

УДК 573.6:577.11-022.532

ЦИТОАКТИВНЫЙ БИОПОЛИМЕР-СОЛЕВОЙ КОМПОЗИТ С НАНОРАЗМЕРНЫМИ КРИСТАЛЛАМИ

С.Д. ЛИТВИНОВ

(Центр нанобиотехнологий РГАУ - МСХА имени КА. Тимирязева)

В статье приводятся анализ имплантационных материалов, необходимые условия синтеза универсального материала для восполнения дефектов тканей, данные синтеза цитоактивного биополимер-солевого композита. Обсуждается эффективность и перспективы работы со стволовыми клетками как инициаторами избирательной регенерации. Предлагается версия механизма действия цитоактивного композитного материала для регенерации различных типов ткани.

Ключевые слова: биополимер-солевой композит, биоматериал, наноразмерный гидроксил- и гидроксилфторапатит, регенерация ткани, стволовые клетки.

В настоящее время для создания имплантатов широко применяется комбинация биополимерных (коллагеновых или альгинатных) волокон с неорганическими солями [1]. Ранее в качестве солевого компонента применялись гранулы аттапульгита (глина) в смеси с коллагеном [2]. Более сложная композиция, состоящая из коллагена (5~25%), минеральных частиц (75-95%) и остеогенного фактора (0,5-4%) предлагалась как материал, обеспечивающий костную индукцию и полную репарацию костных дефектов [3]. В качестве минеральной добавки использовалась смесь гидроксилатапата и трикальций фосфата.

Авторы работы [4] разработали технологию получения волокнистого наполнителя из гидроксилатапата в «интактном виде» с хорошей биосовместимостью. Он может быть использован с различными биополимерами, в т.ч. и коллагеном.

В патенте [5] предлагается материал для витализации поверхностей

имплантатов на основе поглощаемых биополимеров. В материале содержатся неорганические добавки, в т.ч. ортофосфат кальция и(или) гидроксилатапатит. Запатентован материал для имплантатов [6], состоящий из частиц фосфата кальция и пептидного восстановленного волокнистого коллагена. Материал является неиммуногенным и через него происходит прорастание вновь формирующейся ткани.

В патенте [7] для получения материала для костных имплантатов авторы использовали лиофильную сушку смеси коллагена и гидроксилатапата. В изобретении [8] предлагалось использовать для сокращения сроков сращения костных отломков искусственную мозоль в виде муфты, с помощью которой отломки прочно бы фиксировались. Муфта образовывалась в результате ультразвуковой обработки смеси, состоящей из гидроксилатапата (58-60%), желатина или коллагена (30~32%) и воды (6%), введённой в зону костного дефекта.

Биокерамика или стеклокерамика, или поликристаллическая керамика стали применяться в клинической практике с начала 60-х годов XX века. Были получены образцы стёкол с вкраплениями меди, серебра, золота, осажденных с помощью ультрафиолетового излучения [9]. Эти металлические ингредиенты придали стеклу отличные механические и термические свойства. Таким образом были получены первые имплантаты «Bioglass», «Сегavital» [10, 11].

Стеклокерамические имплантаты имеют хорошую биосовместимость, т.е. образуют большое количество связей с краями костного дефекта. Позднее в биокерамические имплантаты стали добавлять оксид алюминия, оксид кремния, фосфат кальция [12] или только фосфат кальция [13], или только гидроксилapatит [14]. В патенте [15] разработан способ нанесения биоактивных покрытий из фосфата кальция на имплантаты из инертного материала. Из соответствующих растворов получают аэрозоль, содержащий ионы кальция и ионы фосфата, и он наносится на горячую поверхность имплантата. В процессе осаждения аэрозоля на поверхности имплантата образуется гладкая плёнка.

Применение композитов для «запуска» регенерации того или иного типа ткани предполагает отсутствие на его поверхности болезнетворных микроорганизмов.

Стерилизация имплантатов осуществляется как физическими, так и химическими агентами [16]. Химическими агентами являются окись этилена и формалин [17], физическими — гамма(у)- и УФ-излучения [18, 19]. Обычно для стерилизации в лабораторных условиях используется 0,25 или 0,5% раствор формалина. Сроки стерилизации — 5-7 сут. Формалин, сочетающий в себе стерилизующие и консервирующие свойства, остаётся основным препаратом, используемым при заготовке трансплан-

татов и изготовлении имплантатов. Однако формалин необычайно склонен к полимеризации и спонтанным реакциям окисления и конденсации, что приводит к значительному снижению активности агента и его растворов [20, 21]. Это ощутимо влияет на результаты стерилизации. Авторы [16] считают, что разноречивые данные о стерилизационной активности формалина свидетельствуют о том, что при его применении не учитывается содержание формальдегида в исходном продукте. В товарном формалине его содержание постоянно занижено. Необходимо также отметить, что в связи с обнаружением у формальдегида канцерогенных свойств его применение для стерилизации и консервации тканей не рекомендовано Международной ассоциацией хирургов.

Отличительной и весьма ценной особенностью окиси этилена как стерилизующего агента является его способность глубоко проникать в обрабатываемые объекты и довольно быстро улетучиваться при комнатной температуре. Сжиженный препарат обеспечивает стерильность биоматериалов в течение 30 мин, а в 50%-м разведении — в течение 1 ч. Стерилизация осуществляется путём погружения трансплантата в рабочую смесь с последующим его проветриванием и помещением в стерильную посуду. Применение концентрированной смеси окиси этилена требует особых условий для защиты персонала от вредного действия его паров (работа в противогазах). Поэтому применение слабых растворов (1%) препарата крайне желательно. Автором [16] разработан способ, позволяющий помещать трансплантат в охлаждённый физиологический раствор, к которому добавляется охлаждённая окись этилена до количества, необходимого для получения 1% раствора. Стерилизация окисью этилена более надёжна, чем стерилизация формали-

ном, так как у микроорганизмов нет устойчивости к ней.

