



УДК 666.3-127; 546.41

ПОРИСТЫЕ ХИТОЗАНОВЫЕ МАТРИКСЫ, АРМИРОВАННЫЕ БИОАКТИВНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

Н.В. Бакунова, С.М. Баринов, В.С. Комлев, В.В. Смирнов, А.Ю. Федотов

Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН,
Ленинский пр., 49, Москва, 119991, Россия, e-mail: fedotov_ayu@mail.ru

Аннотация. Разработан способ изготовления высокопористых композиционных матриксов на основе хитозана, армированного частицами гидроксиапатита, карбонатгидроксиапатита и карбоната кальция. Способ основан на растворении среднемoleкулярного хитозана в уксусной кислоте, введении наполнителя, вспенивании и последующим замещении воды жидкостью, в котором хитозан не растворим. В результате получены композиционные материалы, содержащие до 75 об.% наполнителя. Они характеризуются однородной структурой с развитой взаимопроникающей пористостью (до 95%) и размером крупных пор до 300 мкм, что должно способствовать формированию костной ткани в условиях *in vivo*. Материалы имеют высокую эластичность и регулируемую растворимость. Они могут быть перспективными для изготовления пористых матриксов для новых медицинских технологий восстановления костных тканей.

Ключевые слова: фосфаты кальция, гидроксиапатит, трикальцийфосфат, хитозан, композиционные пористые материалы.

Введение

Одним из наиболее актуальных направлений в области функциональных материалов является создание матриксов, предназначенных для клеточных технологий регенерации костных тканей, повреждённых в результате патологических заболеваний, травм или хирургического вмешательства [1]. Материалы на основе фосфатов кальция, такие как гидроксиапатит (ГА), трикальцийфосфат (ТКФ) и карбонат-замещенный ГА (КГА) обладают благоприятными биологическими свойствами: высокой адсорбцией протеинов, повышенной функцией остеокластов и остеобластов – клеток, участвующих в процессе ремоделирования костной ткани, и пониженной функцией конкурирующих клеток, в частности фибробластов, ответственных за формирование соединительной ткани [2-4]. Следовательно, такие материалы наилучшим образом подходят для создания высокопористой керамики для медицинского назначения. Поры должны быть размером от 100 мкм до 1 мм и взаимосвязанными, что обеспечивает наилучшее проникновение клеток и прорастание тканей и сосудов в имплантат [5-7]. Однако естественная костная ткань представляет собой композиционный материал из неорганической составляющей (главным образом ГА) и органической компоненты (коллаген типа 1) [8]. Нанокристаллы биологического ГА придают кости твердость и жесткость, в то время как волокна



коллагена обеспечивают эластичность и высокую трещиностойкость, а также необходимую скорость резорбции и обновления костной ткани [9,10]. Следовательно, чтобы уменьшить хрупкость и увеличить скорость резорбции имплантата, необходимо создать композиционный материал биополимер – фосфаты кальция. Хитозан рассматривается как наиболее перспективный биополимер для создания таких матриц, так как он обладает такими свойствами как биосовместимость и биорезорбируемость [11]. Также известно, что продукты распада хитозана N-ацетилглюкозамин и глюкозамин не токсичны и могут быть включены в метаболизм глюкозаминогликанов и гликопротеинов [12]. В работе рассматривается вариант создания композиционных материалов хитозан - фосфаты кальция вспениванием хитозана с наполнителем из нанопорошков фосфатов кальция. Так же как и в случае естественной костной ткани, фосфаты кальция придают твердость и жесткость конструкции и необходимые биологические свойства, а биополимер (хитозан), как коллаген типа 1, придает эластичность, повышает трещиностойкость и скорость резорбции материала.

§1. Экспериментальная часть

Высокопористые полимерные матрицы получали по технологии сублимационной сушки. Готовили суспензии хитозана/желатина в ряду 100/0; 90/10; 70/30; 50/50; 30/70; 10/90; 0/100 8%-ном растворе уксусной кислоты. Затем проводили вспенивание, вводя карбонат аммония и тщательно перемешивая лопастной мешалкой. Полученную пену помещали в полиэтиленовую цилиндрическую форму (диаметр 12 мм, высота 24 мм) и замораживали до образования кристаллов льда при температуре -18°C , -45°C и -190°C . Затем проводили сублимационную сушку, с последующим отмыванием образцов от остатков уксусной кислоты. Образцы сушили при температуре 60°C до полного удаления жидкой фазы.

