

УДК 542.65

DOI: 10.15372/KhUR20160502

## Изготовление и исследование микрокапсул из биоактивного гидроксиапатита

Е. А. ЗЕЛИЧЕНКО, В. В. ГУЗЕЕВ, Т. И. ГУЗЕЕВА, О. А. ГУРОВА, Л. Г. СТЕПАНОВА

*Северский технологический институт Национального исследовательского ядерного университета МИФИ, Северск, Россия**E-mail: zelichenko65@mail.ru*

(Поступила 28.10.15; после доработки 18.05.16)

### Аннотация

Разработана методика синтеза микрогранул и микрокапсул из биоактивного гидроксиапатита. Исследованы их фазовый и элементный состав, проведен электронно-микроскопический анализ биорезорбируемого материала. Биологические и доклинические испытания показали, что при заполнении костного дефекта микрогранулами гидроксиапатита у животных формируется полноценная костная ткань.

**Ключевые слова:** гидроксиапатит биоактивный, микрогранулы, микрокапсулы, костная ткань, регенерация, биосовместимость

### ВВЕДЕНИЕ

Болезни суставов – одна из главных причин временной нетрудоспособности людей. Как и болезни костей, они могут провоцировать различные инфекции, травмы и микротравмы, нарушение обмена веществ в организме и, как следствие, избыточный вес, болезни позвоночника и т. д.

Для укрепления и поддержания опорно-двигательного аппарата необходимы минералы – кальций, магний, фосфор, кремний и т. д., полноценный белок, витамины С и D, ряд других питательных веществ, вода.

Источником пополнения минерального состава кости может служить биологический гидроксиапатит (ГАП) – база матрикса костной ткани с неорганической природой. Активируя остеогенез, он усиливает пролиферацию остеобластов и запускает процесс репаративного остеогенеза в месте введения. Гидроксиапатит не затвердевает и не рассасывается, а замещается полноценной костной

тканью; он малотоксичен, не обладает мутагенным, аллергенным действием, а его применение не вызывает развития воспалительных процессов.

Микрокапсулированная форма ГАП обеспечивает пролонгированное действие лекарственного препарата, в частности, поддерживает определенный уровень активного компонента в организме и оказывает эффективное терапевтическое действие в течение длительного времени за счет замедленного высвобождения малых доз активного компонента.

Разработка новых материалов медицинского назначения, предназначенных для контакта со средой живого организма, представляет собой задачу высокой ответственности и сложности.

Проблемы заключаются не только в синтезе материала, обладающего высоким сродством и подобием ГАП натуральной кости организма, но и в обеспечении его доставки к месту дефекта или поражения кости, а также в регулировании скорости процесса репаративного остеогенеза.

Клинические исследования при лечении ряда заболеваний и повреждений кости в восстановительной хирургии в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии указывают на то, что репаративный остеогенез в посттравматических дефектах костной ткани длится месяцы и годы, а в ряде случаев костные дефекты вообще не заполняются костной тканью [1].

Одним из способов доставки ГАП может быть его введение в пораженный сустав или костный дефект в виде ГАП-содержащих микрокапсул с заданными размерами, пористостью или узким диапазоном этих параметров, что позволит регулировать скорость остеогенеза.

Микрокапсулы биodeградируемых композитных материалов предназначены для профилактики и лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата человека, в частности, они должны: 1) влиять непосредственно на причину, из-за которой прогрессирует артроз; 2) защищать хрящевую ткань; 3) стимулировать в организме синтез собственного гиалуроната; 4) восстанавливать вязко-эластичные и защитные свойства синовиальной жидкости, гомеостаз в хряще; 5) уменьшать воспалительные процессы в суставе; устранять болевой синдром в коленном и других крупных суставах; 6) избавлять от тугоподвижности и т. д.

Биоактивные материалы для пластики больших костных дефектов, возникающих в результате хронических воспалений, после удаления кист, хондром, опухолей остро востребованы сегодня, поэтому совершенствование известных и разработка новых эффективных остеопластических материалов для методов устранения костных дефектов имеют актуальное значение.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения микрокапсул синтезирован биоактивный ГАП из костной ткани крупного рогатого скота [2] по усовершенствованной методике [3]. Данная методика предусматривает растворение костей крупного рогатого скота в растворе 1 М HCl, отделение раствора, содержащего ионы кальция, фосфат-ионы и большинство ионов микроэлементов,

входящих в состав кости. Далее из данного раствора (5 М NaOH) осаждали кальцийфосфатный материал, который после многократной промывки дистиллированной водой и последовательной термической обработки с заключительной стадией прокаливания при 800–830 °С и измельчения в шаровой мельнице идентифицировали и исследовали методами инструментального анализа.

