

АПАТИТ – БІОПОЛІМЕРНІ МАТЕРІАЛИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦІЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

Л.Ф. Суходуб^{1*}, О. Мартинюк¹, Л.Б. Суходуб²

¹Сумський державний університет

вул. Римського-Корсакова, 2, Суми 40007, Україна

e-mail: l_sukhodub@yahoo.com

²ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечнікова»

вул. Пушкінська, 14/16, Харків 61057, Україна

У роботі описані синтез і механічні властивості новітніх композитних біоматеріалів третього покоління, які належать до другого структурного рівня організації кісткової тканини людини (КТЛ). Для отримання подібних композитів часто застосовується кістковий матеріал і біологічний колаген тваринного походження, які мають безперечно корисні властивості, але можуть викликати імунну реакцію відторгнення і є потенційно небезпечними у медичному застосуванні. Тому вченими проводяться інтенсивні дослідження із застосуванням інших біополімерів для отримання композитів, близьких до другого рівня структурної ієрархії КТЛ. У цьому сенсі природні полімери (альгінат натрію, хітозан) є найбільш перспективними, оскільки вони мають високу біосумісність щодо з'єднувальної тканини, низьку токсичність, можливість прискорювати регенеративні процеси під час лікування ран, здатність до деградації зі створенням хемотаксисної активності щодо фібробластів і остеобластів, а хітозан характеризується ще й бактеріостатичною активністю до багатьох аеробних і анаеробних бактерій. Формування нанорозмірних (25–75 нм) частинок гідроксиапатиту (ГА) у полімерному скеффолді наближає отримані матеріали до КТЛ, що, у свою чергу, сприяє їх більш ефективній імплантації. У роботі проведені дослідження фазового складу отриманих композитних зразків з використанням методу рентгенівської дифракції, їх механічних властивостей з використанням деформаційної установки МРК-1, а також ступеня набухання та пористості.

Ключові слова: гідроксиапатит, хітозан, натрію альгінат, композиційні матеріали, механічні властивості, пористість, набухання.

Кісткова тканина (КТ) людини являє собою складний композиційний матеріал з багаторівневою структурною організацією. Фібрили колагену мінералізовані ГА і відповідають другому рівню структурної організації КТ. У подібній структурі кристали ГА мають вигляд нанорозмірних пластин довжиною ~ 50 нм, шириною ~ 25 нм і товщиною ~ 2

нм. В організмі людини ГА, який є головним мінералом кісток, дентину й емалі зубів, як правило, відповідає так званому кальційдефіцитному ГА (кдГА) з карбонатною компонентою. Для синтетичного отримання композиту 2-го рівня вчені, як правило, використовують колаген тваринного походження, який є потенційно небезпечним для медичного застосування через ризик виникнення імунної реакції відторгнення. Желатина – продукт часткового гідролізу колагену – також має недолік для використання як полімерної складової апатитного композиту, а саме: надзвичайно висока швидкість резорбції, яка не відповідає швидкості остеогенезу. Тому в ряді лабораторій світу розпочато дослідження з використанням інших біополімерів для отримання композитів, структурно наближених до 2-го рівня організації КТ. Подібний підхід з використанням як природних (альгінат Na, хітозан), так і синтетичних (полівініловий спирт, акриламід) полімерів з одного боку і ГА та кдГА – з іншого і є предметом інтенсивних досліджень у лабораторії Сумського державного університету (СумДУ) «Біонанокompозит» з метою отримання новітніх біоматеріалів і покриттів для практичної наномедицини [1, 2, 6]. Подібні матеріали належать до третього покоління біоматеріалів, для яких характерні як остеокондуктивні (підтримка остеоутворюючих клітин), так і остеоіндуктивні (стимуляція остеосинтезу нової кістки *de novo*) властивості. Запропоновані природні полімери хітозан і альгінат натрію є найбільш перспективними. Вони мають високу біосумісність зі сполучною тканиною, низьку токсичність, здатність підсилювати регенеративні процеси при загоюванні ран, здатність біодеградувати з утворенням сполук, що мають хемотаксисну активність до фібробластів та остеобластів, а хітозан проявляє ще й бактеріостатичні властивості щодо більшості аеробних та анаеробних штамів мікроорганізмів. Оскільки оточуюче середовище живого організму є дуже реакційним [4, 7] і кісткові тканини перебувають під постійним навантаженням, то створення нових композиційних матеріалів і контроль їх механічних властивостей для відновлення кісткових тканин є необхідним та актуальним завданням.

