

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОЗИТОВ ГИДРОКСИАПАТИТА С БИОПОЛИМЕРАМИ

© 2009 Н. И. Пономарева¹, Т. Д. Попрыгина¹, С. И. Карпов²,
М. В. Лесовой², Б. Л. Агапов²

¹ Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко,
ул. Студенческая 10, 394000 Воронеж, Россия

² Воронежский государственный университет, Университетская пл. 1, 394006 Воронеж, Россия

Поступила в редакцию: 06.07.2009 г.

Аннотация. Осуществлен синтез композитов гидроксиапатита в системах «нитрат кальция-гидрофосфат аммония-гидроксид аммония-органический компонент», где в качестве органического компонента присутствовали желатин и/или хондроитинсульфат, а также проведен сравнительный анализ ИК-спектров, снятых при температуре 40° С и 250° С. Методами РФА, ИК-спектроскопии и элементного анализа подтверждено предположение об участии функциональных групп органических соединений в формировании кристаллов гидроксиапатита.

Ключевые слова: гидроксиапатит, хондроитинсульфат, желатин, композиты.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время интенсивно ведутся исследования, связанные с возможностью синтеза искусственного гидроксиапатита (ГА), входящего в состав костной ткани. Среди основных направлений — улучшение механических характеристик полученных материалов и попытки связывания ГА органическими молекулами, что должно, по-видимому, улучшить его биологические свойства. Таким образом, биологическая активность и механические характеристики материала оказываются в прямой зависимости от механизма соответствующих реакций [1,2].

Согласно литературным данным, формирование неорганических кристаллов в живом организме существенно отличается от проведенного в лабораторных условиях. Прежде всего, процесс *in vivo* контролируется органическими веществами (как правило, белковой природы или полисахаридами) [3, 4]. При этом белки не только индуцируют рост кристаллов, но и изменяют их морфологию. Кроме того, в состав костной ткани входят карбонат-ионы, а также натрий, магний, хлор, другие неорганические ионы, замещающие различные позиции в кристаллической решетке ГА. Природный баланс этих веществ настолько сложен, что не может быть воссоздан искусственно.

При проведении исследований мы не ставили своей целью полное подражание природным про-

цессам, однако обратили внимание на то, что в формировании костной ткани принимают участие гетерополисахарид хондроитинсульфат и белок коллаген, причем активные функциональные группы коллагена включаются в этот процесс, по-видимому, только на позднем этапе формирования костного матрикса, так как многочисленные исследования подтверждают полное отсутствие этого белка на ранней стадии формирования правильно организованных ядер кристаллизации (см., например, [5]). Роль мукополисахаридов в этом процессе мало изучена. В 70-е годы было обнаружено, что высокопористый сополимер коллагена типа I и хондроитин-6-сульфата влияет на кинетику и механизм затягивания ран грызунов. С тех пор было исследовано множество сополимеров-трансплантатов, но заметной биологической активностью обладали только образцы, удовлетворяющие следующим условиям: по наномасштабу — средняя молекулярная масса каждого участка полимера между поперечными сшивками сетки составляет 12500 ± 5000 ; по микромасштабу — средний диаметр пор в пределах 20—120 μm . Относительно малые отклонения от этих структурных особенностей приводили к потере биологической активности. За регенерацией дермиса была проведена регенерация периферического нерва. Был сделан вывод о специфичности каждой из форм сополимера для восстановления определенных органов. Таким об-

разом, соосаждение коллагена и хондроитинсульфата вызывает образование биологически активного материала, который используется в медицине для пересадки тканей [4].

Целью настоящей работы было изучение влияния органических макромолекул на осаждение гидроксиапатита в водных растворах, а также обнаружение возможных изменений в спектрах, происходящих при повышении температуры. Учитывая вышеизложенное, в качестве органических полимеров мы выбрали хондроитинсульфат натрия и желатин, продукт гидролиза коллагена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве кальциевого прекурсора при проведении синтеза гидроксиапатита использовали 0,1М раствор нитрата кальция (Schering-Kahbaum, Germany), в качестве фосфорного прекурсора — 0,06М гидрофосфат аммония (Merck, Germany). Для достижения нужного значения pH добавляли раствор аммиака. Для синтеза композитов готовили 0.5 % раствор желатина, хондроитин-6-сульфат натрия добавляли в количестве 0.2 г на 100 мл раствора. Перемешивание раствора осуществляли с помощью магнитной мешалки. Добавление фосфорного прекурсора к кальциевому производили по каплям в течение 9 часов, pH = 10 поддерживали постоянным, при снижении значения pH до 9,5 в систему добавляли гидроксид аммония. Температуру поддерживали постоянной (55° C). Затем осадок оставляли без перемешивания и нагревания на 10 часов, после осуществляли дополнительное перемешивание 5 часов. Осадок фильтровали с помощью вакуумного насоса и фильтра Шотта Ø40, Ø16, промывали кипяченой дистиллированной водой, сушили на воздухе. Исследуемые образцы не подвергали предварительному обжигу для сохранения органической составляющей композитов.