Гранулы ГАП получали методом электроспиннинга и последующей термообработки. Исходная смесь состоит из твердой фазы (биологического ГАП) и раствора, содержащего гиалуроновую кислоту (0,5 %) и альгинат натрия (1–3 %). Соотношение ГАП/раствор было равным 1 : 30. В качестве отвердителя использовали 25–30 % раствор хлорида кальция. Лабораторная установка для проведения электроспиннинга приведена на рис. 1. Состав для проведения электроспиннинга определен на основании результатов экспериментов по исследованию реологических свойств получаемых гелей альгината натрия в зависимости от концентрации, времени набухания и температуры воды.

К капле исходного вязкого раствора прикладывается высокое напряжение (до 15 кВ), в результате чего жидкость приобретает заряд; силы электростатического отталкивания между молекулами начинают противодействовать силам поверхностного натяжения, и капля вытягивается. Мы выбрали определенное соотношение альгината натрия, гиалуроновой кислоты и ГАП, а также напряжение, обеспечивающее электрораспыление жидкости. Капли распыляются в стакан с отвердителем, содержащим насыщенный раствор хлорида кальция. Полученные гранулы многократно промывали в дистиллированной воде, сушили, прокаливали в течение 60 мин при температуре 800–830 °С и просеивали через сита для получения фракций с определенным размером гранул.

Микрокапсулирование микрогранул осуществляли методом центрифугирования. В качестве полимерной матрицы (оболочки) использовали желатин. Для приготовления желатиновой массы без процесса набухания в закрытый реактор, снабженный водяной рубашкой, автоматическим регулятором температур и лопастной мешалкой, добавляли би-

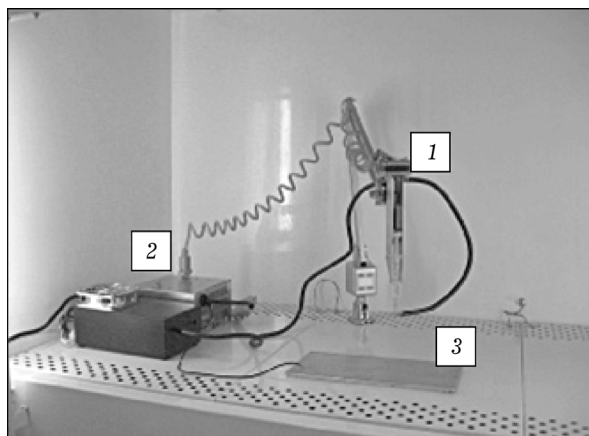


Рис. 1. Лабораторная установка электроспиннинга: 1 – перфузор-шприц с раствором ГАП, альгината натрия и гиалуроновой кислоты, поршень которого соединен с шаговым двигателем; 2 – высоковольтный источник питания; 3 – токопроводящая подложка, на которую устанавливается стакан с хлоридом кальция.

дистиллированную или деионизованную воду и нагревали до 70–75 °С. Далее загружали желатин при включенной мешалке и перемешивали до его полного растворения.

Фазовый состав кальцийфосфатного материала определяли с использованием рентгеновского дифрактометра Shimadzu XRD 6000. Элементный состав установлен с помощью методом рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) на спектрометре VRA-30. ИК-спектры сняты на ИК-спектрофотометре Specord M 80.

Микроскопические исследования поверхности микрокапсул проводили с помощью растрового электронного микроскопа Philips SEM 515 и просвечивающего микроскопа CM 30/STEM (разрешающая способность до 0.24 нм). Удельная поверхность частиц ГАП определена с использованием прибора Sorbtometer M ver 1.0.0.0 многоточечным методом БЭТ.

Исследование микрокапсул биodeградируемых композитных материалов проведено в соответствии с требованиями фармакологического комитета Минздравсоцразвития РФ согласно методическим указаниям [4]. Исследование цитотоксичности культуры клеток выполнено методом прямого контакта (ISO 10993–5, 1999), с использованием фибробластных клеток кроликов.

