

Ю. М. Самченко, И. Е. Болдескул, Л. Б. Суходуб,
С. Н. Данильченко, Л. И. Береза, З. Р. Ульберг,
член-корреспондент НАН Украины Л. Ф. Суходуб

Синтез и спектральная идентификация гидроксилapatитсодержащих гидрогелевых нанокомпозитов для протезирования костной ткани

Синтезовано нові композитні матеріали для протезування кісткової тканини на основі мінералізованих співполімерних гідрогелів акрилового ряду. Розроблено методи отримання, які забезпечують переважне формування в порах гідрогелів нанорозмірного стехіометричного гідроксипатиту та проведено його структурну ідентифікацію з використанням різних спектральних методів.

Формирование в полимерных матрицах наночастиц различной природы позволяет создавать нанокомпозитные материалы с уникальными электрическими, магнитными, оптическими, механическими, каталитическими свойствами [1], которые обладают повышенной биосовместимостью [2]. Гидрогелевые полимерные матрицы являются одними из наиболее перспективных сред для формирования и стабилизации различных медико-биологических материалов, в частности наноразмерных кластеров благородных металлов, обладающих высокой бактерицидной активностью, магнетита, позволяющего осуществлять целенаправленный транспорт наполненных им гидрогелевых микрогранул с инкорпорированными лекарственными препаратами к органу-мишени, а также гидроксиapatита — для создания остеоимплантатов [3].

По различным литературным данным, в имплантатах для протезирования костной ткани (ортопедических и стоматологических) во всем мире нуждается от 1 до 5% населения. Только в США ежегодно проводится более 1 млн операций по восстановлению целостности костной ткани [4].

Гидрогели на основе акриловых мономеров (прежде всего, акриламида) на протяжении ряда лет широко применяются для протезирования мягких тканей в основном при маммопластике [5]. Указанные имплантаты обладают высокой биосовместимостью, эластичностью, стабильностью и устойчивостью формы, по консистенции весьма близки к тканям человеческого организма, однако их прочностные характеристики недостаточны для протезирования костной ткани.

С другой стороны, гидроксиapatит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ — основной неорганический компонент биогенной костной ткани, обладает такими ценными свойствами, как биосовместимость, биоактивность, остеопроводимость и отсутствие воспалительных и токсических эффектов [6], также не лишен недостатков. Практическое применение гидроксиapatита при эндопротезировании ограничивается вследствие твердости, хрупкости и чрезмерной кристалличности [7]. Поэтому представляется, что композитные материалы на основе минерализованных гидрогелей, сочетающие полезные свойства, присущие их полимерной и неорганической составляющей, могут быть весьма перспективными при протезировании костной ткани.

Ранее нами был синтезирован широкий спектр (co)полимерных гидрогелевых матриц с наноразмерной пористой структурой на основе акриламида (АА) и акриловой кислоты (АК), либо акриламида и акрилонитрила (АН), а также их тройного сополимера и разработаны методы инкорпорирования в их поровое пространство наночастиц различных биоматериалов (коллоидного серебра, магнетита, силикатов), перспективных с точки зрения применения в медицине [8].

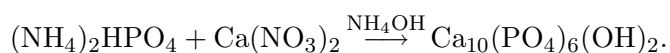
Суммарное содержание шпиготого полимера в гидрогелях варьировалось в диапазоне от 5 до 50%, а концентрация сшивающего агента (N,N' -метилден-бис-акриламил) — в пределах от 0,01 до 1%. Гелеобразование проводилось в водной среде при комнатной температуре. Иницирование полимеризации осуществлялось с использованием окислительно-восстановительной системы. Подробнее методика синтеза гидрогелей описывалась нами в работе [9].

Гидрогелевые нанореакторы были синтезированы в различных консистентных состояниях, а именно, в виде монолитных пленок, пластин, блоков и трубок с различной геометрией, в виде пластичной мазеобразной массы, пригодной к инъекционному введению, а также в виде высокодисперсных порошков с диаметром частиц около 0,05 мкм, что позволяет в широких пределах регулировать их физико-химические параметры: набухаемость, прочность, эластичность, прозрачность, ионо- и паропроницаемость, сорбционную и пролонгирующую способность по отношению к различным лекарственным препаратам.

Кроме того, характеристики порового пространства в синтезированных гидрогелях были оценены другими экспериментальными и теоретическими методами, в том числе исходя из исследований сорбции водяных паров, депрессии температуры плавления по данным дифференциальной сканирующей калориметрии и компьютерного моделирования [10–12].