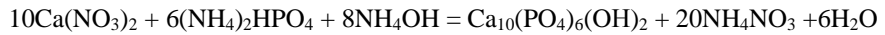
Метою даної роботи є дослідження фізико-механічних і структурних властивостей новітніх нанокompозитних матеріалів на основі біополімерів альгінату, хітозану та дрібнодисперсного гідроксіапатиту.

Матеріали та методи

Матеріали. Гідроксіапатит (лабораторія Біонанокompозит, СумДУ), хітозан М.39 кДа, ступінь деацетилювання 85% («Биопрогресс», Москва), натрію альгінат харчовий (Китай), полівініловий спирт, натрієва сіль карбоксиметилцелюлози харчова (Німеччина), оксид цирконію (“Sigma”).

Нанодисперсний гідроксіапатит (хімічна формула – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) синтезований шляхом осадження зі суміші водних розчинів солей нітратної та фосфорної кислот [3].

Реакцію синтезу проводили при температурі 80°C, значення рН=12 реакційної суміші досягали додаванням 25% водного розчину NH₄OH. Кількість реагентів було вибрано таким чином, щоб підтримати молярне співвідношення Ca:P рівним 1,67. Взаємодія між реагентами відбувається за реакцією:



Приготування композиційних матеріалів проводили шляхом змішування отриманого, висушеного при 37°C та подрібненого ГА з біополімером у співвідношенні 1:1 за масою. Як полімерну основу для композиційних матеріалів було запропоновано використати натрієву сіль карбоксиметилцелюлози (КМЦ) та полівінілового спирту (ПВС). Як армуюча добавка був використаний порошок ZrO₂. Отриману масу компактували в пластмасові циліндри довжиною ~ 11 мм і діаметром 4,5 мм та висушували при кімнатній температурі протягом доби.

Механічні вимірювання. Дослідження механічних властивостей (стиснення) проводили на деформаційній машині МРК-1, гвинтового типу, яка призначена для дослідження механічних властивостей матеріалів шляхом їх квазістатичного навантаження з постійною швидкістю з автоматичним записом діаграм. Опорні площини мають бути перпендикулярні до напрямку прикладеного навантаження при стисненні та паралельні між собою. Сутність методу полягає у визначенні межі міцності та модуля пружності (модуля Юнга) при стисненні як відношення приросту напруги до відповідного приросту відносної деформації стиснення. Перед випробуванням вимірювали розміри зразків. Зразки встановлювали на опорних плитах випробувальної машини так, щоб поздовжня вісь зразка збігалася з напрямом дії сили. Зразок навантажували за швидкості зближення плит випробувальної машини, що забезпечувало деформацію зразка.

Модуль пружності при стисненні (E) в МПа розраховували за формулою

$$E = \frac{(F_1 - F_2) \cdot h_0}{S \cdot (h_2 - h_1) \cdot \frac{v_{зв.}}{v_{стр.}}}$$

де F₁ – сила пружності, що відповідає навантаженню P₁ на діаграмі деформації, Н; F₂ – сила пружності, що відповідає навантаженню P₂ на діаграмі деформації, Н; h₀ – початкова висота зразка, мм; S – площа поперечного перерізу зразка, мм²; h₁ – зміна висоти зразка, що відповідає навантаженню P₁, мм; h₂ – зміна висоти зразка, що відповідає навантаженню P₂, мм; V_{гв.} – швидкість гвинта деформаційної машини, 0,25 мм/хв; V_{стр.} – швидкість стрічки самописця, 12 мм/хв.