Исследования регенерации костной ткани с использованием микрокапсул с биоактивным ГАП проводили на крысах породы

Wistar (30 особей, массой 218–226 г), полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИ гигиены, и на кроликах возрастом 6 мес. (10 особей, массой 2.5–3 кг). До и в ходе экспериментов крысы находились в виварии при температуре воздуха 20–22 °С, влажности не более 50 %, объеме воздухообмена (вытяжка/приток = 8 : 10), световой режим день – ночь (по 12 ч). Водопроводная очищенная вода всем животным подавалась без ограничений, в стандартных поилках. Животных размещали в стандартных пластиковых клетках и содержали на стандартном рационе (гранулированный корм ПК120-3) согласно [5]. Кролики содержались в виварии, в клетках на подстилке площадью 2500 см<sup>2</sup>, при следующих условиях окружающей среды: температура воздуха 20 °С, относительная влажность 60–70 %, автоматическая смена 12-часового светового периода. В качестве подстилки использовались опилки деревьев нехвойных пород. Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП).

При проведении эксперимента учитывались все требования международного стандарта системы обеспечения качества GLP (Good Laboratory Practice). Комбинированное обезболивание проводили путем внутримышечного введения в бедренную мышцу 0.05 мг золетила и 0.01 мг ксилонета (из расчета на массу животного примерно 200 г). После выбривания операционного поля в проекции бедренной кости и обработки кожи 70 % раствором спирта производили разрез кожи длиной 25 мм, параллельно оси бедренной кости, рассекали фасции бедренной мышцы, разводили мышечную ткань, обнажая наружную поверхность бедренной кости. В правой области диафиза бедренной кости делали отверстие диаметром 2 мм, глубиной 0.5 см и вводили в него исследуемый материал микрокапсулы из биodeградируемых композитных материалов. Мышечную ткань над местом введения ушивали, на рану накладывали кожные швы.

Уровень регенерации костной ткани оценивали с помощью рентгенологических исследований на компьютерном томографе Somatom AR.NP фирмы Siemens.

ТАБЛИЦА 1  
Рентгенофазовый анализ ГАП

Фазы	Содержание, об. %	Параметры решетки, Å
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	76	$a = 9.522,$ $c = 6.875$
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	17	$a = 9.519,$ $b = 18.748,$ $c = 6.850,$ $\beta = 120.66$
$\text{Ca}(\text{HPO}_4)(\text{H}_2\text{O})$ (брушит)	6	$a = 6.389,$ $b = 15.227,$ $\beta = 118.95$
Аморфная	1	—

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам РФА, порошок биологического ГАП представлен гексагональной и моноклинной модификациями с площадью удельной поверхности материала более  $70 \text{ м}^2/\text{г}$  (табл. 1).

По результатам рентгенофлуоресцентного (элементного) анализа кальцийфосфатного материала состав смеси следующий, ат. %: кислород 65,1, кальций 21,7, фосфор 13,2. При таком содержании элементов обеспечивается соотношение  $\text{Ca}/\text{P} = 1.64$ , что хорошо согласуется с результатами РФА (см. табл. 1).

На рис. 2 видно, что исходный полученный образец кальцийфосфатного соединения (см. табл. 1) представляет собой порошокобразную смесь агломератов размером до 400 мкм, сложенных зернами размером 15–50 нм.



Рис. 2. Микрофотография исходного порошка кальцийфосфатного соединения (ГАП).

Исследование распределения по размерам зерен порошка, полученного методом секунций по РЭМ-изображениям, показало, что преобладают зерна размером 20–50 нм.

С целью получения микрогранул ГАП проведена серия экспериментов по определению зависимости формы гранул от концентрации альгината натрия в растворе (вязкости раствора), напряжения между металлическим капилляром (иглой) и подложкой, а также от расстояния между ними. Толщина слоя раствора хлорида кальция в стакане, где происходит закрепление микрогранул ГАП, во всех экспериментах составляла 35 мм. Установлены оптимальные параметры: концентрация альгината натрия в растворе 1–3 %, расстояние между иглой и подложкой в 70–100 мм, напряжение порядка 15 кВ. При напряжениях  $>15 \text{ кВ}$  и расстояниях  $>150 \text{ мм}$  в шприце с

