

УДК 544.77.022.84

**Ю.М. Самченко<sup>1</sup>, И.Е. Болдескул<sup>2</sup>, Л.Б. Суходуб<sup>3</sup>,  
С.Н. Данильченко<sup>2</sup>, Л.И. Береза<sup>1</sup>, З.Р. Ульберг<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Институт биокolloидной химии им. Ф.Д. Овчаренко НАН Украины  
бульвар Академика Вернадского, 42, г. Киев<sup>2</sup> Институт прикладной физики НАН Украины  
ул. Петропавловская, 58, г. Сумы<sup>3</sup> Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины  
ул. Пушкинская, 14, г. Харьков

## СИНТЕЗ И СПЕКТРАЛЬНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГИДРОГЕЛЕВЫХ НАНОКОМПОЗИТОВ ДЛЯ ПРОТЕЗИРОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

**Ключевые слова:** гидрогели, нано-реакторы, гидроксипатит, акриламид, эндопротезирование

*Синтезированы новые композитные материалы для протезирования костной ткани на основе минерализованных сополимерных гидрогелей акрилового ряда.*

*Разработаны методы получения, обеспечивающие преобладающее формирование в порах гидрогелей наноразмерного стехиометрического гидроксипатита, и проведена его структурная идентификация с использованием различных спектральных методов.*

### Введение

Формирование в полимерных матрицах наночастиц может приводить к созданию нанокomпозитных материалов с уникальными электрическими, магнитными, оптическими, механическими, каталитическими и другими свойствами [1], а также материалов, обладающих повышенной биосовместимостью [2].

Гидрогелевые полимерные матрицы являются одними из наиболее перспективных сред для формирования и стабилизации различных биоматериалов, представляющих интерес с точки зрения использования в медицине, прежде всего наноразмерных благородных металлов, обладающих высокой бактерицидной активностью, магнетита, позволяющего осуществлять целенаправленный транспорт наполненных им гидрогелевых микрогранул с инкорпорированными лекарственными препаратами к органу-мишени, гидроксипатита (ГА), являющегося аналогом биогенной костной ткани [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

© Ю.М. САМЧЕНКО, И.Е. БОЛДЕСКУЛ,  
Л.Б. СУХОДУБ, С.Н. ДАНИЛЬЧЕНКО,  
Л.И. БЕРЕЗА, З.Р. УЛЬБЕРГ, 2009

акриловых мономеров (прежде всего акриламида) уже на протяжении ряда лет широко применяются для протезирования мягких тканей, прежде всего при маммопластике [5]. Указанные имплантанты 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, гидроксипатит  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , являющийся основным неорганическим компонентом биогенной костной ткани и обладающий такими ценными свойствами, как биосовместимость, биоактивность, остеопроводимость и отсутствие воспалительных и токсических эффектов [6], также не лишен недостатков. Его практическое применение при эндопротезировании ограничено вследствие твердости, хрупкости и чрезмерной кристалличности [7]. Поэтому представляется, что композитные материалы на основе минерализованных гидрогелей, которые сочетают полезные свойства, присущие их полимерной и неорганической составляющим, могут быть весьма перспективными при протезировании костной ткани.

Характерной особенностью гидрогелевых матриц является наличие локальных объемов (пор), представляющих собой своеобразные микро- и наноразмерные реакторы, в которых формируются моно- и гетерофазные системы и композиции с различным соотношением кристаллической и аморфной фаз. Нами был синтезирован широкий спектр сополимерных гидрогелевых матриц с наноразмерной пористой структурой и разработаны методы инкорпорирования в их поровое пространство наночастиц различных биоматериалов (коллоидного серебра, магнетита, силикатов), перспективных с точки зрения применения в медицине [8]. Данная статья посвящена синтезу и идентификация композитных гидрогелевых материалов медицинского назначения, прежде всего с инкорпорированными фосфатами кальция.

