

УДК 617.7: 615.453.2.457: 618.36

## МЕХАНОАКТИВАЦИЯ КАК МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ НАНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

<sup>1</sup>Перевозчиков П.А., <sup>2</sup>Карбань О.В., <sup>1</sup>Самарцев В.С.

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России,  
Ижевск, e-mail: rector@igma.udm.ru;

<sup>2</sup>ФГБУН «Физико-технический институт УрО РАН», Ижевск, e-mail: fti@fti.udm.ru

Методом механоактивации получен наномодифицированный биологический материал на основе плаценты человека. Механоактивация лиофилизированного мелкоизмельченного биологического материала производилась в шаровой планетарной мельнице Pulverisette-7 в течение 60 минут. Механическое измельчение не загрязняло измельчаемую плаценту и не изменяло ее химический состав. Механоактивированная плацента формировала агрегаты порошка с размерами частиц 40–100 нм. Введение механоактивированной плаценты осуществлялось в форме биологического контейнера на склере глаза кролика в эксперименте. Наблюдалось проникновение МА частиц плаценты в толщу склеры на 2/3 ее толщины, что можно было объяснить облегченной диффузионной миграцией наноразмерных частиц через поры в толще склеры и повышенной гидрофильностью полученного материала. Таким образом, механоактивация может быть основой для повышения биологической активности материала животного происхождения и широко применяться в трансплантологии.

**Ключевые слова:** механоактивация, репаративная регенерация, нанодисперсный биологический материал

## MECHANOACTIVATION AS THE METHOD OF RECEIVING THE NANOMODIFIED BIOLOGICAL MATERIALS

<sup>1</sup>Perevozchikov P.A., <sup>2</sup>Karban O.V., <sup>1</sup>Samartsev V.S.

<sup>1</sup>Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, e-mail: rector@igma.udm.ru;

<sup>2</sup>Physical-Technical Institute Ural Branch of RAS, Izhevsk, e-mail: fti@fti.udm.ru

The nanomodified biological material based on using the mechanoactivation method. Mechanoactivation of the lyophilized small-crushing biological material was made in a spherical planetary mill of Pulverisette-7 within 60 minutes. The mechanical crushing doesn't pollute a crushed placenta and doesn't change its chemical composition. The mechanoactivated placenta forms powder aggregates with particle size of 40–100 nanometers. The mechanoactivated placenta was injected into rabbit eye sclera in the form of biological container during the experiment. MA particles placenta penetration into thickness sclera (on 2/3 of its thickness) was registered and this fact is possible to explain by the facilitated diffusive migration of nanodimensional particles through the pore located deep in sclera and raised, as a result of the mechanoactivation, increased by hydrophily of the received material. Thus, mechanoactivation can be a basis for increase of biological activity swore an animal origin and widely to be applied in transplantology.

**Keywords:** mechanoactivation, reparative regeneration, nanodispersed biological material

Одним из инструментов регенераторной хирургии может выступать трансплантация биологических материалов (клеточной взвеси, ткани, части органа, целого органа и т.д.) в качестве биологического метода репаративной регенерации [6]. Однако при применении макроскопических или крупноизмельченных взвесей биологических материалов репаративная регенерация, как правило, наступает только в зоне имплантации, на границе двух объектов: ткань реципиента – биологический материал, без вовлечения в репаративный процесс подлежащих тканей реципиента [7]. В офтальмологической практике в исходе имплантации биологических материалов на склере реципиента формирование новой соединительной ткани происходит только на поверхности склеры, а глубокие слои остаются интактными вследствие ее низкой регенераторной активности [2, 7].

Последние исследования, посвященные изучению регенерации пересаженного био-

логического материала, показали, что при уменьшении дисперсности имплантата (в микрометровом диапазоне) увеличивалась эффективность его взаимодействия с тканями реципиента [7]. Использование нанодисперсных имплантатов из биологических материалов, способных глубоко проникать, интрамурально вызывая репарацию и ангиогенез в подлежащих тканях реципиента, может значительно расширить возможности медицины в комплексном лечении дегенеративно-дистрофических заболеваний.