Проведенные комплексные исследования подтвердили, что поры в гидрогелях представляют собой наноструктурные элементы и могут быть использованы для формирования и стабилизации композитов с преобладающим размером частиц 10–30 нм.

Настоящая работа посвящена синтезу и идентификации композитных гидрогелевых материалов медицинского назначения с инкорпорированными апатитоподобными ортофосфатами кальция, прежде всего гидроксиапатита, формирование наночастиц которого осуществляли путем последовательной обработки гидрогелевой матрицы растворами $(NH_4)_2HPO_4$, $Ca(NO_3)_2$ и NH_4OH в соответствии с базовой реакцией синтеза ГА:



Спектры ИК-поглощения и комбинационного рассеяния получали с помощью ИК Фурье-спектрометра VERTEX 70 (фирма Bruker, Германия), исследуемые пробы высушенных гидрогелей — в виде порошков путем растирания в агатовой ступке с добавлением жидкого азота для уменьшения вязкости (комкования) и последующим прессованием в таблетки КВг.

Спектры ЯМР ^{31}P , измельченных растиранием и помещенных в ампулу образцов, получали методом высокого разрешения в твердом теле при вращении под магическим углом (MAS) и регистрировались с Фурье-преобразованием на спектрометре Avance 400, Bruker (в качестве внешнего эталона использован дигидроаммонийфосфат).

Рентгеновскую дифракцию исследованных нанокompозитов проводили при помощи дифрактометра ДРОН 4-07 (“Буревестник”, Россия). Нами использовалось излучение CuK_{α} (длина волны 0,154 нм) при условиях фокусировки по Брэггу–Брентано ($\vartheta-2\vartheta$) (2ϑ — брэгговский угол). Ток и напряжение на рентгеновской трубке имели значения 20 мА и 30 кВ

соответственно. Регистрация проходила в непрерывном режиме: (скорость 2 град/мин) в диапазоне углов 2ϑ от 5 до 55° .

Сформировав в гидрогелевых нанореакторах частицы силиката кальция и подвергнув их отжигу при 600°C , были получены неорганические частицы, являющиеся своеобразным внутренним слепком гидрогелевой матрицы и характеризующие ее размеры. Исходные поры имеют сферическую форму и преимущественные размеры порядка 10–30 нм. Сопоставимые данные о размерах порового пространства гидрогелевых нанореакторов на основе акриламида и акрилонитрила (эквимолярное соотношение АА и АН; суммарное содержание шпигото полимера в гидрогеле — 50%) получали при формировании в нанопорах коллоидного серебра. При этом также образуются наночастицы сферической формы с преобладающим размером порядка 20–30 нм.

Гидрогелевые нанореакторные матрицы на основе акриловых мономеров использовали и для синтеза композитного материала с инкорпорированным гидроксиапатитом. Известно, что осаждение Са-ГА из раствора — это массовая кристаллизация с образованием множества мелких кристаллитов в результате химической реакции между фосфат-ионами и ионами Са [13]. Встречная диффузия кальциевых и фосфорных соединений в пористую гидрогелевую матрицу, как и другие “мокрые” методы синтеза, является многофакторным процессом, который приводит к образованию широкого набора ортофосфатов кальция, в частности трикальцийфосфата $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, аморфного фосфата кальция, брушита (дикальциевый фосфатдигидрат, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), монетита (гидрофосфат кальция, CaHPO_4), гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, октакальциевого фосфата и др. Учитывая тот факт, что соотношение концентраций реагентов в момент реакции при пропитке не является постоянным, а варьируется в очень широком диапазоне, добиться сдвига равновесия именно в сторону образования стехиометрического гидроксиапатита ($\text{Ca}/\text{P} = 1,67$) довольно затруднительно. В процессе проведенных исследований были установлены закономерности, позволяющие осуществлять целенаправленное формирование ГА в гидрогелевой матрице. Обнаружено, что снижение содержания шпигото полимера в гидрогеле (т. е. уменьшение отношения дисперсной фазы к дисперсионной среде) приводит к преимущественному образованию ГА. Это, вероятно, объясняется увеличением проницаемости пенетрантов через редкосшитую и низкоконцентрированную полимерную сетку, свойственную мазеобразным пластичным гидрогелям. Образование в указанных матрицах нанокристаллического ГА подтверждается различными инструментальными методами, главным образом, рентгенофазовым анализом (рис. 1, кривая 2).

