Журнал прикладной химии. 2015. Т. 88. Вып. 4

ПОЛУЧЕННЫЕ in situ БИОАКТИВНЫЕ КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ И ОЛИГОМЕРОВ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

© Л. А. Рассказова, Д. Н. Лыткина, Е. Г. Шаповалова, В. В. Ботвин, М. А. Поздняков, А. Г. Филимошкин, Н. М. Коротченко, В. В. Козик

Национальный исследовательский Томский государственный университет E-mail: ly 2207@mail.ru

Поступило в Редакцию 8 сентября 2014 г.

Получены in situ композиты на основе олигомеров молочной кислоты, гидрофосфата кальция и гидроксиапатита, синтезированного под воздействием микроволнового излучения. Появление новой полосы валентных колебаний >C=O в ИК спектрах нерастворимой в хлороформе фракции свидетельствует о химическом взаимодействии молочной кислоты с гидроксиапатитом. Для установления возможности формирования кальций-фосфатного слоя на поверхности образцов композитов проведены биомиметические исследования в течение 28 сут при 37°C в физиологическом SBF растворе. Установлено, что все образцы, содержащие фосфаты кальция, способствуют активному формированию нового кальций-фосфатного слоя, в то время как олигомер молочной кислоты в образцах, не содержащих неорганическую составляющую, в результате гидролиза подвергается деструкции в SBF растворе. Оценка скорости резорбции показала, что растворимость фосфатов кальция в составе композитов при 20°C в физиологическом растворе в 3–7 раз выше растворимости чистого гидроксиапатита.

Поиск оптимальных материалов для имплантатов [1-4], разработка и создание различных медицинских биокомпозитов на основе фосфатов кальция (ФК) [5-7], полимеров и олигомеров молочной кислоты (ОМК) являются перспективными направлениями исследований на стыке химии и медицины. Имплантаты на основе таких биокомпозитов, механические и другие важные свойства которых сопоставимы со свойствами кости, обладают достаточной прочностью и не вызывают отрицательных реакций иммунной системы организма. Способность к биодеградации в течение времени, оптимального для восстановления костного дефекта, и отсутствие у продуктов распада нежелательной биологической активности являются обязательными требованиями к таким материалам [8, 9].

Проблема разработки способов улучшения прочностных, биохимических и других важных свойств композитов на основе ФК включает три основные задачи: 1) получение композитов на основе компонентов, которые способны связывать ФК и упрочнять материал; 2) поиск оптимального соотношения выбранных компонентов; 3) изучение физико-химических взаимодействий компонентов с целью управления функциональными свойствами материалов. Работы в этом направлении ведутся учеными РФ и других стран на протяжении нескольких десятилетий [10–16].

Важным принципом при создании биоматериалов для имплантации является воспроизведение основных характеристик натуральной костной ткани, потому что именно уникальное строение кости (химический состав, морфология и структура) оказывает сильное влияние на процессы регенерации. Из-за низкой растворимости синтетического гидроксиапатита Ca₅(PO₄)₃OH (ГА) происходит нарастание новой костной ткани на поверхности имплантата, в то время как его материал еще не растворился, что зачастую приводит к необходимости проведения повторной операции. Таким образом, существует необходимость создания материала с оптимальным временем растворения в организме, причем скорость роста новой костной ткани должна соответствовать скорости растворения имплантируемого материала (резорбции) [17]. Способность материалов формировать на своей поверхности кальций-фосфатный слой из модельного SBF раствора (Simulated Body Fluid), имитирующего

УДК 546.41/547-326

минеральный состав плазмы крови человека, оценивается по методике, предложенной Kokubo [18].

В настоящей работе в качестве ФК использована смесь гидроксиапатита Са₅(РО₄)₃ОН, являющегося основным компонентом костной ткани, и гидрофосфата кальция СаНРО₄, повышающего резорбируемость материалов на его основе. Фосфатам кальция в композитах отволится роль активного источника необходимых элементов для построения костной ткани, они также способствуют повышению прочности материалов. Композиты, содержащие ФК (биоактивная составляющая) и ОМК (связующий компонент), рассматриваются как исходные материалы для получения имплантатов на основе полимолочной кислоты (ПМК). Известно, что материалы на основе ПМК по механическим свойствам близки к свойствам кости и не вызывают ее разрушений при циклических динамических нагрузках [1, 2]. Оптимальное время резорбции, контролируемая скорость деградации полимерной матрицы и отсутствие у продуктов распада негативной биологической активности являются непременными свойствами полимеров молочной кислоты, что обусловливает их востребованность в качестве полимерной составляющей биодеградируемых имплантатов [3, 4].

