

УДК 544.72

**МЕТОД ОЧИСТКИ И МОДИФИКАЦИИ МАТЕРИАЛА
ДЛЯ КОСТНЫХ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ В БИФАЗНЫХ СРЕДАХ,
СОДЕРЖАЩИХ CO₂ ПОД ВЫСОКИМ ДАВЛЕНИЕМ**

М. В. Булат¹, М. А. Пигалёва^{1,*}, И. В. Новиков¹, Э. Е. Левин¹, М. О. Галлямов^{1,2}

Представлено академиком РАН А.Р. Хохловым 13.12.2018 г.

Поступило 13.12.2018 г.

Впервые предложен перспективный метод очистки фрагментов костной ткани животного происхождения от высокомолекулярных соединений в бифазных средах, содержащих CO₂ под высоким давлением, а именно в растворах угольной и пероксиугольной кислот. Эффективность такой очистки подтверждена с помощью СЭМ и ИК-спектроскопии. Оказалось, что при экспозиции фрагментов костей в растворах угольной и пероксиугольной кислот под высоким давлением CO₂ экстрагируются также и компоненты минеральной составляющей костной ткани, что при пересадении экстракта позволяет получать высокодисперсные частицы гидроксиапатита. Структура и состав экстрактов исследованы методами РСА и сканирующей электронной микроскопии.

Ключевые слова: костная ткань, сверхкритический CO₂, угольная кислота, пероксиугольная кислота, экстракция, гидроксиапатит.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524855588-593>

Растущее по всему миру число остеопластических операций и ужесточение регуляционных норм, применяемых к костным трансплантатам относительно их стерильности и биосовместимости, обуславливают необходимость поиска оптимальных подходов к подготовке костного материала высокого качества для нужд регенеративной медицины [1].

Использование не только сверхкритического (СК) CO₂, но и некоторых двухфазных систем, включающих в качестве неполярной фазы CO₂ под высоким давлением, для модификации костной ткани представляется перспективным, но малоизученным методом. Уникальной особенностью среды, содержащей CO₂ под высоким давлением, является то, что после окончания процесса модификации биоткани и декомпрессии CO₂, будучи газом при нормальных условиях, самопроизвольно покидает модифицированный готовый продукт. Это удобное и простое решение проблемы остаточного растворителя важно для приложений, требующих высокой чистоты материалов, включая медицину.

Известно использование в биомедицинских приложениях либо чистого СК CO₂, либо СК CO₂ в присутствии сорастворителей с сохранением гомофаз-

ной и, как правило, сверхкритической системы. Действительно, установлено, что неполярный СК CO₂ способен глубоко проникать в пористые матрицы и эффективно экстрагировать растворимые в нём слабополярные компоненты, такие, например, как липиды [2, 3]. Однако отмечается, что его растворяющая способность применительно к полярным веществам весьма ограничена. Эту проблему решают добавлением полярных сорастворителей к CO₂, что улучшает искомую экстракционную способность. Во всех описанных в литературе случаях использования сорастворителя для СК CO₂ при очистке костной ткани [4, 5] авторы стремились добавлять лишь малые его количества (доли процента) с целью сохранить гомогенную фазу, причём в сверхкритических условиях. Мы предлагаем отказаться от этой традиционной концепции и перейти к использованию заведомо больших количеств полярного сорастворителя, сопоставимых с количеством самого CO₂ под давлением в реакторе. В этих условиях гомофазность системы сохранить не удастся и в реакторе будет происходить фазовое разделение на полярную и неполярную фазы, в определённой степени насыщаемые вторым компонентом. Однако такие бифазные системы с фазоворазделённым неполярным CO₂ (насыщаемым полярным компонентом) и полярной жидкостной фазой (насыщаемой CO₂) представляются нам эффективными для растворения как неполярных, так и по-

¹Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова

²Институт элементоорганических соединений
им. А.Н. Несмеянова Российской Академии наук, Москва
*E-mail: pigaleva@polly.phys.msu.ru