В то же время обращает на себя внимание тот факт, что когда обработку аммиаком на заключительной стадии формирования фосфатов кальция осуществляют с промежуточным высушиванием гидрогелевой матрицы, приводящим к ее коллапсу и снижению проницаемости для пенетрантов, то равновесие сдвигается в сторону образования монетита (см. рис. 1, кривая 3).

Превалирующее образование нанокристаллического ГА выявлено и в случае гидрогелевых матриц, синтезированных в виде высокодисперсных частиц с диаметром около 0,05 мкм, которые также характеризуются повышенной степенью набухания и скоростью впитывания жидкости [14].

Было установлено, что структура фосфатов кальция, формирующихся в гидрогелевой матрице, определяется концентрацией кальцийфосфатных прекурсоров, используемых в процессе обработки. Идентификацию соответствующих продуктов проводили посредством сопоставления спектров ЯМР ^{31}P с соответствующими дифрактограммами.

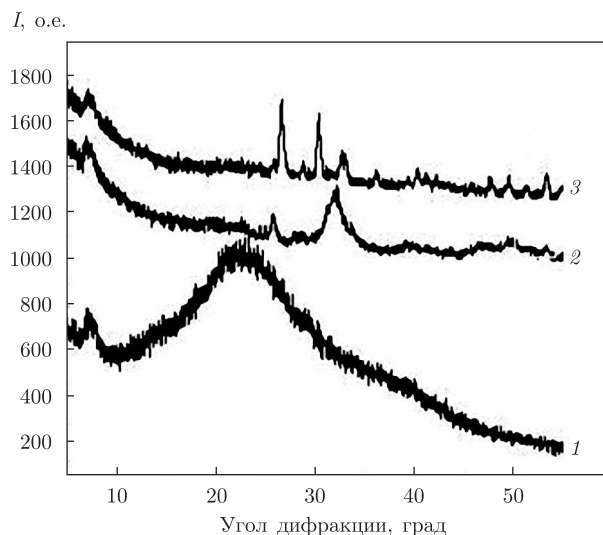


Рис. 1. Рентгеновские дифрактограммы незаполненной нанореакторной гомополиакриламидной матрицы (1) и сформированных в ней гидроксиапатита (2) и монетита (3)

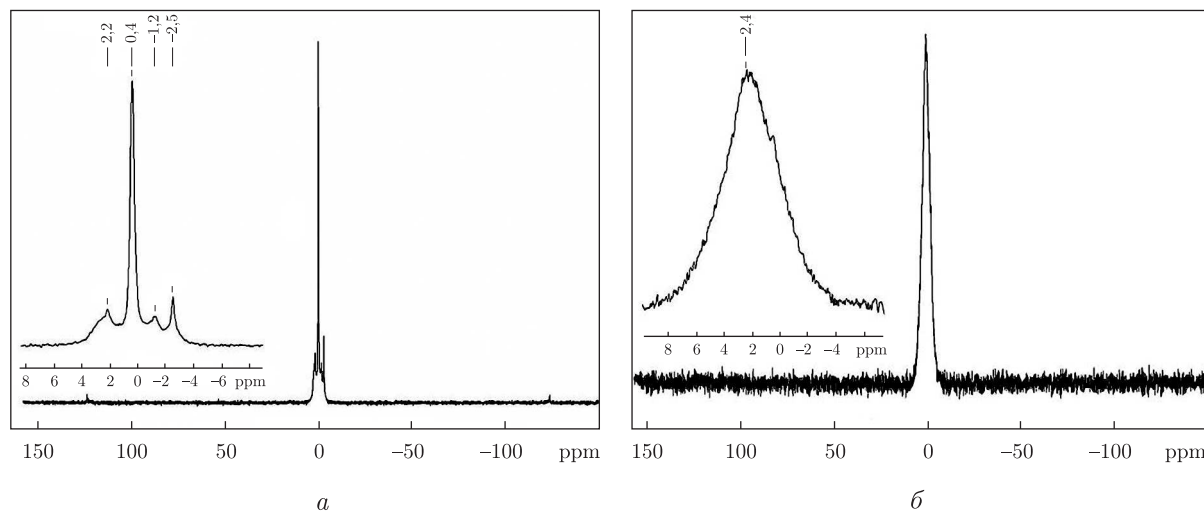


Рис. 2. ЯМР ³¹P-спектры гидрогелевой нанореакторной матрицы на основе гомополиакриламидного геля, обработанной растворами Ca(NO₃)₂ и (NH₄)₂HPO₄ с концентрацией 12 и 5,8% (а) и 5,1 и 2,5% (б)