Наиболее удобным и надёжным способом стерилизации трансплантатов (имплантатов) является у-излучение. Согласно данным [22], стерилизация коллагена и коллаген-минеральной смеси у-излучением в интервале от 2 до 40 кГр не приводит к изменению биосовместимости имплантатов. Граница подлинности стерилизации соответствует 15 кГр. В соответствии с имеющимися данными, стерилизацию имплантатов для биологических и клинических испытаний целесообразно проводить дозой в 25 кГр.

В работе [23] оценивается уровень у-излучения для имплантатов, инфицированных гепатитом В и С. Обращается внимание на то, что общепринятая в мире доза в 36 кГр не обеспечивает уничтожение вируса гепатита, так как для этого требуется 50 кГр. Но столь высокая доза оказывает отрицательное побочное воздействие на микроструктуру имплантата.

Изготовление имплантационных материалов на основе клеточных технологий (инжиниринг тканей) предполагает изначальную стерильность в производственном цикле. Последнее обстоятельство требует дорогостоящего оборудования, постоянный контроль процесса и особые условия хранения готовой продукции. Это повышает стоимость материала для регенерации, что делает его широкое применение для основной части населения маловозможным.

Тем не менее клеточные технологии (биотехнологии) занимают львиную долю внимания современных учёных, работающих над созданием имплантационных материалов. Из существующих на сегодняшний день материалов большая их часть предназначена для регенерации костной ткани. Однако заболевания паренхиматозных органов (легкие, печень, почка, поджелудочная железа), а также дефек-

ты сердечной мышцы (миокарда), повреждения периферических нервов с большим диастазом (разрывам в несколько сантиметров) стимулируют поиск материала универсального характера, т.е. материала, способного восстанавливать не выборочно один тип ткани (кость или хрящ, или легкое, почку и т.д.), а несколько типов сразу. Часто аварийная ситуация наносит организму повреждение не одного органа или ткани, а нескольких, т.е. является политравмой.

Таким образом, идеальным является создание имплантационного материала универсального типа.

Замещение дефектных участков костной, хрящевой и мягкой (паренхиматозных органов) тканей имплантационным материалом с целью восстановления полноценной бездефектной тканевой структуры, на первый взгляд, кажется совершенно невыполнимой задачей.

Даже в случае восполнения только костных дефектов материалы могут быть представлены несколькими группами [24]. Например, по способу получения имплантаты подразделяются на 4 группы: натуральные, синтетические, композиционные, полусинтетические.

Натуральные материалы (биологического происхождения) включают: костные трансплантаты (ауто-, алло- и ксенокость, например, материал Bio-Oss [25]); продукты размножения клеток (аутогенные кость и хрящ).

Синтетические материалы полностью состоят из веществ, получающихся соответствующими химическими способами. Они подразделяются на: полученные неорганическим синтезом (биостекла, биокерамика); полученные органическим или ферментативным синтезом (органические полимеры, например, В,Б-полилактид; факторы роста костной ткани, например, костный морфогенетический белок BMP — синтетический по способу получения).

Полусинтетические материалы — материалы натурального происхождения, претерпевшие химическую, физическую или термическую обработку. Для этого чаще всего используется кость животных.

Композиционные материалы (комполиты) представляют собой комбинации веществ натуральных, синтетических и полусинтетических; обычно они являются механическими смесями нескольких различных компонентов. Примерами подобных материалов могут быть: неорганические носители, содержащие в себе действующие вещества, например, факторы роста костной ткани или концентрат из тромбоцитов; органические матрицы с неорганическими добавками.

Согласно [26] композитные материалы — это смесь двух или более фаз, связанных вместе так, что передача механического напряжения происходит по их границе. Композитные материалы позволяют обеспечить сочетание свойств, которые не могут быть достигнуты с помощью материала, представляющего собой одну фазу (под фазой понимается однородная часть гетерофазной, т.е. разнородной, системы). Идеальным композитом является кость, так как фибриллы коллагена, имеющие низкий модуль упругости (низкие прочностные свойства), сочетаются на нанометрическом уровне с кристаллами гидроксилатапата (точнее карбонатгидроксилатапата — даллита), которые имеют высокие прочностные характеристики. Учитывая, что в нативной костной ткани солевой компонент (апатит) связан химическими связями с коллагеновыми волокнами и что блоки кристаллов имеют регулярное расположение в пространстве некоторые исследователи [26] считают, что такое сочетание фаз композита является идеальной моделью имплантационного материала. Для оценки качества такого материала при сравнении

с качеством натуральной кости предлагается индекс (I):

$$I_q = (B \times P \times T) / Ю [26]$$

где Ю — модуль упругости Юнга; P — прочность на растяжение; T — трещиностойчивость; B — биоактивность (Б).

Такие материалы, как Bioglass®, Cerasorb®, имеют I одного порядка с таким же индексом для кортикального слоя трубчатой кости. Тем не менее, их эффективность оставляет желать много лучшего, так как время биодеградации этих и других керамических материалов, так же как и у кости, исчисляется месяцами и годами. А это таит в себе определённую опасность. Многолетний опыт применения для имплантации ауто- и аллокости подтверждает это.

Таким образом, приходится согласиться с тем, что приведение прочностных характеристик композита в соответствие с костными является не только неправильным, но и порочным, так как тормозит развитие исследовательской мысли в направлении совершенствования и универсализации имплантационных композитов. Видимо, поэтому авторы работы [26] признают возможность создания биосовместимых рассасывающихся каркасных материалов.

Под биосовместимостью можно понимать наличие у материала двух существенных свойств: эффективного функционирования и отсутствие токсичности [26]. При этом биосовместимость не является только свойством материала.