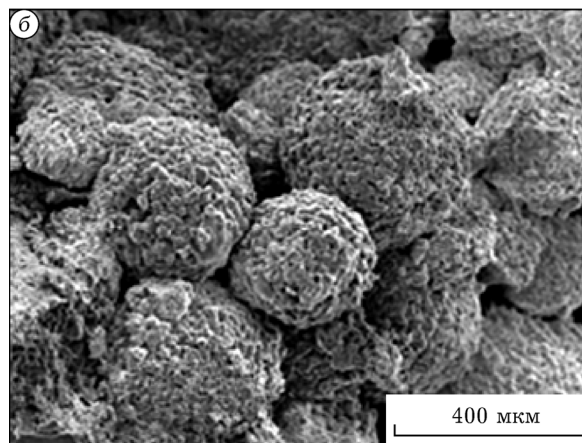
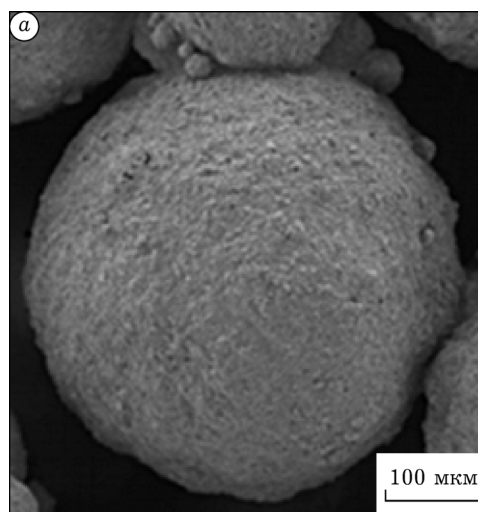


Рис. 3. Микрофотографии гранул ГАП: а – исходная, б – после прокаливания при  $850 \text{ °C}$ .

раствором происходит пробой, а при расстояниях менее 150 мм пробой наблюдается между иглой и подложкой. При расстоянии между иглой и подложкой 70–100 мм во время эксперимента наблюдали разлетающиеся капли.

Эксперименты показали, что оптимальная частота вращения шагового двигателя составляет 8–10 Гц и соответствует скорости подачи полимера, равной 0.28–0.35 мл/мин. При меньшей скорости полимер “застывал” на кончике иглы, образуя “пробку”, а при большей скорости вместо капель начинают формироваться волокна (нити).

На микрофотографиях исходной и полученной гранул ГАП (рис. 3, б) хорошо видна мелкопористая шероховатая поверхность гранулы размером примерно 400 мкм.

Установлено, что изменяя параметры процесса электроспиннинга можно варьировать диаметр полученных гранул, от сотен нанометров до микрометров. Разработанная методика позволяет также регулировать морфологические характеристики матрикса, формируемого из данного состава.

В эксперименте с исследуемым материалом на крысах на гистологических препаратах на 14-е сут в препаратах наблюдали следующую картину (рис. 4, а): кортикальные пластинки кости на большем протяжении сохранены. Костный мозг обычного строения, с артефициальными изменениями клеток за счет декальцинации. Продуктивная реакция в костном мозге минимальная. В кости выделяется небольшой участок остеогенеза с минерализацией межклеточного вещества – образованием костных трабекул, содержащих три типа костных клеток (остеобластов, остеокластов и остеоцитов), и с отсутствием сосудов. Через 1 мес. после операции в препаратах костной ткани с заполнением дефекта микрокапсулами (см. рис. 4, б): в кости определяется широкий участок новообразованной костной ткани, представленный редкими костными трабекулами, костными пластинками, ориентированными параллельно кортикальному слою, а также первичные остеоны. Костные трабекулы преимущественно среднего размера и неоднородные