Электронная микроскопия проводилась на приборе JSM-6380 LV (Япония), элементный анализ выполняли с помощью приставки «Energy-250». Дифрактограммы получены на приборах ДРОН-3М, ДРОН-7, излучение CuK_α , скорость сканирования 2°/мин. ИК-анализ был проведен с использованием спектрометра Bruker Equinox 55 с Фурье преобразованием в режиме диффузного отражения (DRIFT). Для удаления адсорбированной воды, а также установления структурных изменений материала использовали приставку диффузного отражения PURGED PRAYING MANTIS DRP-XXX фирмы HARRICK для *in situ* нагревания, что по-

зволило получать ИК-спектры при различных температурах.

Перед проведением анализа образец растирали до состояния «пудры», с размером частиц меньше 5 мкм и смешивали с предварительно подготовленным бромидом калия Merck (for IR spectroscopy). Продувочный газ (азот) подавался в приставку через газовый штуцер со скоростью около 60 мл/мин, что позволяло нивелировать изменения в виде спектра при повышенных температурах и позволяло отводить из приставки продукты десорбции и разложения. Для изучения изменения структуры адсорбента при нагревании проводили ступенчатое изменение температуры с нагреванием при температурах 313, 523К, выдерживая образец при каждой температуре в течение 90 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дифрактограммы полученных образцов имеют все характерные для ГА рефлексы от плоскостей с $d = 3.44, 2.817, 2.779, 2.723, 2.265, 1.945, 1.841 \text{ \AA}$ (ASTM card 9—432), однако количество аморфной составляющей было различным и достигало максимума в образцах, содержащих желатин, добавленный в конце синтеза. На рис. 1 приведена типичная дифрактограмма ГА, на рис. 2 — дифрактограмма композита ГА с хондроитинсульфатом.

Обнаружено, что образование дополнительной фазы, идентифицированной методом РФА как $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [6, 7], происходит лишь при заметном снижении pH (ниже 8) или при введении в систему аммиака с опозданием. На дифрактограммах таких образцов обычно появляются пики высокой интенсивности при $d = 3.21, 2.80, 1.93, 1.74 \text{ \AA}$. Возможно также присутствие фазы $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (основные рефлексы при $d = 3.23, 3.08, 3.04, 2.76 \text{ \AA}$ частично накладываются на линии самого ГА или $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). По литературным данным [5], образование трикальцийфосфата при выбранных условиях может происходить только в присутствии примесей магния. Полученные образцы не подвергались обжигу, однако имеют достаточно четкие дифрактограммы ГА. Варьирование условий синтеза приводило к образованию как кристаллических, так и гелеобразных осадков, которые, однако, не являются аморфными по результатам РФА. Этот факт объясняется изменением степени гидратации частиц и проявлением размерного эффекта [8].

По данным элементного анализа, осадки содержат небольшое количество (0,2—0,3 вес.%) натрия.