К биосовместимым материалам относятся: биоинертные, рассасывающиеся (биодеградируемые) и биоактивные.

Биоинертные материалы вызывают в организме реакцию в виде инкапсуляции имплантата в рыхлую соединительную ткань с образованием рубца.

Рассасывающиеся (биodeградируемые) материалы обычно растворяются (лизуются) при контакте с биологическими жидкостями *in vivo*.

Биоактивные материалы стимулируют реакцию организма. Различают два вида: остеокондуктивные и остеопродуктивные. Кондуктивные материалы стимулируют рост кости своей поверхностью за счёт включения в состав малорастворимого солевого компонента: среднего фосфата кальция, октафосфата кальция, гидроксилатапата или другой малорастворимой соли с биогенными элементами, например, магнием.

Остеопродуктивные материалы (остеоиндуктивные) стимулируют рост костной ткани в направлении от границы кость — имплантат.

Относительно роли каркаса в имплантационном композите распространено соображение: «для того, чтобы можно было регенерировать ткань каркасы должны иметь структуру, которая действует как шаблон, или матрица для роста ткани в трёх направлениях и стимулирует новый рост в форме, заданной каркасом. Очевидно, что конструкцией шаблона является структура, копирующая структуру ткани организма-хозяина. Для того чтобы позволить ткани расти в трёх направлениях, шаблон должен быть сетью больших пор (макропор). Поры должны быть соединены друг с другом, а отверстия между порами должны иметь диаметр более 100 мкм. Взаимосвязанная сеть пор необходима для того, чтобы позволить клеткам мигрировать по каркасу и способствовать росту ткани на протяжении всего шаблона. В конечном счёте идеальные каркасы стимулируют рост кровеносных сосудов (ангиогенез) внутри сети пор» [26].

Нашей задачей было создание композитного имплантационного быстро биodeградирующего материала, имеющего универсальный характер действия, т.е. способного обеспечить

регенерацию не только костной, хрящевой, но и ткани паренхиматозных органов.

Придание более широкого спектра действия имплантационному материалу (не только для костной ткани) предполагает решение ряда проблем, иногда взаимоисключающего характера, как, например, необходимость быстрой биodeградации материала (дни или недели) и наличие у него же высоких (соизмеримых с костными) прочностных характеристик.

Таким образом, идти по пути создания материала с «концентрацией» различных свойств в нём (типа три в одном или пять в одном) авторам кажется неприемлемым и, скорее всего, невозможным. Во всяком случае, очень затратным по конечному результату. Известно, что «золотой» материал, как бы универсален он не был, никогда не будет востребован по экономическим соображениям. В этом случае можно апеллировать только к регенераторным механизмам организма на генетическом уровне.

Известно, что инфекция может присоединяться к имплантированному материалу в течение пяти (!) лет [27]. Поэтому минимальность времени пребывания в организме протезирующего инородного тела — залог успешного восстановления ткани в дефектном участке. Для выполнения этой задачи мы приступили к созданию имплантационного биodeградирующего материала с минимальным временем нахождения в биологической системе.

Исследовательский опыт наших предшественников [28, 29] показывал, что оптимальный результат (по затратам и эффективности действия) может быть получен, если на некую матрицу (иногда называемую матрицсом) осадить кристаллы нанометрического размера плохо растворимой соли (с произведением растворимости 10^{-20} и меньше при наличии в формульной единице 3-5 ионов). В роли

матрицы должен выступать нетоксичный биodeградируемый полимер неиммуногенного характера, а солевой компонент может быть плохо растворимая соль, которая почти не подвергается гидролизу для сохранения pH в пределах 7—8.

Нами (в качестве матрицы) был выбран биополимер (коллагеновое или альгинатное волокно), а солевой компонент — гидроксилapatит ($\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6 = 10\text{Ca}^{2+} + 20\text{H}^+ + 6\text{PO}_4^{3-}$), который имеет произведение растворимости $1,022 \cdot 10^{-122}$ [30]. Рассчитанная из произведения растворимости равновесная концентрация иона кальция $[\text{Ca}^{2+}]$ в насыщенном растворе этой соли должна быть равна $0,24 \cdot 10^{-7}$ М/л. На самом деле равновесие *in vivo* поддерживается нахождением в сыворотке крови Ca^{2+} и HPO_4^{2-} , тогда активная концентрация кальция в сыворотке крови для взрослого здорового человека натощак будет $a_{\text{Ca}} = 0,47 \cdot 10^{-3}$ М/л [31].

Работа по созданию материала сопряжена со значительными трудностями, так как материал будет находиться и проявлять свои свойства в среде, которая является продуктом многих процессов, идущих одновременно в колебательном режиме [32, 33]. При этом всенепременно выполнение следующих условий: материал должен быстро биodeградировать (дни или недели); быть пористым; быть цитоактивным (стимулировать регенерацию на генетическом уровне).

Сочетание этих условий предполагает, что материал будет композитным, что и сможет обеспечить универсальный характер его действия. Композитность подразумевает наличие фибриллярной матрицы, на волокнах которой расположены наноразмерные кристаллы соли (гидроксил- или гидроксилфторapatита). Пористость необходима для диффузии внутрь полипатентных малодифференцированных (стволовых) клеток, а

солевой компонент — для стимуляции этих клеток к «запуску» регенерации. Таким образом, это должен быть биоматериал, запускающий (иницирующий регенерацию) на генетическом уровне.

