

НАНОБИОМАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ МИНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА КОСТНОЙ ТКАНИ

© 2011 Е.В. Писарева¹, Л.Т. Волова², М.Ю. Власов², А.Б. Соколовская¹

¹ Самарский государственный университет

² Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 02.12.2011

Разработан новый способ получения нанобиоматериала – аллогенного гидроксиапатита (ГАП) и способ его введения в организм путем создания эктопического депо в мышечной ткани. Определён химический состав материала. Проведены испытания препарата на двух моделях резорбции костной ткани у животных. В исследованных моделях выявлены изменения уровня основных биохимических маркеров коллагенового обмена, которые при введении препарата были менее выражены.

Ключевые слова: *гидроксиапатит, остеорезорбция, метаболизм, костная ткань*

В настоящее время для замещения костных дефектов в хирургической стоматологии, ортопедии и травматологии используются много различных видов гидроксиапатита (ГАП), отличающихся по форме и величине частиц. Экспериментально и клинически показано, что использование ГАП имеет значительные преимущества перед другими имплантационными материалами [1-3]. К его положительным характеристикам относятся такие показатели как легкость стерилизации, продолжительный срок хранения, высокий уровень биосовместимости и крайне медленная резорбция в организме [4]. В процессе замещения костного дефекта в присутствии ГАП под влиянием биологических жидкостей и тканевых ферментов он может частично или полностью резорбироваться [5]. Поскольку ГАП является кальцийсодержащим материалом, интересным является его использование не только в хирургии и стоматологии при замещении костных дефектов, но и для коррекции метаболических нарушений костной ткани при остеорезорбции и остеопорозе. Существующие способы лечения, связанные в основном с пероральным применением кальцийсодержащих препаратов, несмотря на большое

многообразие лекарственных средств не достаточно эффективны, поскольку большинство пациентов имеют заболевания желудочно-кишечного тракта и в связи с этим нарушение всасывания кальция в кишечнике [6, 7]. Поэтому создание новых высокоэффективных препаратов с использованием современных, приоритетных технологий, а также поиск альтернативных способов введения препаратов в организм является весьма актуальным и оправданным на сегодняшний день.

Цель исследования: разработка способов получения и исследование свойств минерального кальцийсодержащего материала аллогенного происхождения.

Материалы и методы. Аттестация частиц и определение химического состава препарата проводились на базе Самарских вузов и НИИ Российской академии наук, Российской академии медицинских наук и Российской академии сельскохозяйственных наук методами трансмиссионной и сканирующей зондовой микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии, атомно-адсорбционного анализа, пламенной фотометрии с использованием атомно-абсорбционного анализатора «Varian» SpectrAA 200 с помощью гидридной приставки VGA 77 [8], рентгено-флуоресцентного анализатора БРА 18 [9], пламенного фотометра ПАЖ 2, электронного микроскопа ЭМБ-100б и сканирующего зондового электронного микроскопа Solver PRO-M [10]. Определение микробиологической чистоты полученных препаратов проводили согласно статьи Госфармакопии XI издание, выпуск № 2 «Методы микробиологического контроля лекарственных средств» с использованием эталонных культур *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [11-13].

Писарева Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биохимии. E-mail: pella1@rambler.ru

Волова Лариса Теодоровна, доктор медицинских наук, профессор, директор Института экспериментальной медицины и биотехнологий. E-mail: csrl.sam@mail.ru

Власов Михаил Юрьевич, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник Института экспериментальной медицины и биотехнологий. E-mail: mvlasov1@rambler.ru

