

25. Гринвальд В.М. Исследование принципов построения биотехнической системы и разработка аппаратуры экстракорпорального искусственного очищения крови / Дис. ... д-ра техн. наук. – М., 2012. 387 с.
26. Эвентов В.Л. Теоретическое обоснование, экспериментальные исследования, создание и внедрение в клиническую практику аппаратуры для гемодиализа с использованием электрохимических методов / Дис. ... д-ра техн. наук. – М., 2003. 274 с.

Николай Александрович Базаев,
канд. техн. наук, начальник,
научно-исследовательская лаборатория,
Институт биомедицинских систем,
ФГАОУ ВО «НИУ «МИЭТ»,
г. Зеленоград, г. Москва,
Виктор Матвеевич Гринвальд,
д-р техн. наук, гл. научный сотрудник,
Сергей Васильевич Селищев,
д-р физ.-мат. наук, профессор, директор,
Институт биомедицинских систем,
ФГАОУ ВО «НИУ «МИЭТ»,
г. Зеленоград, г. Москва,
e-mail: vicgrin@gmail.com

Д.В. Смоленцев, М.В. Гурин, А.А. Венедиктов, С.В. Евдокимов, Р.А. Фадеев

Получение ксеногенной костной крошки для имплантаций с помощью сверхкритической флюидной экстракции

Аннотация

Была разработана и внедрена технология получения остеопластического материала – ксеногенной костной крошки – для использования в качестве имплантационного материала в стоматологии, парадонтологии, челюстно-лицевой хирургии и других областях медицины. Отличительной особенностью данной технологии является применение метода сверхкритической флюидной экстракции для глубокой делипидизации и очистки материала. Полученный материал по предложенной технологии был исследован в модели *in vitro* на цитотоксичность. Результаты исследования показали, что материал обладает достоверно низкой цитотоксичностью, вполне допустимой для производства имплантируемого изделия в медицинских целях.

Известно, что для достижения оптимальной биологической совместимости имплантируемая конструкция по своим физико-химическим и структурно-морфологическим характеристикам должна приближаться к замещаемым ею структурам. В данном случае речь идет о костной ткани, поэтому в идеале поверхность имплантата должна представлять собой материал на основе биоактивного материала, обладающего высоким остеointegrационным потенциалом [1]. Идеальный имплантат должен иметь следующие характеристики: высокую остеогенную потенцию, отсутствие антигенности, простоту получения, удобство для клинического применения, постоянную доступность, способность к биodeградации, не препятствовать костеобразованию [2]. В зависимости от происхождения костнопластические материалы подразделяют на следующие группы:

- 1) аутогенные (донором является сам пациент);
- 2) аллогенные (донором является другой человек);
- 3) аллопластические (синтетические, в том числе полученные из природных минералов, кораллов);
- 4) ксеногенные (донором является животное).

Аутогенная кость имеет важные преимущества перед другими костнопластическими материалами, так как только в ней содержатся жизнеспособные остеобласты и костные стволовые клетки, отсутствуют антигенные протеины. При использовании свободных аутотрансплантатов морфологически установлено, что остеогенез происходит традиционно, аналогично заживлению переломов. Однако забор такой кости сопряжен с дополнительным травмированием пациента и не всегда возможен из-за индивидуальных клинических особенностей.

При пересадке в ткани аллогенной кости происходит развитие кости от костного ложа. Иначе говоря, аллогенная кость, являясь остеокондуктивным материалом, играет роль матрикса, хотя многие исследователи признают за ней и остеиндуктивные свойства. Однако современные методы обработки аллокости пока не могут полностью исключить сохранение факторов, негативно влияющих на безопасность и эффективность

материала, а забор трупного сырья осложнен морально-этическим аспектом.

Аллопластические (синтетические) биоматериалы были разработаны в качестве недорогой альтернативы биологическим костнозамещающим материалам. Первое упоминание о применении аллопластического костнозамещающего имплантата (синтетический гидроксипатит) относится к концу 1970-х гг. Однако этим материалам оказалась присуща специфическая особенность резорбции, что ограничивает их применение в клинической практике.

Ксеноимплантаты, как и алло- и аутоматериалы, состоят из коллагеновых волокон и минеральной составляющей костной ткани. В организме человека коллаген находится в сухожилиях, хрящах, кости. Как и алло-, ксеноматериалы обладают способностью резорбироваться в тканях и стимулировать регенеративные процессы, в том числе в кости. Чаще всего используют ксеноимплантаты из бычьей кости, прошедшей специальные обработки, в результате чего устраняется антигенное воздействие ксеноимплантата в тканях организма. [3]. Стоит отметить, что естественная обработанная кость является одним из предпочтительных материалов в реконструктивной хирургии [4]. Это связано с наличием в естественной кости особых белков, стимулирующих рост костной ткани. Данная группа белков называется костными морфогенетическими белками, или факторами роста кости [5]. Для имплантации, прежде всего стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, большой интерес представляет использование в качестве материала для заполнения дефектов недеминерализованная костная крошка, которая служит хорошей матрицей для образования собственной кости в месте дефекта и вызывает остеогенез в зоне дефекта, т. е. обладает остеиндуктивными свойствами [6].