Структурні дослідження. Структура отриманих зразків була визначена методом рентгенівської дифракції на автоматизованому дифрактометрі ДРОН-3 (НПП «Буревестник»,

Росія). Система автоматизації ДРОН заснована на мікропроцесорному контролері, який забезпечує управління гоніометром ГУР-8 та передачу даних у цифровому вигляді на ПК. При дослідженні використовували випромінювання $\text{CuK}\alpha$ (довжина хвилі 0,154 нм), фокус по Брегу-Брентано θ - 2θ (2θ – брегівський кут). Величини струму та напруги становили 20 мА та 40 кВ відповідно. Дослідження зразків проводили в режимі безперервної реєстрації (швидкість $4^\circ/\text{хв.}$), діапазон кутів 2θ від 10° до 60° . Результати експерименту передаються безпосередньо у програмний пакет підтримки експерименту DifWin-1 (ТОО «Эталон ПТЦ») для попередньої обробки. Ідентифікацію кристалічних фаз проводила за допомогою картотеки JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Пористість і набухання. Для визначення пористості отриманих композиційних матеріалів зразок масою m_0 поміщали в мірний циліндр, що містить відомий об'єм етанолу (V_1), і витримували протягом 30 хв. Об'єм етанолу з зануреним зразком відповідає V_2 . Потім зразок, у пори якого проник етанол, витягували з циліндра, зважували (m_1) і відзначали об'єм спирту, що залишився (V_3).

Пористість (Π) розраховували за формулою [5]:

$$\Pi = \frac{m_1 - m_0}{\rho_{\text{ет}} \cdot (V_2 - V_3)} \cdot 100\%$$

де $\rho_{\text{ет}}$ – густина етанолу.

Рівноважний ступінь набухання композиційних матеріалів вивчали ваговим методом. Для цього висушені зразки заливали надлишком дисперсійного середовища і ставили в термостат при заданій температурі. Через 24 год зразки діставали, фільтрувальним папером видаляли надлишок рідини з поверхні та зважували з точністю до четвертого знака на вагах.

Розрахунок рівноважного ступеня набухання Q проводили за формулою:

$$Q = \frac{m - m_0}{m_0}$$

де m_0 – маса сухого зразка, г; m – маса зразка, що набух до рівноважного стану, г.

Результати і їхнє обговорення

Фазовий аналіз, пористість, набухання. За допомогою методу рентгенівської дифракції був визначений фазовий склад отриманих композитів (рис. 1). Результати рентгеноструктурного аналізу показали, що основною фазою є дрібнодисперсний ГА (JCPDS 9-432). На рентгенограмах зразків ГА+полімер+ ZrO_2 присутній основний пік фази ZrO_2 (JCPDS 86-1450). Ці дані свідчать про відсутність хімічної взаємодії між наявними речовинами.

Оскільки біокомпозити у своєму складі мають органічні полімери, здатні адсорбувати рідину, були отримані дані щодо ступеня набухання та пористості досліджуваних зразків

(рис. 2). Набухання отриманих зразків відбувається за рахунок поглинання рідини полімером та пористості матеріалу. Виходячи з порівняння даних гістограми, можна сказати, що основну частку в ступінь набухання більшості отриманих зразків вносить полімерна складова, в той час як набухання зразків ПВС + ГА та Ch+ ГА+ZrO₂ більшою мірою відбувається за рахунок пористості, оскільки ступені набухання та пористості даних композитних матеріалів приблизно рівні. Серед усіх отриманих зразків найбільшим ступенем набухання характеризуються зразки Alg+Ch+ГА та Alg+Ch+ГА+ZrO₂; значення ступеня набухання в 4–5 разів перевищує значення пористості даних матеріалів. Також треба відмітити, що присутність оксиду цирконію знижує ступінь набухання отриманих зразків, водночас підвищуючи пористість даних композитних матеріалів.