лярных, а также амфифильных соединений (последнее при условии формирования развитой границы раздела фаз, служащей для них аттрактором). Поскольку подлежащие экстракции для самой возможности последующего использования костного материала в регенеративной медицине липиды, белки, полисахариды, их ковалентно связанные гибриды, комплексы и иные высокомолекулярные соединения остаточного клеточного материала (включая остециты) характеризуются весьма различными степенями гидро-, липо- и амфифильности, такой комплексный подход позволяет ожидать их более полного удаления. Приложение высокого давления p в сотни атмосфер обеспечивает, согласно известному соотношению Уошберна $r \sim -2\sigma \cos \theta / p$ (где σ — поверхностное натяжение жидкости, θ — угол смачивания ею стенок пор), доступ жидкости в исходно не смачиваемые ею поры радиусом r до единиц нанометров, устраняя противодействие капиллярных эффектов, что и позволяет эффективно осуществлять экстракцию из пористых матриц смешанными растворителями под давлением.

В настоящей работе в качестве второй фазы в бифазных системах под высоким давлением CO_2 выбраны вода и водный раствор перекиси водорода. Хорошо известно, что при растворении молекул CO_2 в воде и в перекиси водорода под давлением формируются угольная и пероксиугольная кислоты, соответственно самонейтрализующиеся при последующей декомпрессии [6].

Модификация костной ткани в бифазных системах под высоким давлением, содержащих фазоворазделенные CO_2 и водную среду с присутствием угольной и пероксиугольной кислот, проводилась по следующей схеме. Небольшой цилиндрический фрагмент костной ткани (кортикальная бедренная кость барана) высотой около 0,5 см и диаметром около 1,5 см, 5 мл полярного компонента бифазной системы (либо H_2O , полученная на установке Mil-

lipore Milli-Q Synthesis непосредственно перед экспериментом, либо 3%-й водный раствор H_2O_2 поставки “Sigma-Aldrich”) и магнитный перемешивающий элемент помещали в реактор высокого давления объемом 10 мл, крышка и стакан которого выполнены из нержавеющей стали, рубашка — из титана. После этого в реакторе с помощью ручного пресса (#81-5.75-10, “HIP”, США) нагнетали давление в 390 атм CO_2 (МГПЗ, Россия, высокой чистоты, >99,995%) при 25 °С. Температура последующей экспозиции закрытого реактора контролировалась водным термостатом (ET 15, “Lauda”, Германия) с магнитной мешалкой (40 °С и 25 °С для систем с угольной и пероксиугольной кислотами соответственно). Температура и давление подбирались таким образом, чтобы обеспечить близкие плотности двух фаз в бифазных системах. Через 24 ч экспозиции фрагментов костной ткани под высоким давлением CO_2 проводили озвучивание реакторов ультразвуком в течение 15 мин, чтобы увеличить границу раздела полярной и неполярной фаз в реакторе. Затем реактор медленно декомпрессировали. Образцы костного матрикса извлекали и сушили в термошкафу (FD23, “Binder”, Германия) при 40 °С в течение 24 ч. Сухой экстрагированный материал получали методом полива из растворов и последующего высушивания при 40 °С. По завершении как образцы, так и экстракты подвергали анализу. Образцы модифицированных костных фрагментов, исследованные методом рентгеновской и ИК-спектроскопии, предварительно измельчали в агатовой ступке.

