

PACS numbers: 81.20.Fw, 82.33.Fg, 82.35.Jk, 82.70.Gg, 82.80.-d, 83.80.Kn, 87.68.+z

Гидрогелевые нанореакторы для формирования гидроксипатита

Ю. М. Самченко, Л. Ф. Суходуб*, С. Н. Данильченко*, Л. И. Береза,
З. Р. Ульберг, Л. Б. Суходуб**, А. Г. Шостенко***

*Институт биокolloидной химии им. Ф. Д. Овчаренко НАН Украины,
бульв. Акад. Вернадского, 42,
03142 Киев, Украина*

**Институт прикладной физики НАН Украины,
ул. Петропавловская, 58,
40030 Сумы, Украина*

***Институт микробиологии и иммунологии АМН Украины,
ул. Пушкинская, 14,
61057 Харьков, Украина*

****Университет Николая Коперника,
ул. Гагарина, 7,
87-100 Торунь, Польша*

На основе сополимеров акрилового ряда получены гидрогелевые нанореакторы для формирования и стабилизации наноразмерных частиц гидроксипатита, которые могут применяться в медицине в качестве заменителя костной ткани.

На основі гідрогельових кополімерів акрилового ряду одержано гідрогельові нанореактори для формування і стабілізації нанорозмірних частинок гідроксипатиту, що можуть використовуватися у медицині в якості замітника кісткової тканини.

Hydrogel nanoreactors based on the acrylic-copolymers' series are synthesized for formation and stabilization of hydroxyapatite nanoparticles, which can be used in a medicine as bone-tissue substitute.

Ключевые слова: нанореакторы, гидрогели, гидроксипатит, акриламид, ткань костная.

(Получено 5 сентября 2006 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Синтезу и характеристики наноразмерных частиц металлов и композитов на их основе в последнее время уделяется значительное внимание исследователей [1, 2], что обусловлено, прежде всего, их уникальными каталитическими, оптическими, магнитными и электрическими характеристиками [3, 4]. Полимерные матрицы являются одними из наиболее перспективных сред для формирования и стабилизации наноразмерных благородных металлов [5, 6]. Ранее мы уже сообщали о получении на основе акриловых мономеров гидрогелевых нанореакторов, позволяющих синтезировать в их межпоровом пространстве наночастицы серебра и магнетита [7, 8]. Гидрогелевые нанореакторы могут синтезировать в различных консистентных состояниях, а именно, в виде монолитных пленок, пластин, блоков и трубок с различной геометрией, в виде пластичной мазеобразной массы, а также в виде высокодисперсных порошков с диаметром около 0,05 мкм. Синтезированные гидрогели 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.

Размер порового пространства в гидрогелях был охарактеризован с использованием различных экспериментальных и теоретических методов, а именно, исходя из сорбции и десорбции паров воды, депрессии температуры замерзания заключенной в порах гидрогелей воды по данным ДСК-измерений, электронно-микроскопических исследований и компьютерного моделирования. Было продемонстрировано, что размер пор в гидрогелях варьируется в широких пределах (5–100 нм) в зависимости от их химического состава (природа и соотношение используемых мономеров, частота сшивки, доля сшитого полимера в гидрогеле) и консистентного состояния. Подробнее указанные экспериментальные данные были сопоставлены в [9].

На основании разработанных гидрогелей с инкорпорированным наноразмерным коллоидным серебром были получены терапевтические системы комплексного действия, проявляющие, помимо химиотерапевтического воздействия, обусловленного высвобождением сорбированного лекарственного препарата, еще и местное бактерицидное действие, эффективность которого различна к разным штаммам болезнетворных микроорганизмов. Было показано, что наименьшей чувствительностью к гидрогелевым матрицам с 0,5%-ным содержанием коллоидного серебра обладают энтеробактерии и грибы рода *Candida*, а наиболее уязвимы — энтерококки, стрептококки и, особенно, стафилококки. С другой стороны, нанореакторные матрицы с инкорпорированным магнетитом могут применяться для созда-

ния магнитоуправляемых носителей лекарственных препаратов с их адресным пролонгированным высвобождением.