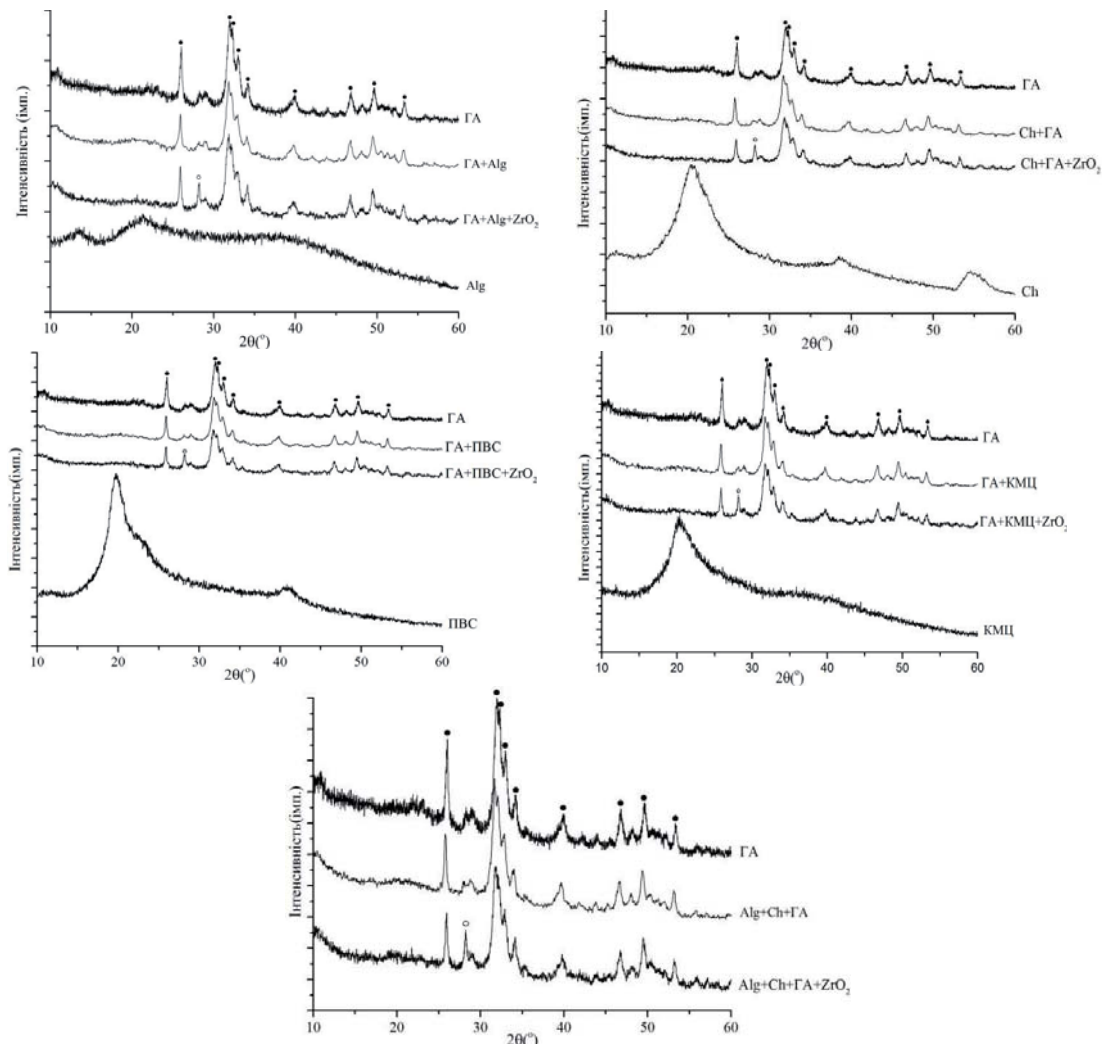


Рис. 1. Рентгенограми окремих компонентів і отриманих ГА-полімерних композиційних матеріалів: ● – головні піки ГА; ○ – головний пік ZrO₂.

Механічні властивості

Результати всіх вимірювань і обчислень визначення механічних властивостей отриманих апатит-полімерних композитів при випробуванні на стиск наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Механічні характеристики композиційних матеріалів

№ п/п	Зразок	Розміри, мм	Межа міцності σ , МПа	Модуль пружності E, МПа
1	Альгінат* + ГА**	4,39*10,89	2,69	220,1
2	Альгінат + ГА+5%ZrO ₂	4,32*10,71	1,76	40,85
3	Хітозан + ГА	4,27*10,76	4,05	252,6
4	Хітозан + ГА+5%ZrO ₂	4,27*10,58	4,79	156,47
5	КМЦ + ГА	4,30*11,18	3,11	67,91
6	КМЦ + ГА+5%ZrO ₂	4,33*11,16	3,49	138,7
7	ПВС + ГА	4,33*11,59	2,64	53,65
8	ПВС + ГА+5%ZrO ₂	4,24*10,62	2,99	56,22
9	(0,5 мас.ч.Альгінат +0,5 мас.ч.Хітозан)+ ГА	4,25*10,23	2,43	72,73
10	(0,5 мас.ч.Альгінат +0,5 мас.ч.Хітозан)+ ГА+5%ZrO ₂	4,26*10,72	2,81	150

Примітки.* – всі досліджені полімери були застосовані у формі водних розчинів з концентрацією 3мас.%; ** – ГА був застосований у формі висушеного при 37°C дрібнодисперсного порошку.