Исследование морфологии внутренней структуры фрагментов костной ткани (поверхности сколов) до и после их обработки в растворах угольной и пероксиугольной кислот под высоким давлением CO_2 проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU8000 (Япония), следуя описанному ранее подходу [7] с использованием магнетронного запыления металлом (Pt/Pd, 80/20,

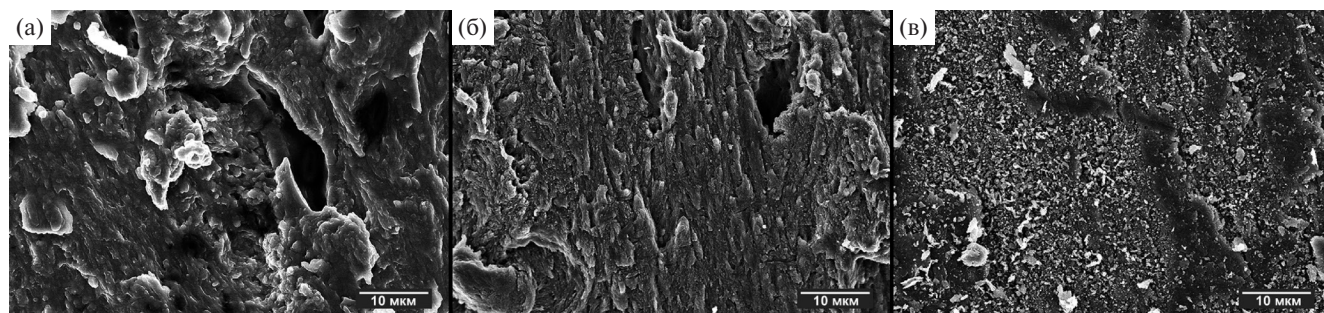


Рис. 1. СЭМ-изображения сколов костного материала: исходная, необработанная кость (а); обработанная (б, в) в растворах угольной кислоты (десять 24-часовых циклов при 390 атм и 25 °С с перемешиванием) (б), пероксиугольной кислоты (десять 24-часовых циклов при 390 атм и 40 °С с перемешиванием) (в).

10 нм) [8]. Съёмку изображений вели в режиме регистрации вторичных электронов при ускоряющем напряжении 10 кВ. На изображениях исходной кости видно присутствие маскирующей структуру костного композита плёнки (рис. 1а), тогда как на изображениях сколов костных фрагментов, обработанных в растворах угольной и пероксиугольной кислот под высоким давлением CO_2 , она отсутствует и внутренняя структура костной ткани просматривается более чётко, что можно считать подтверждением эффективности экстракции в таких бифазных средах [9]. В то же время видно, что происходит частичная деструкция костной ткани, экспонированной в растворах пероксиугольной кислоты под высоким давлением CO_2 , и это ведёт к образованию многочисленных осколков на поверхности костной ткани и свидетельствует об изменениях в неорганической фазе материала (рис. 1в).

Для дальнейшей оценки эффекта от воздействия бифазных систем, содержащих CO_2 под высоким давлением, на костную ткань образцы были исследованы с помощью инфракрасной спектроскопии. ИК-спектры образцов костной ткани регистрировали на спектрометре Nexus (“Thermo Nicolet”, USA) в режиме пропускания с использованием таблеток KBr в диапазоне $3600\text{--}600\text{ см}^{-1}$ (рис. 2). Можно отметить уменьшение интенсивности некоторых пиков, соответствующих липидным, белковым и полисахаридным компонентам и фрагментам в костных образцах после экспозиции в растворах угольной и пероксиугольной кислот (а именно пик 2960 см^{-1} , который может быть отнесён к ν_{as} -колебаниям CH_3 -групп, 2920 см^{-1} — ν_{as} — к колеба-