Целью работы является синтез in situ биологически активных композитов как материалов для изготовления костных имплантатов на основе фосфатов кальция и олигомеров молочной кислоты, а также оценка их способности формировать на поверхности кальций-фосфатный слой в модельном SBF растворе.

Экспериментальная часть

Олигомеры молочной кислоты получали поликонденсацией молочной кислоты в инертной атмосфере:

$$x \operatorname{HO}-\operatorname{CH}-\operatorname{C} \xrightarrow{\operatorname{CH}_{3}} \operatorname{O} \xrightarrow{\operatorname{CH}_{3}} \operatorname{H} \xrightarrow{\operatorname{O}} \operatorname{CH} \xrightarrow{\operatorname{CH}_{3}} \operatorname{O} \xrightarrow{\operatorname{O}} \operatorname{OH} + (x-1) \operatorname{H}_{2} \operatorname{O}$$
(1)

Для синтеза ОМК использовали 80%-ный водный раствор *L*-молочной кислоты (PURAC, марка х.ч.). Для варьирования молекулярной массы (MM) и степени полидисперсности олигомеров синтез проводили как в присутствии *n*-толуолсульфокислоты (*n*-TCK)

в качестве катализатора, так и без катализатора. Первый этап получения композитов ФК/ОМК включает приготовление водной суспензии ГА при pH ~ 10 с использованием СВЧ излучения [19, 20] согласно уравнению

$$5Ca(NO_3)_2 + 3(NH_4)_2HPO_4 + 4NH_4OH \rightarrow Ca_5(PO_4)_3OH + 10NH_4NO_3 + 3H_2O.$$
 (2)

Для приготовления исходных растворов использовали реактивы марки х.ч.: кальций азотнокислый четырехводный, аммоний фосфорнокислый двузамещенный, водный раствор аммиака (ρ = 0.907 г⋅мл⁻¹) и свободную от углекислого газа дистиллированную воду. Свежеприготовленные растворы смешивали и подвергали микроволновому воздействию в течение 40 мин. После 48-часового отстаивания осадок ГА отфильтровывали на воронке Бюхнера, промывали дистиллированной водой до pH ~ 7 и сушили при 100°С до постоянной массы.

На втором этапе получения композитов высушенный ГА добавляли к раствору молочной кислоты, в котором предварительно растворяли *n*-TCK. Поликонденсация молочной кислоты проходила в колбе роторного испарителя в течение 5 ч с одновременным образованием композита (in situ).

Молекулярные массы ОМК определяли методом гельпроникающей хроматографии (ГПХ) на приборе фирмы GPC Agilent System 1100, снабженном детектором UV-Detektor (230 нм) DAD Agilent 1100, с использованием серии полимерных колонок PSS SDV с размером пор от 50 до 10⁵ Å. В качестве элюента использовали тетрагидрофуран (ТГФ) со скоростью потока 1 мл·мин⁻¹ при 35°С; олигомер растворяли в течение 3 ч. Калибровочная линия установлена с помощью полистирольных стандартов с MM от 162 до 246 000 г моль⁻¹. Пробу олигомера концентрацией 3 г мл⁻¹ очищали, пропуская через фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Рентгенофазовый анализ (РФА) ГА и композитов выполняли на дифрактометре Shimadzu XRD 6000 с излучением Cu_{K_a} = 1.5406 Å в интервале 20–140° (20). Фазы идентифицировали с помощью базы данных PCPDF WIN–1.3.

Для подтверждения взаимодействия ГА с молочной кислотой, происходящего в процессе поликонденсации, образцы композитов подвергали экстрагированию хлороформом в аппарате Сокслета. Часть композита, оставшегося в бумажном патроне, выдерживали в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 до полного удаления воды и CHCl₃. ИК спектры образцов, полученных до и после экстракции в аппарате Сокслета, в виде порошков регистрировали на ИК спектрометре Nicolet 5700 с приставкой НПВО с Ge-кристаллом в диапазоне 4000–500 см⁻¹.

Для оценки интегральной растворимости фосфатов кальция в составе композитов определяли суммарную концентрацию ионов кальция Ca²⁺ в насыщенном физиологическом растворе (NaCl, 0.9%) при 20°C (трилонометрическое титрование в присутствии эриохрома черного T с аммиачным буферным раствором) [21].

Биологическую активность образцов как способность формировать на их поверхности кальций-фосфатный слой в модельном SBF растворе оценивали по методике [18]. Изготовленные прессованием подложки в виде таблеток диаметром 5 мм помещали в SBF раствор, который по минеральному составу и концентрации ионов идентичен плазме крови человека (табл. 1).

