

## Гидрогелевые композиты с гидроксиапатитом

Е. Е. Сыч, Ю. М. Самченко, И. Е. Болдескул, Л. А. Иванченко,  
Н. Д. Пинчук, С. Н. Данильченко

*Изучена возможность получения композитов на основе сополимерных гидрогелей акриломида и акрилонитрила, содержащих 20 и 50% (мас.) порошков гидроксиапатита и стеклокерамики. Для полученных композитов определены аддитивная и кажущаяся плотность, пористость. Изучены механическое поведение и свойства *in vitro*. Установлено, что наличие кристаллической составляющей в композите приводит к стабилизации величины рН, которая не превышает 6,6.*

**Ключевые слова:** композиционный материал, гидроксиапатит, акриламид, акрилонитрил, сополимер.

### Введение

В современном медицинском материаловедении существует достаточное количество материалов для замены поврежденных или утраченных участков костной ткани, но разработчики и исследователи всё еще находятся в поиске универсального биоматериала. Особенно это связано с необходимостью замены больших участков удаленной костной ткани пациента и ускорения процесса регенерации.

Одним из перспективных способов улучшения регенерации кости является метод инженерии клеток-предшественников костной ткани [1]. Метод основан на размещении стромальных клеток костного мозга или жировой ткани пациента на подложку из биоматериала, где происходит образование новых тканей за счёт роста и дифференциации клеток. Затем полученную “конструкцию” трансплантируют пациенту в область костного дефекта, что приводит к ускорению регенерации уже в условиях его организма.

Часто в качестве подложек используют природные и синтетические биополимеры: альгинат и коллаген, поликапролактон, полимеры молочной и гликолиевой кислот [2]. К неорганическим материалам, применяемым для указанных целей, относят гидроксиапатит (ГА) как биологического (биогенного), так и синтетического происхождения, трикальцийфосфат, фосфатные стекла и композиции на их основе [3].

Основными требованиями, предъявляемыми к подложкам для клонирования клеток, являются высокая биоиндуктивность и в ряде случаев достаточная механическая прочность для замены участков кости, испытывающих значительные механические нагрузки [2, 4].

Известно, что гидроксиапатит биогенного происхождения (БГА) имеет ряд преимуществ над синтетическим, так как сохраняет исходный химический состав костного минерала и его пористую структуру [5, 6]. Натрийборосиликатное стекло в сочетании с БГА улучшает его механические свойства и позволяет регулировать макроструктуру

материала [7, 8]. При имплантации биоматериалы типа БГА—стекло постепенно растворяются в физиологической среде пациента и замещаются новообразованной костной тканью. При этом ионы кальция и фосфора являются своеобразным “строительным материалом” для новых участков кости, а ионы кремния играют роль дополнительных элементов, жизненно необходимых для нормального роста и развития скелетных тканей.

Полученные в работе [4] данные свидетельствуют о том, что процессы адгезии и пролиферации культивированных клеточных линий наиболее активно протекают на деминерализованном матриксе кортикальной и губчатой кости. Отсутствие пролиферативной активности клеток к подложкам из природного или синтетического ГА авторы объясняют особенностями формирования костной ткани, участием остеобластов и остеоцитов, а также тем, что апатиты могут оказывать дифференцирующее, а не индуцирующее влияние на рост культивируемых стволовых клеток.

Природный коллаген, или деминерализованный костный матрикс, а также некоторые высокомолекулярные соединения сами по себе или в комплексе с коллагеном обладают более выраженными индуктивными свойствами по сравнению с апатитами, что лучше способствует процессам адгезии и пролиферации культивированных клеточных линий [4, 9].

Однако препятствием для использования коллагена или полимеров в качестве подложек для культивирования стволовых клеток является их недостаточная механическая прочность, которая часто необходима для имплантации в поврежденные участки костной ткани. Для устранения этого недостатка возможно применение композитов на основе минерализованных гидрогелей, которые сочетают полезные свойства как полимерной, так и неорганической составляющих [10].