Одним из методов увеличения дисперсности материалов и повышения его биологической доступности является обработка в высокоэнергетических измельчительных устройствах (механоактивация) [10], что позволяет получить более эффективные медицинские препараты. При этом возможны два пути модификации материалов. Первый – повышение дисперсности материалов с образованием новых соединений, требующих дополнительных серьезных

исследований своего биологического действия. И второй – изменение структурного состояния материалов при условии сохранения химического состава, при этом могут формироваться метастабильные полиморфные модификации, не приводящие к изменению фармакологического действия материала. Однако биологическая активность таких материалов значительно выше [1, 3, 11]. Хотя механоактивация используется в медицинских технологиях давно [9], в частности, при модификации лекарственных препаратов, например, глюконата кальция [4, 8], повышение дисперсности и перевод в аморфное состояние которого привело к повышению лекарственной эффективности препарата. Однако до сих пор никто не занимался получением механоактивированных нанодисперсных биологических имплантатов и оценкой их биологической активности.

**Цель исследования** – создание метода получения нанодисперсного биологического материала и изучение взаимодействия его с тканями реципиента в эксперименте.

#### Материал и методы исследования

Биологический материал, представленный плацентой человека, полученной в ходе кесарева сечения и родов доношенным плодом, отделенной от пуповины и амниотической оболочки, промытый в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида, был высушен методом лиофильной сушки, а затем механически измельчен до крупнодисперсного порошка с размерами зерен от 45 мкм.

Крупнодисперсный материал плаценты и порошок после механоактивации помещался в биологический контейнер (БК), изготовленный из отрезка сосуда пуповины длиной до 10 мм и шириной до 2 мм.

Экспериментальные исследования выполнялись на половозрелых кроликах породы Шиншилла в возрасте от 1 года до 2 лет с массой тела от 3 до 3,5 кг согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Имплантацию БК производили под местной анестезией в верхне-наружном квадранте под слизистую оболочку на склере глазного яблока кролика. В качестве контроля производилась имплантация БК, содержащего макродисперсную взвесь плаценты с размерами частиц от 50 мкм и более [5]. Динамику структурно-функциональных изменений глаза животных проводили через 3 дня, 7 дней, 1, 2 и 3 месяца после пересадки. Для контроля микроанатомических изменений энуклеированные глаза фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, заливали в парафин. Полученные срезы зоны оперативного вмешательства помещались на поверхность предметного стекла с последующей химической очисткой от парафина. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

Структурно-фазовый анализ порошков исходной крупнодисперсной и механоактивированной плаценты проводился методом рентгеновской дифракции (РД) на дифрактометре ДРОН-3 в монохроматизированном  $\text{Cu K}_\alpha$ -излучении.

Контроль плаценты до и после механоактивации проводили методом Фурье-ИК-спектроскопии на спектрометре Excalibur 3100 фирмы Varian.

Анализ на возможное привнесение примесей в образцы плаценты при механоактивации проводился методом атомной эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе Spectroflame Modula (Spectro Analytical Instruments, Германия).

Исследование макромолекулярной организации и распределения внедренного нанодисперсного механоактивированного биологического материала проводились на сканирующей зондовой лаборатории Ntegra (NT-MDT) в прерывисто-контактной методике на воздухе. Все исследования осуществлялись на участках, отмеченных на рисунке стрелками (рис. 1).

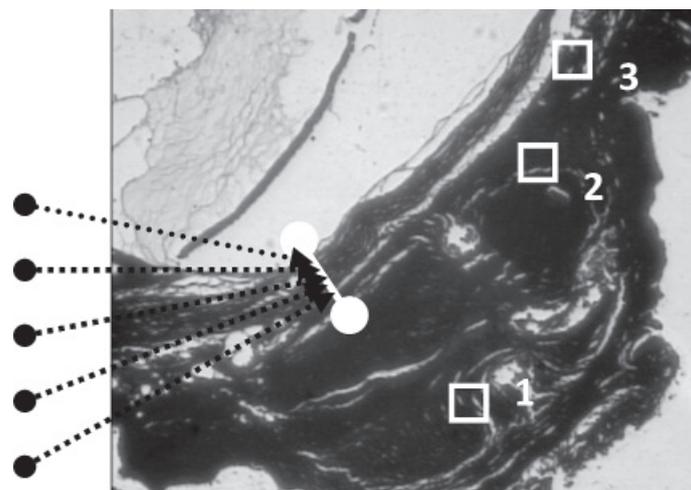


Рис. 1. Схема исследования. Участки АСМ и конфокального оптического и спектрального исследований:  
1 – плацента в биоконтейнере; 2 – стенка биоконтейнера; 3 – склера.  
Стрелками показаны участки (400 нм) проведения спектрального анализа