Для восстановления ткани в области дефекта в настоящее время применяются разнообразные материалы биологического и небиологического происхождения. При этом все они называются «биоматериалами» (не по характеру происхождения, а по области применения, т.е. для биологических объектов). Биоматериалы, обеспечивающие регенерацию тканей, ещё называются имплантатами, трансплантатами, композитами. Диапазон их применения широк: заполнение корневого канала зуба [34] или полости кисты кости [35], замещение хрящевой перегородки носа [36], заполнение области дефекта в тканях паренхиматозных органов [37], миокарда [38]. Видимо, в связи с этим «биоматериал» имеет несколько толкований. Он может трактоваться как природный или синтетический материал, используемый для того, чтобы заменить часть биологической (живой) системы. При этом предполагается, что он (материал) функционирует в близком контакте с биологической тканью. Специальный комитет при Клемсонском университете [27] формально определил «биоматериал (*biomaterial*)», как системно- и фармацевтически инертное вещество, разработанное (предназначенное) для внедрения в определённых пределах или объединения с живыми системами. В противоположность понятию «биологический материал (*biological material*)» — материал типа матрицы кости или эмали зуба, сформированный в биологической системе. При этом предполагается, что искусственные материалы или приспособления, которые просто находятся в контакте с кожей, типа слуховых аппаратов, не являются биоматериалами, так

как кожа действует (выступает) как барьер, ограничивающий биосистему от внешнего мира. Использование биоматериалов подразумевает замену части органа тела (которая потеряла свою функцию в связи с болезнью или травмой), помогая заживлению или улучшению функции и ликвидации патологии.

Другие авторы [39] под биоматериалом понимают материал, биологически совместимый с тканью, т.е. вызывающий адекватный отклик — не токсичный, не иммуногенный, не вызывающий других реакций организма, не отторгающийся им как инородное тело. При этом материал должен быть биологически активным. Имплантируемый биоматериал должен сохранять свои функциональные качества в течение определённого периода времени, не изменяя существенно свою структуру и механические свойства [39].

Не менее витиевато определяют биоматериал авторы [40], которые считают, что биоматериал — это материал, обладающий адекватными физическими и механическими свойствами для выполнения своей функции.

Все предложенные ранее толкования биоматериала предполагают некоторую (в той или иной степени) инертность, что, скорее, может соответствовать понятию «протез», которое определяется как изготовленное человеком устройство, используемое внутри организма для замены, восстановления или усиления поражённой болезнью, поврежденной или отсутствующей части тела [40]. Синонимом «протез» является «имплантат».

В формировании понятия (в данном случае «биоматериал») необходимо определить главное свойство, или признак материала или процесса, который закладывается в основу определения.

В работе [27] — это инертность вещества, в работе [39] — также инерт-

ность, а в работе [40] — выполнение «своей функции». Эта функция может быть представлена двумя составляющими: а) механическое восполнение дефекта ткани органа тела, б) стимуляция регенерации ткани в зоне дефекта.

Механическое восполнение или коррекция дефекта с помощью инертных имплантатов (металл, керамика) на данном (современном) этапе — малоперспективный путь. В связи с растущей потребностью в долгосрочном восстановлении предполагается сместить акцент с замены тканей протезами на регенерацию или обеспечение неким механическим приспособлением (аппаратом) восстановления ткани с последующим удалением приспособления. Весьма успешный опыт в этом направлении — применение аппарата Г.А. Илизарова. Но этим приемом обеспечивается (и то не всегда) рост только костной ткани.

Поэтому кажется более перспективным развитие научного направления по регенерации тканей путём введения некоего вещества в организм, стимулирующего клеточную деятельность самого организма. Это направление развивается благодаря развитию исследований в области инжиниринга тканей человеческого организма. Инжиниринг тканей — это конструирование и создание в лаборатории живых функциональных компонентов, которые могут быть использованы для регенерации неправильно функционирующих тканей. Более упрощенно инжиниринг можно представить как выращивание фрагментов тканей человеческого организма *in vitro* с последующей имплантацией их. Это предполагает работу с клеточным материалом пациента или донора.

Другим подходом инжиниринга является «производство» (выращивание) стволовых клеток, с последующим введением их в дефектный участок организма, что также предполагает

работу с клеточным материалом «на стороне» (вне организма). Теоретически плодотворность такого подхода к регенерации является оправданной. Однако на практике результаты не всегда соответствуют ожиданиям: видимо, современный уровень развития научной мысли или технических возможностей не позволяет управлять поведением стволовых клеток после их возвращения из реактора (термостата) в биологическую систему организма.

Тем не менее, клеточная индустрия развивается бурно, так как формирование фрагмента требуемой ткани без участия клеток невозможно. Идентификация стволовых клеток и возможность их забора у пациента, высеивание их на каркасы необходимой архитектуры *in vitro* позволяет расширить круг регенерируемых тканей.

В настоящее время внимание исследователей сосредоточено на разработке каркасов для инкубирования клеточной массы перед помещением в область дефекта. В качестве каркасов можно использовать как биоинертные материалы (оксид алюминия, оксид циркония, металлы и сплавы, полиэтилен), рассасывающие (полигликоливая и полимолочная кислоты, коллаген, альгинат кальция-натрия, фосфаты кальция), так и биоактивные (гидроксилапатит, фторгидроксилапатит, керамика на основе среднего фосфата кальция).

Иногда высказывается ошибочное мнение, что «каркасы должны иметь структуру, которая действует как шаблон, или матрица для роста ткани в трёх измерениях и стимулирует новый рост в форме, заданной каркасом. Очевидно, что конструкцией шаблона является структура, копирующая структуру ткани организма-хозяина» [40]. Это умозрительное и ничем не подтверждённое заключение отчасти является не только неправильным, но и вредным, так как тормозит развитие научного поиска в перспектив-

ном направлении. Роль каркаса может быть совсем иной. В одном авторе сходятся несомненно: каркасы, с культивируемыми на них клетками *in vitro* (ещё эти каркасы называются «конструктами») после имплантации должны способствовать росту кровеносных сосудов, т.е. обеспечивать ангиогенез.

