1) N = M_{\text{исх.}} - M_{\text{дем.}},$$

где N — масса удаленных фосфатов кальция, г; $M_{\text{исх.}}$ — масса исходного образца, г; $M_{\text{дем.}}$ — масса деминерализованного образца, г;

$$2) E = N + P,$$

где E — масса фосфатов кальция в образце до деминерализации, г; P — масса оставшихся после деминерализации фосфатов кальция, г;

$$3) M_{\text{Ca(исх.)}} = 0,3785 E,$$

$$M_{\text{Ca(дем.)}} = 0,3785 P,$$

где $M_{\text{Ca(исх.)}}$, $M_{\text{Ca(дем.)}}$ — масса кальция в исходном и деминерализованном образцах, соответственно, г; 0,3785 — средняя массовая доля кальция в биологическом гидроксиапатите брутто-формулы $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_x(\text{HPO}_4)_y(\text{OH})_{0,3}$, $x + y = 1,7$;

$$4) \text{Ca}_{\text{ост.}} = M_{\text{Ca(дем.)}} / M_{\text{Ca(исх.)}} \cdot 100 \%,$$

где $\text{Ca}_{\text{ост.}}$ — процентное содержание остаточного кальция.

Очистка костного матрикса с использованием сверхкритического CO_2

Для предварительной очистки образцов ККМ от жировых и белковых компонентов путем экстракции в аппарате Сокслета был протестирован ряд органических растворителей: диэтиловый эфир, ацетон, пентан, метиловый метилен, пентан, а также их различные сочетания в последовательных экстракциях. Найденные оптимальные условия экстракции: ацетон (8 ч), затем пентан (8 ч).

После экстракции костные блоки сушили на воздухе при комнатной температуре в течение 12 ч. Остатки растворителя удаляли в вакууме (40 мин при 10 мм рт. ст.). Окончательную очистку образцов проводили в проточном реакторе (рис. 1)

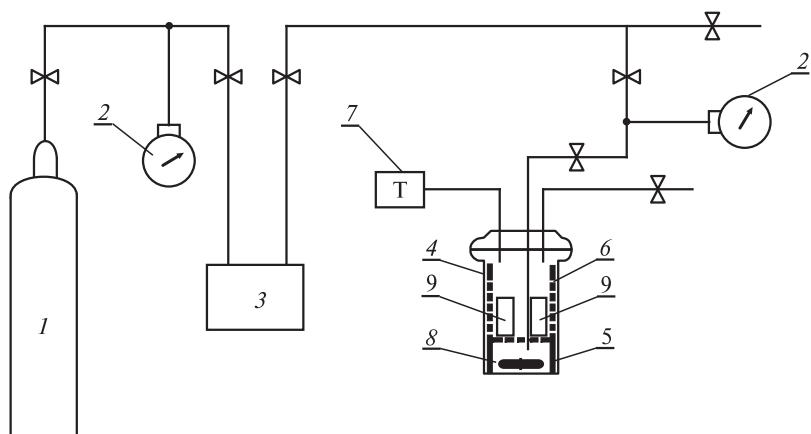


Рис. 1. Принципиальная схема установки с проточным реактором:

1 — баллон с CO_2 ; 2, 2' — манометры; 3 — насос высокого давления; 4 — проточный реактор; 5 — тefлоновое кольцо; 6 — перфорированный тefлоновый стакан; 7 — термопара; 8 — якорь магнитной мешалки; 9 — образцы матрикса

Сверхкритическая обработка ксеногенного костного матрикса в процессе изготовления имплантатов для остеосинтеза

при перемешивании при 46 или 53 °С и давлении СК-СО₂ 10 МПа, для подачи которого использовали насос высокого давления производства «TharSFC». Необходимое время экстракции во всех случаях определяли путем доведения образцов до постоянной массы по результатам контрольного взвешивания с точностью ±1 мг.

Введение резорбируемых полилактидов в пористую структуру костного матрикса

Для введения в поры очищенных образцов использовали полилактиды (ПЛА) марки PARASORB PDL 02 и 04 фирмы Corbion с молекулярными массами (M) 20 и 40 кДа соответственно. Поглощение раствора ПЛА объемом образцов происходило за счет их естественной пористости за один прием, что обеспечивало более равномерную адсорбцию полимера внутри имплантата. Повторная процедура увеличивает градиент концентрации полилактида по высоте образца за счет испарения растворителя. Предварительно очищенные в СК-СО₂ костные блоки помещали в раствор полимера в хлористом метилене (0,7 мл). После полного поглощения раствора остатки растворителя удаляли в вакууме (40 мин при 10 мм рт. ст.). Для дальнейших биологических экспериментов были приготовлены 4 серии образцов, содержащих ПЛА с M = 20 и 40 кДа в количестве 5 и 10 % от исходной массы костного блока.