## Объекты и методы исследования

Формирование наночастиц ГА осуществляли в гидрогелевых матрицах, синтезированных на основе акриламида и акрилонитрила, а также сшивающего агента (N,N'-метилден-бис-акриламид). Суммарное содержание сшитого полимера в гидрогелях варьировалось в диапазоне от 5% до 50%, а концентрация сшивающего агента — в пределах от 0,01% до 1%. Гелеобразование проводилось в водной среде при комнатной температуре. Иницирование полимеризации осуществлялось с использованием окислительно-восстановительной системы. Более подробная методика синтеза гидрогелей описывалась нами ранее [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 магнеобразной массы, способной к продавливанию через шприц, а также в виде высокодисперсных порошков с диаметром частиц около 0,05 мкм. Синтезированные гидрогелевые матрицы обладают высокой биосовместимостью, а их базовые физико-химические параметры (набухаемость, прочность, эластичность, прозрачность, ионо- и паропроницаемость, сорбционная и пролонгирующая способность по отношению к различным лекарственным препаратам) могут целенаправленно изменяться в широких пределах.

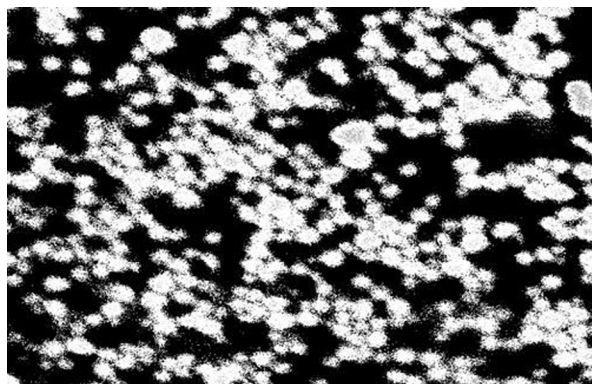
Формирование наночастиц серебра в порах гидрогелевых нанореакторов на основе акриламида (АА) и акриловой кислоты (АК), АА и акрилонитрила (АН), а также на основе их тройного сополимера осуществляли посредством их последовательной обработки 2-процентным водным раствором нитрата серебра и раствором, содержащим 0,2% метола и 4% лимонной кислоты. Формирование наночастиц магнетита производилось способом набухания гидрогелей в смешанном растворе солей  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{Fe}^{3+}$  с последующей обработкой 20-процентным раствором NaOH. Формирование наночастиц силикатов происходило путем последовательной обработки гидрогелевой матрицы растворами трисили-

ката натрия и хлорида кальция. Формирование наночастиц гидроксилатапата (ГА) достигалось методом последовательной обработки гидрогелевой матрицы растворами  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Спектры ИК-поглощения и комбинационного рассеяния были получены с помощью ИК-Фурье-спектрометра “Vertex-70” производства фирмы “Bruker” (Германия). Исследуемые пробы высушенных гидрогелей в виде порошков готовили растиранием в агатовой ступке с добавлением жидкого азота для уменьшения вязкости (комкования) и последующим прессованием в таблетки КВг.

Спектры ЯМР  $^{31}\text{P}$  измельченных растиранием и помещенных в ампулу образцов были получены методом высокого разрешения в твердом теле при вращении под магическим углом (MAS) и регистрировались с Фурье-преобразованием на спектрометре “Avance-400” (“Bruker”).

Рентгеновская дифракция полученных наноконструктов исследовалась с использованием дифрактометра ДРОН 4-07 (“Буревестник”, Россия). Использовалось излучение  $\text{CuK}_\alpha$  (длина волны 0,154 нм) при условиях фокусировки по Брэггу–Брентано ( $\theta$ – $2\theta$ ) ( $2\theta$  — брэгговский угол). Ток и напряжение на рентгеновской трубке имели значения 20 мА и 30 кВ соответственно. Регистрация проводилась в непрерывном



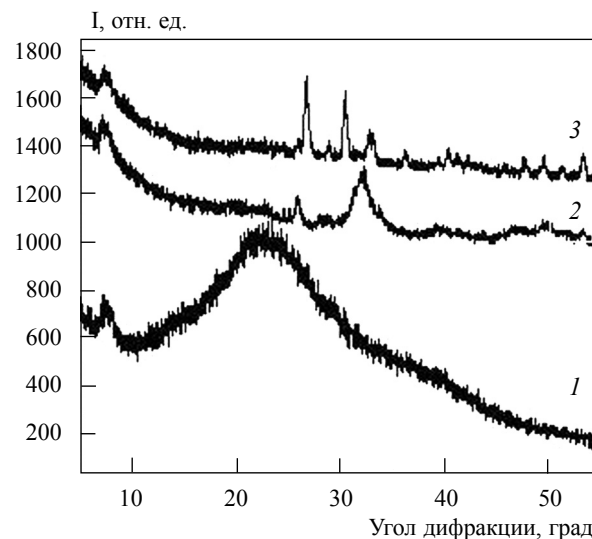
**Рис. 1.** Микрофотография гидрогелевой нанореакторной матрицы на основе АА и АН (1:1) с инкорпорированным коллоидным серебром