У результаті обчислень було з'ясовано, що найвищу межу міцності 4,05, 3,11, 4,79 та 3,49 МПа мають зразки Хітозан +ГА, КМЦ+ГА, Хітозан+ГА+5%ZrO₂ та КМЦ+ГА+5%ZrO₂ відповідно. Порівнюючи механічні властивості при випробуваннях на стиск, можна сказати, що максимальний модуль пружності 220,1, 252,6 та 156,47 мають зразки Альгінат+ГА, Хітозан 3%+ГА та Хітозан+ГА+5%ZrO₂ відповідно. Встановлено, що додавання оксиду цирконію до таких зразків як КМЦ+ГА+5%ZrO₂, ПВС+ГА+5%ZrO₂ та (0,5 мас.ч.Альгінат +0,5 мас.ч.Хітозан)+ГА+ 5%ZrO₂ підвищує значення модуля пружності й межі міцності даних матеріалів. На відміну від цього, у зразках Альгінат + ГА+5%ZrO₂ і Хітозан + ГА+5%ZrO₂ відбулося зниження механічних показників порівняно зі зразками без ZrO₂, що потребує додаткових досліджень.

На основі існуючих методик визначення механічних властивостей матеріалів методом стискання при силовому навантаженні одержані діаграми деформації досліджуваних зразків,

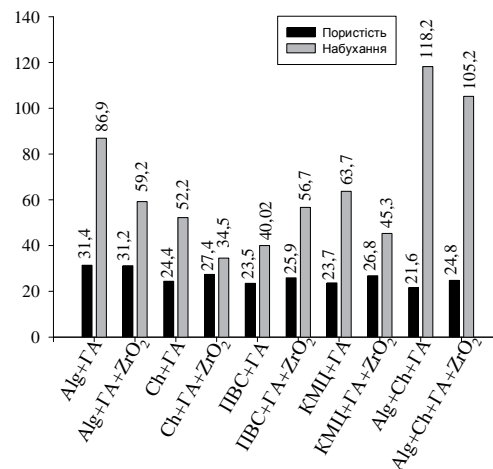


Рис. 2. Ступінь набування та пористість досліджуваних зразків.

за допомогою яких розраховані механічні властивості даних композиційних матеріалів, а саме межа міцності й модуль пружності, які характеризують напругу, що може витримати зразок, та його пружні властивості. Методом рентгенівської дифракції був визначений фазовий склад одержаних композитів. Отримано дані щодо набухання та пористості досліджених зразків. Визначено полімери, які вносять більший вклад у набухання композиційних матеріалів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Баринов С. М., Комлев В. С.* Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005. 187 с.
2. *Буланов Е. Н.* Получение и исследование наноструктурированных биосовместимых материалов на основе гидроксиапатита: электронное учебно-метод. пособие. Нижний Новгород: Нижегород. Гос. ун-тет, 2012. 103 с.
3. *Каназав Т.* Неорганические фосфатные материалы / пер. с англ.; под ред. акад. А.П. Шпака и В.Л. Карбовского. К.: Наукова думка, 1998. 297 с.
4. *Dorozhkin S. V.* Medical application of calcium orthophosphate bioceramics // *BIO*. 2011. Vol. 1. P. 1–51.
5. *Pramanik N., Mohapatra S., Bhargava P.* et al. Chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite-poly(ethylene co vinyl alcohol) (EVA) nanocomposite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications // *Mater . Sci. Eng. C*. 2009. Vol. 29. P. 228–236.
6. *Sukhodub L. F., Yanovska G. O., Sukhodub L. B.* et al. Nanocomposite apatite-biopolymer materials and coatings for biomedical applications // *J. Nano-Electr. Physics*. 2014. Vol. 6. N 1. P. 1-16.
7. *Webster T. J., Ergun C., Dpremus R. H.* et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics // *J. Biomed. Mater. Res*. 2000. Vol. 51. P. 475–483.