Настоящее сообщение посвящено решению другой актуальной медицинской задачи — формированию и стабилизации в гидрогелевых нанореакторных матрицах частиц гидроксиапатита — в качестве аналога и заменителя костной ткани. Было исследовано набухание полученных композитных материалов в различных средах, в том числе, биологических, изучены их спектральные и рентгеноструктурные характеристики. На основе синтезированных гидрогелевых нанореакторов с инкорпорированным гидроксиапатитом разработаны и испытываются материалы для эндопротезирования и заполнения дефектов костной ткани.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гидрогелевые нанореакторные матрицы были получены посредством трехмерной радикальной полимеризации акриловых мономеров (акриламида, акрилонитрила, акриловой кислоты), осуществляемой в среде полярного растворителя, при комнатной температуре, с применением окислительно-восстановительной иницирующей системы (персульфат калия–метабисульфит натрия). Подробнее методика синтеза гидрогелевых нанореакторных матриц описывалась нами ранее [7].

В синтезированных гидрогелевых нанореакторах было осуществлено формирование наночастиц гидроксиапатита с преобладающим размером 20–40 нм. Инкорпорация наночастиц гидроксиапатита осуществлялась посредством последовательной обработки гидрогелевой матрицы растворами $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и NH_4OH . Было установлено оптимальное соотношение реагентов и оптимальные температурные и временные режимы обработки, позволяющие достичь наибольшей эффективности процесса формирования частиц гидроксиапатита в нанопорах гидрогеля.

Способность гидрогелей к набуханию изучалась гравиметрическим методом. Степень набухания определялась по формуле:

$$Q = (M_n - M_c) / M_c,$$

где M_n — масса набухшего до равновесного значения образца, M_c — масса высушенного образца.

При подсчетах усреднялись результаты, полученные при измерении набухания пяти аналогичных образцов. Масса гидрогелевых образцов определялась с точностью до четвертого знака после запятой.

Рентгеноструктурные исследования были выполнены на дифрактометре ДРОН4-07 («Буревестник», Россия). Использовалось излучение CuK_α (длина волны 0,154 нм) при условиях фокусировки по

Брэггу–Брентано ($9 - 29$) (29 — брэгговский угол). Ток и напряжение на рентгеновской трубке имели значения 20 мА и 30 кВ, соответственно. Образцы снимали в режиме непрерывной регистрации (скорость $2^\circ/\text{мин}$) в диапазоне углов 2θ от 5 до 55° .

Все процедуры обработки экспериментальных данных были выполнены с помощью лицензионного программного пакета поддержки эксперимента и обработки результатов (DIFWIN-1, ТОО «Эталон ПТЦ»). Идентификация кристаллических фаз была выполнена также с помощью системного программного обеспечения со ссылкой на стандартные JCPDS карточки (картотека Объединенного комитета по стандартам порошковой дифракции или Международного центра дифракционных данных).

Растровая электронная микроскопия с рентгеновским микроанализом была реализована на приборе РЕММА102 (SELMI, Украина). Прибор позволяет визуализировать поверхность образца в широком диапазоне увеличений с разрешением порядка 10 нм и получать данные об элементном составе из анализа характеристических рентгеновских спектров, возбуждаемых электронным зондом. В режиме получения изображения во вторичных электронах ускоряющее напряжение было 5 кВ. Микроанализ выполнялся с использованием энергодисперсного спектрометра EDX (ЭДАР). Для калибровок при количественном анализе использовали штатные эталонные образцы. Обработка спектрометрической информации, выполнение необходимых калибровочных измерений, расшифровка характеристических рентгеновских спектров и количественный анализ проводились с помощью программного обеспечения системы микроанализа. Процедура расчета состава образца основана на классической схеме ZAF-коррекции матричных эффектов, методом внешнего эталона. Перед исследованием образец покрывался тонкой проводящей пленкой серебра в вакуумной установке ВУП-5М (SELMI, Украина).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика набухания синтезированных гидрогелевых нанореакторных матриц со сформированными наночастицами гидроксиапатита и ненаполненных была исследована в дистиллированной воде физиологическом растворе. На рисунке 1 приведены соответствующие данные применительно к дистиллированной воде. Соответствующие кривые для набухания в физиологическом растворе обладают подобным профилем. Как можно заключить, кривые, характеризующие набухание, являются типичными кривыми насыщения, особенно, в случае нанореакторных матриц с инкорпорированным гидроксиапатитом. С увеличением времени созревания (продолжительности нахождения нанореакторных матриц в 1%-ном водном растворе аммиака) эффективность процесса насыщения матрицы