Цель данной работы — изучение возможности создания композитов на основе сополимерных гидрогелей и кальцийфосфатов с соотношениями 80 : 20 и 50 : 50 для использования в качестве подложек клеток-предшественников костной ткани. В качестве неорганической кальцийфосфатной составляющей использованы гидроксиапатиты и композиты биогенный гидроксипатит—стекло, далее называемые ОК (Остеоапатит Керамический™).

Предполагалось, что неорганическая составляющая будет обеспечивать механическую прочность и поддержку трёхмерного роста клеток, а полимерный компонент — увеличивать общую биоактивность полученного композита для улучшения адгезии и пролиферации культивированных клеточных линий при их соответствующем использовании в клеточной инженерии.

### **Материалы и методы исследования**

Сополимерные гидрогели на основе акриломида и акрилонитрила (П-6 и П-12 соответственно) получали свободно-радикальной полимеризацией в водной среде при комнатной температуре. Иницирование проводили посредством окислительно-восстановительной системы персульфат калия—метабисульфит натрия. Сшивание с образованием трехмерной пространственной сетки осуществляли с использованием бифункционального мономера — N, N' — метилен-бис-акриломида. Были синтезированы две гидрогелевые матрицы (П-6 и П-12), отличающиеся соотношением

**Т а б л и ц а 1. Химический состав гидрогелевых матриц**

Наименование геля	АА : АН	$C_{\text{МБА}}$ , %	$C_{\text{сш. пол.}}$ , %
П-6	34 : 66	0,42	37
П-12	29 : 71	0,47	44,5

**Т а б л и ц а 2. Некоторые параметры исследованных образцов композитов**

Номер образца	Состав образца	$\rho_{\text{к}}$ , г/см <sup>3</sup>	$\rho$ , г/см <sup>3</sup>	$\Theta$ , %	Скорость растворения, % (мас.) / (см <sup>2</sup> ·сут)	pH после 2 ч в физ. р-ре
179	Гель П-6	1,31	—	—	2,35	6,4
139	Гель П-6 + 20% ГА № 96	1,17	1,17	20,5	0,42	—
141	Гель П-6 + 50% ГА № 96	0,60	0,60	67,0	0,26	—
169	Гель П-12	1,59	—	—	3,06	6,6
170	Гель П-12 + 50% ГА № 91	1,61	2,08	22,6	4,15	6,1
171	Гель П-12 + 20% ГА № 91	1,66	1,76	5,9	4,99	6,3
172	Гель П-12 + 20% ОК № 7	1,65	1,74	5,1	4,17	6,5
173	Гель П-12 + 20% ОК № 8	1,55	1,74	10,9	3,50	6,5
174*	Гель П-12 + 50% ОК № 7	—	—	—	—	6,1
175*	Гель П-12 + 50% ОК № 8	—	—	—	—	6,1

\*Порошок.

мономеров и концентрацией сшитого полимера в гидрогеле, а также частотой сшивки. Сведения об их химическом составе приведены в табл. 1.

Неорганическую составляющую вводили в соответствующую композицию в количестве 20 или 50% (мас.) от содержания сшитого полимера (табл. 2). Гелеобразование проводили при комнатной температуре в цилиндрических пресс-формах объемом 10 см<sup>3</sup> в течение 1 ч. Полученные образцы промывали дистиллированной водой в течение 12 ч.

Порошки ГА № 91 получены нами химическим методом осаждения по методике, описанной в работе [11]: к 100 см<sup>3</sup> 1 М раствора Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> на холоду при перемешивании добавляли 100 см<sup>3</sup> 6 М раствора NH<sub>4</sub>OH и медленно доливали 100 см<sup>3</sup> 0,6 М раствора (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Полученный белый осадок выдерживали в маточном растворе на протяжении 0,5 ч при 100 °С. Затем осадок промывали до pH = 7 дистиллированной водой методом декантации и высушивали при комнатной температуре.