режиме (скорость  $2^\circ/\text{мин}$ ) в диапазоне углов  $2\theta$  от  $5^\circ$  до  $55^\circ$ .

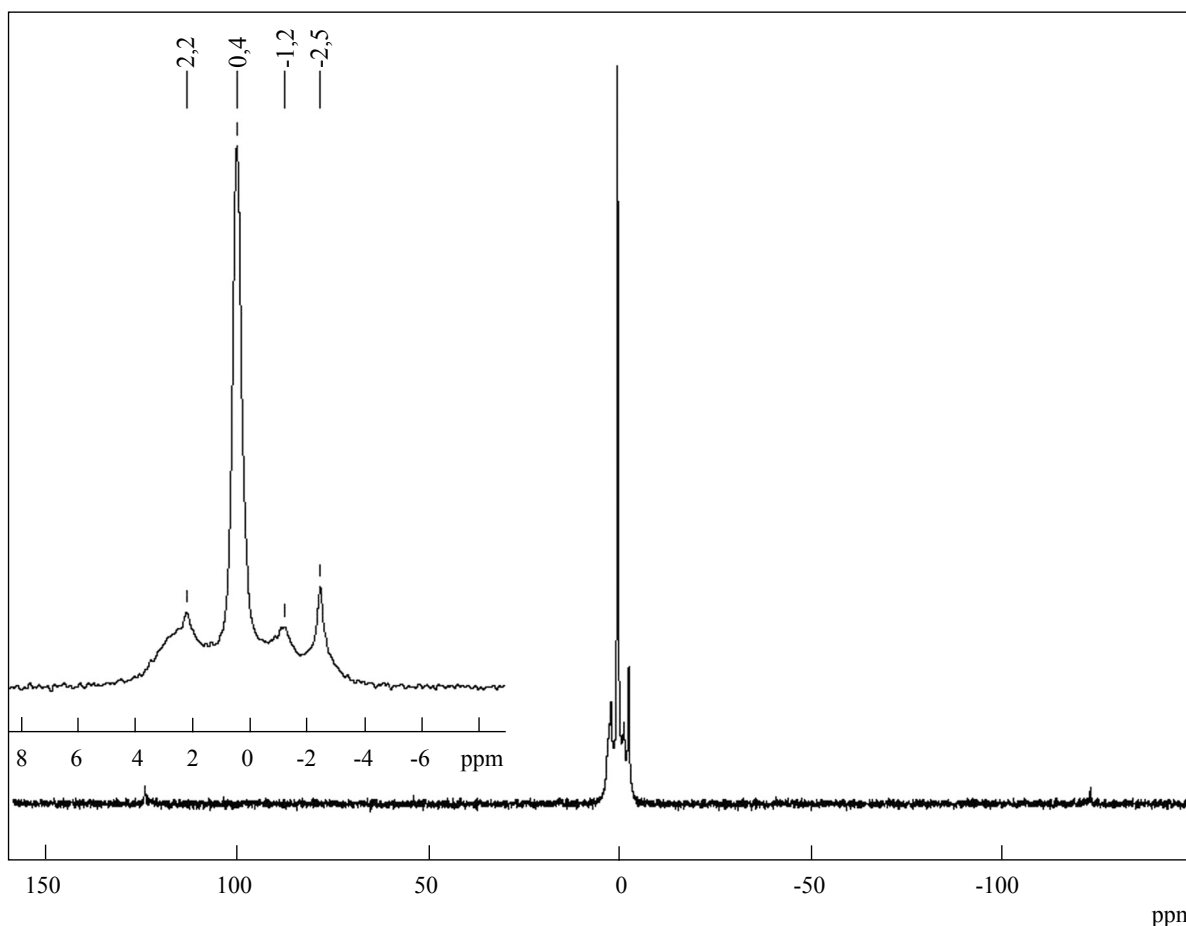
Микроскопические исследования образцов гидрогелей проводили с использованием электронного сканирующего микроскопа BS-340 производства фирмы “Tesla” (Чехословакия).