Соколовская Алена Борисовна, магистрант

Для изучения метаболизма костной ткани на уровне целостного организма проведено испытание материала на патогенетических моделях остеорезорбции – гипоэстрогенной (самки) и гиперглюкокортикоидной (самцы). Преимущество этих моделей – высокая скорость и быстрота формирования данного патологического процесса [14-16]. Исследования проведены на 1000 животных. В каждой модельной серии выделяли по 5 экспериментальных групп: 1 – контроль (интактные животные), 2 – резорбция (овариоэктомия, инъекции глюкокортикоидов), 3 – опыт (введение ГАП на фоне резорбции), 4 – плацебо (инъекции изотонического раствора NaCl на фоне резорбции), 5 – группа сравнения (введение ГАП здоровым животным). Также были исследованы различные дозы (от 10 до 200 мг/мл), кратность и динамика введения препарата. Все животные содержались в аналогичных условиях вивария на сбалансированном по белкам, жирам, углеводам и микроэлементам рационе питания. Для проведения биохимических исследований животных умерщвляли путем декапитации. Все экспериментальные процедуры проводились согласно международным правилам по содержанию и работе с лабораторными животными [17]. В экспериментах изучали содержание связанного и свободного оксипролина в сыворотке крови – по методу Крель А.А., Фурцевой Л.Н. [18], активность щелочной фосфатазы и концентрацию неорганического фосфата по методу Боданского А. и Ca^{2+} по методу Вишневской Т.М., Ляшевской Т.Н. [19]. Проводили биометрическое измерение бедренных костей крыс. Полученные в экспериментах результаты подвергали статистической обработке стандартным способом, используя *t*-критерий Стьюдента, с применением пакетов прикладных программ «Microsoft Excel», «Statistica 5.0». Изменения исследуемых показателей считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$. Нормальность распределения подтверждали определением коэффициентов асимметрии, эксцесса, критериев Пирсона и Фишера.

Результаты исследований и их обсуждение. В Институте экспериментальной медицины и биотехнологий Самарского государственного медицинского университета впервые предложена и разработана технология получения аллогенного ГАП в рамках безотходного и экологически безопасного производства имплантатов из биологических тканей. Суть технологии заключается в одновременном получении сразу двух видов биоматериала: деминерализованного костного матрикса и естественного происхождения ГАП, который получается путем осаждения минерального компонента из деминерализующего костную ткань раствора. Способ запатентован в РФ [20].

В результате исследований установлен химический спектр биоматериала. В отличие от всех известных кальцийсодержащих препаратов и синтетического ГАП натуральный минеральный материал, наряду с кальцием и фосфором, содержит комплекс микроэлементов, которые входят в неорганический компонент костной ткани человека: Ca – 413-537 мг/г; P – 167-380 мг/г; Mg – 1,30-3,50 мг/г; Fe – 0,09-0,026 мг/г; Zn – 0,01-0,820 мг/г; Co – 0,011-0,024 мг/г; Cr – 0,006-0,020 мг/г. Характерной особенностью препарата является высокое содержание в нем магния – стимулятора остеогенеза. Качественный анализ выделенного ГАП на рентгено-флуоресцентном анализаторе показал наряду с ранее выявленными наличие большого количества других микроэлементов: Cu, Ti, Ge, V, I, Al, Ni, Ba, а также Cl, Sr и др. Наличие последних элементов может быть связано с описанными ниже эффектами воздействия ГАП на рост патогенной микрофлоры и чувствительность к антибиотикам, а также влиянием на метаболизм костной ткани, поскольку соли Sr на сегодняшний день относятся к перспективным направлениям антиостеопоретической терапии [7]. Исследования с помощью трансмиссионной и сканирующей зондовой микроскопии показали, что данный материал на 60-70% состоит из частиц размером менее 100 нм, таким образом он может быть отнесён к бионаноматериалам [21].

Таблица 1. Число выросших колоний *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* при определении числа жизнеспособных бактерий методом посева на плотные питательные среды

Параметр	Разведение исходной суспензии (КОЕ/мл)						
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
числовая характеристика (контроль <i>S.aureus</i>)	>300	>300	>300	>300	>300	200	16
числовая характеристика (опыт) <i>S.aureus</i>	>300	>300	>300	>300	>300	26	2
числовая характеристика контроль <i>E.coli</i>	>300	>300	>300	>300	>300	230	39
числовая характеристика (опыт) <i>E.coli</i>	>300	>300	>300	>300	>300	104	18

Таблица 2. Определение чувствительности к антибиотикам в культуре *Escherichia coli* методом бумажных дисков