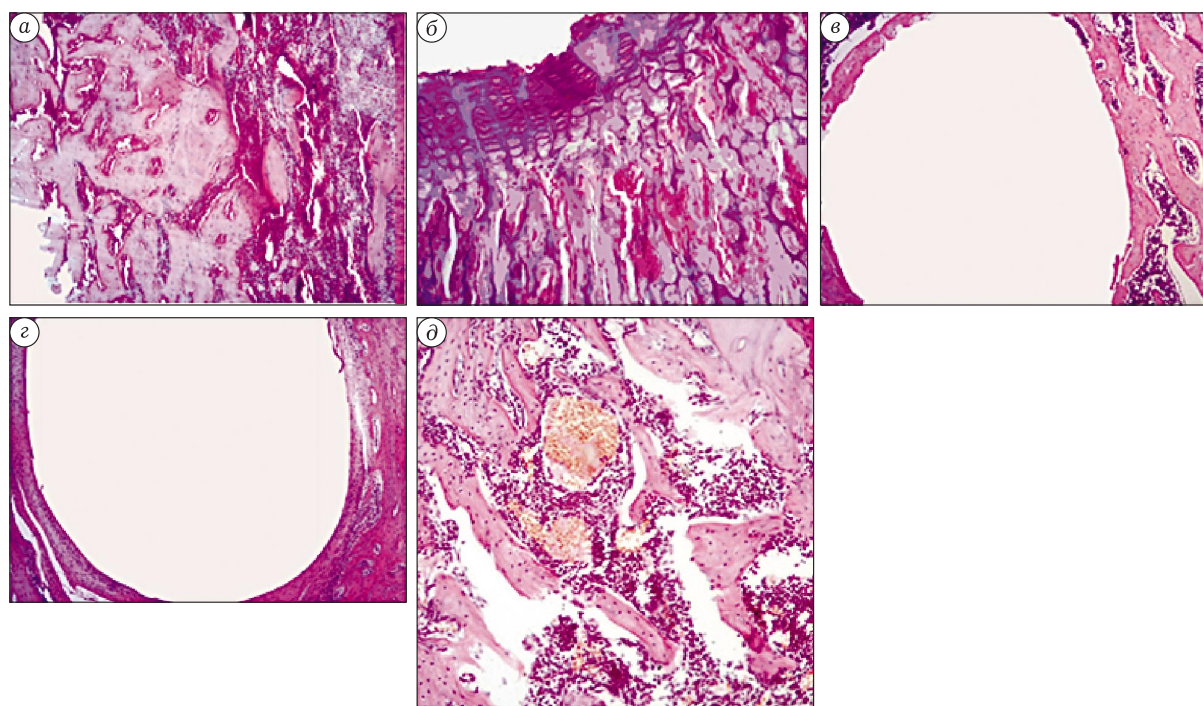


Рис. 4. Результаты гистологических срезов экспериментальных препаратов: а – участок остеогенеза с продуктивной реакцией; б – костные трабекулы с наличием хондроцитов; в – зрелые костные трабекулы; г – костные трабекулы и выраженная продуктивная реакция вокруг зоны дефекта; д – новообразованные костные балки с наличием довольно крупного кровеносного сосуда между ними. Окраска гематоксилин-эозин, ув. 100.

по своей оптической структуре: более плотные с эозинофильной зернистостью (крупные гранулы желтовато-красного цвета) в центре и менее плотные с четкой базофильной зернистостью (гранулы темно-синего цвета) – в периферических отделах. В периферических отделах данного участка имеются остатки хряща (энхондральный остеогенез). Через 1.5 мес. эксперимента в центре диафиза кости фиксируется новообразованная костная ткань в виде кольца (см. рис. 4, в). Костные пластинки: частично тонкие, частично широкие, ориентированы в различных направлениях. Костный мозг обычного строения. Через 2 мес. после операции в гистологических препаратах (см. рис. 4, г) в центре диафиза определяется округлый участок, окруженный новообразованной костной тканью. Внутренняя стенка состоит из фиброзной ткани, периферические отделы сформированы в виде кольца, представленного зрелой костной тканью. На остальном протяжении кость и костный мозг типичного строения.

В эксперименте с исследуемым материалом на кроликах на гистологических препаратах через 1.5 мес. после операции обнаружено, что в новообразованной костной ткани к костным трабекулам подрастают сосуды. Вокруг них костное вещество формируется в виде концентрических костных пластинок, составляющих первичные остеоны. По всей толщине имплантата в результате его биодеградации материал замещается вновь образующейся костной тканью (см. рис. 4, д).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, применение микрокапсул из биодеградируемых композитных материалов биологического ГАП не вызывает нарушений функционального состояния организма животных, не оказывает местно-раздражающего действия на введение, а по истечении 2 мес. на месте костного дефекта и по всей толщине имплантата в результате биодеградации происходит замена материала вновь образующейся костной тканью. Следовательно, используемые микрокапсулы биодеградируемого композитного материала (биологического ГАП) отвечают требованиям, предъявляемым к имплантируемым медицинским изделиям.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Волова Т. Г., Шишацкая Е. И., Миронов П. В. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии. Красноярск: изд. Сиб. фед. ун-та, 2009. 262 с.
- 2 Талашова Н. А., Силантьева Т. А. // Гений ортопедии. 2007. № 4. С. 71–75.
- 3 Зеличенко Е. А., Гузеев В. В., Гурова О. А., Роголина А. С., Ковальская Я. Б. // Химия уст. разв. 2012. Т. 20, № 5. С. 543–548.
- 4 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Харбиева. М.: Медицина, 2005. 832 с.
- 5 Каркищенко Н. Н., Грачев С. В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. М.: Профиль, 2010. 358 с.