Имплантация модифицированных матриксов в подкожную клетчатку лабораторных животных

Исследования на животных были выполнены при соблюдении международных правил биоэтики в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации и правил гуманного отношения к лабораторным животным и стандарта ГОСТ Р ISO 10993-2 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к условиям содержания животных».

Имплантация проводилась крысам линии Вистар 3-месячного возраста массой 250–300 г. Под общей анестезией в асептических условиях в проекции позвоночника выполнялся линейный доступ, через который в подкожной клетчатке формировались карманы для имплантации материала. Срок наблюдения составлял 30 суток, после чего исследуемые образцы матрикса иссекались и передавались на гистологическое исследование.

Изготовление гистологических срезов

Для проведения исследования образцы подготавливали по стандартной гистологической схеме Меркулова с деминерализацией [11]. Окраску срезов проводили гематоксилином и эозином. Изучение микрофотографий, полученных с цифрового микроскопа с 200-кратным увеличением, проводили с использованием программ ImageView, HistoMorph v.2.2.

Полученные гистологические данные служили для оценки биологической совместимости образцов по следующим параметрам: воспаление, интеграция с окружающими тканями и ангиогенез (образование новых кровеносных сосудов). Для удобства обработки результатов принята бальная система оценки.

Для воспаления:

3 балла — отсутствие воспаления;

2 балла — признаков гнойного воспаления нет, небольшая лейкоцитарная инфильтрация;

1 балл — выраженная лейкоцитарная инфильтрация, без очагов гнойного воспаления;

0 баллов — выраженное гнойное воспаление.

Для интеграции с окружающими тканями:

3 балла — образец окружен прозрачной тонкой соединительнотканной капсулой, частично или полностью резорбирован;

2 балла — на образце отмечается участки уплотнения соединительно-тканной капсулы, резорбция не выражена;

1 балл — образец частично окружен плотной неоформленной соединительнотканной капсулой;

0 баллов — образец полностью окружен плотной неоформленной соединительной тканью, ограничен от собственных тканей.

Для ангиогенеза:

3 балла — площадь новообразованных сосудов больше 5 %;

2 балла — площадь новообразованных сосудов в пределах 3—5 %;

1 балла — площадь новообразованных сосудов в пределах 2—4 %;

0 баллов — площадь новообразованных сосудов в пределах 1,5—3 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С целью получения образцов ККМ с различным содержанием кальция проводили их обработку соляной кислотой концентрации 0,15, 0,3 и 0,6 н в течение различного времени, в результате чего получены блоки различной степени деминерализации.

Установлено, что при использовании блоков с массой 0,6—1 г для получения частично деминерализованных образцов с остаточным содержанием кальция 70—90 %, следует проводить обработку раствором HCl с концентрацией 0,15 н в течение 10 мин или 0,3 н в течение 3 мин. Для получения частично деминерализованных блоков с остаточным содержанием кальция 40—60 и 10—30 % можно проводить обработку 0,3 и 0,6 н растворами HCl в течение 10—60 и 20—90 мин, соответственно, в зависимости от массы блока.

Данные об изменении массы образцов ККМ при последовательной обработке органическими растворителями и СК-СО₂ приведены в табл. 1. Дополнительное

Таблица 1

Последовательное изменение массы костных блоков при экстракции в оптимизированных условиях

№	Начальная масса, г	Масса после экстракции, г		Уменьшение массы после экстракции, %	Условия экстракции в СО ₂		Масса после экстракции СК-СО ₂	Суммарное уменьшение массы, %
		ацетоном	пентаном		время, ч	температура, °C		
1	0,929	0,349	— *	62,43	14	46	0,342	63,19
2	1,105	0,470	0,464	58,01	8	46	0,463	58,10
3	1,092	0,448	0,443	59,43	6	53	0,441	59,62
4	0,806	0,284	0,282	65,01	6	53	0,28	65,26
5	1,474	0,699	0,695	52,85	6	53	0,694	52,92

* Без использования пентана.

Сверхкритическая обработка ксеногенного костного матрикса в процессе изготовления имплантатов для остеосинтеза

Таблица 2

Влияние молекулярной массы и концентрации ПЛА на биосовместимость

№ образца	Содержание ПЛА, %	Молекулярная масса ПЛА, кДа	Параметры в баллах**			
			воспаление	интеграция с окружающими тканями	ангиогенез	сумма
1*	0	—	3,00	1,25	0,50	4,75
2	0	—	3,00	1,75	0,75	5,50
3	5	40	3,00	2,25	2,75	8,00
4	5	20	3,00	2,25	2,25	7,50
5	10	20	3,00	2,00	1,75	6,75

* Образец обработан органическими растворителями, но не обработан СК-СО₂.