### Результаты исследований и их обсуждение

Размер порового пространства в синтезированных гидрогелях был нами охарактеризован разнообразными теоретическими и экспериментальными методами, а именно: исходя из депрессии температуры плавления по данным дифференциальной сканирующей калориметрии, исследования сорбции водяных паров, электронной микроскопии и компьютерного моделирования [10–12]. Проведенные комплексные исследования подтвердили, что поры в гидрогелях представляют собой наноразмерные структурные элементы и могут быть использованы в качестве нанореакторов для формирования и стабилизации частиц с превалирующим размером 10–30 нм.



**Рис. 2.** Рентгеновские дифрактограммы ненаполненной нанореакторной гомополиакриламидной матрицы (1) и сформированных в ней гидроксилатапата (2) и монетита (3)



**Рис. 3.** ЯМР  $^{31}\text{P}$ -спектры гидрогелевой нанореакторной матрицы на основе гомополиакриламидного геля, обработанной растворами  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  с концентрацией 12% и 5,8%

Сформировав в гидрогелевых нанореакторах частицы силиката кальция и подвергнув их отжигу при  $600\text{ }^\circ\text{C}$ , мы получили неорганические частицы, являющиеся своеобразным внутренним слепком гидрогелевой матрицы и характеризующие ее размеры. Исходные поры имели сферическую форму и преимущественные размеры порядка 10–30 нм. Сопоставимые данные о размерах порового пространства гидрогелевых нанореакторов на основе акриламида и акрилонитрила (эквивалентное соотношение мономеров; суммарное содержание сшитого полимера в гидрогеле — 50%) были получены и в случае формирования в нанопорах коллоидного серебра. При этом сформированные наночас-

тицы имели сферическую форму с преобладающим размером порядка 20–30 нм (рис. 1).

Гидрогелевые нанореакторные матрицы на основе акриловых мономеров были использованы и для получения 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 является многофакторным процессом, приводящим к образованию широкого набора ортофосфатов кальция, в частности три-

