

6. *Leng L.Z., Rubin D.G., Patsalides A., Riina H.A.* Fusion of intraoperative three-dimensional rotational angiography and flat-panel detector computed tomography for cerebrovascular neuronavigation // *World Neurosurg.* 2013. Vol. 79. PP. 504-509.
7. *Бывальцев В.А.* Превентивная реваскуляризация для профилактики ишемических и геморрагических инсультов / Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2010.
8. *Iihara K., Satow T., Matsushige T., Kataoka H., Nakajima N., Fukuda K.* Hybrid operating room for the treatment of complex neurovascular and brachiocephalic lesions // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* 2012. Vol. 65. PP. 178-183.
9. *Fandino J., Taussky P., Marbacher S., Muroi C., Diepers M., Fathi A.* The concept of a hybrid operating room: Applications in cerebrovascular surgery // *Acta Neurochirurgica Supplement.* 2013. Vol. 115. PP. 113-117.
10. *Yamakawa K., Kiyama S., Murayama Y., Uezono S.* Incidence and neurological outcomes of aneurysm rupture during interventional neuroradiology procedures in a hybrid operating suite // *J. Anesth.* 2012. Vol. 26. PP. 592-594.
11. *Murayama Y., Arakawa H., Ishibashi T., Kawamura D., Ebara M., Irie K., Takao H.* Combined surgical and endovascular treatment of complex cerebrovascular diseases in the hybrid operating room // *J. Neurointerv. Surg.* 2013. Vol. 5. PP. 489-493.

Вадим Анатольевич Бывальцев,
 д-р мед. наук, зав. курсом нейрохирургии,
 ФГБОУ ВО «ИГМУ»,
 руководитель научно-клинического
 отдела нейрохирургии ФГБНУ «ИНЦХТ»,
 профессор кафедры травматологии,
 ортопедии и нейрохирургии,
 ГБОУ ДПО «ИГМАПО»,
 гл. нейрохирург,
 ОАО «РЖД»,
 руководитель Центра нейрохирургии,
 НУЗ «ДКБ»,
Евгений Георгиевич Бельх,
 ассистент курса нейрохирургии,
 ФГБОУ ВО «ИГМУ»,
 г. Иркутск,
Кеничио Кикута,
 доктор медицины, профессор,
 Фукуйский медицинский университет,
 г. Фукуи, Япония,
Иван Андреевич Степанов,
 аспирант курса нейрохирургии,
 ФГБОУ ВО «ИГМУ»,
 г. Иркутск,
 e-mail: edmoilers@mail.ru

*А.Т. Телешев, В.Н. Горшенев, М.А. Яковлева, В.А. Фомичев,
 Р.С. Фадеев, В.В. Минайчев, В.С. Акатов*

Гидроксиапатит для замещения дефектов костной ткани

Аннотация

Осуществлен синтез гидроксиапатита в условиях механоакустической обработки водной реакционной смеси гидрофосфата аммония и нитрата кальция с помощью промышленно значимого роторно-пульсационного аппарата. Установлено, что механоакустическая обработка реакционной смеси позволяет сформировать наноразмерные частицы гидроксиапатита, имеющие преимущественно средний диаметр около 20 нм. Предложена очистка технического гидроксиапатита от следов нитрата аммония путем его термической обработки при температуре 350 °С. Установлено, что кристаллическая фаза гидроксиапатита не является доминирующей в его структуре. Пористость гидроксиапатита составляет величину около 75 % при среднем радиусе поры 2,8 × 103 нм. Установлено, что термически обработанный гидроксиапатит в водной среде приобретает пастообразную форму. Показано, что паста гидроксиапатита не обладает цитотоксичностью, не препятствует адгезии клеток, однако практически полностью ингибирует их распластывание.