Вид бактерий	Величина зоны задержки роста (в мм)					
	левоми- цитин	ампи- цилин	гента- мицин	тетра- циклин	цефта- зидин	имипе- нем
<i>E. coli</i> контроль	26	17	17	16	20	24
<i>E. coli</i> + ГАП опыт	26	17	20	22	18	20

Таблица 3. Определение чувствительности к антибиотикам в культуре *Staphylococcus aureus* методом бумажных дисков

Вид бактерий	Величина зоны задержки роста (в мм)					
	фузидин	ампи- цилин	гента- мицин	цефало- тин	офлок- сацин	окса- циллин
<i>S. aureus</i> контроль	23	22	19	28	20	15
<i>S. aureus</i> + ГАП опыт	24	24	20	27	20	20

При определении чувствительности культур микроорганизмов к антибиотикам выявлено, что под влиянием аллогенного ГАП интенсивность роста культуры *E. coli* снизилась в 2 раза, а *S. aureus* – в 8 раз (таблица 1), при этом у *E. coli* повысилась чувствительность к тетрациклину (таблица 2), а у *S. aureus* – к оксациллину (таблица 3).

Полученные результаты могут оказаться важными в практическом плане, поскольку к наиболее опасным и часто встречающимся осложнениям, развивающимся на фоне иммуносупрессии, возникающей после хирургического вмешательства, относятся инфекции, возбудителями которых являются, главным образом, условнопатогенные представители нормальной микрофлоры организма *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* [22]. На основании проведенных исследований установлено, что получаемый в ИЭМБ СамГМУ ГАП является стерильным и отличается высоким качеством по показателю «Микробиологическая чистота».

Разработан и запатентован новый способ введения ГАП в мышцу с целью создания эктопического депо минерального компонента кости для стимуляции остеогенеза [23]. Результаты проведенных ранее биохимических исследований [24-25] показали, что у животных во всех моделях остеопороза развиваются процессы резорбции костной ткани, биометрические показатели свидетельствуют о снижении массы и плотности костей конечностей крыс. При этом отмечено повышение уровня свободного оксипролина (маркера распада коллагена) – на 50% при введении глюкокортикоидов, тогда как удаление яичников не вызвало явных изменений данного показателя. Введение ГАП экспериментальным животным приводило к возвращению показателя к контрольным значениям. Процессы разрушения кости сопровождались

также уменьшением интенсивности биосинтеза коллагена, выраженном в достоверном снижении уровня одного из маркеров костного ремоделирования – белковосвязанного оксипролина – у всех животных независимо от способа моделирования резорбции. Внутримышечное введение суспензии аллогенного ГАП на фоне создаваемой резорбции приводило к нормализации этого показателя.

В настоящем исследовании отмечено снижение концентрации свободного оксипролина в сыворотке крови крыс, которым вводили дозы аллогенного ГАП в диапазоне от 10 до 40 мг/мл, поэтому для исследования воздействия различных вариантов введения аллогенного ГАП (однократно и двукратно) было решено использовать указанный диапазон доз ГАП с шагом в 10 мг/мл. Содержание белковосвязанного оксипролина у животных, которым в разное время в зависимости от проведения операции делали инъекции аллогенного ГАП, свидетельствует о том, что введение ГАП в дозировке 30 мг/мл с лечебной целью (однократное введение) и с лечебной и профилактической одновременно (двукратное введение) сопровождается значительным повышением уровня этого показателя по сравнению с группой оперированных крыс. Можно предположить, что ГАП вызывает стимуляцию ремоделирования костной ткани в этих группах. Активность щелочной фосфатазы достоверно снижалась на 35% и 28% в обеих патогенетических моделях. Эктопическая имплантация суспензии аллогенного ГАП в мышцу опытных и интактных животных приводила к возрастанию активности щелочной фосфатазы, что характерно для процессов дифференцировки остеобластов в условиях регенерации костной ткани. Уровни кальция и неорганического фосфата находились в пределах физиологической нормы, что можно объяснить действием механизмов фосфорно-

кальциевого гомеостаза. Однако в границах физиологической нормы у животных при введении ГАП на фоне гипоестрогении отмечается повышение уровня кальция в сыворотке на 25%, а в группе сравнения – на 38%. У животных всех опытных серий после имплантации ГАП уже через 2 месяца отмечено повышение плотности и увеличение костной массы, особенно в сериях крыс с удаленными яичниками и при введении стероидов. Внутримышечное введение аллогенного ГАП интактным животным (группа сравнения) не вызывало существенных изменений исследуемых показателей метаболизма костной ткани.