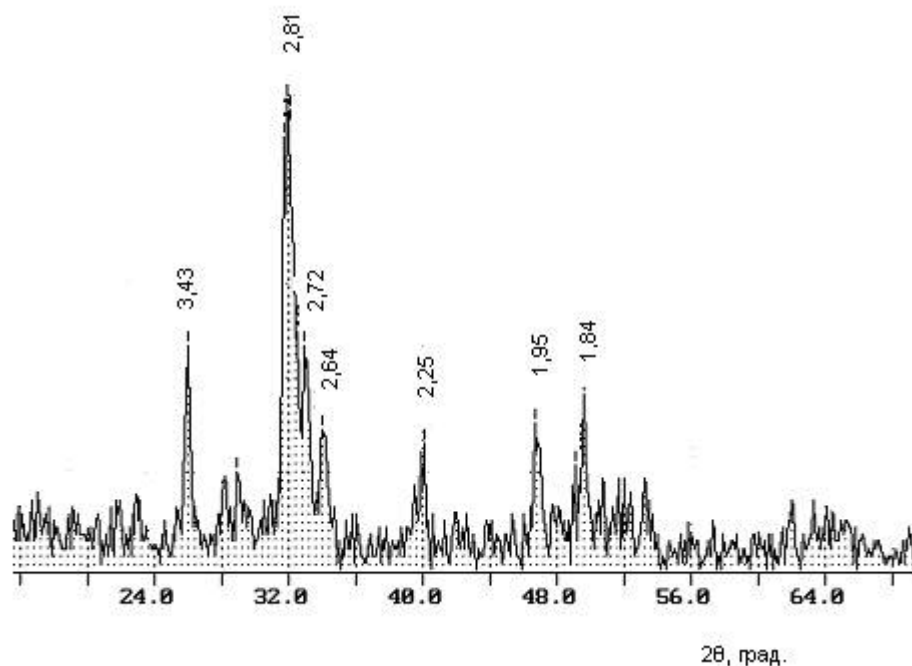


Рис. 1. Дифрактограмма ГА.

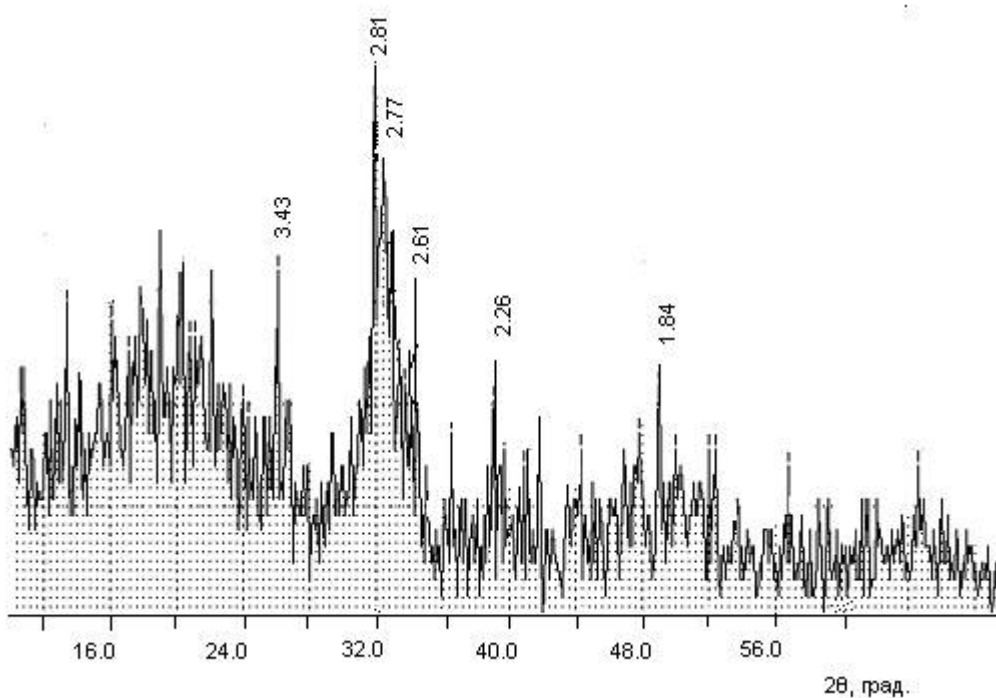


Рис. 2. Дифрактограмма композита ГА с хондроитинсульфатом.

При добавлении в систему желатина получались образцы с повышенной твердостью. На рис. 3, 4 показаны микрофотографии поверхности композита ГА с хондроитинсульфатом (образец I) и композита ГА с желатином (образец II), полученные с помощью растрового электронного микроскопа.