Спектроскопический флуоресцентный анализ гистологических срезов по точкам был выполнен на сканирующей зондовой лаборатории Ntegra Spectra (NT-MDT). Выбор области на образце осуществлялся с помощью оптического микроскопа с возможностью динамического увеличения и системой цифрового мониторинга. Далее спектральные характеристики для каждой из выбранных областей анализировались путем лазерной накачки и спектрального анализа. Все спектры получены на воздухе при комнатной температуре из области фокуса лазера с участков около 400 нм. Распределение химического состава по образцу проводилось выбором отдельных участков спектральной картины полученной на ПЗС (прибор с зарядовой связью) детекторе и анализировалось путем дальнейшего двумерного сканирования в выбранной области образца.

### Результаты исследования и их обсуждение

Для получения НБМ был использован метод механоактивации высушенного мелкоизмельченного биологического материала в шаровой планетарной мельнице Pulverisette-7. При этом время измельчения составляло 30, 60 и 120 минут. Проведенные

АСМ-исследования полученных порошков показали, что уже при времени измельчения 60 минут размер частиц в механоактивированном биологическом материале достигает 40–100 нм. При дальнейшем измельчении дисперсность частиц материала практически не изменяется.

Рентгеновские дифрактограммы исходного и измельченного порошков плаценты человека представлены на рис. 2. Как в исходном, так и МА состоянии аллоплацента находится в рентгеноаморфном состоянии. Отсутствие структурных рефлексов  $\alpha$ -Fe свидетельствует о том, что при механическом измельчении в пределах чувствительности метода рентгеновской дифракции не произошло загрязнения образцов материалом используемых измельчающих тел. При этом содержание Si в образцах как до, так и после механической активации, по данным эмиссионной спектроскопии, не превышает 0,005 – мас. %, остальных элементов – 0,0002 мас. %, что также свидетельствует об отсутствии загрязнения образцов.

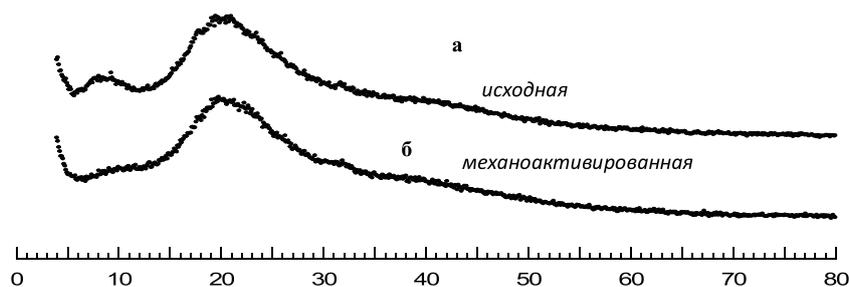


Рис. 2. Рентгеновские дифрактограммы аллоплаценты: а – до; б – после механоактивации

ИК-спектры исходной и МА плаценты представлены на рис. 3. Хорошо видно, что они практически идентичны за исключением небольшого перераспределения интенсивностей полосы в области больших волновых чисел. Изменение соотношения интенсивностей сигнала механоактивированного образца в области 2400–2800  $\text{см}^{-1}$ , а также 3200–3500  $\text{см}^{-1}$  свидетельствует о деструкции как внутримолекулярных, так и межмолекулярных водородных связей в процессе механообработки. Поскольку

ку мы имеем дело с чрезвычайно сложным органическим объектом, который содержит большое количество всевозможных органических структур об остальных изменениях без дополнительных исследований (масс-спектрометрии, ЭПР, ЯМР-исследований и т.д.) по результатам одной только ИК-спектроскопии говорить трудно. Можно отметить, что спектры по виду подходят на отдельные белковые структуры, а также соединения с гетерогенной циклической связью.