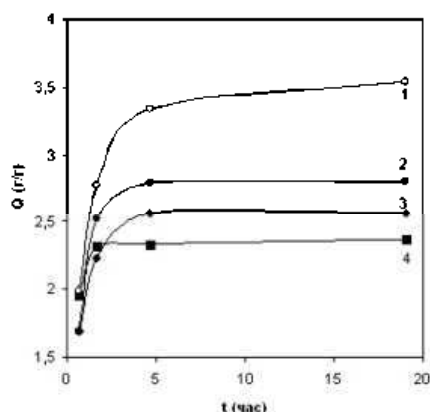


Рис. 1. Кинетика набухания в дистиллированной воде ненаполненной гидрогелевой нанореакторной матрицы на основе ПААГ (1) и наполненных матриц со временем формирования гидроксиапатита: 0,5 (2), 0,75 (3), 2 (4) часа.

неорганическим компонентом возрастает, свидетельством чего является снижение равновесной степени набухания и сокращение времени ее достижения.

На рисунке 2 сопоставлены дифрактограммы ненаполненной гидрогелевой матрицы (а) и гидрогелевой нанореакторной матрицы со сформированными наночастицами гидроксиапатита (б). Индексами Миллера отмечены положения дифракционных линий $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ по данным JCPDS # 9-0432. Как можно заключить из сопоставления приведенных дифрактограмм, инкорпорация кальций-фосфатной составляющей в гидрогелевую нанореакторную матрицу действительно имеет место в условиях ее последовательной обработки растворами $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и NH_4OH .

Наблюдающаяся размытая картина рентгеновской дифракции свидетельствует о высокой дисперсности инкорпорированных частиц гидроксиапатита. Приблизительная оценка размеров сформированных кристаллитов может быть выполнена с использованием формулы Селякова–Шеррера, связывающей уширение линии и обуславливающий его малый размер кристаллита L :

$$L = \frac{K\lambda}{\beta_m \cos \vartheta},$$

где λ — длина волны; ϑ — угол дифракции; β_m — физическое уширение линии образца (ширина пика на половине высоты или интегральная ширина), обусловленное малыми размерами кристаллитов; K — константа, близкая к единице. Для линии (002), соответствующей кристаллографическому направлению перпендикулярному базисной

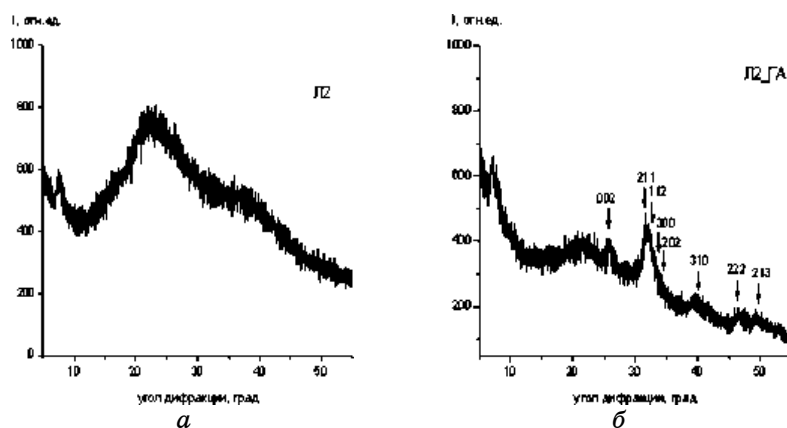


Рис. 2. Дифрактограммы ненаполненной гидрогелевой матрицы на основе ПААГ (а) и гидрогелевой матрицы с инкорпорированными наночастицами гидроксиапатита (б).