Однако если в ткани «хозяина» остается искусственный материал, то регенерации тканей до их первоначальных состояний и функций не происходит. Из этого следует, что идеальные каркасы должны быть рассасывающимися, с тем, чтобы в конечном счёте не имелось никаких следов их присутствия.

Учитывая, что нахождение инородного тела в организме-хозяине (в течение длительного времени) не исключает присоединение к нему инфекции [27], наиболее эффективным с позиций инфицирования будет материал, каркас которого существует в зоне регенерации минимально возможное время.

Считается, что механические свойства конструкта, получаемого посредством инжиниринга тканей, должны соответствовать механическим свойствам ткани организма хозяина [40]. По мнению авторов, это очевидно из опыта полной замены бедра. К сожалению, данный пример не является убедительным, так как в случае замены бедра никакой регенерации тканей не происходит. С точки зрения авторов [41], невозможно создать имплантат, который бы имел одновременно и высокие прочностные характеристики (наподобие костных) и малое время биотрансформации (быструю биодеградацию), чтобы исключить возможность инфицирования. Условия регенераторного процесса заставляют выбрать: либо прочностные свойства, но длительная биодеградация имплантата, либо отсутствие прочностных свойств, но быстрая биотрансформация материа-

ла в здоровую полноценную ткань. В связи со сказанным кажется перспективным разработку материала (имплантата), который без привлечения (или культивирования) клеток (в режиме *in vitro*) мог бы, благодаря своему химическому составу, стимулировать клеточную деятельность самого организма, т.е. запускать регенераторный механизм, апеллируя к малодифференцированным клеткам самого организма-хозяина (рис. 1).

Такой материал (композит), разработанный нами в конце 90-х годов под названием «ЛитАр» [42], продолжает совершенствоваться в лаборатории Центра нанобиотехнологий РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева [43]. Он представляет собой систему биополимерных волокон с осажёнными на них кристаллами гидроксил- или гидроксилфторапатита (рис. 2).

На рисунке 2 представлена фотография материала под электронным микроскопом. Видно обилие кристаллов апатита и пространства микронных размеров между волокнами биополимера.

Таким образом, одно из условий — пористость — в описываемом композите реализовано. Оно же обеспечивает быструю биодеградацию, так как клетки организма могут свободно перемещаться внутри материала, вызывая его лизис в кратчайшие сроки (2–3 нед.). Для стимулирования клеточной активности на генетическом уровне необходимо проникновение кристаллов апатита внутрь стволовой клетки. Это предполагает наличие в композитном материале наноразмерных кристаллов.

Для подтверждения наличия в нашем материале апатита и наноразмерности его кристаллов было проведено рентгенофазовое исследование образцов композита на альгинатной и коллагеновой основе (на рисунках 3 а и б приведены их диффрактограммы). Поскольку набор

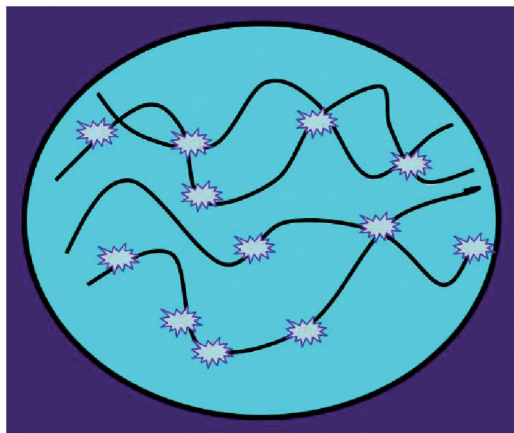


Рис. 1. Схема строения биополимер-солевого композита: ломаные линии — волокна полимера, звёздочки — нанокристаллы соли (гидроксил- или гидроксилфторапатита)

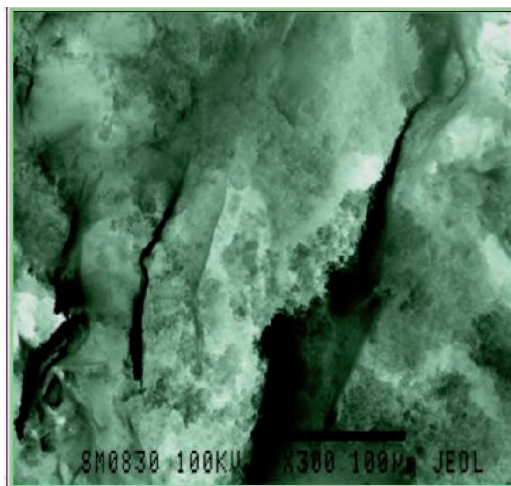
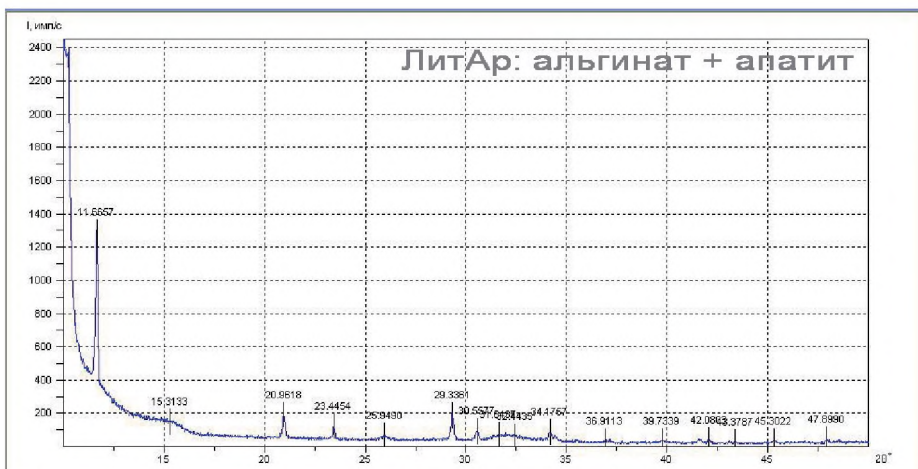
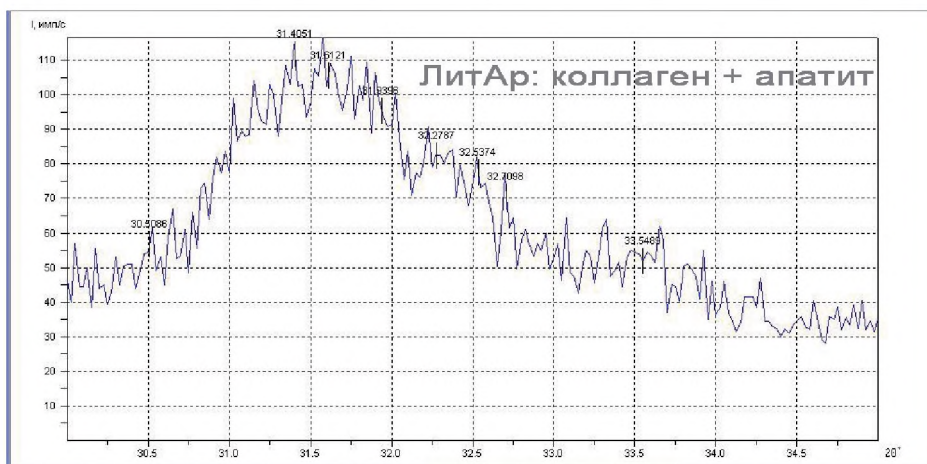