На сегодня известно много способов обработки материала, основанных на химических, термических и энзимных методах, целью которых является депротеинизация и прочая очистка материала, т. е. разрушение и выведение антигенных бел-

ков, не относящихся к коллагеновым белкам или белкам – факторам роста [7]. Но многие из них не способны справиться с поставленной задачей, особенно если это касается производства больших партий материала, поскольку часто такие белки залегают глубоко в костных порах, а сверху закрыты толстым липидным слоем, обладающим низкой смачиваемостью и способным также обладать иммуногенностью. Поэтому депротенинизацию необходимо совмещать с делипидизацией с целью глубокого проникновения в костные поры для качественного выведения липидов и антигенных протеинов кости с сохранением при этом естественных свойств коллагеновой матрицы. Другие же способы, например термические, обуславливают удаление всех иммуногенных молекулярных композиций, но снижают эффективность применения материала, разрушая коллагеновые структуры. Из мирового опыта известен способ обработки ксеногенного материала (бычьей кости) методом сверхкритической флюидной экстракции при $P = 250$ атм., $T = 50$ °С, потоке 10 г/мин, расходе газа в 100...250 г на 1 г кости с последующей обработкой в растворах перекиси водорода. На начальной стадии осуществлялась глубокая очистка материала от липидов и прочих полярных биомолекул, а также веществ, выносящихся потоком диоксида углерода; затем наступала стадия депротенинизации в растворах перекиси водорода. В результате материал получался неиммуногенным и обладал прекрасной биосовместимостью и эффективностью в качестве имплантационного материала, что было доказано экспериментами на модели *in vivo* – на овцах [8].

Нами запатентован способ получения остеопластического материала из ксеногенной (бычьей) кости с применением метода сверхкритической флюидной экстракции с целью глубокой очистки костных пор от липидов, липидоподобных и прочих веществ, способных извлекаться потоком диоксида углерода [9]. Основываясь на данном способе, мы разработали технологию получения костной крошки для использования в качестве имплантируемого материала, имеющего большой спрос в стоматологии, челюстно-лицевой и реконструктивной хирургии, ортопедии, травматологии.

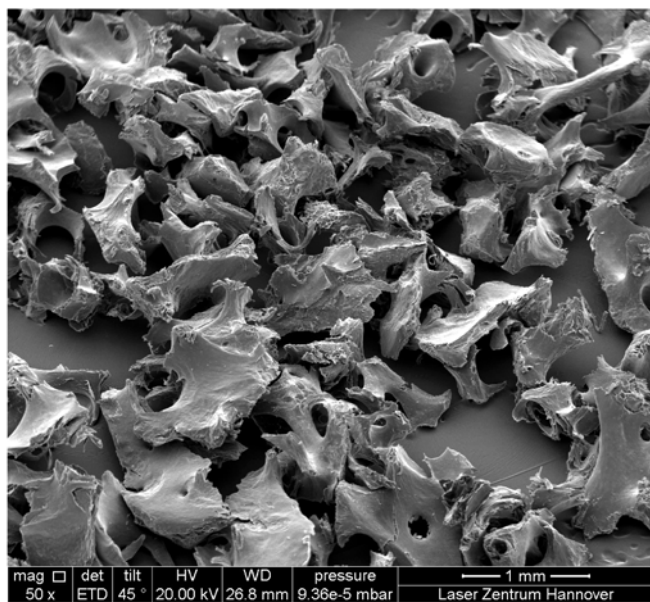


Рис. 1. Снимок электронной микроскопии костной крошки

Согласно этой технологии, кость получали от коров, прошедших ветеринарное освидетельствование, через 24 ч после забоя, замораживали при -18 °С, далее освобождали от мягких тканей, распиливали на фрагменты необходимой величины. Полученные фрагменты выдерживали в гипертоническом солевом растворе хлористого натрия с концентрацией от 1 до 10 % в течение 1...8 суток. Затем фрагменты костного материала помещали в ультразвуковую ванну с раствором перекиси водорода (от 1 до 10 %) на 1...8 суток. Далее костные фрагмен-

ты подвергали очистке методом сверхкритической флюидной экстракции при температуре 50 °С и давлении от 250 атм., со скоростью потока 30 г/мин из расчета 80 г жидкого CO_2 на 1 г кости. Расход газа был рассчитан в ходе нескольких серий экспериментов после достижения полного обезжиривания кости и был на порядок ниже описанного аналогичного подхода, что достигалось предварительным измельчением кости на блоки, дававшим явное преимущество для организации серийного производства. После этого недеминерализованные костные фрагменты дробили на мельнице с ситом до размера частиц 0,25...1 мм, подвергали лиофилизации в течение 1...48 ч, упаковывали в газопроницаемые пакеты и стерилизовали оксидом этилена. Полученный материал был идеально сухим и рассыпчатым (рис. 1).