Для получения композиционных материалов в суспензию хитозана/желатина (100/0 и 50/50), до вспенивания, вводили наполнители. В качестве наполнителя использовали нанодисперсные порошки ГА, ТКФ и КГА получаемые методом химического осаждения из водных растворов [13] Далее последовательность действий та же (изложена выше).

Полученные композиционные матрицы исследовали методами рентгенофазового анализа (РФА, Shimadzu XRD-6000), Фурье ИК-спектроскопии (Nicolet Avatar), сканирующей электронной микроскопии (микроскоп LEO 1420). Растворимость определяли по потере массы при выдерживании образцов композиционных матриц в физиологическом растворе при 37°C в течение 1, 3, 7, 14 и 28 суток с последующей сушкой при 60°C . Измеряли изменение массы образцов после выдержки в физиологическом растворе и сушки.

Измерение эластичности образцов композиционных матриц проводили на приборе Instron Electropulse E-3000. Образцы в форме цилиндров помещали в физиологический раствор на 1 сутки, после чего их циклически нагружали с шагом деформации 2% до величины деформации, когда образец переставал восстанавливаться до исходного размера после снятия нагрузки. Эту деформацию обозначили предельной деформацией ($D_{\text{пред}}$). Коэффициент эластичности определяли по формуле:

$$K_{эл} = D_{пред} / h,$$

где h – высота образца. Величина $K_{эл}$ характеризует предельную величину упругой деформации образца при сжатии.

§2. Результаты и обсуждение

По данным РФА, композиционных матриксах присутствуют исходные фазы хитозан и наполнители ГА, ТКФ и КГА. Пористость матриксов без наполнителя составляет около 98%. Матрикса имеют взаимопроникающую поровую структуру с равномерным распределением пор по объему (рис. 1 а). Крупные поры имеют овальную форму с размером 50 – 500 мкм, мелкие поры - неправильную овальную форму с размером 10 – 50 мкм. Количество крупных пор составляет около 90% от общего их количества. Поры разделены между собой тонкими стенками в виде пленок толщиной около 2 мкм.