Подложки выдерживали в SBF растворе при 37°С в течение 28 сут с ежедневным обновлением раствора. Так как селективное определение ионов Ca²⁺ методом трилонометрического титрования [22] в присутствии ионов Mg²⁺ затруднительно (константы устойчивости комплексов кальция и магния с ЭДТА близки — lgK = 10.7 для CaY²⁻ и lgK = 8.7 для MgY²⁻) [23]), то скорость формирования кальций-фосфатного слоя на поверхности подложек оценивали по уменьшению суммарной концентрации ионов кальция и магния

 $\Delta_{Ca^{2+} \text{ и Mg}^{2+}}$, ммоль·л⁻¹) в SBF растворе [24], считая концентрацию ионов магния фиксированной. Морфологию поверхности подложек со сформированным кальций-фосфатным слоем наблюдали с применением сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе Hitachi TM-3000 при ускоряющем напряжении 15 кВ в условиях режима снятия зарядки с образца (электронная пушка: 5·10⁻² Па; камера для образца: 30–50 Па).

Обсуждение результатов

Среднемассовая степень полимеризации $\overline{X_w}$ образцов ОМК, полученных методом поликонденсации в отсутствие катализатора, достигает 20 при степени полидисперсности $\overline{X_w} / \overline{X_n} \approx 2$ ($\overline{X_n}$ — среднечисленная степень полимеризации). С целью увеличения $\overline{X_w}$ реакцию проводили в присутствии *n*-TCK. О влиянии катализатора и его количества на среднемассовую ММ $\overline{M_w}$ и полидисперсность продуктов судили по данным, приведенным в табл. 2. С повышением содержания катализатора $\overline{M_w}$ олигомеров увеличивается. Известно, что при уменьшении среднемассовой ММ и повышении степени полидисперсности физико-механические свойства полимеров, как правило, ухудшаются.

По результатам ГПХ оптимальное количество катализатора составляет 2 мас% *n*-TCK. Использование олигомеров с большей ММ и меньшей степенью полидисперсности должно привести к улучшению механических свойств композитов и положительно сказаться на биодеградации олигомерной матрицы [25].

Состав и условные обозначения композитов, полученных in situ с различным содержанием ФК и ОМК, представлены ниже:

Образец	Композит	Композит	Композит
	А	Б	В
ФК/ОМК,	25/75	50/50	75/25
мас%			

	· 1 ·		1	1	1			
Creare	Концентрация, ммоль-л-1							
Среда	Na ⁺	K^+	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl-	HCO ₃ -	HPO4 ²⁻	SO4 ²⁻
SBF раствор	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0.5
Плазма крови человека	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5

Таблица 1

Концентрация ионов в SBF растворе и плазме крови человека



Основной фазой композитов А и Б по результатам рентгенофазового анализа является гидрофосфат кальция, композит В содержит две фазы — гидроксиапатит Ca₅(PO₄)₃OH и CaHPO₄. В качестве примера на рис. 1 приведены рентгенограммы композитов Б и В.

В ИК спектрах ОМК (рис. 2) присутствуют полосы, относящиеся к валентным колебаниям карбонильных групп v(> C = O) (1730–1750 см⁻¹) и v(C–H) в метильных группах (2990–2880 см⁻¹); в области 1100– 1400 см⁻¹ присутствуют полосы, соответствующие деформационным колебаниям δ (C–H) в метиновых группах. В ИК спектрах композитов регистрируются полосы, характерные как для фосфатов кальция — валентные (1085–960 см⁻¹) и деформационные (560–605 см⁻¹) колебания фосфатных групп v(PO₄³⁻, HPO₄²⁻), δ (PO₄³⁻, HPO₄²⁻), так и полосы, характерные для ОМК. В области 1630–1580 см⁻¹ появляются новые интенсивные полосы, относящиеся к колебаниям групп –СОО⁻, которые появляются в результате взаи-

Таблица 2

Значения $\overline{M_{w}}$, $\overline{X_{w}}$ и $\overline{X_{w}}$ / $\overline{X_{n}}$ олигомеров молочной кислоты при разном содержании катализатора в реакционной смеси

Содержание <i>n</i> -ТСК в ОМК, мас%	$\overline{M_{\mathrm{w}}}$	$\overline{X_{\mathrm{w}}}$	$\overline{X_{\mathrm{w}}} / \overline{X_{\mathrm{ff}}}$
Без катализатора	1200	20	2.09
0.5	11000	150	1.89
1.0	14000	200	1.89
2.0	14000	200	1.66
5.0	15500	215	1.85

модействия ГА с молочной кислотой с образованием гидрофосфата кальция:

$$Ca_{5}(PO_{4})_{3}OH + 4HO - CH - CH - C \rightarrow 2 \left(HO - CH - C - C - O\right)_{2}Ca + 3CaHPO_{4} + 2H_{2}O. \quad (3)$$

Значения интегральной концентрации Ca²⁺ (ммоль·л⁻¹) в физиологическом растворе, насыщен-

ном ионами кальция в результате длительного (в течение 7 сут) выдерживания в нем ГА и композитов 500 v

Рис. 2. ИК спектры чистых ОМК, ГА и композитов А–В. ν — волновое число (см⁻¹).