Типичный ИК-спектр карбонатзамещенного ГА характеризуется наличием полос колебаний ОН-групп ($\nu = 3606\text{—}3617\text{ см}^{-1}$), полосами валентных и деформационных колебаний фосфатных групп ($1047, 604, 569\text{ см}^{-1}$) и карбонатной группы ($1420, 1385\text{ см}^{-1}$). Таким образом, все исследованные ГА содержали некоторое количество CO_3^{2-} групп. Со-

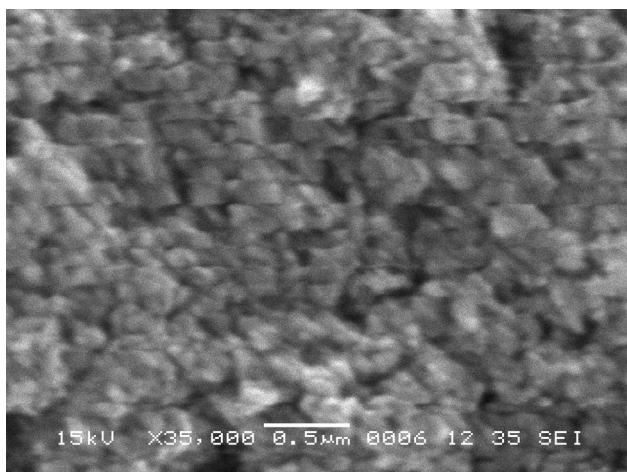


Рис. 3. Микрофотография поверхности образца I. Метка — 0.5мкм.

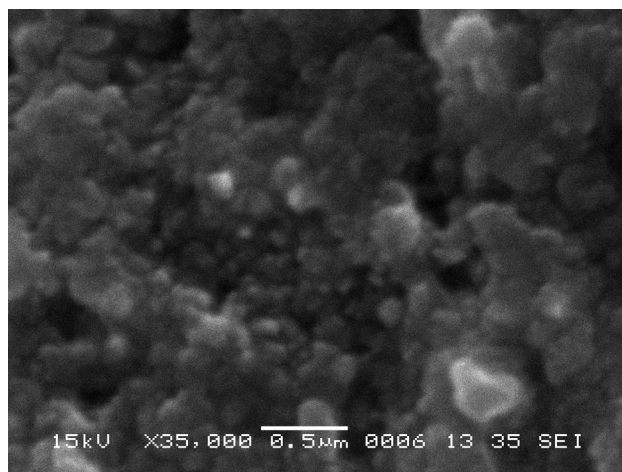


Рис. 4. Микрофотография поверхности образца II. Метка — 0.5мкм.

гласно литературным данным, карбонат-ионы частично замещают гидроксильные, расположенные в Са-каналах гидроксиапатита, т.е. образуются карбонатгидроксиапатиты типа А [2, 9].

При введении биополимеров наряду с появлением новых полос поглощения органических функциональных групп в композитах увеличивается содержание связанной воды, особенно этот эффект выражен в присутствии желатина (рис. 5).

Увеличение температуры до 250° С приводит к разрыву водородных связей между СО и NH группами, а также увеличению числа недиссоциированных карбоксильных групп [10].

Структура сульфогруппы хондроитинсульфата изменяется при повышении температуры, а также интересным является тот факт, что разрывается га-

лактозаминная связь. Этот эффект наблюдается уже при сравнительно невысоких температурах (до 80° С), в результате чего промытые образцы по данным элементного анализа вообще не содержат азота.

Обнаружено, что полимеры не образуют связей с ОН группами ГА.

Во всех композитах присутствуют полосы при частотах 1424 и 873 см^{-1} , отвечающие колебаниям карбонатных групп, а также полосы валентных колебаний воды. Пик 1039 см^{-1} , не образующий ярко выраженного триплета, подтверждает образование карбонатгидроксиапатита.

На основании данных ИК и РФА спектров можно сделать заключение об образовании в этих системах композитов, содержащих карбонатгидроксиапатит переменного состава.