Рис. 2. Биополимер-солевой композит. Электронный микроскоп Jem-2000 FX-II. Ув. x 300

основных рефлексов, характеризующий апатитную структуру, находится в интервале $30\sim 35^\circ$ и одинаков для обоих образцов, то на одном рисунке (3 а) приведен полный спектр в широком диапазоне $10\text{—}50^\circ$, а на другом (3 б) — более подробный в интервале $30\sim 35^\circ$.



а



б

Рис. 3. Рентгенограммы образцов биоматериала (композита) на альгинатной (а) и коллагеновой (б) основе. По оси X — угол поворота каретки в $2\theta^\circ$, по Y — интенсивность рентгеновского излучения. Анализ выполнен на диффрактометре ДРОН-7

На основании данных рентгенофазового анализа (рис. 3 а, б) синтезированного нами материала произведён расчёт средних значений кристаллов апатита в биополимер-солевом композите (таблица).

Из данных таблицы следует, что размер кристаллов (L), рассчитанных по формуле Шерера ($L = K\lambda/\beta m \cos\Theta$), колеблется в интервале 11-17 нм. При этом невозможно определить, какой

из этих размеров является среднестатистическим.

Более точные результаты можно получить, используя метод мягкой абляции объекта под воздействием субмиллиметрового излучения лазера на свободных электронах [44]. В результате измерений, проведённых с помощью этого метода, было установлено, что в биополимер-солевом композите находится две фрак-

**Параметры кристаллических фаз образцов,
синтезированных на биополимерной матрице**

Параметр	Ca ₅ (PO ₄) ₃ F JCPDS 34-0011	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH JCPDS 09-0432	Синтезированные образцы						
			1	2	3	4	5	6	7
<i>a</i> , Å	9,38	9,42	9,52	9,41	9,36	9,41	9,41	9,41	9,41
<i>c</i> , Å	6,88	6,88	6,21	6,54	6,69	6,54	6,78	6,78	7,05
<i>L</i> , нм	—	—	10,62	14,15	16,99	14,15	10,62	12,13	16,99
<i>X</i> , %	—	—	0,014	0,033	0,057	0,033	0,014	0,021	0,057

ции нанокристаллов: 3-5 и 25-90 нм (с максимальным содержанием частиц среднегометрического диаметра 45 нм). Те же измерения показали, что трубчатая часть большеберцовой кости взрослого человека имеет среднегометрический диаметр частиц 38 нм, что соответствует данным других авторов [27]. Близкие значения кристаллических размеров соли (апатита) в кости и материале говорит о том, что их различает только регулярное (для кости) и хаотическое (для композита) расположение минерального компонента (гидроксилапатита), соответствующее в обоих случаях примерно 70% (вес).

Наличие наночастиц «малого» диаметра позволяет предположить о возможности диффузии их в протоплазму клетки, как это показано на рисунке 4.

Гидролиз гидроксил- или гидроксилфторапатита в замкнутом пространстве (протоплазме или ядре клетки) приведет к изменению pH примерно до 7, что ослабит водородные связи между гетероциклами двойной спирали ДНК, этого достаточно для её раскрытия и запуска регенераторного механизма.

В завершении необходимо отметить, что эволюция имплантационных материалов от аллокости до полимер-солевых композитов в основном связана с созданием заменителей костной ткани. Попытка синтеза материала, универсального по свойствам

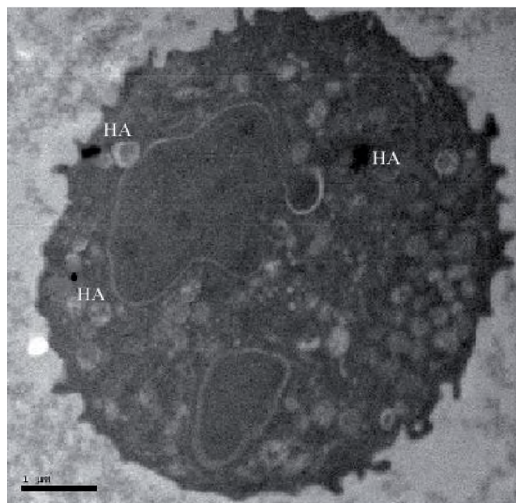


Рис. 4. Поглощение кристаллов гидроксил-апатита (HA) полиядерными нейтрофилами (Polymorphonuclear Neutrophils) [45]

(не только для регенерации костной, но и хрящевой тканей паренхиматозных органов) привела к необходимости вовлечения в этот процесс малодифференцированных стволовых клеток. Имеющийся опыт показывает, что клетки, выведенные из организма, после их обработки в термостате не всегда дают воспроизводимый желаемый результат при обратном их введении. Более перспективным кажется создание материала, который после имплантации апеллировал бы непосредственно к стволовым клеткам самого организма без извлечения их наружу. При этом воздействие

введённого материала должно быть таково, чтобы инициировать регенерацию на генетическом уровне.