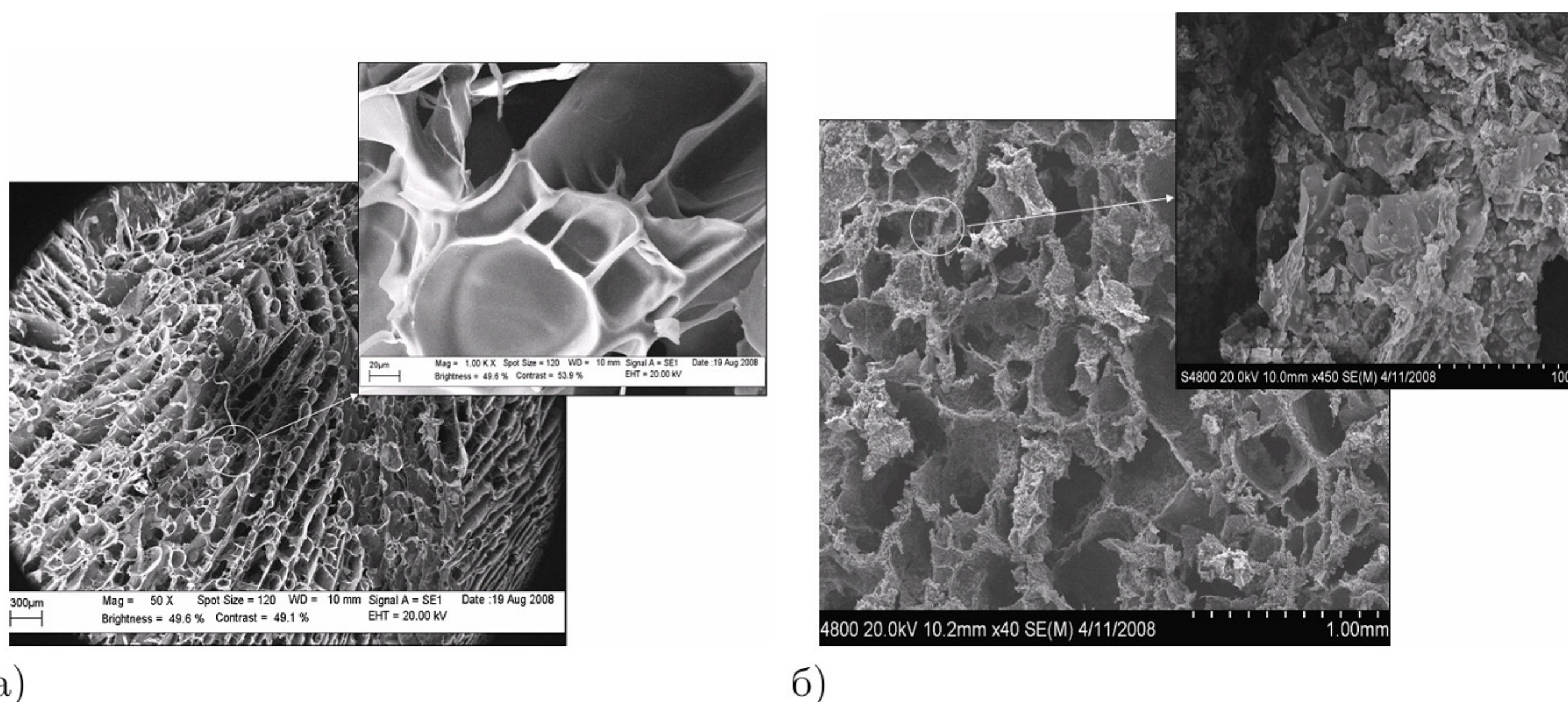
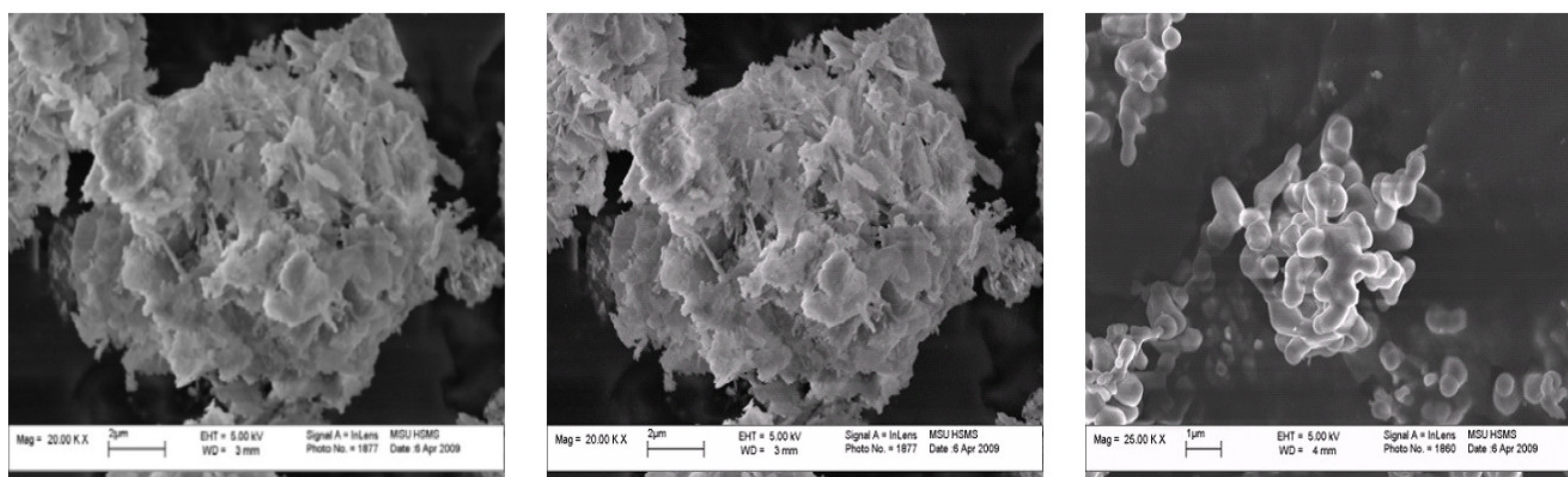


Рис. 1. Микроструктуры матриксов на основе хитозана: а) матрикс без наполнителя, б) матрикс армированный частицами ТКФ.

Для получения композиционных матриксов в суспензию вводили наполнители в виде дисперсных частиц ГА, КГА и ТКФ. Изображения сканирующей электронной микроскопии этих порошков приведены на рис. 2 а, б и в соответственно. Видно, что частицы ГА имеют округлую форму и размер 100–200 нм. В то время как частицы КГА обладают пластинчатой формой с толщиной пластин около 30 нм и длиной/шириной до 1 мкм. Частицы ТКФ по форме схожи с ГА, но крупнее 0,5 - 1 мкм.