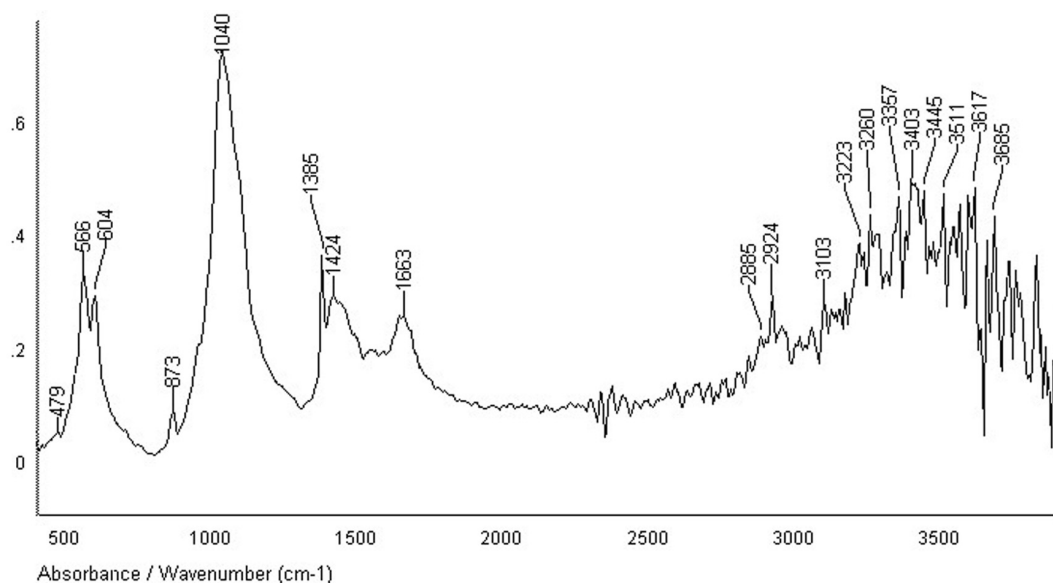


Рис. 5. ИК-спектр композита ГА с желатином ($t = 40^\circ \text{C}$).

Таким образом, все полученные образцы характеризуются наличием только слабых адсорбционных взаимодействий между органической и неорганической составляющей, большую роль играют водородные связи, причем гидроксильная группа ГА не принимает участия в образовании настоящих химических связей с биополимерами и служит, по-видимому, для увеличения степени гидратации. Все функциональные группы органических соединений, наоборот, задействованы в образовании слабых связей с ГА, причем частота колебаний соответствующих групп изменяется не только при образовании композита, но и при изменении температуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Путьяев В.И. // Соровский образовательный журнал. 2004. Т. 8. № 1. С.44.
2. Баринев С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005. 204 с.
3. Quyen Q.Hoang, Frank Sicheri, Andrew J.Howard, Daniel S.C.Yang. // Nature. 2003. V. 425. P. 977.
4. Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine / edited by B.D.Ratner. USA: Academic Press, 1996. P. 82.
5. Hans Ed., Sheel J., Tsuguo Fukuda. Crystal Growth Technology. 2003. P. 525.
6. Миркин Л.И. Справочник по рентгеноструктурному анализу поликристаллов. М.: Физматгиз, 1961. 863 с.
7. Ковба Л.М., Трунов В.К. Рентгенофазный анализ. М.: МГУ, 1976. 232 с.
8. Суворова Е.И., Буффа Ф.А. // Кристаллография. 2001. Т. 46. № 5. С. 796.
9. Родичева Г.В., Орловский В.П., Баринев С.М. // ЖНХ. 2001. Т. 46. № 11. С. 1798.
10. Наканиси К. ИК-спектры и строение органических соединений. М.: Мир, 1965. 216с.

Пономарева Наталия Ивановна — зав.кафедрой неорганической и физической химии Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (4732) 437-688; e-mail: n_ponomareva@vsma.ac.ru

Попрыгина Татьяна Дмитриевна — ассистент кафедры неорганической и физической химии Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко; тел.: (4732) 437-688; e-mail: tanechkavma@rambler.ru

Карпов Сергей Иванович — доцент кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-828; e-mail: sergk@chem.vsu.ru

Лесовой Михаил Васильевич — директор ЦКПНО Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-244

Агапов Борис Львович — доцент кафедры физики Воронежского государственного университета; тел.: (4732) 208-244

Ponomareva N.I. — head of chair of inorganic and physical chemistry, Voronezh State Medical Academy after N. N. Burdenko; tel.: (4732) 437-688; e-mail: n_ponomareva@vsma.ac.ru

Poprygina T.D. — the assistant of chair of inorganic and physical chemistry, Voronezh State Medical Academy after N. N. Burdenko; tel.: (4732) 437-688; e-mail: tanechkavma@rambler.ru

Karpov S.I. — assistant professor of chair of analytical chemistry, Voronezh State University; tel.: (4732) 208-828; e-mail: sergk@chem.vsu.ru

Lesovoy M.V. — director of scientific center, Voronezh State University; tel.: (4732) 208-244

Agapov B.L. — assistant professor of chair of physics, Voronezh State University; tel.: (4732) 208-244