Введение

Костная ткань – живой гетерогенный материал, состоящий из клеток и внеклеточного матрикса, представляющего собой сочетание коллагеновых фибрилл с минеральной фазой (гидроксиапатит – ГАП, карбонатапатит) и воды [1]-[3]. Органическая фибриллярная матрица в основном состоит из коллагеновых волокон первого типа [4]. Волокна коллагена эластичны и устойчивы к излому в отличие от минеральной фазы, определяющей прочность костной ткани [5], [6]. Комбинация высокой ударной вязкости коллагена и высокой жесткости минеральной части обеспечивает высокие механические свойства кости [7]. Искусственные конструкции из композитных материалов, включающие в себя органическую и минеральную части, представляют большой интерес для развития производства биоматериалов, которые имитируют структуру и свойства натуральной костной ткани и пригодны для регенерации опорно-двигательного аппарата. Многочисленные данные [8]-[10] показывают высокую биосовместимость композиций, сочетающих ГАП и коллаген. При создании искусственных биокомпозиций технологические вопросы управления формированием структуры

материала остаются нерешенными. На механическую прочность существенное влияние оказывает степень дисперсности минеральной части композиции. При этом синтетический ГАП, частицы которого характеризуются высокой дисперсностью, может в большей степени способствовать остеобластной дифференцировке мезенхимальных клеток [11], [12].

Целью рассматриваемой работы являлась оптимизация синтеза ГАП, пригодного для заполнения дефектов костной ткани, и создания на его основе osteoconductive и osteoinductive материалов.

Экспериментальная часть

Процесс получения ГАП осуществлялся включением в технологическую схему роторно-пульсационного аппарата (РПА) (ООО НПФ «Авиатехника») [13]. Для получения ГАП соответствующей чистоты наиболее приемлемой с позиций контроля за процессом является хорошо известная (например [9], [14]) реакция обмена между диаммонийфосфатом и нитратом кальция. Синтез ГАП с помощью РПА осуществляли следующим образом. Тетрагидрат нитрата кальция в количестве 450,6 г растворяли в 5 л дистиллированной воды, добавляли концен-

трированный раствор аммиака до pH 10,1 (раствор № 1). Для приготовления раствора № 2 диаммонийфосфат в количестве 151 г растворяли в 2 л дистиллированной воды и концентрированным раствором аммиака задавали величину pH = 10,0. При включенном охлаждении в загрузочную емкость помещали раствор № 1 и запускали двигатель аппарата (2500 мин⁻¹). Со скоростью 1...0,5 л/мин в загрузочную емкость вводили раствор № 2. Смесь обрабатывали в рабочем режиме аппарата 2 мин и сливали.

Очистка ГАП декантацией. Полученную пульпу, содержащую ГАП, отстаивали, жидкость декантировали, осадок промывали дистиллированной водой и повторяли отстаивание, декантацию и промывку. Осадок переносили на вакуум-фильтр, фильтровали, ретенат промывали спиртом и горячей водой до pH промывной воды, равного 7,5. Остаток сушили при температуре 120 °С в течение 3 ч.

Очистка ГАП в режиме центрифугирования проводилась на установке «Allegro 64R» («Beckman») в режиме 6000 мин⁻¹, по 15...20 мин при 10 °С.

При **термической очистке ГАП** отфильтрованная пульпа подвергалась нагреванию при 350 °С в течение 30 мин.

Размеры частиц дисперсной фазы оценивались с помощью метода динамического светорассеяния на приборе «Zetasizer Nano» фирмы «Malvern». ИК-спектры снимали в режиме отражения на спектрометре «Nicolet 380», стекло ZnSe. Элементный анализ проводили на CHN-анализаторе «Eager 300». Калориметрические кривые были получены на приборе «Netzsch», модель DSC-204 F1. Рентгенофазовый анализ проводили на дифрактометре «Емма» фирмы «GBC Scientific Equipment Pty Ltd.». Использовали сканирующий электронный микроскоп «Neon 40 EsB».

Исследование биосовместимости пасты ГАП *in vitro*

Использовались эмбриональные фибробласты мышцы линии NIH/3T3, которые были получены из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали в питательной среде DMEM/F12 («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», США), 80 мкг/мл сульфата гентамицина («Sigma-Aldrich», США), при 37 °С, в условиях 5%-ного содержания CO₂ в воздухе. Для исследования биосовместимости пасты ГАП *in vitro* клетки высевали на стекла для микроскопии толщиной 170 мкм. Предварительно половину стекла покрывали пастой ГАП, другую половину оставляли непокрытой. Клетки высевали на поверхности стекло плотностью 1 · 10⁴ клеток/см². Через 72 ч от момента посева клеток проводили исследование цитотоксического действия, митотической активности и микрофотографирование клеток. В качестве образца сравнения использовали коммерческую пасту «ReproBone novo» («Ceramisys», Англия).