Выводы: в рамках нового биотехнологического производства получен эффективный комплексный минеральный наноматериал, оказывающий влияние на метаболизм и ремоделирование костной ткани. Комплексный анализ препаратов аллогенного ГАП позволяет сделать вывод о их микробиологической чистоте категории 1.2 (пригодны для производства стерильных препаратов). Пролонгированное действие аллогенного ГАП осуществляется за счет создания его эктопического депо. Доклинические исследования *in vivo* подтверждают безопасность и безвредность препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Лесников, В.Н.* Внутрикостные стоматологические имплантанты. Конструкции, производство и применение в клинической практике // Под ред. *В.Н. Лесникова, А.В. Лепилина.* – Саратов: Саратовский университет, 1997. С. 48-51.
2. *Писарева, Е.В.* Влияние аллогенного гидроксиапатита на метаболизм костной ткани / *Е.В. Писарева, М.Ю. Власов, О.В. Грибкова* и др. // Вестник Самарского государственного университета. Естественнонаучная серия. 2007. Т. 58. С. 191-197.
3. *Klein, A.A.* Biodegradation behavior of various calcium phosphates // *J. Biomaterials Res.* 1983. V. 17, N 5. P. 769-784.
4. *Воложин, А.И.* Остеопластическая эффективность различных форм гидроксиапатита по данным экспериментально-морфологического исследования / *А.И. Воложин, В.С. Агапов* и др. // Стоматология. 2000. Т. 79, №3. С. 4-15.
5. *Jarcho, M.* Calcium Phosphate Ceramics as Hard Tissue Prosthetics // *Clin. Orthop.* 1981. V. 157. P. 259-278.
6. *Лоренс Риггз, Б.* Остеопороз: этиология, диагностика, лечение / *Б. Лоренс Риггз.* – М.: Бином, 2000. 558 с.
7. *Шварц, Г.Я.* Фармакотерапия остеопороза. – М.: Медицинское информационное агентство, 2002. 368 с.
8. *Ермаченко, Л.А.* Атомно-абсорбционный анализ в санитарно-гигиенических исследованиях / Под ред. *Л.Г. Подуновой.* – М.: Изд-во Чувашия, 1997. 207 с.
9. *Павлинский, Г.В.* Основы физики рентгеновского излучения. – М.: Физматлит, 2007. 240 с.
10. *Журавель, Л.В.* Метрология наноразмерных порошков биоматериала с использованием поверхности пористого кремния / *Л.В. Журавель, Н.В. Латухина, Е.В. Писарева* и др. // Нанотехнологии. Сборник докладов Харьковской нанотехнологической ассамблеи. 2008. Т. 1. С. 187-191.
11. *Каграманова, К.А.* Испытание на стерильность. Методы микробиологического контроля лекарственных средств. Проект Общей фармакопейной статьи для ГФ XII изд. / *К.А. Каграманова, Н.И. Каламова, С.В. Денисова* и др. // Ремедиум. Ведомости Научного Центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств МЗ РФ (НЦ ЭГКЛС). 2002. №2. С. 52-58.
12. *Гунар, О.В.* Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / *О.В. Гунар, Л.А. Каграманова* // Санитарно-микробиологическое исследование фармацевтических препаратов / Под ред. *А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной.* – М.: БИНОМ, 2008. С. 989-1011.
13. *Поляк, М.С.* Определение чувствительности к противомикробным препаратам «Методом дисков». – СПб.: Медицина, 1997. 56 с.
14. *Писарева, Е.В.* Влияние дефицита эстрогенов и инъекций глюкокортикоидов на метаболизм костной ткани у животных / *Е.В. Писарева, М.Ю. Власов* // Известия Самарского научного центра РАН. Т. 11. № 1(4). 2009. С. 737-739.
15. *Власов, М.Ю.* Биохимические маркеры метаболизма костной ткани у крыс при стероидиндуцированной остеорезорбции / *М.Ю. Власов, Е.В. Писарева* // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2009. № 2(25). С. 272-273.
16. *Власов, М.Ю.* Содержание 11-оксикортикостероидов, эстрадиола и тиреотропного гормона у животных при моделировании гипоестрогенной и глюкокортикоидной остеорезорбции / *М.Ю. Власов, Е.В. Писарева* // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2009. № 2(25). С. 270-271.
17. European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC
18. *Крель, А.А.* Методы определения оксипролина в биологических жидкостях и их применение в клинической практике / *А.А. Крель, Л.Н. Фурцева* // Вопр. мед. химии. 1968. № 6. С. 635-643.
19. *Колб, В.Г.* Справочник по клинической химии / *В.Г. Колб, В.С. Камышиников.* – Минск: Беларусь, 1982. 121 с.
20. *Волова, Л.Т.* Способ получения аллогенного гидроксиапатита / *Л.Т. Волова, В.Г. Подковкин* // Патент на изобретение № 2168998 (РФ). Зарегистрирован 14.02.2000 г.
21. *Волова, Л.Т.* Биоимплантат для восстановления структуры и объема костной ткани / *Л.Т. Волова, В.Г. Подковкин, Е.В. Писарева, М.Ю. Власов* // Патент на изобретение № 2372892 (РФ). Зарегистрирован 16.06.2008 г.
22. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология // Под ред. *Л.Б. Борисова.* – М.: Медицина, 1994. 200 с.
23. *Волова, Л.Т.* Способ стимуляции остеогенеза / *Л.Т. Волова, В.Г. Подковкин, М.Ю. Власов* // Патент на изобретение № 2219933 (РФ). Зарегистрирован 27.12.2003 г.