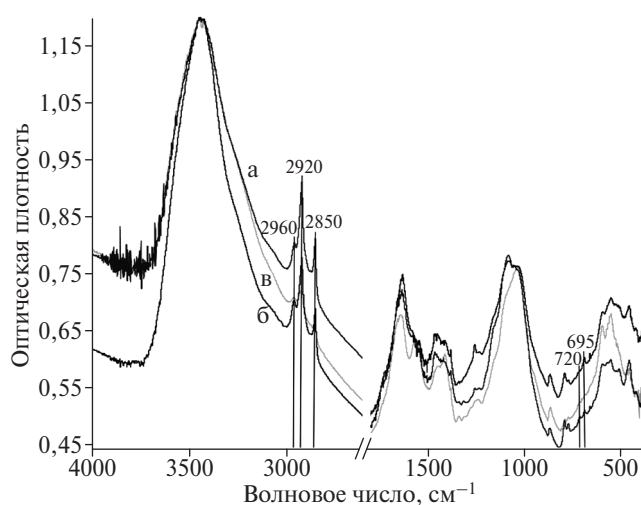


Рис. 2. ИК-спектры исходной костной ткани (а), а также обработанной (б, в) в растворах угольной (б) и пероксиугольной (в) кислот под высоким давлением CO_2 .

ниям CH_2 -групп, 2850 см^{-1} — к ν_{s} -колебаниям CH_2 -групп, а также полосы 720 см^{-1} — к маятниковым колебаниям CH_2 -групп и 695 см^{-1} — к δ_{CH} неполярным колебаниям групп $\text{HRC} = \text{CR}'\text{H}$).

Для определения кристаллической структуры неорганической фазы материала, экстрагированного из плёнок во время их экспозиции в присутствии угольной и пероксиугольной кислот под высоким давлением CO_2 , был проведён рентгеноструктурный анализ, а также сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) экстрактов, сопряжённая с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией.

Рентгеновские дифрактограммы измеряли в шаговом режиме на дифрактометре Rigaku D/Max RC (геометрия Брегга—Брентано, CuK_α -излучение) в интервале дифракционных углов $2\theta = 10^\circ\text{--}100^\circ$. Идентификацию кристаллических фаз проводили с использованием банка дифрактограмм ICDD PDF-4+ [10]. Количественный фазовый анализ проводили методом Ритвельда [11, 12] в программном пакете DDM 1.95 [13]. Рентгенограммы изученных образцов приведены на рис. 3. Образец исходной костной ткани (рис. 3а) содержит единственную фазу со структурой гидроксилатапата. Значительная ширина пиков связана с малостью размера когерентно дифрагирующего домена.

Некоторые расхождения расчётной и экспериментальной рентгенограмм связаны с неполным учётом анизотропного уширения в плоскости (110), вероятно, связанного с особенностями структурного упорядочения доменов неорганической фазы в костном материале. На рентгенограмме образца пересажённого экстракта, полученного из растворов угольной кислоты при экспозиции в ней фрагмента кости под высоким давлением CO_2 (рис. 3б), кроме фазы со структурой гидроксилатапата, идентифицированы следующие фазы: NaCl , KCl , CaCO_3 . Несистематические вариации интенсивности пиков CaCO_3 свидетельствуют о том, что наблюдаемые особенности не являются следствием наличия преимущественной кристаллографической ориентации (текстуры), а могут быть объяснены тем, что эта фаза находится в крупнокристаллическом состоянии, имитирующем текстуру за счёт малого количества частиц, попадающих в рентгеновский пучок во время измерения. Значительно большая ширина пиков пересажённого гидроксилатапата в сравнении с исходной, необработанной, костью свидетельствует о том, что пересажённая фаза находится в наноразмерном состоянии.

На рентгенограмме образца пересажённого экстракта, полученного из растворов пероксиуголь-