Далее материал исследовали на модели *in vitro*, используя метод определения, основанный на оценке выживаемости культивируемых клеток. В работе использовали мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека. Аспират костного мозга разводили 1:1 раствором Хенкса («Sigma-Aldrich», США) и проводили центрифугирование на градиенте Histopaque-1077 («Sigma-Aldrich», США) при 800 G в течение 30 мин. Далее стерильной серологической пипеткой собирали клетки на границе раздела «Histopaque-1077 – жидкость», растворяли в среде α MEM (1:4) и центрифугировали при 400 G в течение 5 мин. Осадок, содержащий мононуклеарные клетки, ресуспендировали в среде α MEM с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и переносили в культуральную посуду. Далее клетки инкубировали в течение 48 ч при 37 °С в условиях 5 % содержания CO_2 в воздухе. После этого не прикрепившиеся к культуральной посуде клетки удаляли и продолжали культивирование прикрепившихся клеток. Смену питательной среды осуществляли каждые 2...3 дня. Клетки культивировали до достижения 70...80 % конfluence. В экспериментах использовали клетки 1...4 пассажей. Субкультивирование клеток проводили в среде α MEM с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл сульфата гентамицина, при 37 °С, в условиях 5 % содержания CO_2 в воздухе. Клетки культивировали в среде α MEM («Sigma-Aldrich», США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», США), 40 мкг/мл сульфата гентамицина («Sigma-Aldrich», США), при 37 °С, в условиях 5 % содержания CO_2 в воздухе. Динамику численности клеток (кривые роста популяций), культивируемых на образцах, оценивали по прямому подсчету числа клеток, открепленных с поверхности образцов, каждые 24 ч в течение 3 суток. Клетки открепляли от поверхности образцов с помощью коктейля «Accutase» («Sigma-Aldrich», США), ресуспендировали в питательной среде L-15 («Sigma-Aldrich», США) с 1 % эмбриональной телячьей сыворотки. Далее клетки окрашивали 0,4%-ным раствором трипанового синего в течение 1 мин. Подсчет количества клеток осуществляли с помощью автоматического счетчика клеток «Countess» («Invitrogen», США). Определение количества живых и погибших клеток проводили с помощью окрашивания клеток флуоресцентными красителями кальцеином AM («Sigma-Aldrich», США) и йодидом пропидия («Sigma-Aldrich», США). Клетки открепляли от поверхности образцов с помощью коктейля «Accutase». Клетки окрашивали в среде L-15 с 1 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, содержащей 1 мкг/мл кальцеина AM и 2 мкг/мл йодида пропидия, в течение 25 мин, при 37 °С. Анализ живых и погибших клеток осуществляли с использованием проточного цитометра «EPICS XL» («Beckman Coulter», США) [10].

Материал имел размер частиц 0,25...1 мм, каждый образец имел объем 1 см³, площадь поверхности испытываемого материала составляла 2 × 2 см², полученный аспират костного мозга объемом 3 мл помещали в стерильную емкость, содержащую 50 МЕ гепарина натрия, и держали при температуре 4...6 °С. Выделение клеток проводили не более чем через 1 ч после получения материала, нанесение клеток на материал производили с равномерным перемешиванием частиц.

Результаты опытов представляли в виде среднего \pm 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.

В эксперименте на клетках было проанализировано два образца: костная крошка по предложенной технологии и известный коммерческий аналог, широко применяемый в стоматологии, – материал «BioOss» фирмы «Geistlich».

В результате эксперимента были получены результаты по цитотоксичности со статистической значимостью $U_{кр}(0,05) = 3$, которые представлены в графике на рис. 2.

Как можно видеть, полученный нами продукт по отсутствию цитотоксичности достоверно не уступает известному коммерческому аналогу. Применение описанной технологии решает большую проблему с обеспечением доступного имплантируемого материала как матрикса для закрытия дефектов костной ткани в стоматологии, парадонтологии, челюстно-лицевой хирургии. А способ, лежащий в основе данной технологии, является не только эффективным для производства качественной продукции, но и экологически чистым и безопасным с точки зрения чистоты и отсутствия остаточных веществ, что очень важно в производстве медицинских изделий.