Стаття: надійшла до редакції 12.05.14

доопрацьована 23.09.14

прийнята до друку 24.09.14

APATITE - BIOPOLYMER MATERIALS FOR BONE REGENERATION

L. Sukhodub¹, O. Martynyuk¹, L. Sukhodub²

¹*Sumy State University*

2, Rymskyi-Korsakov St., Sumy 40007, Ukraine

e-mail: l_sukhodub@yahoo.com

²*SE "I.I.Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology"*

14/16, Pushkinska St., Kharkiv 61057, Ukraine

The work describes the synthesis and mechanical properties of novel composite biomaterials third generation, which relate to the second structural levels of organization of the bone tissue (BT). For more similar composites often applied bone material and biological collagen is of animal origin, which are undoubtedly beneficial properties, but can cause immune reactions of rejection and is potentially dangerous in medical application. So the scientists conducted intensive research on the use of other biopolymers for composites, close to the second level of the structural hierarchy of BT. In this sense, natural polymers (sodium alginate, Chitosan) is the most promising because they have a high biocompatibility, low toxicity, the ability to accelerate regeneration during the treatment of wounds, ability to degradation with the creation of chemotaxis activity in relation to the fibroblasts and osteoblasts. Chitosan is characterized by a bacteriostatic activity against many of aerobic and anaerobic bacteria. Formation of nanosized (25–75 nm) hydroxyapatite (HA) particles in polymer scaffolds links obtained materials to BT, which, in turn, promotes their more efficient implantation. In the work was studied the phase composition of composites, using the method of x-ray diffraction, mechanical properties, using deformation device MPK-1, as well the degree of swelling and porosity.

Keywords: hydroxyapatite, Chitosan, sodium alginate, composites, mechanical properties, porosity, swelling.

АПАТИТ - БИОПОЛИМЕРНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Л.Ф. Суходуб¹, А.А. Мартынюк¹, Л.Б. Суходуб²

¹*Сумской государственной университет*

ул. Римского-Корсакова, 2, Сумы 40007, Украина

e-mail: l_sukhodub@yahoo.com

²*ДУ «Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова»*

ул. Пушкинская, 14/16, Харьков 61057, Украина

В работе описаны синтез и механические свойства новых композитных биоматериалов третьего поколения, которые относятся ко второму структурному уровню организации

костной ткани человека (КТЧ). Для получения подобных композитов часто применяются костный материал и биологический коллаген животного происхождения, имеют безусловно полезные свойства, но могут вызвать иммунную реакцию отторжения и являются потенциально опасными в медицинском применении. Поэтому учеными проводятся интенсивные исследования с применением других биополимеров для получения композитов, близких ко второму уровню структурной иерархии КТЧ. В этом смысле природные полимеры (альгинат натрия, хитозан) являются наиболее перспективными, поскольку они имеют высокую биосовместимость по отношению к соединительной ткани, низкую токсичность, возможность ускорять регенеративные процессы при лечении ран, способность к деградации с созданием хемотаксисной активности по отношению к фибробластам и остеобластам, а хитозан характеризуется еще и бактериостатической активностью в отношении многих аэробных и анаэробных бактерий. Формирование наноразмерных (25–75 нм) частиц гидроксиапатита (ГА) в полимерном скелетте приближает полученные материалы к КТЧ, что, в свою очередь, способствует их более эффективной имплантации. В работе проведены исследования фазового состава полученных композитных образцов с использованием метода рентгеновской дифракции, их механических свойств с использованием деформационной установки МРК-1, а также степени набухания и пористости.

Ключевые слова: гидроксиапатит, хитозан, натрия альгинат, композиционные материалы, механические свойства, пористость, набухание.

УДК 577.359/57.043:57.053:57.042

ВПЛИВ ЕЛЕКТРОМАГНІТНОГО ПОЛЯ ЧАСТОТОЮ 8 ГЦ НА ВИКЛИКАНІ K^+ -ДЕПОЛЯРИЗАЦІЄЮ СКОРОЧЕННЯ ГЛАДЕНЬКИХ М'ЯЗІВ

М. Мельник^{*}, В. Мартинюк, О. Артеменко

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

вул. Володимирська, 64/13, Київ 01601, Україна

e-mail: gribovamari@gmail.com

Вивчали вплив електромагнітного поля частотою 8 Гц та індукцією 25 мкТл на викликані K^+ -деполяризацією скорочення гладеньких м'язів та зміну внутрішньоклітинної концентрації кальцію в гладеньком'язових клітинах шлунка щурів. Електромагнітне поле пригнічувало спайкову компоненту викликаних K^+ -деполяризацією скорочень смужок гладеньких м'язів з часозалежним характером, тоді як на тонічну компоненту суттєво не