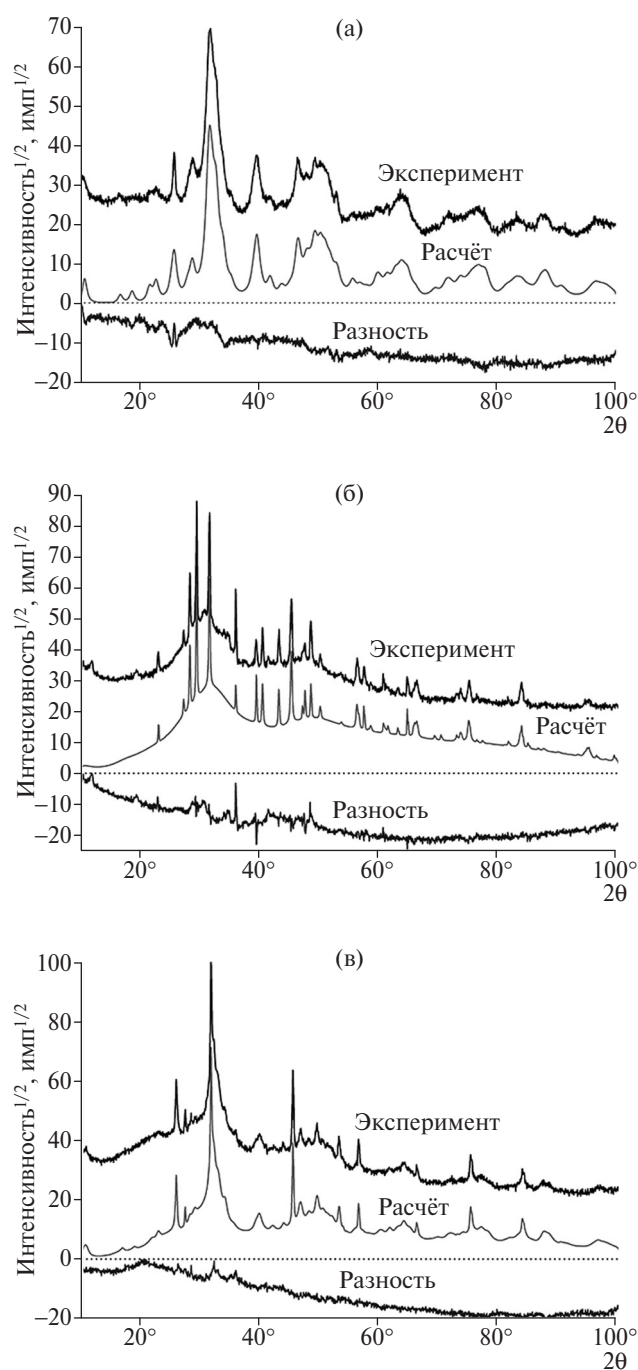


Рис. 3. Результаты полнопрофильного анализа дифрактограмм по методу Ритвельда. а — образец исходного, необработанного, костного фрагмента, образцы экстракта, полученные из растворов угольной (б) и пероксиугольной (в) кислот при экспозиции в них фрагмента кости под высоким давлением CO_2 .

ной кислоты при экспозиции в ней фрагмента кости под высоким давлением CO_2 , идентифицированы только гидроксилапатит и хлорид натрия, причём гидроксилапатит в виде двух фаз с существенно различными полуширинами пиков и находящимися примерно в равных весовых долях; фаза с большой

шириной аналогична той, что обнаружена в предыдущем описанном образце.

Наличие в системе фаз, значительно различающихся по полуширинам, может свидетельствовать о протекавшем в ходе получения образца процессе кристаллизации. Стоит отметить, что ширины пиков фазы с меньшей шириной меньше, чем у образца “контроль”, т.е. она находится в более закристаллизованной форме.

Отсутствие карбоната кальция в костном экстракте, полученном из растворов пероксиугольной кислоты под высоким давлением CO_2 , можно объяснить следующим образом. Известно, что карбонат кальция слабо растворим в воде, но лучше растворяется в присутствии перекиси водорода благодаря более низким значениям рН и более высоким значениям диэлектрической проницаемости [14]. Поэтому в отсутствие перекиси водорода можно ожидать более выраженного роста диспергированных кристаллических частиц карбоната кальция по мере растворения исходного гидроксилапатита кости в процессе экспозиции.