а

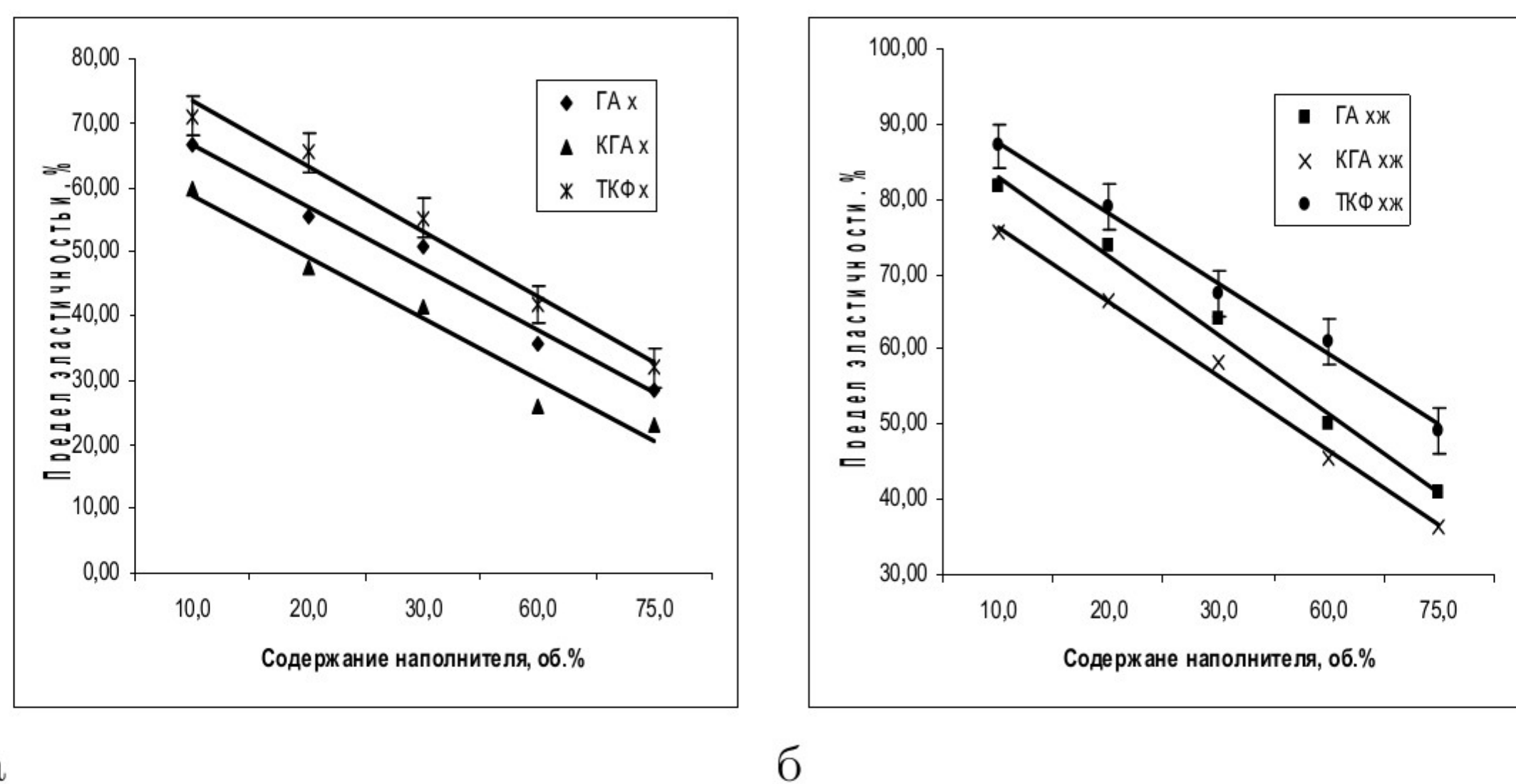
б

в

Рис. 2. Микрофотографии наполнителей: а) частицы ГА, б) частицы КГА, в) частицы ТКФ.

Поскольку фосфаты кальция обладают наилучшими биологическими свойствами по сравнению с другими материалами, то введение их в полимерный матрикс улучшает биологические свойства композита, а также влияет на структуру. Матрикс, содержащий дисперсные частицы фосфатов кальция, характеризуется равномерной структурой. С увеличением содержания наполнителя пористость матриксов снижается до 95%. Поры имеют округлую форму и размер 100–300 мкм. Частицы располагаются в стенках полимерного каркаса равномерно рис. 1 б. Толщина стенок составляет 10–20 мкм.