Порошки ГА № 96 синтезированы аналогичным методом в Институте прикладной физики НАН Украины (г. Сумы).

Порошки ОК № 7 и 8 получены с соотношением БГА : стекло = 51,3 : 48,7 при температуре 600 °С. Для получения порошков ОК № 7 и 8 исходный БГА имел размер гранул <160 и 630—1000 мкм соответственно. Как было установлено, размер гранул сырьевых компонентов, исходных для получения образцов ОК, влияет на биохимическую растворимость конечного биоматериала [12].

Образцы сополимерных гидрогелей на основе акрилонитрила и акриломида (№ 169 и 179) прозрачные и однородные, в то время как образцы всех полученных композитов имеют молочный цвет и непрозрачны.

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР)  $P^{31}$  получали с высоким разрешением в твердом теле при вращении по магическому углу и регистрировали с Фурье-преобразованием на спектрометре Avance-400 (Bruker). Для идентификации образцов измеряли химические сдвиги  $\delta P^{31}$  относительно ортофосфорной кислоты.

Рентгенодифракционные исследования структуры материалов выполнены на дифрактометре ДРОН-4-07 (“Буревестник”, Россия) в  $CuK_{\alpha}$ -излучении (длина волны — 0,154 нм). Идентификацию кристаллических фаз проводили с использованием программных пакетов DIFWIN-1, Crystallographica Search-Match (Oxford Cryosystems, [www.crystallographica.co.uk](http://www.crystallographica.co.uk)) и базы данных Powder Diffraction File 2.

Для полученных в данной работе композитов определены кажущаяся и аддитивная плотность, пористость. Аддитивную плотность композитов рассчитывали на основании плотностей полимера и неорганических составляющих:

$$\rho = \frac{\rho_1 \cdot \rho_2}{\rho_1 \cdot C_2 + \rho_2 \cdot C_1},$$

где  $\rho_1$ ,  $\rho_2$  — плотность полимера и ГА, г/см<sup>3</sup>;  $C_1$ ,  $C_2$  — массовая доля полимера и ГА в композите.

Пористость определяли по формуле

$$\Theta = \left(1 - \frac{\rho_k}{\rho}\right) \cdot 100\%,$$

где  $\rho_k$ ,  $\rho$  — кажущаяся и аддитивная плотность композита, г/см<sup>3</sup>.

Механические характеристики материалов исследовали двумя методами: классическим (ГОСТ 27034-86 “Сплавы твердые спеченные. Метод определения предела прочности и предела текучести при сжатии”) и “жестким” (испытания на разрыв непрямым методом или “бразильский тест”). Классический метод предполагает приложение нагрузки к образцу, который находится между двумя параллельно размещёнными опорами, в осевом направлении к направлению разрушения образца. “Жесткий” метод подразумевает наложение нагрузки перпендикулярно направлению разрушения образца. Нагрузка составляла ~0,1 т. Испытания проводили на испытательном прессе ПСУ-50.

Для оценки биологической активности (исследования *in vitro*) изучали поведение образцов в физиологическом растворе при 37 °С в течение 48 ч при соотношении твердой и жидкой фаз 1 : 30. После чего образцы

извлекали из раствора, тщательно промывали дистиллированной водой, высушивали и взвешивали. По изменению массы относительно исходной с единицы поверхности на протяжении суток определяли скорость растворения материала.

Кроме того, при исследовании поведения *in vitro* образцов № 169, 172 и 173 отбирали пробу раствора после 48 ч для определения концентрации ионов, перешедших из исследуемого материала в раствор, методом неразрушающего энергодисперсионного рентгенфлуоресцентного анализа (ЭДРФА) с использованием прибора EXPERT 3L. Для этих образцов изучали изменение pH физиологического раствора при пребывании в нём исследуемого материала в течение 2 ч. Изменение pH фиксировали портативным pH-метром марки Cheker (Hanna Instruments).