Список литературы:

1. Гришина И.П., Дударева О.А., Маркелова О.А., Лясникова А.В. Биосовместимые наноматериалы и композиционные покрытия на их основе для биомедицинской инженерии // Конструкции из композиционных материалов. 2013. № 2. С. 22-28.
2. Кирилова И.А., Подорожная В.Т., Ардашев И.П., Черников С.В. Различные виды костнопластических материалов для восстановления костной структуры // Политравма. 2008. № 4. С. 60-64.
3. Мудрая В.Н., Степаненко И.Г., Шаповалов А.С. Применение костнопластических материалов в современной стоматологии // Журнал клинической лабораторной медицины. 2010. Т. 5. № 1. С. 52-57.
4. Грудянов А.И., Ерохин А.И. Хирургические методы лечения заболеваний пародонта. – М.: Медицинское информационное агентство, 2006. С. 128.
5. Костив Р.Е., Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю. Трофические факторы роста костной ткани и клиническое значение // Тихоокеанский медицинский журнал. 2017. № 1. С. 10-16.
6. Дунаев М.В., Китаев В.А., Матавкина М.В., Дружинин А.Е., Бубнов А.С. Сравнительный анализ и клинический опыт использования остеопластических материалов на основе недеминерализованного костного коллагена и искусствен-

ного гидроксиапатита при закрытии костных дефектов в амбулаторной хирургической стоматологии // Вестник РАМН. 2014. № 7-8. С. 112-120.

7. Кузьмина Д.А., Пухур О.Л., Иванов А.С. Эндонтическое лечение зубов: методология и технология. – СПб.: СпецЛит, 2013.
8. Fages J., Marty A., Delga C., Condoret JS., Combes D., Frayssinet P. Histological integration of allogeneic cancellous bone tissue treated by supercritical CO₂ implanted in sheep bones // Biomaterials. 1998. Vol 24. № 19. PP. 2247-2253.
9. Евдокимов С.В., Венедиктов А.А., Гурин М.В., Благодырев В.И., Смоленцев Д.В. Способ получения остеопластического материала / RU 2609201 С1. 2017. Бюл. № 4.
10. Булкина Н.В., Зюлькина Л.А., Иванов П.В., Ведяева А.П., Шастин Е.Н., Кавтаева Г.Г. Исследование экспериментальных биоматериалов как биологических матриц для клеток *in vitro* // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 5 / Электронный научный журнал. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27019>.

Дмитрий Владимирович Смоленцев,
директор,
ООО «МедИнжБио»,
Максим Вячеславович Гурин,
инженер-исследователь,
Алексей Александрович Венедиктов,
канд. биол. наук, управляющий,
ООО «Кардиоплант»,
Сергей Васильевич Евдокимов,
канд. техн. наук, управляющий,
ЗАО НПП «МедИнж»,
г. Пенза,
Роман Сергеевич Фадеев,
канд. биол. наук, зав. лабораторией,
ФБУН «Институт теоретической
и экспериментальной биофизики» РАН,
г. Путино, Московская обл.,
e-mail: gmv7981@mail.ru

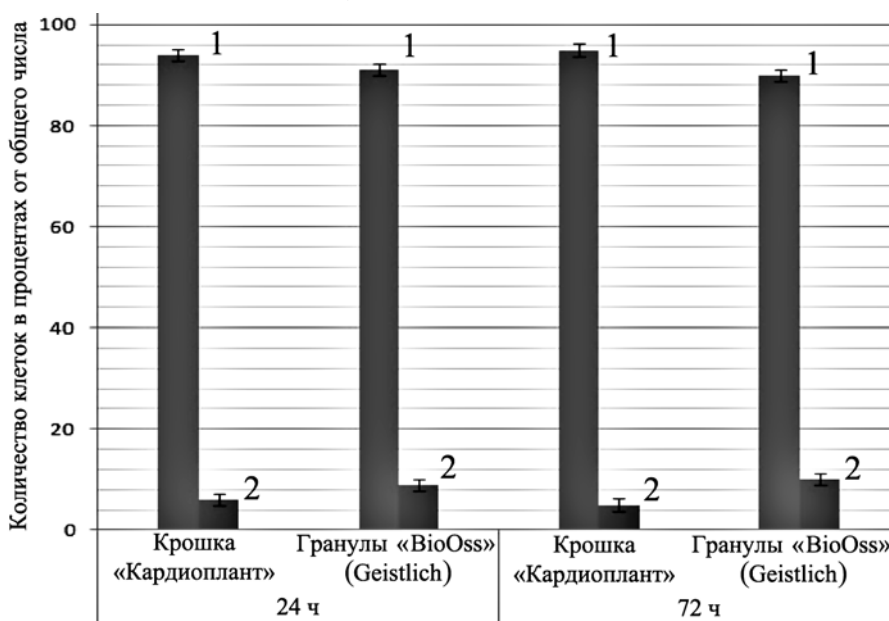


Рис. 2. График анализа выживаемости культивируемых клеток: 1 – живые; 2 – погибшие