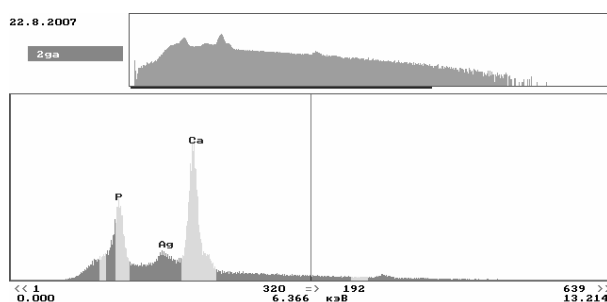


Рис. 3. Рентгеновский спектр образца гидрогелевой нанореакторной матрицы с инкорпорированными наночастицами гидроксиапатита, снятый при помощи EDX (ЭДАР).

плоскости гексагональной элементарной ячейки апатита, уширение соответствует размеру 10–15 нм. Линии, отвечающие перпендикулярным направлениям (например, (300) и (310)), уширены еще в большей степени, что свидетельствует об очень малой ширине/толщине кристаллитов (примерно 3–5 нм).

Таким образом, по форме кристаллиты гидроксиапатита в наполненной гидрогелевой нанореакторной матрице вытянуты вдоль гексагональной оси, как это наблюдается и в биогенном апатите, а по размерам в 1,5–2 раза меньше размеров кристаллитов гидроксиапатита зрелой костной ткани.

Как следует из рентгеноспектрального анализа (ЭДАР) нанокластеров гидроксиапатита, сформированных в гидрогелевой нанореакторной матрице (рис. 3), соотношение Ca/P в них составляет 2,62,

что превышает стехиометрическое отношение (2,17) для чистого гидроксиапатита. Подобное соотношение, как правило, имеет место в тех случаях, когда помимо фазы гидроксиапатита, в системе присутствует избыточный кальций в составе, так называемого, «неапатитного» окружения [10, 11].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что гидрогелевые нанореакторы на основе акриловых мономеров могут с успехом применяться для получения, стабилизации и хранения нанокластеров гидроксиапатита, близкого по своему строению к биогенному. Превалирующий размер сформированных частиц гидроксиапатита составляет 3–15 нм.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. M. Antonietti and C. Goltner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36**: 910 (1997).
2. S. Keki, J. Torok, and G. Deak, *J. Coll. Int. Sci.*, **229**: 550 (2000).
3. K. Ghosh and S. Maiti, *J. Appl. Polym. Sci.*, **60**: 323 (1996).
4. S. Keki, L. Nagy, and G. Deak, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **15**: 1455 (2004).
5. Г. Б. Сергеев, *Нанохимия* (Москва: Издательство Московского университета: 2003).
6. *Нанотехнология в ближайшем десятилетии. Прогноз направления исследований* (Ред. М. Роко, Р. Уильямс, П. Аливисатос) (Москва: Мир: 2002).
7. Ю. М. Самченко, Н. А. Пасмурцева, З. Р. Ульберг, *Доповіди НАН України*, №2: 146 (2007).
8. Ю. М. Самченко, Н. А. Пасмурцева, З. Р. Ульберг, *Доповіди НАН України*, №6: 143 (2007).
9. Ю. М. Самченко, *Гідрогелеві носії лікарських препаратів з керованими колоїдно-хімічними властивостями* (автореферат дис. докт. ... хім. наук) (Київ: 2006).
10. S. N. Danilchenko, V. A. Pokrovsky, V. M. Bogatyrov, L. F. Sukhodub, and B. Sukhio-Cleff, *Cryst. Res. Technol.*, **40**: 692 (2005).
11. S. N. Danilchenko, A. V. Koropov, I. Yu. Protsenko, B. Sulhio-Cleff, and L. F. Sukhodub, *Cryst. Res. Technol.*, **41**: 263 (2006).