Морфологию частиц исходного материала и перееосаждённого экстракта сравнивали на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6490LV в отражённых электронах (полупроводниковый детектор, напряжение 10 кВ, режим суммирования), без запыления. Характеристические рентгеновские спектры измеряли с использованием приставки локального рентгеноспектрального анализа INCA X-sight (“Oxford Instruments”). Микрофотографии образцов приведены на рис. 4. Частицы исходного, необработанного, фрагмента кости (рис. 4а) не обладают правильной формой. На сколах видны следы слоёв, вероятно, объясняющих наблюдаемую анизотропию пиков на дифрактограмме.

Ввиду сильного заряжения всех образцов в отсутствие запыления металлом достоверность количественного анализа рентгеновских спектров будет невысока, поэтому обсуждение ограничено информацией качественного характера. На рентгеновском спектре исходного образца костной ткани обнаружены линии, характерные для гидроксилапатита: Са, Р, О. Также зарегистрированы линии магния, натрия, азота и углерода (последние два характерны для органической компоненты матрикса). Образец экстракта, полученного из растворов угольной кислоты при экспозиции в ней фрагмента кости под высоким давлением CO_2 (рис. 4б), представляет собой смесь частиц двух различных морфологий. Частицы первого типа представляют собой большие пластинки размером 10–50 мкм и толщиной менее

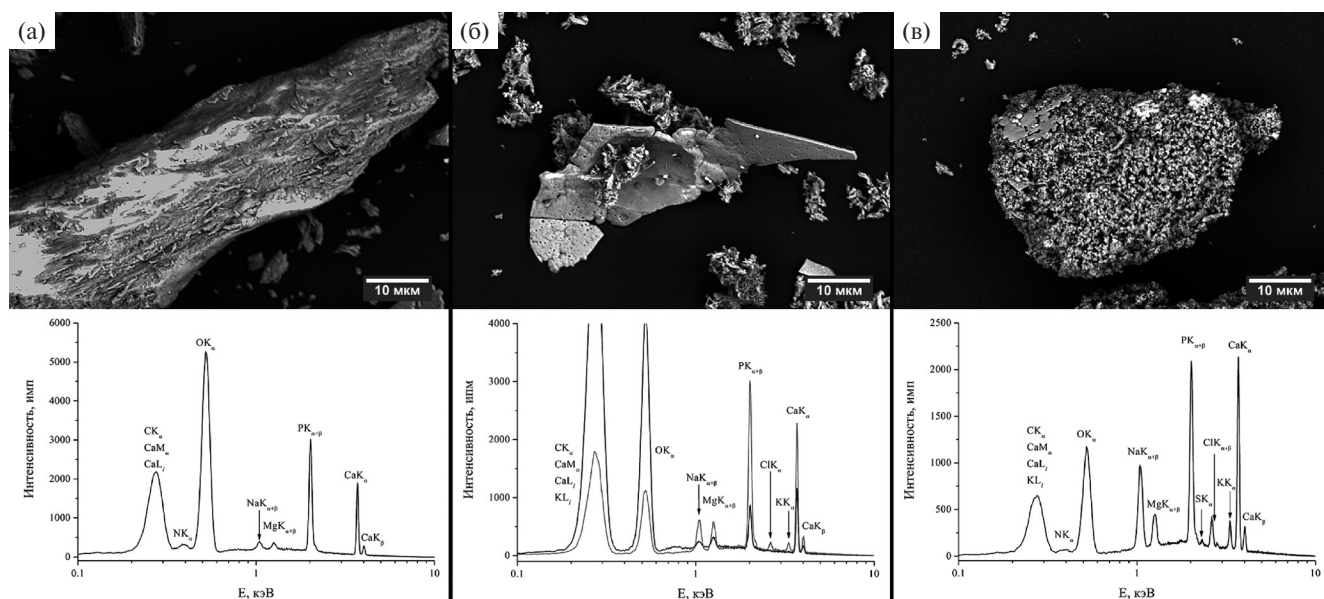


Рис. 4. Электронные микрофотографии (верхний ряд) измельчённых образцов исходной костной ткани (а), экстрактов, полученных из растворов угольной (б) и пероксиугольной (в) кислот при экспозиции в них фрагмента кости под высоким давлением CO_2 , в отражённых электронах и соответствующие им рентгеновские спектры. Два спектра, приведённых на панели (б), измерены на пластинке (чёрный спектр) и на агломерате частиц (серый спектр).