### Результаты и их обсуждение

*Спектры ЯМР  $P^{31}$*  гидрогелевых матриц с инкорпорированными ГА и стеклокерамикой различного происхождения (№ 91 и 96, ОК 7 и 8) характеризуются единичным пиком с химическим сдвигом 2,8 м. д. (рис. 1). Спектры ЯМР  $P^{31}$ , полученные для стехиометрического ГА, полностью идентичны спектрам композитных материалов, что подтверждает правильность отнесения пика. Отметим, что в случае использования в качестве внешнего эталона аммонийдигидрофосфата химический сдвиг для ГА составлял около 2,2—2,4 м. д. [10].

Результаты *рентгенофазового анализа* синтезированных композитов также продемонстрировали, что ГА является основной присутствующей в них фазой минерального происхождения (рис. 2). Лишь в образце № 174, как следует из анализа соответствующей дифрактограммы, выявлено наличие незначительной примеси трикальцийфосфата.

*Физико-механические свойства.* Деформационное поведение образцов сополимерных гидрогелей № 169 и 179 резиноподобное: при небольшом давлении материалы расплющиваются в “лепёшку” без разрушения, а при снятии нагрузки полностью возвращаются форма и размер образца без остаточных деформаций. При испытаниях материалы прилипают к рабочей поверхности испытательной машины. Значения рассчитанной плотности гидрогелей представлены в табл. 2.

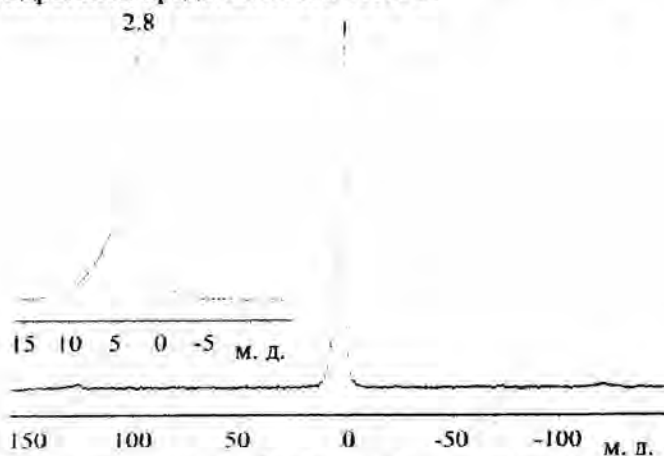


Рис. 1. Спектр ЯМР  $P^{31}$  образца № 139 (II-6 + 20% (мас.) ГА № 96).

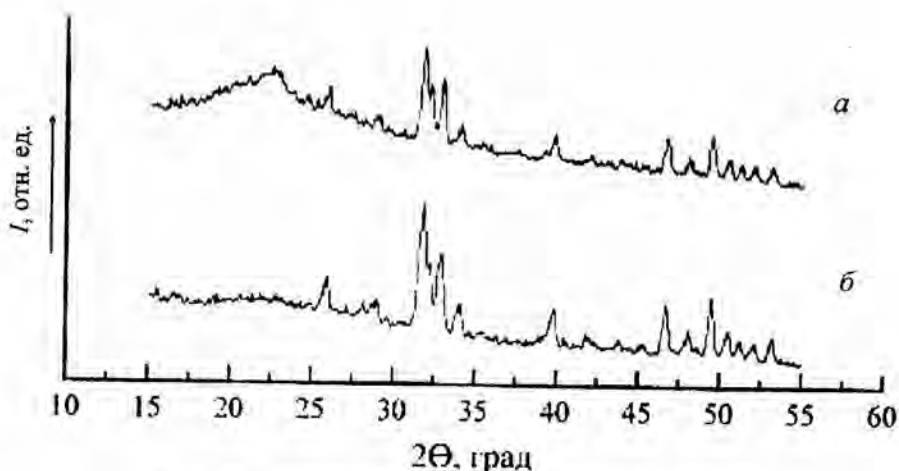


Рис. 2. Дифрактограммы образцов № 174 (а) и 175 (б).