Цитотоксический тест

Число живых и погибших клеток определяли с помощью флуоресцентной микроскопии, используя окрашивание флуоресцентными красителями кальцеином АМ («Sigma-Aldrich», США) и йодидом пропидия («Sigma-Aldrich», США). Клетки окрашивали в среде культивирования, содержащей 1 мкг/мл кальцеина АМ и 2 мкг/мл йодида пропидия, в течение 25 мин при 37 °С. Для анализа подсчитывали не менее 500 клеток. Анализ количества живых и погибших клеток осуществляли с использованием флуоресцентного микроскопа DM 6000 («Leica», Германия). Также для получения изображений клетки окрашивали с помощью флуоресцентных красителей «Hoechst 33342» («Sigma-Aldrich», США) и акридинового оранжевого («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1 и 2 мкг/мл соответственно, в течение 10 мин, при 37 °С. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа TCSSP5 («Leica», Германия).

Анализ митотической активности

Число митотических клеток определяли с помощью флуоресцентной микроскопии, используя прижизненное окраши-

вание флуоресцентным ядерным красителем «Hoechst 33342» («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1 мкг/мл. Митотические клетки выявляли по распределению хроматина, характерному для профазы, метафазы, анафазы и телофазы, с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 («Leica», Германия). Для анализа подсчитывали не менее 500 клеток. Митотический индекс (MI) вычисляли по формуле $MI = (P + M + A + T) / N \times 100 \%$, где $(P + M + A + T)$ – сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы, а N – общее число проанализированных клеток.

Статистический анализ

Результаты опытов представляли в виде среднего ± стандартная ошибка ($M \pm SEM$). Опыты проводили не менее чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с использованием критерия Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

Установлено, что механоакустическая активация обменной реакции между диаммонийфосфатом и нитратом кальция позволяет сформировать наноразмерные частицы ГАП. Следует отметить, что уменьшение скорости подачи раствора диаммонийфосфата в реактор и увеличение скорости перемешивания реагентов приводит к увеличению дисперсности. Так, при скорости вращения ротора РПА 3000 мин⁻¹ и скорости введения в реактор раствора диаммонийфосфата 0,5 л/мин была получена дисперсия, характеризующаяся частицами, имеющими средний диаметр примерно 20 нм. Массовая доля таких частиц в реакционной среде составляла ≈ 90 %. В работе реализованы следующие варианты получения чистого ГАП: очистка ГАП декантацией, очистка ГАП с помощью центрифугирования (этот подход в отличие от седиментации в гравитационном поле позволяет увеличить скорость процесса очистки). Очистка ГАП путем его промывки связана с большим расходом воды и не может быть признана эффективной. Интерес представляет термическая обработка ГАП с целью очистки его от примесей, которая использовалась в работе [14]. Показано, что образец ГАП, загрязненный нитратом аммония, может быть успешно очищен термической обработкой при 350 °С в течение 30 мин. Так, фильтрование пульпы, однократная промывка ретената водой, его сушка при температуре 120 °С в течение 3 ч приводят к образцу технического ГАП, загрязненного нитратом аммония (полосы поглощения 1330, 820 см⁻¹). Для термически обработанного образца ГАП в ИК-спектре отражения эти полосы не обнаруживаются. Данные элементного анализа очищенного ГАП подтверждают полное отсутствие азотсодержащих примесей в термообработанном ГАП (эталон – нитрат аммония). Дополнительным подтверждением отсутствия нитрата аммония в очищенных образцах ГАП служат результаты калориметрического эксперимента (рис. 1).

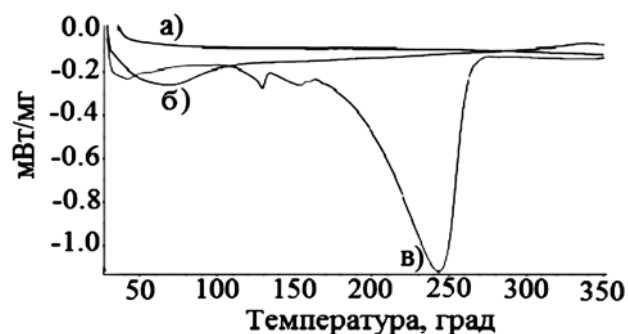


Рис. 1. Калориметрические кривые: а) ГАП, прогретого при 350 °С; б) ГАП, очищенного промывкой; в) нитрата аммония

ГАП, полученный реакцией обмена и подвергнутый термообработке, переходит в ксерогель, имеющий характерную голубую люминесценцию. Дифрактограмма термообработанного образца ГАП представлена на рис. 2. Идентифицирована кристаллическая фаза ГАП, имеющая элементарную гексаго-

нальную ячейку с размерами (Å): а) = 9,4257; б) = 6,8853. Пространственная группа P63/m.