1 мкм с хорошо различимыми порами. Спектры, измеренные на этих частицах, аналогичны по набору элементов спектрам образца исходной кости и, по всей видимости, являются фазой гидроксил-апатита, обнаруженной на дифрактограммах (рис. 3б). Частицы второго типа представляют собой агломераты размером 5–10 мкм из небольших пластинок размером менее 1 мкм. В их спектрах в дополнение к элементам, обнаруженным в пластинке, присутствуют линии хлора и калия. Образец экстракта, полученного из растворов пероксиугольной кислоты при экспозиции в ней фрагмента кости под высоким давлением CO_2 (рис. 4в), составлен из округлых агломератов размером 20–30 мкм. Агломераты состоят из небольших (менее 1 мкм) частиц, причём на поверхности некоторых из них обнаружены ажурные пластины размером около 10 мкм. Спектрально этот образец аналогичен агломератам предыдущего образца, но содержит дополнительно очень слабые линии азота и серы, присущие белкам. Гидроксил-апатит, который перекристаллизуется из растворов экстракта костной ткани в угольной и пероксиугольной кислотах в виде более мелких кристаллов, чем в исходной костной ткани, которые имеют размер менее 50 мкм, можно использовать в качестве перспективного порошкового материала для регенерации костных дефектов [15].

Таким образом, в данной работе впервые изучено влияние экспозиции в двухфазных средах под высоким давлением ($\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{CO}_2$) костной

ткани животного происхождения на её внутреннюю структуру. Такие кислые под давлением, но само-нейтрализующиеся при декомпрессии системы представляются перспективными для использования в процессах получения материалов для биомедицинских приложений. Показано, что в присутствии угольной и пероксиугольной кислот под высоким давлением CO_2 можно добиться экстракции из фрагментов костей остаточных высокомолекулярных соединений органической фазы и клеточного материала, ограничивающих биосовместимость костной ткани для применения в тканевой инженерии. В то же время такие системы продемонстрировали способность к экстракции также и компонент неорганической фазы. Интересно, что гидроксил-апатит, экстрагированный из кости в этих системах, осаждаясь, перекристаллизовывается в существенно более мелкие по сравнению с исходными в костном материале плоские кристаллиты, которые, как и очищенный матрикс, могут представлять интерес для применения в биомедицинских приложениях.

Благодарности. Авторы благодарят Отдел структурных исследований ИОХ РАН за исследование образцов методом электронной микроскопии на микроскопе Hitachi.