В случае насыщения гидрогелевой матрицы 12%-м раствором Ca(NO₃)₂ и 5,8%-м раствором (NH₄)₂HPO₄ в ЯМР-спектре проявлялось четыре сигнала с химическими сдвигами $\delta^{31P} = 0,4$ (с наибольшей интенсивностью); 2,2; -1,2 и -2,5 м. д., относящиеся к брушиту, гидроксиапатиту, монетиту и ортофосфату кальция соответственно (рис. 2, а). По мере разбавления растворов для насыщения интенсивность сигналов, соответствующих брушиту, монетиту и ортофосфатам кальция, монотонно уменьшается, а интенсивность сигнала гидроксиапатита ($\delta = 2,2-2,4$ м. д.) — увеличивается. Наконец, в случае использования растворов Ca(NO₃)₂ и (NH₄)₂HPO₄ с концентрацией, не превышающей соответственно 5,1 и 2,5%, в ЯМР-спектре присутствует лишь один сигнал (см. рис. 2, б) с химическим сдвигом, отвечающим гидроксиапатиту Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂.

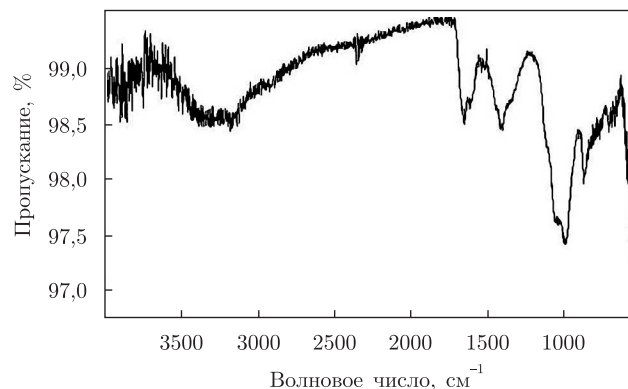


Рис. 3. ИК-спектр гидрогелевой нанореакторной матрицы на основе гомополиакриламидного геля с инкорпорированными частицами гидроксиапатита

Весьма информативной с точки зрения экспресс-диагностики формирующихся в гидрогелевых нанореакторах кальцийфосфатных фаз является ИК спектроскопия. Необходимо отметить, что даже незначительные изменения локальной симметрии фосфат-аниона в зависимости от эффектов химического окружения и пространственной структуры приводят к существенным изменениям его спектральных проявлений.

Прежде всего отметим, что к основным спектральным особенностям неминерализованных гомополиакриламидных гидрогелевых матриц можно отнести три максимума: наиболее интенсивный $\nu_{as}(\text{CH}) = 2930 \text{ см}^{-1}$ и меньшей интенсивности в области 2850 см^{-1} , а также 2770 см^{-1} . Последний из них соответствует симметричному колебанию $\nu_s(\text{CH}_2)$, в то время как колебание с частотой $\nu = 2850 \text{ см}^{-1}$ может быть идентифицировано с непрореагировавшим акриламидом, в спектре которого аналогичный максимум преобладает в указанном спектральном участке.

В спектрах полиакриламидного геля максимумы в области $\nu(\text{NH}) = 3407 \text{ см}^{-1}$ и 3189 см^{-1} отнесены к антисимметричным валентным колебаниям свободной и связанной (включенной в систему водородных связей) амидной группы. Для сополимерных образцов, содержащих акрилонитрильные звенья, наблюдаются малоинтенсивные максимумы в области поглощения нитрильной группы $2200\text{--}2340 \text{ см}^{-1}$.

В ИК-спектрах образцов ГА (рис. 3), синтезированных в гидрогелях, наличие фосфатных анионов подтверждается появлением новой широкой интенсивной полосы поглощения с максимумами в интервале 1060 и 990 см^{-1} (дублет с преобладанием по интенсивности низкочастотной компоненты и наличием плеча 1123 см^{-1}), принадлежащие трижды вырожденному антисимметричному колебанию фосфат-аниона, а также дублет деформационной моды $\delta(\text{OPO}) = 550\text{--}630 \text{ см}^{-1}$, уширенный за счет наложения полосы либрационных колебаний ОН-групп. Как видно из сопоставления ИК-спектров минерализованной и неминерализованной гидрогелевой матрицы, в исходном гидрогеле указанные полосы отсутствуют.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сформулировать критерии оптимизации процесса инкорпорирования нанокристаллического гидроксиапатита в гидрогелевые матрицы на основе акриловых (со)полимеров с целью получения биосовместимых композитных имплантатов для протезирования костной ткани и демонстрируют возможность использования несложных инструментальных методов для их экспресс-диагностики.