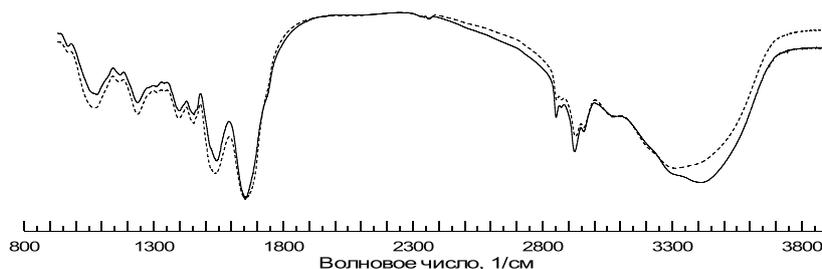


Рис. 3. ИК-спектры исходного порошка плаценты и порошка плаценты человека после механоактивации

В целом из приведенных выше результатов исследований следует, что механическое измельчение не загрязняет измельчаемую плаценту, в ней не происходит каких-либо существенных механоиндуцированных химических превращений и, соответственно, изменения ее химического состава.

При микроскопическом изучении среза биоконтейнера внутри пуповинного сосуда наблюдаются мелкие пылевидные частицы синевато-сиреневого цвета – агломераты нанодисперсного порошка аллоплаценты, которые не превышают 1–2 мкм в диаметре

и совпадают по размеру с агрегатами порошка МА плаценты до имплантации. При анализе контрольного биологического материала плаценты обнаруживается, что размер не подвергавшегося механоактивации материала значительно превышает 50 мкм, приближаясь по размерам к надклеточным тканевым структурам. Эти данные подтверждаются всеми использованными методами (светооптические гистологические методы, лазерная конфокальная и атомно-силовая микроскопия (рис. 4).

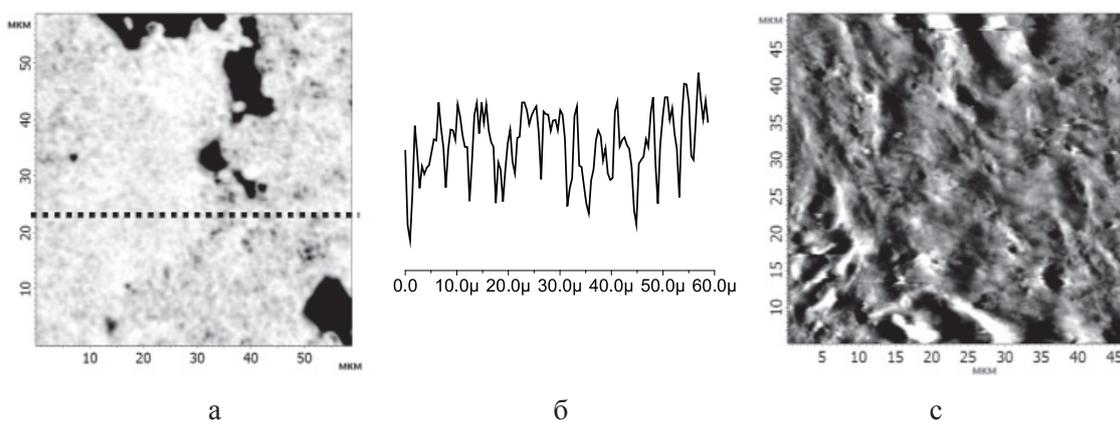


Рис. 4. Плацента в биоконтейнере:  
а – конфокальное лазерное изображение МА биоматериала; б – профиль вдоль линии;  
с – АСМ изображении макродисперсного биоматериала в контроле

В ходе проведенных экспериментальных исследований выявлено, что послеоперационный период у кроликов протекал без видимых осложнений. Также не наблюдалось явной картины отторжения и вторичной инфекции.

В ранние сроки после имплантации БК на 3–7-е сутки во всех рассмотренных случаях имплантат сосуда пуповины сохранялся. Отмечалась умеренная воспалительная инфильтрация как стенки сосуда, так и окружающей конъюнктивы и субконъюнктивальной основы. Это проявлялось в лимфоцитарно-моноцитарных клеточных ответах, умеренной инфильтрации мононуклеоцитами тканей прилежащей склеры и конъюнктивы, появлении отдельных лейкоцитов в стенке и в содержимом биоконтейнера. При этом в контроле проявления клеточных реакций были менее выражены. Прилегающий участок склеры реципиента в опыте характеризовался разрыхлением стромы, между коллагеновыми волокнами которой видны нейтрофилы и лимфоциты, а также мелкие полихромно окрашенные пылевидные частицы, аналогичные наблюдаемым при исследовании гистологического среза биоконтейнера. При этом отмече-

но сохранение наноразмерной структуры измельченной плаценты 40–100 нм. Разволокнение поверхностных слоев склеры в контроле, их инфильтрация под биоконтейнером не отмечались.