Представленные результаты показали наличие такой возможности у цитоактивного биополимер-солевого композита, в состав которого входят наноразмерные кристаллы апатита.

Анализ экспериментальных и клинических результатов применения биокомпозита в медицине и сельском хозяйстве позволил предложить механизм, который требует дальнейшей детальной проверки.

Возможность применения «ЛитАр» в сельском хозяйстве предполагает два пути развития: животноводство и садоводство (возможно и растениеводство). В первом случае можно использовать регенераторные способности материала для восполнения дефектов костей крупных животных (лошади, коровы, свиньи), например, восстановление поврежденной при опоросе ключицы свиноматки.

В садоводстве (растениеводстве) перспективными являются опыты по действию «ЛитАр» на ткани ствола дерева, которые проводили на 6—7-летних свободнорастущих деревьях сосны обыкновенной [43]. В середине июня на уровне 5-го междоузлия удаляли участок луба размером 30 мм по горизонтали и 10 мм по вертикали, в контроле сразу прикладывали

его на место, в опыте вначале нанесли 20 мг «ЛитАр» в сухом виде на камбиальную зону (3 см²), место повреждения закрывали скотчем. В каждом варианте было 3 дерева. В начале сентября взяли высечки, включавшие весь луб и древесину текущего и частично предыдущего года. Высечки делали так, чтобы они захватывали зону повреждения и участки, находящиеся от нее на 1,5 см выше и ниже (размеры высечек 50~60 мм в вертикальном направлении и 12-15 мм в горизонтальном).

На основании анализа срезов высечек, сделанных на удалении 15 мм вниз по стволу от места механического повреждения можно сделать вывод о том, что добавление композита «ЛитАр» приводит к снижению степени травматизации тканей, при этом продолжается нормальная дифференциация слоя флоэмы и ксилемы текущего года (флоэмо- и ксилогenez). Причинами такого действия могут быть как ускорение заживления непосредственно в зоне травматизации, так и блокировка исходящих из этой зоны сигналов. Данные пилотные результаты открывают перспективу применения цитоактивного композитного нанокристаллического материала «ЛитАр» как активатора биологических процессов в объектах сельского хозяйства.

Библиографический список

1. *Леонтьев В.К., Литвинов С.Д., Судакова Т.В.* Имплантационные материалы для замещения дефектов костной и хрящевой ткани // *Российский вестник дентальной имплантологии*, 2003. № 2. С. 10-19.
2. *Berenguer A.* Clay-collagen complex an process for their retention. European patent specification 0154741 Bl. A 61 127/00. 14.03.84.
3. *Chu G., Marthan R.* Inductive collagen — based bone repair preparations. United States Patent N 4. 886336. 19.12.1989.
4. *Toa N.K.* Fibrous bone filler and process of producing the same. European Patent N 0241753 H61 1 27/00. 20.03.86.
5. *Ruhland N.* Material zum vitalisieren von implantatoberflächen. Dtsch. Paten-tamt. DE 3409372 Al. 19.09.85.
6. *Pier K.A., Brace B.Ph.* Xenogenic collagen/mineral preparations in bone repair. Unated States Patent N 4. 795.467. 03.01.89.
7. *Ries P., Mittemeler H.* Verfahren zur Her stellung von Knochensaltz Material. European Patent 0164483 Bl. 12.06.84.