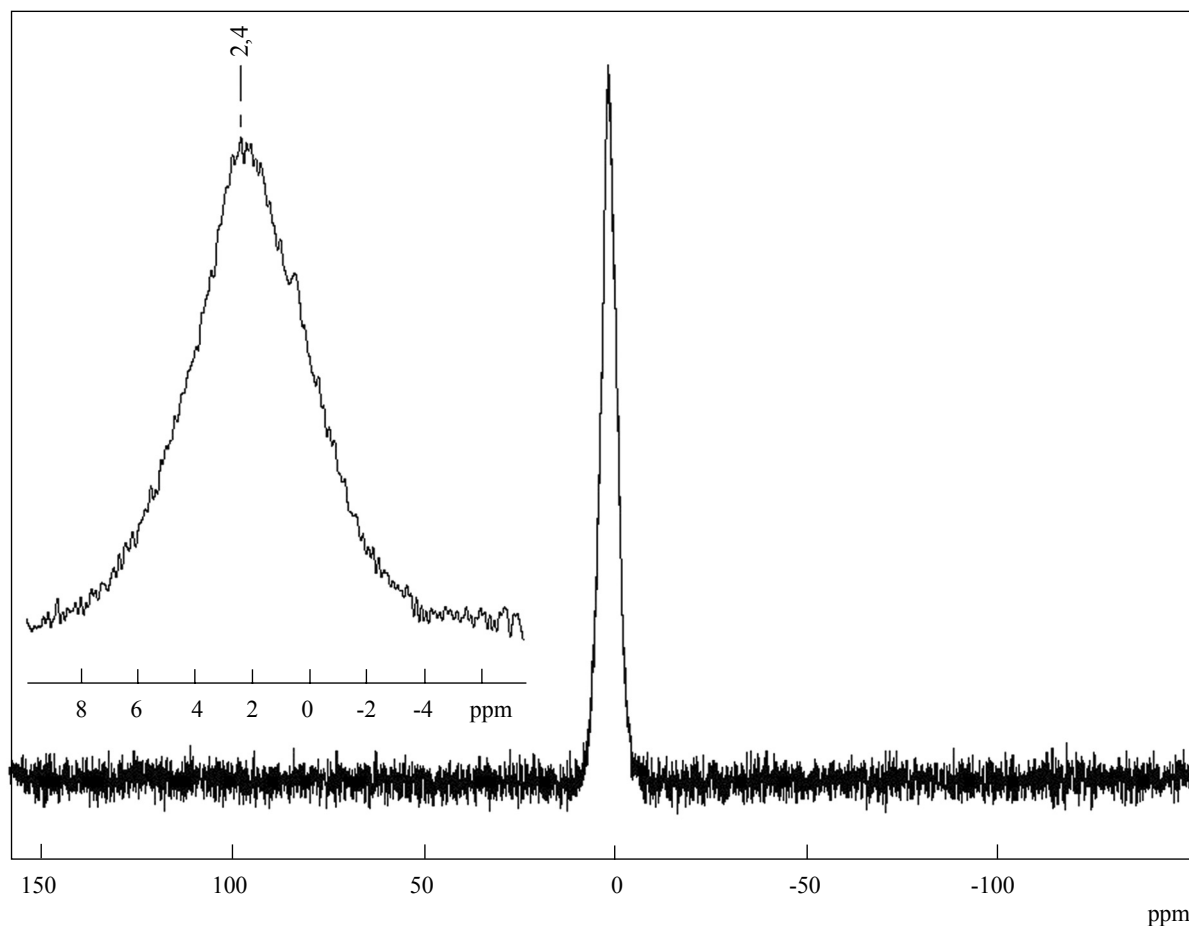
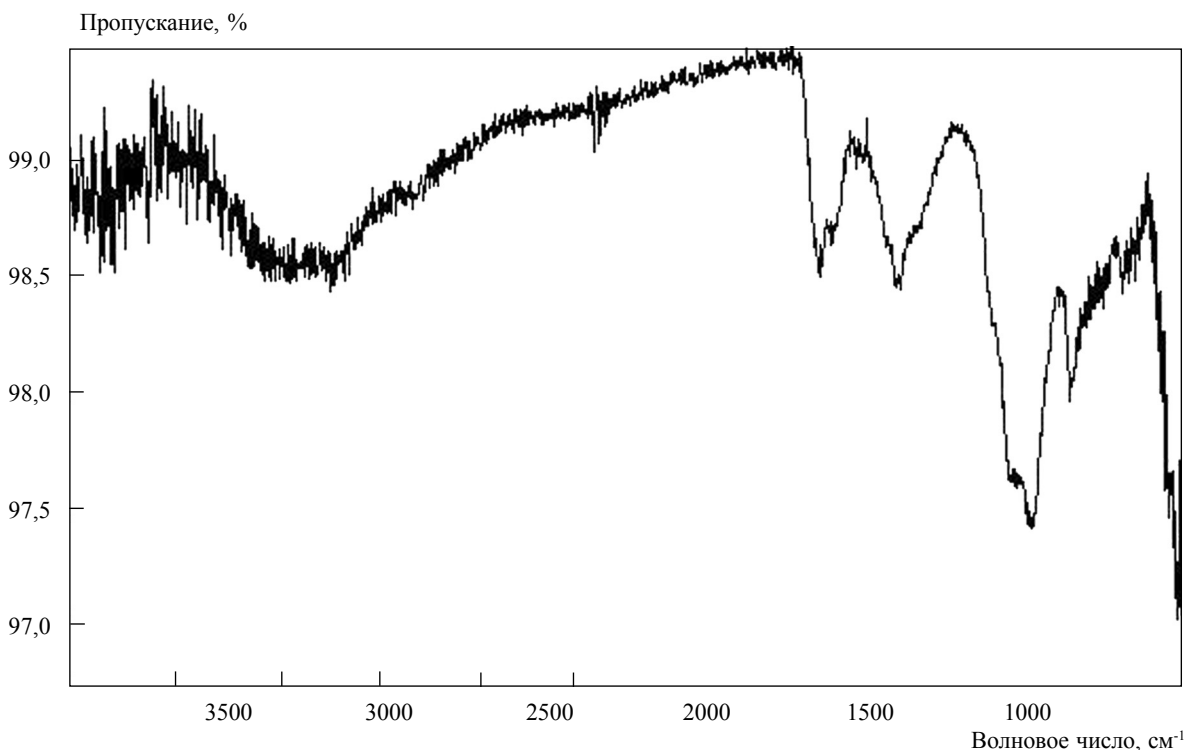