Для исследования скорости проникновения нанодисперсной плаценты в толщу склеры были проведены спектроскопические исследования поперечного среза склеры по точкам и биологического контейнера на 7-е сутки после имплантации БК. В качестве контрольных точек исследовалась МА плацента человека и интактная склера. Представленные на рис. 5 спектры дают представление о распределении интенсивностей для различных участков склеры. Сопоставление этих кривых показывает следующее: для спектров, соответствующих точкам 1 и 2, максимум интенсивности отвечает длинам волн, лежащим в интервале 540–550 нм, и соответствует максимуму, наблюдаемому в спектре интактной склеры с небольшим смещением в сторону длинных волн (не более 5 нм). На кривых для точек 3–5 наблюдаются два максимума: первый максимум отвечает длинам волн 545–555 нм; второй максимум смещен в сторону длинных волн и лежит в интервале

от 554 до 570 нм. Эти данные приводят к выводу, что на участках 3–5 содержится вещество, максимум которого совпадает с максимумом для МА плаценты и соответственно на этих участках произошло взаимодействие ткани склера с НБМ. Таким

образом, на 7-е сутки имплантации в опыте наблюдается проникновение МА частиц плаценты в толщу склеры на 2/3 ее толщины, что можно объяснить облегченной диффузионной миграцией наноразмерных частиц через поры в толще склеры.

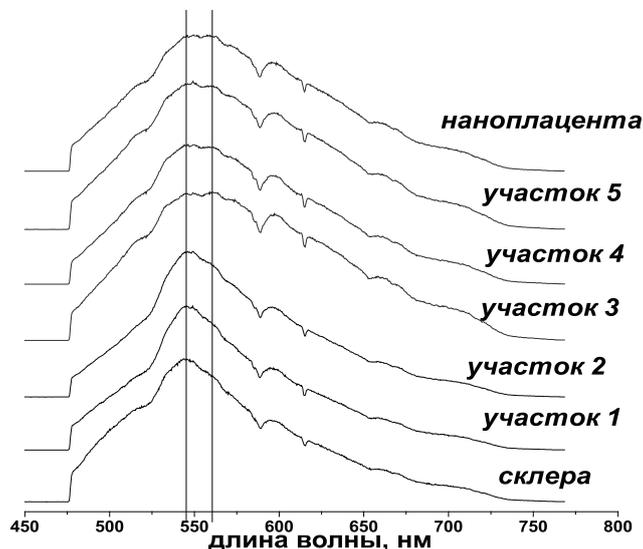


Рис. 5. Флуоресцентные спектры в опыте (на 7-е сутки после имплантации)

В отдаленные сроки наблюдения (2–3 мес.) происходит полное рассасывание БК в зоне имплантации, при этом в зоне введения наблюдалась выраженная грануляционная ткань, представленная соединительнотканной капсулой на поверхности склеры. В опыте в наружных слоях склеры наблюдалось увеличение числа активных фибробластов, окруженных новообразованными коллагеновыми волокнами, что хорошо было видно при окраске пикрофуксином по Ван-Гизону. Однако при использовании БК с крупнодисперсной плацентой новообразование коллагеновых волокон в самой склере не отмечено.

#### Заключение

Таким образом, механоактивация биологического материала плацентарного происхождения, приводит к увеличению дисперсности материала, не изменяя его химического состава. В результате проведенной механообработки плацента становится нанодисперсным рентгеноаморфным порошком, что облегчает диффузионную миграцию частиц имплантата через поры (размером до 100 нм) в толщу склеры. Полученный наноразмерный материал, обладающий высокой степенью диспергированности, вероятно, одновременно приобретает новые специфичные для него свойства. Так,

в результате интенсивного механического измельчения происходит значительное разрушение макромолекулярных комплексов с изменением их стереометрических параметров, изменением антигенных свойств материала. При анализе на уровне ИК-спектра выявляется повышенная гидрофильность полученного материала. Все это с учетом повышенной диффузионной способности может быть основой для повышения биологической активности исследованного нанодисперсного материала. Это позволяет шире варьировать объем введения донорских тканей, уменьшить травматические последствия хирургического вмешательства.