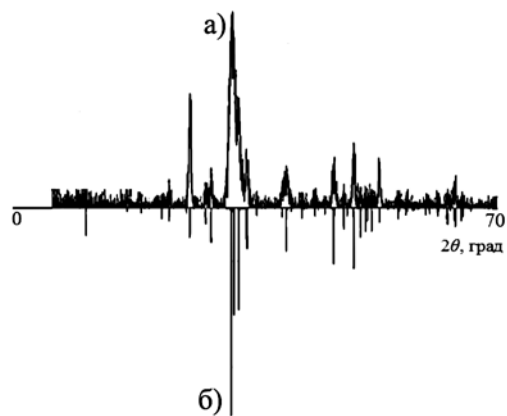


Рис. 2. Дифрактограммы: а) термообработанного ГАП; б) литературная дифрактограмма ГАП [15]

С помощью метода эталонной контактной порометрии по изменению веса образца, обработанного под вакуумом октаном, показано, что пористость термообработанного ГАП составляет величину около 75 % при среднем радиусе поры $2,8 \cdot 10^3$ нм. ГАП, очищенный от примесей и диспергированный в воде с образованием пастообразной формы, склонен к изменению своих свойств во времени. Эти изменения, в частности, направлены в сторону укрупнения частиц дисперсной фазы. Так, после выдержки дисперсии очищенного ГАП в водной среде в течение 30 дней при температуре 20 °С средний диаметр частиц возрастает до 44 нм.

Определено падение дзета-потенциала с +30 мВ для дисперсии неочищенного гидроксиапатита до значения около +5 мВ, характерного для дисперсии очищенного гидроксиапатита.

Изучение биосовместимости пасты ГАП проводили через 72 ч после начала культивирования клеток. На рис. 3а представлены результаты изучения биосовместимости. Показано, что паста ГАП, как и паста «ReproBone novo», не обладает цитотоксическим действием. Количество погибших клеток при культивировании на данных образцах не отличалось от количества погибших клеток при культивировании на поверхности культурального пластика. Изучение митотической активности клеток, культивируемых на стеклах, покрытых пастой ГАП, проводили через 72 ч после начала культивирования. Показано, что клетки на поверхности пасты ГАП, как и пасты «ReproBone novo», не способны к делению. При культивировании клеток на культуральном пластике митотический индекс после 72 ч культивирования составлял $(4,1 \pm 0,8)$ % (рис. 3б). С учетом полученных данных сделано предположение, что пасты могут препятствовать адгезии и расщеплению клеток на

их поверхности. Для проверки данного предположения был проведен морфологический анализ адгезии и расщепления клеток на поверхности паст ГАП и «ReproBone novo». Установлено, что клетки прикрепляются к поверхности паст, однако к расщеплению на пастах способна лишь часть клеток, а именно около (35 ± 5) % от их общего количества.

Эта особенность была выявлена как для разработанной пасты ГАП, так и для пасты «ReproBone novo».

Выводы

Установлено, что механоакустическая обработка реакционной смеси позволяет сформировать наноразмерные частицы гидроксиапатита, имеющие преимущественно средний диаметр около 20 нм. Предложена очистка технического ГАП от следов нитрата аммония путем его термической обработки при температуре 350 °С. Установлено, что паста ГАП не обладает цитотоксическим действием, не препятствует адгезии клеток, однако значительно ингибирует расщепление клеток и их митотическую активность.