Источник финансирования. Исследование выполнено за счёт гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 16–03–00702а, 18–29–06049мк).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vangsness C., Dellamaggiore R. Current Safety Sterilization and Tissue Banking Issues for Soft Tissue Allografts // *Clin. Sports Med.* 2009. V. 28. P. 183–189. DOI: 10.1016/j.csm.2008.10.008.
2. Westhof E. Water and Biological Macromolecules. Boca Raton (FL): CRC Press, 1993.
3. Michalarias I., Gao X., Ford R., Li J. Recent Progress on Our Understanding of Water Around Biomolecules // *J. Mol. Liq.* 2005. V. 117. P. 107–116. DOI: 10.1016/j.molliq.2004.08.011.
4. Chen C., Chang C., Chen Y., Lin T., Su C., Lee S. Applications of Supercritical Fluid in Alloplastic Bone Graft: A Novel Method and in vitro Tests // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2006. V. 45. P. 3400–3405. DOI: 10.1021/ie0507169.
5. Russell N., Oliver R., Walsh W. The Effect of Sterilization Methods on the Osteoconductivity of Allograft Bone in a Critical-Sized Bilateral Tibial Defect Model in Rabbits // *Biomaterials* 2013. V. 34. P. 8185–8194. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.022.
6. Pigaleva M., Elmanovich I., Kononevich Y., Gallyamov M., Muzafarov A. A Biphasic H₂O/CO₂ System as a Versatile Reaction Medium for Organic Synthesis // *RSC Adv.* 2015. V. 5. P. 103573–103608. DOI: 10.1039/c5ra18469j.
7. Качала В., Хемчян Л., Кашин А., Орлов Н., Грачев А., Залесский С., Анаников В. Комплексное исследование структуры и механизмов получения и превращений газообразных, жидких и твердых химических систем методами масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР и электронной микроскопии // *Успехи химии.* 2013. Т. 82. С. 648–685. DOI: 10.1070/RC2013v082n07ABEN004413.
8. Кашин А., Анаников В. Формирование наноразмерных покрытий и наночастиц металлов путём магнетронного распыления и исследование методом сканирующей электронной микроскопии // *Изв. АН. Сер. хим.* 2011. № 12. С. 2551–2556. DOI: 10.1007/s11172–011–0399-x.
9. Zhang N., Zhou M., Zhang Y., Wang X., Ma S., Dong L., Yang T., Ma L., Li B. Porcine Bone Grafts Defatted by Lipase: Efficacy of Defatting and Assessment of Cytocompatibility // *Cell Tissue Bank.* 2014. V. 15. P. 357–367. DOI: 10.1007/s10561–013–9391-z.
10. <http://www.icdd.com/index.php/pdf-4/>
11. Rietveld H. A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures // *J. App. Cryst.* 1969. V. 2. P. 65. DOI: 10.1107/S0021889869006558.
12. Bish D., Howard S. Quantitative Phase Analysis Using the Rietveld Method // *J. Appl. Cryst.* 1988. V. 21. P. 86. DOI: 10.1107/S0021889887009415.
13. Solovyov L. Full-Profile Refinement by Derivative Difference Minimization // *J. Appl. Cryst.* 2004. V. 37. P. 743. DOI: 10.1107/S0021889804015638.
14. Pingitore N., Fretzdorff S., Seitz B., Estrada L., Borrego P., Crawford G., Love K. Dissolution Kinetics of CaCO₃ in Common Laboratory Solvents // *J. Sedimentary Res.* 1993. V. 63. № 4. P. 641–645. DOI: 10.1306/D4267B9A-2B26-11D7-8648000102C1865D.
15. Zhou H., Lee J. Nanoscale Hydroxyapatite Particles for Bone Tissue Engineering // *Acta Biomaterialia.* 2011. V. 7. P. 2769–2781. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.03.019.

**THE METHOD OF CLEANING AND MODIFICATION
OF THE MATERIAL FOR BONE XENOGRAFTS IN BI-PHASE MEDIA
CONTAINING HIGH PRESSURE CO₂**

M. V. Bulat¹, M. A. Pigaleva^{1,2}, I. V. Novikov¹, E. E. Levin¹, M. O. Gallyamov^{1,2}

¹ *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

² *Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS A.R. Khokhlov December 13, 2018

Received December 13, 2018

In the present work, a promising method was proposed for purification of fragments of animal bone tissue from high-molecular weight compounds in bi-phase media containing high-pressure CO₂ for the first time, namely, in solutions of carbonic and peroxycarbonic acids. The effectiveness of this purification was confirmed by SEM and IR spectroscopy. It turned out that during the exposure of bone fragments in solutions of carbonic and peroxycarbonic acids under high pressure of CO₂, the components of the mineral phase of bone tissue are also extracted, which allows to obtain highly dispersed particles of hydroxyapatite during the deposition of the extract. The structure and composition of the extracts were investigated by XRD analysis and SEM.

Keywords: bone tissue, supercritical CO₂, carbonic acid, peroxycarbonic acid, extraction, hydroxyapatite.