Рис. 4. ЯМР  $^{31}\text{P}$ -спектры гидрогелевой нанореакторной матрицы на основе гомополиакриламидного геля, обработанной растворами  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  с концентрацией 5,1% и 2,5%

кальцийфосфата  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , аморфного фосфата кальция, брушита (дикальциевого фосфата дигидрата  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), монетита (гидрофосфата кальция  $\text{CaHPO}_4$ ), гидроксилapatита  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , 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 гидроксилapatита ( $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$ ) довольно затруднительно. В процессе проведенных исследований были установлены закономерности, позволяющие осуществлять целенаправленное формирование ГА в гидрогелевой матрице. Так, было проде-

монстрировано, что снижение содержания сшитого полимера в гидрогеле (т. е. уменьшение отношения дисперсной фазы к дисперсионной среде) приводит к преимущественному образованию ГА. Это, вероятно, объясняется увеличением проницаемости пенетрантов через редкоститую и низкоконцентрированную полимерную сетку, свойственную мазеобразным пластичным гидрогелям. Образование в указанных матрицах нанокристаллического ГА подтверждается различными инструментальными методами, прежде всего рентгенофазовым анализом (рис. 2, кривая 2).

В то же время обращает на себя внимание тот факт, что когда обработку аммиаком на заключи-



**Рис. 5.** ИК-спектр гидрогелевой нанореакторной матрицы на основе гомополиакриламидного геля с инкорпорированными частицами гидроксиапатита

тельной 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 (рис. 1, кривая 3).

Превалирующее образование нанокристаллического ГА было обнаружено 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 продемонстрировано, что структура фосфатов кальция, формирующихся в гидрогелевой матрице, определяется концентрацией кальций-фосфатных прекурсоров, используемых в процессе обработки. Соответствующие продукты идентифицировали посредством сопоставления спектров ЯМР  $^{31}\text{P}$  с соответствующими дифрактограммами.

В случае насыщения гидрогелевой матрицы 12-процентным раствором  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и 5,8-процентным раствором  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  в ЯМР-спектре проявлялось четыре сигнала (химические сдвиги измерены относительно аммонийдигидрофосфата в качестве внешнего эталона) с химическими сдвигами  $\delta^{31}\text{P}$ : 0,4 (с наибольшей интенсивностью); 2,0; -1,2 и -2,5 м. д., относящиеся к брушиту, гидроксиапатиту, монетиту и ортофосфату кальция соответственно (рис. 3). По мере разбавления растворов для насыщения интенсивность сигналов, соответствующих брушиту, монетиту и ортофосфату кальция, монотонно уменьшается, а интенсивность сигнала гидроксиапатита ( $\delta = 2,2\text{--}2,4$  м. д.) увеличивается. Наконец, в случае использования растворов  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  с концентрацией, не превышающей соответственно 5,1% и 2,5%, в ЯМР-спектре присутствует лишь один сигнал (рис. 4) с химическим сдвигом, отвечающим гидроксиапатиту  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

Весьма информативной с точки зрения экспресс-диагностики формирующихся в гидрогелевых нанореакторах кальций-фосфатных фаз является ИК-спектроскопия. Необходимо отметить, что даже незначительные изменения локальной симметрии фосфат-аниона в зависимости от влияния 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  $\nu_{\text{as}}(\text{CH}) = 2930 \text{ см}^{-1}$  и меньшей интенсивности в области  $2850 \text{ см}^{-1}$ , а также  $2770 \text{ см}^{-1}$ . Последний из них, по-видимому, 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  $3189 \text{ см}^{-1}$  могут быть 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. 5), синтезированных в гидрогелях, наличие фосфатных анионов подтверждается появлением новой широкой интенсивной полосы поглощения с максимумами в интервале  $1060$  и  $990 \text{ см}^{-1}$  (дублет с преобладанием по интенсивности низкочастотной компоненты и наличием плеча  $1123 \text{ см}^{-1}$ , принадлежащий 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 можно заключить из сопоставления ИК-спектров минерализованной и неминерализованной гидрогелевой матрицы, в исходном гидрогеле указанные полосы отсутствуют.