Для образцов композитов с ГА и ОК также характерно резиноподобное поведение при разрушении, но они имеют большее сопротивление деформации, чем образцы гидрогелей. При определении прочностных характеристик классическим методом происходит полный возврат формы, однако сторона, которую нагружали, становится обеднённой гидрогелем и обогащенной твердой составляющей образца, при этом видна четкая граница. При испытании “ребром” после снятия нагрузки наблюдалась остаточная деформация, но лишь в месте, обогащенном неорганической составляющей. Из табл. 2 следует, что на плотность и пористость материалов влияют тип применённого геля, ГА или ОК.

Для сравнения, компактные образцы составов ОК № 7 и 8 имеют хрупкий характер разрушения и прочность при сжатии ~60 МПа, кажущуюся плотность 1,87 и 1,78 г/см<sup>3</sup> и общую пористость 33,0 и 35,4% соответственно.

*Исследования in vitro.* Образец № 141, обладающий максимальной плотностью, которая меньше плотности воды, и минимальной пористостью, при погружении в физиологический раствор не “тонул”, оставаясь на поверхности, однако после двух суток он находился уже на дне стакана. Другие исследованные образцы композитов не обнаруживали подобного поведения. После извлечения образцов из раствора наблюдалось заметное их набухание вплоть до потери формы, после сушки их объем значительно уменьшался и они приобретали желтоватую окраску.

Изучение изменения величины рН физиологического раствора при нахождении в нём исследуемых материалов показало, что наличие ГА № 91 в образцах № 170 и 171 приводит к некоторому уменьшению рН соответствующего раствора, а для образцов № 169, 172 и 173 этот параметр мало изменяется и находится на уровне 6,5—6,6 на протяжении 2 ч (табл. 2). Следует отметить, что для стеклокерамики без гидрогеля рН соответствующего раствора увеличивается до 8,5—8,8 в течение 2 ч. Довольно высокими рН характеризуются обычно и растворы, содержащие порошки ГА (>7) [11]. В связи с изложенным снижение рН в растворах с

композитами по сравнению с таковыми для гелей П-6 и П-12 можно объяснить преимущественно наличием некоторой “закупорки” гелями собственных пор в частицах стеклокерамики, входящей в состав композитов. Стабильность величины рН полученных и исследованных в данной работе композитов является положительным фактором в случае использования их в клеточной инженерии.

Гели П-6 и П-12 отличаются по плотности и растворимости, аналогичным образом отличаются и композиты на их основе (табл. 2). Добавление ГА № 96 к гелю П-6 значительно снижает как плотность, так и растворимость соответствующих композитов № 139 и 141, что требует дальнейших исследований. Добавление ГА № 91 к гелю П-12 приводит к повышению пористости и улучшению растворимости соответствующих композитов по сравнению с исходным гелем. Аналогичным образом влияет добавление 20% (мас.) порошков ОК № 7 и 8 к тому же гелю, хотя собственная скорость растворения стеклокерамики ОК № 7 и 8 составляет 0,11 и 0,04% (мас.)/(см<sup>2</sup>·сут) соответственно.

Методом ЭДРФА установлено, что после 48 ч исследований образцов композитов *in vitro* в физиологический раствор переходит 0,0013—0,0017% (мас.) Са, 0,001% (мас.) Si и 0,001% (мас.) Fe, что является подтверждением растворения неорганической составляющей композитов.

### Выводы

Установлено, что образцы композитов по сравнению с чистыми гидрогелями имеют большее сопротивление деформации. Показано, что в физиологическом растворе с погруженными в него образцами композитов происходит очень слабое изменение величины рН. Это является положительным фактором при использовании полученных материалов в качестве подложек для клеток-предшественников костной ткани.