#### Список литературы

1. Изменение супрамолекулярной структуры клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* при механоферментативной обработке / А.Л. Бычков [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2009. – № 5. – С. 479–486.
2. Каноков В.Н. Экспериментально-гистологические основы новых технологий в офтальмохирургии / В.Н. Каноков, А.А. Стадников. – Оренбург: ОАО «ИПК «Южный Урал», 2009. – 104 с.
3. Ломовский О.И. Прикладная механохимия: фармацевтика и медицинская промышленность // Обработка дисперсных материалов и сред. – 2001. – Вып. 11 – С. 81–100.
4. Механоактивированный лекарственный препарат кальция глюконат: рентгеноструктурные, микроскопические и рентгеноэлектронные исследования / Г.Н. Коныгин

и др. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – Т. 13, № 3. – С. 249–252.

5. Морфологическое исследование биоконтейнеров в эксперименте / А.В. Корепанов [и др.] // Морфологические ведомости. – 2005. – № 1–2. – С. 91–92.

6. Мулдашев Э.Р. Теоретические и прикладные аспекты создания аллотрансплантатов серии «Аллоплант» для пластической хирургии лица: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 1994. – 40 с.

7. Муслимов С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. – Уфа: Башкортостан, 2000. – 168 с.

8. Способ лечения гипокальциемий, остеопорозов, переломов: пат. № 2268053 РФ / Г.Н. Коньгин [и др.]; заявитель и патентообладатель Коньгин Г.Н.; заявка № 2004113712/14 зарегистр. 05.05.2004 г. // Изобретения. Полезные модели. – 2006. – № 02.

9. Фундаментальные основы механической активации, механосинтеза и механохимических технологий / под ред. Е.Г. Авакумова. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2009.

10. Boldyreva, E., Boldyrev, V. (Eds.) Reactivity of Molecular Solids / E. Boldyreva, V. Boldyrev. – London: John Wiley & Sons, 1999. – 328 p.

11. Panic G., Winter R.A comparative study of the effect of hydrostatic pressure up to 4 GPa on the monoclinic and the orthorhombic polymorphs of paracetamol // Biochemistry. – 2000. – Vol. 39. – P. 1862–1869.

### References

1. Bychkov A.L. et al. Saccharomyces cerevisiae cell wall supramolecular structure change during mekhanofermentative processing // Chemistry in interests of a sustainable development, 2005, no. 3, pp. 479–486.

2. Kanukov V.N., Stadnikov A.A. An experimental and histologic bases of new technologies in an ophthalmosurgery, Orenburg, 2009, pp. 104.

3. Lomovskij O.I. Applied mechanochemistry: pharmaceuticals and medical industry // Processing of disperse materials and environments, 2001, no. 11, pp. 81–100.

4. Konygin G.N. et al. The mechanoactivated medicine of calcium a gluconate: X-ray diffraction, microscopic and X-ray electronic researches // Chemistry in interests of a sustainable development, 2005, no. 3, pp. 249–252.

5. Korepanov A.V. et al. Morphological research of biocontainers in experiment // Morphological sheets, 2005, no. 1–2, pp. 91–92.

6. Muldashev Je.R. Theoretical and applied aspects of creating the Alloplant allotransplantations for face regenerative surgery of the person: thesis abstract ... Dr.s of medical sciences. Petersburg, 1994, pp. 40.

7. Muslimov S.A. Morphological aspects of regenerative surgery, Ufa, 2000, pp. 168.

8. Konygin G.N. et al. Methods of treatment of gipokaltsiyemiya, osteoporosis and fracture therapy // Russian Federation Patent № 2268053, 2006, Inventions. Useful models, no. 2.

9. Fundamental bases of mechanical activation, mechano-synthesis and mechanochemical technologies, Novosibirsk, 2009.

10. Boldyreva E., Boldyrev V. (Eds.) Reactivity of Molecular Solids, London, pp. 328.

11. Panic G., Winter R. A comparative study of the effect of hydrostatic pressure up to 4 GPa on the monoclinic and the orthorhombic polymorphs of paracetamol // Biochemistry, 2000, no. 39, pp. 1862–1869.

### Рецензенты:

Селякин С.П., д.м.н., профессор кафедры анатомии человека, ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Ижевск;

Васильев Ю.Г., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Ижевск.

Работа поступила в редакцию 15.08.2013.