Список литературы:

1. Boskey A.L. Bone Mineralization. In: Bone Biomechanics. Ed. by Cowin S.C. – Boca Raton CRC Press, 2001. № 3. PP. 5.1-5.34.
2. Harada S.I., Rodan G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass // Nature. 2003. Vol. 423. № 6937. PP. 349-355.
3. Weiner S., Wagner H.D. The material bone: Structure-mechanical function relations // Annual Review of Materials Science. 1998. Vol. 28. № 1. PP. 271-298.
4. Sierpowska J., Lammi M.J., Hakulinen M.A., Jurvelin J.S., Lappalainen R., Toyras J. Effect of human trabecular bone composition on its electrical properties // Medical Engineering and Physics. 2007. Vol. 29. № 8. PP. 845-852.
5. Boivin G., Meunier P.J. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization // J. Musculoskel Neuron Interact. 2002. Vol. 2. № 6. PP. 538-543.
6. Favus M.J. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral // Metabolism American Society for Bone and Mineral Research. 2003. № 5.
7. de Carmejane O., Morris M.D., Davis M.K. et al. Bone chemical structure response to mechanical stress studied by high pressure Raman spectroscopy // Calcified Tissue Int. 2005. Vol. 76. № 3. PP. 207-213.
8. Горшенев В.Н., Телешев А.Т., Ершов Ю.А., Казиев Г.З., Колесов В.В., Склянчук Е.Д. Способ получения пористого костного биокомпозита / Патент РФ № 2482880, 2013. БИ № 15. 2013. 167 с.
9. Горшенев В.Н., Ершов Ю.А., Телешев А.Т., Склянчук Е.Д., Просвирич А.А., Григорьев С.А. Гидроксиапатитовые био-

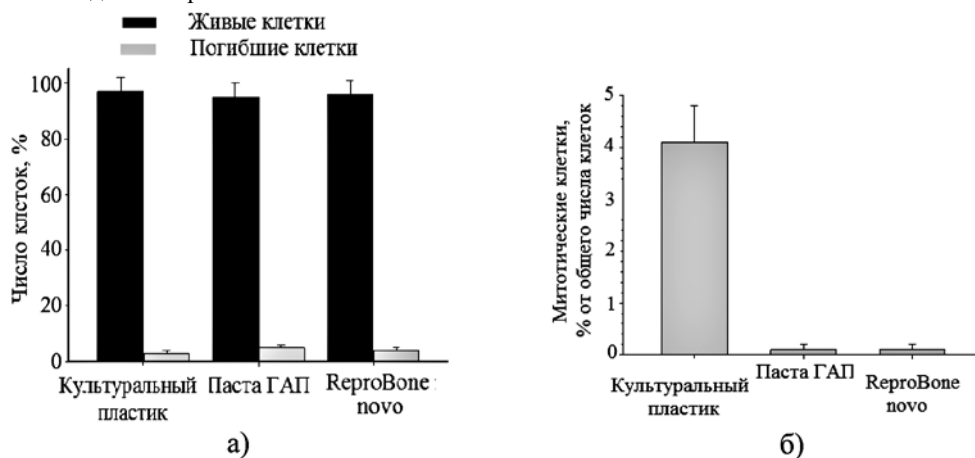


Рис. 3. Жизнеспособность клеток на пасте ГАП и пасте «ReproBone novo» (а); отсутствие митотической активности клеток, культивируемых на поверхности пасты ГАП и «ReproBone novo» (б)

композиты медицинского назначения // Медицинская техника. 2014. № 1. С. 30-32.

10. Склянчук Е.Д., Просвиринов А.А., Малышев И.Ю., Фадеева И.С., Фесенко Н.И., Горшенин В.Н., Телешев А.Т., Ершов Ю.А., Гурьев В.В. Индуцированные коллаген-апатитовым биокомпозитом функциональные ответы перитонеальных макрофагов // Технологии живых систем. 2014. № 6. С. 20-35.
11. Huang J., Best S., Bonfield W., Brooks R.A., Rushton N., Jayasinghe S.N. et al. In vitro assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2004. Vol. 15. PP. 441-445.
12. Pezzatini S., Solito R., Morbidelli L., Lamponi S., Boanini E., Bigi A. et al. The effect of hydroxyapatite nanocrystals on microvascular endothelial cell viability and functions // J. Biomed. Mater. Res. 2006. Vol. 76 A. PP. 656-663.
13. Кесель Б.А., Федоров А.Д., Гимушин И.Ф., Кесель Б.А., Федоров А.Д., Гимушин И.Ф., Волков Г.А., Гатауллин Р.Ш., Воскобойников Д.В., Весельев Д.А. Роторно-пульсационный аппарат (РПА) / Патент № 2166986 РФ. БИ № 11. 2006.
14. Ковалева Е.С., Филиппов Я.Ю., Путляев В.И., Третьяков Ю.Д., Иванов В.К., Силкин Н.И., Галимуллина Л.Ф., Родионов А.А., Мамин Г.В., Орлинский С.Б., Салахов М.Х. Биорезорбируемые порошковые материалы на основе $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$ // Ученые записки Казанского университета. Серия «Естественные науки». 2010. Т. 152. № 1. С. 79-98.
15. Saenger A.T., Kuhs W.F. Golden Book of Phase Transitions // Wrocław. 2002. Vol. 1. PP. 100-123.