8. Поляков В.В., Чеменов Г.Г. Способ остеосинтеза. А. С. 1685420 от 28.09.88.
9. Park J.B., Lakes R.S. Biomaterials: New York. Plenum Press, 1992.
10. Ogino M., Ohuchi F., Hench L.L. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate film on bioglass // J. Biomed. Mater. Res., 1986. Vol. 12. P. 55-64.
11. Torigama M. Composition for coating bioceramics and composite bioceramics produced there with. United States patent N 4988362. 29.01.91.
12. Bolander M.R., Bllian G. Use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects. United States Patent N 4902296. 20.02.90.
13. Grunecker A. Fleible Prothesen Mirivorgegebener Geitalt und verfahren zu ihrer Herstellung. Dtsch. Patent D.E. 3611798 Al. 04.12.86.
14. Heikkila I. Bioactive glass versus hydroxyapatite in reconstration of osteochondral defects in rabbit // Acta orthop. Scand., 1993. Vol. 64, N 6. P. 678-682.
15. Berenguer A. Clay-collagen complex an process for their retention. European patent specification ol54741 Bl. A 61 127/00. 14.03.84.
16. Савельев В.И., Родюкова Е.И. Трансплантация костной ткани. Новосибирск: Наука, 1992.
17. Уокер Дж. Формальдегид. М.: Иностран. лит-ра, 1957.
18. Волова Л.Т. Аллогенные деминерализованные костные матриксы и регуляция остеогенеза: Автореф. докт. дис. М., 1997.
19. Прокопова Л.В., Николаева Н.Г. Использование УФ-облучённой аутооспонгиозы при костнопластических операциях у детей // Вест. хир. им. И.И. Грекова, 1990. Т. 145. № 12. С. 58-61.
20. Паньшин А.Г., Соколова Л.И., Фридлянская И.И. Цитотоксические свойства слабых растворов формальдегида // Трансплантация биологических тканей, стерилизованных и консервированных формалином, 1980. Вып. 5. С. 26-34.
21. Парфентьева В.Ф., Разводовский В.Д., Дмитриенко В.И. Консервация гомологичных костных трансплантатов. Кишинёв: Картя Молдовеняска, 1969.
22. Smetstad T.L. Gamma irradiation of collagen/mineral mixtures. European Patent N 0270254. A 61 L 27/00. 06.11.86.
23. Лекишвили М.В., Исаева Е.И., Пономарёв В.Н., Васильев М.Г. Лучевая стерилизация деминерализованных костных трансплантатов в свете профилактики инфицирования гепатитов В и С // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, 2002. № 1. С. 75-77.
24. Леонтьев В.К., Литвинов С.Д., Судакова Т.В. Имплантационные материалы для замещения дефектов костной и хрящевой ткани // Российский вестник дентальной имплантологии, 2003. № 2. С. 10-19.
25. Schlegel A., Donath K. BIO-OSS — A resorbable bone substitute? // J Long-Term Effects Med. Impl, 1998. N 8. P. 201-209.
26. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. М.: Техносфера, 2007.
27. Park J.B., Lakes R.S. Biomaterials. An Introduction. N-York and London, 1992. 394 p.
28. Hayaschi K., Yabuhi T., Tabuchi K., Fujii T. Repair of experimental bone defect with a collagen block containing synthesized apatite // Arch. Orthop. Trauma. Surg., 1982. N 4. P. 265-269.
29. Mittelmeier H., Katthagen B.D. Clinical experience with the implantation of collagen-apatite for local bone regeneration // Z. Orthop. Ihre. Grenzgeb., 1983. N 2. P. 115-123.
30. Gineste L., Gineste M., Ranz X. et al. Degradation of hydroxylapatite, fluorapatite, and fluorhydroxyapatite coating of dental implants in dogs // J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.), 1999. N 3. P. 224-234.
31. Ньюман У., Ньюман М. Минеральный обмен кости. М.: Изд. ин. лит., 1961.
32. Корзухин М.Д. Колебательные процессы в биологических и химических системах. Под. ред. Г.М. Франка. М., 1967.

33. Эттейн И.Р., Кастин К., Де Кеннер П., Орбан М. Колебательные химические реакции // В мире науки, 1983. № 5. С. 72—81.
34. Litvinov S.D., Chigarina S.E. Material «LitAr» for biological filling root canals // Intern. Dent. J. (Pub by FDI World Dent. Press), 2001. N 5.
35. Литвинов С.Д., Буланов С.И. Коллаген-апатитовый материал при замещении дефектов костной ткани челюсти // Стоматология, 2001. № 3. С. 7-12.
36. Литвинов С.Д., Серёгин А.С., Пуштова Т.Б., Олейникова М.М. Перспективы применения материала «ЛитАр» для восстановления хрящевой перегородки носа у детей // Российская оториноларингология, 2006. № 3(22). С. 66-70.
37. Селякин С.П., Чуйков В.М., Марков А.И., Назаров С.Б. Применение коллаген-гидроксиапатитового материала «ЛитАр» в условиях репаративной регенерации легочной ткани // Успехи современного естествознания, 2005. № 12.
38. Markov I.I., Litvinov S.D., Van'kov V.A., Skvortzov O.I. Stimulation of the posttraumatic cellular myocardium regeneration by means of the polymer-salt-based composite material LitAr // The International Journal of Artificial Organs, 2009. Vol. 32. N 7.
39. Баринов С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция; Институт физико-химических проблем керамических материалов. М.: Наука, 2005.
40. Хенч Л., Джонс Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. М.: Техносфера, 2007.
41. Литвинов С.Д., Ершов Ю.А. Биоадекватный имплантационный материал на основе коллаген-гидроксолевого композита // Материаловедение, 2000. № 7. С. 34-38.
42. Litvinov S.D., Krasnov A.F., Ershov Yu.A. Specific Features of Bone Tissue Regeneration after Replacement of the defect with a Synthetic Implant // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. Plenum Publishing Corporation, 1995. Vol. 119. № 4. P. 422-425.
43. Литвинов С.Д. Наноразмерный материал «ЛитАр» и перспективы его применения в медицине и сельском хозяйстве. Нанобиотехнологии в сельском хозяйстве. Доклады Международной научно-практической конференции 15-19 декабря 2008 г. М.: Изд-во РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, 2008. С. 42-43.
44. Петров А.К., Козлов А.С., Тарабан М.Б., Горячковская Т.Н., Малышкин С.Б., Попик В.М., Пельтек С.Е. Мягкая абляция объектов под воздействием субмиллиметрового излучения лазера на свободных электронах // Доклады Академии Наук, 2005. Т. 404. № 5. С. 698-700.
45. Velard F., Laurent-Maquin D., Bouthors S., Jallot E., Nedelee J.M., Be-laouaj A., Laquerriere P. Zinc Doped Hydroxyapatite as Immunomodulatory Bio-material // Journal of Artificial Organs, 2009. Vol. 32. № 7.

Рецензент — к. с.-х. н. М.С. Раскин

SUMMARY

Implantation materials analysis, necessary synthesis conditions of universal material for tissue defects compensation, data on cyto-active biopolymer-saline composite synthesis are adduced in the article. Both effectiveness and perspectives of stem cells use, functioning as selective regeneration initiators, have been considered. Cyto-active composite material mechanism of action version for various tissue types regeneration has been offered.

Key words: biopolymer-saline composite, biomaterial, nanosized hydroxyl- and hydroxylfluorine apatite, tissue regeneration, stem cells.

Литвинов Сергей Дмитриевич — д. фарм. н. Эл. почта: litar21@yandex.ru