Эластичность матриксов линейно снижается с увеличением ортофосфата кальция, причем свое влияние оказывает состав наполнителя. Аналогично растворимости, эластичность матриксов при армировании снижается в ряду ТКФ>ГА>КГА. Например, предел эластичности хитозановых матриксов армированных 10 об.% ТКФ, ГА и КГА составляет 71,1%, 66,5% и 60% соответственно, а при 75 об.% составляет 32%, 28,6% и 23% соответственно (рис. 3 а). Также на эластичность влияет состав полимерного матрикса. Матрикс на основе хитозан/желатин (1/1) армированный фосфатами кальция по сравнению с хитозановым матриксом обладает эластичностью в среднем на 10% выше (рис. 3 б).



а

б

Рис. 3. Влияние концентрации наполнителя на эластичность: а) матрикс на основе хитозана, б) матрикс на основе хитозан/желатин (1/1).



Заключение

1) Разработана технология высокопористых композиционных материалов с матрицей на основе биополимера(ов) армированных наночастицами на основе фосфатов кальция до 75 об%. Полученные матрицы обладают взаимосвязанной пористой структурой с пористостью около 95%.

2) Изучено влияние состава композиционных матриц на физико-химические свойства. Установлено, что с увеличением содержания желатина увеличивается растворимость и эластичность композиционных матриц. С увеличением содержания фосфатов кальция падает эластичность и растворимость композиционных матриц.

Исследование выполнено в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 годы (Госконтракт № 14.740.12.0865 по обобщенной теме «Исследование новых конструкционных и функциональных материалов и технологий их обработки») на оборудовании Центра коллективного пользования «Диагностика структуры и свойств наноматериалов» НИУ «БелГУ».

Литература

1. Vallet-Regi M., Gonzales-Calbet J.M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues // Progress in Solid State Chem. – 2004. – 32. – P.1-31.
2. Meyer U., Joos U., Wiesmann H.P. // Int J Oral Maxillofac Surg 33:635. – 2004.
3. Thompson J.B., Kindt J.H., Drake B., Hansma H.G., Morse D.E., Hansma P.K. // Nature 414:773. –2001.
4. Fratzl P., Gupta H.S., Paschalis E.P., Roschger P. // J Mater Chem. – 2004. – 14:2115
5. Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K. // Tissue Eng. – 2001. – 7:679.
6. Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F. // Biomaterials. – 2000. – 21:2347.
7. Holy C.E., Shoichet M.S., Davies J.E. // J. Biomed. Mater. Res. – 2000. – 51:376.
8. Murugan R., Ramakrishna S. // Compos. Sci. Technol. – 2005. – 65:2385.
9. Weiner S., Wagner H.D. // Ann. Rev. Mater. Sci. – 1998. – 28:271.
10. Dorozhkin S.V. // J. Mater. Sci. – 2007. – 42:1061.
11. Хитин и Хитозан: Получение свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М.: Наука, 2002. – С.7-22.
12. Shigemasa A., Minami S. Использование хитина и хитозана в медицине / Кобунси Како. – 1997. – 46;2. – С.27-33.
13. Руководство по неорганическому синтезу // Ключников Н.Г. – М.: Химия, 1965. – 231 с.



POROUS CHITOSAN MATRIXES REINFORCED BY BIOACTIVE CALCIUM COMPOUND FOR BONE REGENERATION

N.V. Bakunova, S.M. Barinov, V.S. Komlev, V.V Smirnov, A.Yu. Fedotov

Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science,
Russian Academy of Sciences,
Leninsky av., 4, Moscow, 119049, Russia. e-mail: fedotov_ayu@mail.ru

Abstract. A new method of fabrication of high porous composite materials based on chitosan reinforced by particles of hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite and calcium carbonate has been developed. The method includes the dissolution of a medium molecular weight chitosan in acetic acid solution followed by introduction of fillers foaming and replacing water by the solution in which chitosan does not dissolve. Composite materials containing up to 75 vol. % fillers have been obtained. They are characterized by a homogeneous microstructure with interpenetrating porosity up to 95% and size pore up to 300 micrometer. They are favorable for the new bone tissue formation. Materials have high elasticity and controllable solubility. These composite materials can be perspective for producing scaffolds intended for new medical technology of bone tissue regeneration.

Keywords: calcium phosphates, hydroxyapatite, tricalcium phosphate, chitosan, composite scaffolds.