Андрей Терентьевич Телешев,
д-р хим. наук, профессор,
Московский педагогический
государственный университет,
Владимир Николаевич Горшенин,
канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
Марина Андреевна Яковлева,
канд. биолог. наук, научный сотрудник,
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН,
Владимир Андреевич Фомичев,
студент,
Московский педагогический
государственный университет,
г. Москва,
Роман Сергеевич Фадеев,
канд. биолог. наук, ст. научный сотрудник,
Институт теоретической
и экспериментальной биофизики РАН,
Владислав Валентинович Минайчев,
студент,
Пуцинский государственный
естественно-научный институт,
Владимир Семенович Акатов,
д-р физ.-мат. наук, профессор,
Институт теоретической
и экспериментальной биофизики РАН,
г. Пуццо, Московская обл.,
e-mail: lina.invers@gmail.com

И.Б. Римшан, Н.Н. Журбина, У.Е. Курилова, Д.И. Рябкин, А.Ю. Герасименко

Биосовместимый наноматериал для восстановления целостности рассеченных биологических тканей

Аннотация

Описана технология получения биосовместимого наноматериала для лазерного восстановления целостности рассеченных фрагментов биоткани – трахеи крупно-рогатого скота. Исследована прочность на разрыв швов, полученных путем лазерного облучения биосовместимого наноматериала, нанесенного на края рассеченных биотканей. Максимальная прочность на разрыв лазерных швов при использовании биосовместимого наноматериала, состоящего из 25 % мас. альбумина, 1 % мас. коллагена, 1 % мас. многостенных углеродных нанотрубок и 0,1 % мас. красителя индоцианина зеленого, достигала ~0,196 МПа. Изучена биосовместимость наноматериала методом МТТ-теста. Налучшее влияние на пролиферативную активность клеток оказало разведение биосовместимого наноматериала в культуральной среде с клетками до концентраций 1/10, 1/20, 1/160 и 1/320.

Введение

Одной из важных задач современной хирургии является создание новых методов восстановления целостности рассеченных биологических тканей, так как существующие традиционные способы с использованием шовных материалов, сшивающих аппаратов, скобных соединений, клеевых композиций и других средств имеют ряд недостатков [1], [2]. В последнее время уделяется большое внимание методу лазерного восстановления целостности биологических тканей. Данный метод обладает важными преимуществами в хирургии: быстрое заживление ран, сокращение времени операции, снижение вероятности появления фиброза или его полное отсутствие [3]-[5].

На прочность хирургических лазерных швов биологических тканей оказывают влияние режим работы лазера, характеристики биотканей, контроль температуры ткани. Сложностей, связанных с подбором режима лазерной обработки, можно избежать при использовании специальных биосовместимых материалов в жидком или гелеобразном виде, кото-

рые изготавливаются с заданными агрегатными, оптическими и биологическими характеристиками. Данные материалы наносятся на поверхности соединяемых участков ткани, далее поверхности сжимаются друг с другом и производится облучение лазером. Процесс лазерной обработки должен проходить так, чтобы при минимальном количестве поглощенной энергии лазерного излучения происходила коагуляция нанесенного биосовместимого материала, соединяющего участки биоткани. Различные добавки к связующим веществам в составе биосовместимых материалов существенно влияют на прочность и качество лазерных швов [6]-[8]. Высокие значения прочности на разрыв достигаются при использовании наполнителей из наночастиц [9]. В последние годы одним из способов повышения прочности биосовместимых материалов является добавление в их состав углеродных нанотрубок (УНТ). Данные частицы способны значительно увеличить прочность материалов, а также могут выступать в роли хромофоров, поглощая лазерное излучение, тем самым не допуская перегрева биотканей.