** Усредненные данные по 10 образцам.

использование пентана позволило сократить время обработки в среде СК-СО₂ до достижения постоянной массы с 14 до 8 ч при 46°C и до 6 ч при 53°C.

С целью установления зависимости параметров биосовместимости матриксов от условий обработки в работе использовались образцы ККМ с низкой степенью деминерализации (с содержанием остаточного кальция 70–80 %), что обычно позволяет в более коротких экспериментах *in vivo* оценить скорость ангиогенеза и уровень биосовместимости [12].

Результаты исследований на биосовместимость частично деминерализованных образцов ККМ, обработанных органическими растворителями, доочищенных в СК-СО₂ и дополнительно обработанных нанесением различных количеств ПЛА с различающейся молекулярной массой приведены в табл. 2.

Полученные данные показывают, что дополнительная очистка в среде СК-СО₂ приводит к повышению биосовместимости матрикса. В исследованной серии наилучшими параметрами биосовместимости обладает образец, полученный введением 5 % ПЛА (молекулярная масса 40 кДа) в костный матрикс, дополнительно очищенный в СК-СО₂.

Таким образом, представленная методика очистки биологических матриксов с использованием СК-СО₂ может позволить получить имплантат с повышенной потенцией к ангиогенезу, большей склонностью к интеграции с окружающими тканями и сниженной способностью вызывать воспалительную реакцию. Введение биорезорбируемых полимеров (полилактидов) в пористую структуру костного матрикса приводит к дальнейшему повышению его биологической совместимости.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Российскому Фонду Фундаментальных Исследований (проект 18-29-06010) за финансовую поддержку и ООО ИПК «ЛИК» за техническую поддержку настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuan H., De Brujin J.D., Li Y., Feng J., Yang Z., De Groot K., Zhang X. // J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2001. Vol. 12. P. 7.

2. Kuemmerle J.M., Oberle A., Oechslin C., Bohner M., Frei C., Boecken I., von Rechenberg B. // J. Craniomaxillofac. Surg. 2005. No 33. P. 37.
3. Habibovic P., Sees T.M., van den Doel M.A., van Blitterswijk C.A., de Groot K. // J. Biomed. Mater. Res. 2006. Vol. A77. P. 747.
4. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. М.: Техносфера, 2007. 304 с.
5. Bone Graft Substitutes-Global Pipeline Analysis, Competitive Landscape and Market Forecast to 2017 // GDME0097MAR. 2011. Jul. P. 1–88.
6. Reddi A.H. // Cytokine Growth Factor Rev. 2005. Vol. 16. P. 249.
7. Takagi S., Chow L. // J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2001. Vol. 12. P. 135.
8. Yin Y., Ye F., Yao K., Cui J., Song X. // J. Mater. Sci.: Mater. Med. 2003. Vol. 14. P. 255.
9. Pietrzak W.S., Ali S.N., Chitturi D., Jacob M., Woodell-May J.E. // Cell Tissue Bank. 2011. Vol. 12. P. 81.
10. Iwata H., Sakano S., Itoh T., Bauer T.W. // Clin. Orthop. Relat. Res. 2002. No 395. P. 99.
11. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. М.: МедГИЗ, 1956. С. 32.
12. Кириллова И.А., Садовая М.А., Подорожная В.Т. Хирургия позвоночника. 2012. Т. 3. С. 72.

**SUPERCRITICAL PROCESSING OF XENOCALIC BONE MATRIX
IN THE TECHNOLOGY OF MANUFACTURE OF IMPLANTS
FOR OSTEOSYNTHESIS**

**¹L.V. Erkhova, ¹Yu.M. Panov, ²N.S Gavryushenko, ²V.V. Zaitsev,
^{2,3}Yu.S. Lukina, ²D.V. Smolentsev, ²K.A. Vorob'ev, ¹D.P. Krut'ko,
¹D.A. Lemenovskii**

¹M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, Russia
²N.N. Priorov Central Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Moscow, Russia
³D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

A method for producing new generation of xenogenic biomatrixes, which are characterized by their special purity and suitable for implantation in a living organism, is proposed by additional treatment with supercritical carbon dioxide. The obtained highly pure biomatrixes were modified by introducing dosed amounts of polylactides with a molecular weight of 20 and 40 KDa into their pore space. In vivo testing of the obtained materials showed their high biocompatibility with varying degrees of integration with surrounding tissues.

Key words: supercritical carbon dioxide, biological matrix, xenogenic bone tissue, resorbability, polylactide.