24. *Писарева, Е.В.* Влияние аллогенного гидроксиапатита на процессы метаболизма костной ткани у животных // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2009. № 2(25). С. 291-292.
25. *Писарева, Е.В.* Применение аллогенного гидроксиапатита для коррекции резорбции костной ткани // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2009. № 2(25). С. 292-293.
26. *Писарева, Е.В.* Влияние минерального компонента костной ткани на процессы остеорезорбции / *Е.В. Писарева, М.Ю. Власов* // Междунар. журн. приклад. и фунд. исследований. 2010. № 11. С. 44-45.

NANOBIOMATERIAL ON THE BASIS OF BONE TISSUE MINERAL COMPONENT

© 2011 E.V. Pisareva¹, L.T. Volova², M.Yu. Vlasov², A.B. Sokolovskaya¹

¹ Samara State University

² Samara State Medical University

The new way of reception the nanobiomaterial – allogenic hydroxyapatite (GAP) and way of its introduction in organism by creation the ectopic depot in muscular tissue is developed. Chemical composition of material is defined. Tests of preparation for two models of bone tissue resorption at animals are conducted. In the investigated models changes in level of the basic biochemical markers of collagenic exchange, which at preparation introduction have been less expressed, are revealed.

Key words: *hydroxyapatite, osteoresorption, metabolism, bone tissue*

Elena Pisareva, Candidate of Biology, Senior Lecturer at the Biochemistry Department. E-mail: pella1@rambler.ru

Larisa Volova, Doctor of Medicine, Professor, Director of the Institute of Experimental Medicine and Biotechnologies.

E-mail: csrl.sam@mail.ru

Mikhail Vlasov, Candidate of Biology, Minor Research Fellow at the Institute of Experimental Medicine and Biotechnologies.

E-mail: mvlasov1@rambler.ru

Alyona Sokolovskaya, Magistrant