1. *Бронштейн Л. М., Сидоров С. Н., Валецкий П. М.* Наноструктурированные полимерные системы как нанореакторы для формирования наночастиц // *Успехи химии.* – 2004. – **73**, № 5. – С. 542–558.
2. *Сергеев Г. Б.* Нанохимия. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 2003. – 227 с.
3. *Kim J., Lee T.* Thermo- and pH-Responsive Hydrogel-Coated Gold Nanoparticles // *Chem. Mater.* – 2004. – No 16. – P. 3647–3651.
4. *Путляев В. И.* Современные биокерамические материалы // *Сорос. образов. журн.* – 2004. – **8**, № 1. – С. 44–50.
5. *Gertsyuk M., Samchenko Y.* Separation of Nonreacted Acrylamide from Polyacrylamide Gel for Endoprosthesing // *Ars Separatoria Acta.* – 2007. – No 5. – P. 99–102.
6. *Demirtas T., Karakecili A., Gumusderelioglu M.* Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in vitro characterization // *J. Mater. Sci: Mater. Med.* – 2008. – **19**, No 5. – P. 729–735.
7. *Matsusaki M., Kadowaki K., Tateishi K.* Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct-Hydroxyapatite Composites Generated by an Alternate Soaking Process: Potential for Repair of Bone Defects // *Tissue Engineering: Part A.* – 2008. – **14**, No 1. – P. 1–9.
8. *Самченко Ю. М., Пасмурцева Н. А., Ульберг З. Р.* Диффузия лекарственных препаратов из гидрогелевых нанореакторов // *Доп. НАН України.* – 2007. – № 6. – С. 143–148.
9. *Samchenko Yu., Ulberg Z., Socolyuk A.* Synthetic hydrogels based on acrylic comonomers // *J. de Chim. Physique.* – 1996. – No 93. – P. 920–931.
10. *Самченко Ю. М., Атаманенко И. Д., Полторацкая Т. П., Ульберг З. Р.* Состояние воды в мелкодисперсных гидрогелях на основе акриламида и акриловой кислоты // *Коллоид. журн.* – 2006. – **68**, № 5. – С. 670–673.
11. *Самченко Ю. М., Альтшулер М. А., Циркина В. В.* О сорбционных свойствах (co)полимерных гидрогелей акриловой кислоты // *Доп. НАН України.* – 2003. – № 12. – С. 136–140.
12. *Кондратенко П. О., Самченко Ю. М., Пасмурцева Н. О., Ульберг З. Р.* Моделивання пористої структури сітчастих полімерів // *Полімер. журн.* – 2007. – **29**, № 3. – С. 222–228.
13. *Шпак А. П., Карбовский В. Л., Трачевский В. В.* Апатиты. – Киев: Академперіодика, 2002. – 414 с.
14. *Самченко Ю. М., Пасмурцева Н. А., Ульберг З. Р.* Гидрогелевые нанореакторы медицинского назначения // *Доп. НАН України.* – 2007. – № 2. – С. 146–150.

Институт биокolloидной химии

им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины, Киев

Институт прикладной физики НАН Украины, Сумы

Институт микробиологии и иммунологии

им. И. И. Мечникова АМН Украины, Харьков

Поступило в редакцию 13.03.2009

**Yu. M. Samchenko, I. E. Boldeskul, L. B. Suchodub, S. N. Danilchenko,
L. I. Bereza, Z. R. Ulberg, Corresponding Member of the NAS of Ukraine
L. F. Suchodub**

Synthesis and spectral identification of hydrogel nanocomposites for prosthetics of bone tissue

New nanocomposite materials for prosthetics of a bone tissue on the base of mineralized acrylic copolymer hydrogels are synthesized. The methods of synthesis providing the prevailing formation of nanosized stoichiometric hydroxyapatite in hydrogel pores are developed, and its structural identification with the use of various spectral methods is accomplished.