1. Jo I., Lee J. M., Suh H. Hyongbum kim bone tissue engineering using marrow stromal cells // *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. — 2007. — 12. — P. 48—53.
2. Frenkel S. R., Di Cesare P. E. Scaffolds for articular cartilage repair // *Annals of Biomedical Engineering*. — 2004. — 32, No. 1. — P. 26—34.
3. Habraken W. J. E. M., Wolke J. G. C., Jansen J. A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering // *Advanced Drug Delivery Rev.* — 2007. — 59. — P. 234—248.
4. Климовицкий В. Г., Гринь В. К., Василенко И. В. и др. Индуктивные свойства носителей мезенхимальных стволовых клеток // *Травма*. — 2007. — 8, № 3. — С. 243—247.
5. Leventouri Th. Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions // *Biomaterials*. — 2006. — 27. — P. 3339—3342.
6. Kim Y. G., Seo D. S., Lee J. K. Dissolution of synthetic and bovine bone-derived hydroxyapatites fabricated by hot-pressing // *Appl. Surface Science*. — 2008. — 255. — P. 589—592.
7. Ivanchenko L. A., Pinchuk N. D., Krupa A. A., Fal'kovskaya T. I. Structure and properties of composite materials based on hydroxylapatite // *Glass and Ceramics (English Translation of Steklo i Keramika)*. — 2003. — 60, No. 5—6. — P. 193—194.
8. Skorokhod V. V., Ivanchenko L. A., Pinchuk N. D. et al. Porosity and bioactivity of hydroxyapatite — glass composites // *Functional Materials*. — 2006. — 13, No. 2. — P. 260—264.

9. Kosenko O. O., Lukash L. L., Samchenko Yu. M. et al. Copolymeric hydrogel membranes for immobilization and cultivation of human stem cells // *Bipolymers and Cells*. — 2006. — 22, Issue. 2. — P. 143—148.
10. Самченко Ю. М., Болдескул И. Е., Суходуб Л. Б. и др. Синтез и спектральная идентификация гидрогелевых нанокомпозитов для протезирования костной ткани // *Наноструктурное материаловедение*. — 2009. — № 1. — С. 52—59.
11. Фадеева И. В., Шворнев Л. И., Баринов С. М. и др. Синтез и структура магнийсодержащих гидроксилатапитов // *Неорган. материалы*. — 2003. — 39, № 9. — С. 1102—1105.
12. Сич О. Є., Пінчук Н. Д., Іванченко Л. А. Дослідження спікання пористих гранул різного розміру біогенного гідроксиапатиту в системі “гідроксиапатит—скло” // *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*. — 2009. — 7, № 2. — С. 595—600.

### Гідрогелеві композити з гідроксиапатитом

О. Є. Сич, Ю. М. Самченко, І. Є. Болдескул, Л. А. Іванченко,  
Н. Д. Пінчук, С. М. Данильченко

*Вивчено можливість отримання композитів на основі сополімерних гідрогелей акриломіду та акрилонітрилу, які містять 20 та 50% (мас.) порошків гідроксиапатиту та склокераміки. Для отриманих композитів були визначені адитивна та уявна густина, пористість. Досліджено механічну поведінку та властивості in vitro. Встановлено, що наявність кристалічної складової в композиті приводить до стабілізації величини рН, яка не перевищує 6,6.*

**Ключові слова:** композиційний матеріал, гідроксиапатит, акриломід, акрилонітрил, сополімер.

### Hydrogel composites with hydroxyapatite

O. Sych, Yu. Samchenko, I. Boldeskul, N. Pinchuk, S. Danil'chenko

*In the present work the possibility of preparation of composites based on copolymer hydrogels of acrylamide and acrylonitrile containing 20 and 50% (wt.) hydroxyapatite and glass ceramics powders has been investigated. The additive and apparent density and porosity for the prepared composites have been determined. Mechanical behaviour and properties in vitro have been investigated. It was established that the presence of the crystalline component in the composite led to stabilization of pH that did not exceed 6.6.*

**Keywords:** composite, hydroxyapatite, acrylamide, acrylonitrile, copolymer.