1500

ΓА

OMK

3000

COO

(табл. 2), позволяют судить об ожидаемой резорбируемости композитов в среде организма. Интегральная растворимость фосфатов кальция в составе композитов A–B (pH 7, I = 0.15, T = 20°C, P = 0.95) приведена ниже:

Образец*	<i>с</i> _{Ca} 2+, ммоль∙л ⁻¹
А	4.72 ± 0.06
Б	3.39 ± 0.06
В	7.09 ± 0.07

* Для сравнения: растворимость ГА, определенная при тех же условиях, составляет 0.97 ± 0.01 ммоль $\cdot n^{-1}$.

Видно, что растворимость фосфатов кальция в составе композитов в 3–7 раз выше растворимости чистого ГА. Такие изменения растворимости должны способствовать увеличению скорости резорбции биоматериала.

По результатам измерений суммарной концентрации ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ в растворе строили кинетические кривые $\Delta c_{Ca^{2+} + Mg^{2+}}$ (ммоль·л⁻¹) — τ (сут) их накопления на поверхностях подложек из SBF раствора (рис. 3).

Анализ кинетических кривых показывает, что на поверхности чистого ГА (рис. 3, кривая I) происходит активная адсорбция ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ из SBF рас-



Рис. 3. Кинетические кривые накопления ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} на поверхностях ГА (1), ОМК (2) и композита B (3) из SBF раствора.

 $c_{Ca^{2+}+Mg^{2+}}$ — изменение суммарной концентрации ионов (ммоль·л⁻¹), τ — время (сут).

твора в течение всего времени выдерживания подложек в растворе. Заметная убыль ионов кальция с поверхности композита В (рис. 3, кривая 3) в первые 48 ч выдерживания подложек в растворе обусловлена относительно высокой растворимостью гидрофосфата кальция СаНРО₄, входящего в состав композита. Начиная со вторых суток происходит адсорбция ионов кальция из раствора на поверхности подложек композита В, что связано с наличием фазы ГА в составе композита. Скорость процесса формирования кальций-фосфатного слоя на поверхности чистого ГА выше, чем на поверхности композита В, о чем свидетельствует большее значение угла наклона зависимости *1*. На поверхности чистого ОМК (рис. 3, кривая 2) происходят незначительные процессы адсорбции-десорбции ионов кальция из SBF раствора, о чем свидетельствуют небольшие изменения концентрации ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ в растворе.

Данные СЭМ (рис. 4) наглядно подтверждают результаты биомиметических исследований и свидетельствуют как о формировании кальций-фосфатных слоев на подложках ГА и композита В (рис. 4, *1* и *2*) уже через 7 сут выдерживания их в SBF растворе, так и об отсутствии формирования кальций-фосфатного слоя на чистой полимерной подложке (рис. 4, *3*).

Формирование кальций-фосфатного слоя на поверхности подложек происходит согласно механизму, предложенному в работе [26]. Содержащая гидроксильные группы поверхность подложек, несущая частичный отрицательный заряд, притягивает ионы Са²⁺ из раствора с одновременной их адсорбцией на поверхности и постепенной сменой заряда поверх-

100 мкм

Рис. 4. Электронные микрофотографии поверхности подложек.

Увеличение 3000.

Динамика роста кальций-фосфатного слоя на поверхности: 1 — гидроксиапатита, 2 — композита *B*, 3 — олигомера молочной кислоты.

ности на частичный положительный. Процесс завершается присоединением PO₄^{3–}-ионов. В результате таких последовательно-параллельных событий на поверхности образуются слои из малорастворимых фосфатов кальция. Таким образом, сниженное относительно чистого ГА содержание OH[–]-групп в составе композита В приводит к понижению общей скорости адсорбции ионов кальция и магния из SBF раствора на поверхности композита.

Выводы

1. Получены биологически активные композиты на основе фосфатов кальция и олигомеров молочной кислоты методом in situ. Состав и структура композитов подтверждены методами ИК спектроскопии и РФА. Композиты образуются в результате взаимодействия гидроксиапатита с олигомерами молочной кислоты.