## Заключение

Таким образом, проведенные исследования позволили сформулировать критерии оптимизации процесса инкорпорирования нанокристаллического гидроксиапатита в гидрогелевые матрицы на основе акриловых сополимеров с целью получения биосовместимых композитных имплантантов для протезирования костной ткани.

Полученные композитные материалы были охарактеризованы с использованием методов рентгеновской дифракции, электронной микроскопии, ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Сформулированы критерии, позволяющие достигать превалирующего формирования в гидрогелевой нанореакторной матрице именно наночастиц гидроксиапатита, представляющего наибольший интерес применительно к протезированию костной ткани.

Синтезовано нові композитні матеріали для протезування кісткової тканини на основі мінералізованих кополімерних гідрогелів акрилового ряду.

Розроблено методи синтезу, що забезпечують переважне формування у порах гідрогелів нанорозмірного стехіометричного гідроксиапатиту, та проведено його структурну ідентифікацію з використанням різноманітних спектральних методів.

**Ключові слова:** гідрогелі, нанореактори, гідроксиапатит, акриламід, ендопротезування

New nanocomposite materials for prosthetics of a bone tissue on the base of mineralized acrylic copolymer hydrogels were synthesized.

The methods of synthesis providing prevailing formation in a hydrogel pores of nanosized stoichiometric hydroxyapatite are developed and its structural identification with use of various spectral methods is accomplished.

**Key words:** hydrogels, nanoreactors, hydroxyapatite, acrylamide, endoprosthetics

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. — М.: Изд-во МГУ, 2003. — 227 с.
3. *Kim J., Lee T.* Thermo- and pH-Responsive Hydrogel-Coated Gold Nanoparticles // *Chem. Mater.* — 2004. — № 16. — P. 3647–3651.
4. *Путляев В.И.* Современные биокерамические материалы // *Соросовский образовательный журнал.* — 2004. — 8, № 1. — С. 44–50.
5. *Gertsyuk M., Samchenko Y.* Separation of Nonreacted Acrylamide from Polyacrylamide Gel for Endoprothesing // *Ars Separatoria Acta.* — 2007. — № 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, № 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, № 1. — P. 1–9.
8. *Самченко Ю.М., Пасмурцева Н.А., Ульберг З.Р.* Диффузия лекарственных препаратов из гидрогелевых нанореакторов // *Доповіді НАН України.* — 2007. — № 6. — С. 143–148.
9. *Samchenko Yu., Ulberg Z., Socolyuk A.* Synthetic hydrogels based on acrylic comonomers. // *Journal de Chimie Physique.* — 1996. — № 93. — P. 920–931.
10. *Состояние воды в мелкодисперсных гидрогелях на основе акриламида и акриловой кислоты / Самченко Ю.М., Атаманенко И.Д., Полторацкая Т.П., Ульберг З.Р.* // *Коллоидный журнал.* — 2006. — 68, № 5. — С. 670–673.
11. *Самченко Ю.М., Альтицулер М.А., Цирина В.В.* О сорбционных свойствах сополимерных гидрогелей акриловой кислоты // *Доповіді НАН України.* — 2003. — № 12. — С.136–140.
12. *Моделирование пористой структуры ситчастых полимеров / Кондратенко П.О., Самченко Ю.М., Пасмурцева Н.О., Ульберг З.Р.* // *Полимерный журнал.* — 2007. — 29, № 3. — С. 222–228.
13. *Шпак П.П., Карбовский В.Л., Трачевский В.В.* Апатиты. — К.: Академперіодика, 2002. — 414 с.
14. *Самченко Ю.М., Пасмурцева Н.А., Ульберг З.Р.* Гидрогелевые нанореакторы медицинского назначения // *Доповіді НАН України.* — 2007. — № 2. — С. 146–150.