2. Установлено влияние катализатора на молекулярную массу и степень полидисперсности олигомеров молочной кислоты. Оптимальное соотношение молекулярной массы и степени полидисперсности олигомеров молочной кислоты найдено при содержании катализатора 2 мас%. 3. Интегральная растворимость в физиологическом растворе фосфатов кальция в составе композитов в несколько раз превышает растворимость синтетического гидроксиапатита, что дает основание ожидать повышения резорбируемости таких композитов в организме.

4. Установлено, что в SBF растворе на поверхности образцов, содержащих фосфаты кальция, активно формируется кальций-фосфатный слой (28 сут, 37°С), в то время как чистый олигомер молочной кислоты только деструктирует в результате гидролиза.

Список литературы

- [1] Севастьянов В. И., Кирпичников М. П. Биосовместимые материалы. М.: МИА, 2011. 569 с.
- [2] Дженкинс М. Полимеры в биологии и медицине / Пер. с англ. под ред. О.И. Киселевой. М.: Науч. мир, 2011. 256 с. (Jenkins M. Biomedical Polymers. Elsevier Science & Technology, 2007).
- [3] Хэнч Л., Джонс Р. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Пер. с англ. под ред. Ю. Цвирко, А. Лушниковой. М.: Техносфера, 2007. 304 с. (*Hench L., Jones J.* Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering. Woodhead Publishing, 2005).

- [4] Фомин А. С., Комлев В. С., Баринов С. М. // Перспектив. материалы. 2006. № 2. С. 51–54.
- [5] Баринов С. М., Комлев В. С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005. 204 с.
- [6] Путляев В. И. // Соросовский образоват. журн. 2004. Т. 8. № 1. С. 44–50.
- [7] Ben-Nissan B. Advances in Calcium Phosphate Biomaterials. Spinger, 2014. 547 p.
- [8] Штильман М. И. Полимеры медико-биологического назначения. М.: ИКЦ «Академкнига», 2006. 400 с.
- [9] Bartolo P., Kruth J., Silva J. et al. // CIRP Annals Manufacturing Technol. 2012. N 61. P. 635–655.
- [10] Kasuga T., Ota Y. // Biomaterials. 2001. N 22. P. 19– 23.
- [11] Yu Q., Qin Y. // eXPRESS Polym. Lett. 2013. N 1. P. 55– 62.
- [12] Petricca S., Marra K., Kumta P. // Acta Biomaterialia. 2006. N 2. P. 277–286.
- [13] Sun F., Zhou H. // Acta Biomaterialia. 2011. N 7. P. 3813– 3828.
- [14] Yang C., Yi L., Cui Yi. et al. // Acta Biomaterialia. 2009. N 5. P. 2680–2692.
- [15] Fujii S., Miyanari Y., Nishimura T. et al. // Polym. Degrad. a. Stab. 2013. N 98. P. 377–386.
- [16] Diao H., Si Y., Zhu A. et al. // Material Sci. a. Eng. C. 2012. N 32. P. 1796–1801.

- [17] Пат. РФ 2429885 (опубл. 2011). Композиционный материал на основе гидроксиапатита и карбоната кальция для заполнения костных дефектов при реконструктивно-пластических операциях.
- [18] Kokubo T., Takadama H. // Biomaterials. 2006. N 27. P. 2907–2915.
- [19] Рассказова Л. А., Коротченко Н. М., Зеер Г. М. // ЖПХ. 2013. Т. 86. № 5. С. 744–748 (Rasskazova L., Korotchenko N., Zeer G. // Russ. J. Appl. Chem. 2013. V. 86. N 5. Р. 691–695).
- [20] Пат. РФ 2507151 (опубл. 2014). Способ получения кремниймодифицированного гидроксиапатита с использованием СВЧ-излучения.
- [21] Шварценбах Г., Флашка Г. Комплексонометрическое титрование. М.: Химия, 1970. 360 с.
- [22] Шарло Г. Методы аналитической химии. Количественный анализ неорганических соединений. М.: Химия, 1966. 976 с.
- [23] *Лурье Ю. Ю.* Справочник по аналитической химии. М.: Альянс, 2007. 447 с.
- [24] Сурменева М. А., Сурменев Р. А., Пичугин В. Ф.и др. // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2011. № 12. С. 81–87.
- [25] Биосовместимость / Под ред. В.И. Севастьянова. М.: ИЦ ВНИИгеосистем, 1999. 368 с.
- [26] Ohtsuki C, Aoki Y, Kokubo T. et al. // J Ceram Soc Japan. 1995. N 103. P. 449–454.