

УДК 542.65

Определение физико-химических характеристик и биоактивности *in vitro* композитного Са-Р/хитозанового покрытия, полученного методом электрохимического осаждения

Я. А. КАМЕНЧУК¹, Е. А. ЗЕЛИЧЕНКО², В. В. ГУЗЕЕВ¹, А. Б. ШАШКИН², И. А. ХЛУСОВ¹, К. В. ЗАЙЦЕВ¹¹“ВТО Росмедтехнологий” им. Г. А. Илизарова, Томский филиал,
ул. Никитина, 17, Томск 634034 (Россия)

E-mail: Yana100@inbox.ru

²КНПО “Биотехника”,
пер. Плеханова, 5, Томск 634034 (Россия)

(Поступила 28.10.09; после доработки 19.02.10)

Аннотация

Исследованы физико-химические и биологические свойства композитного кальций-фосфатного хитозанового покрытия. Показано, что введение хитозана увеличивает содержание аморфной фазы, состоящей из наноразмерных частиц, а увеличение его концентрации приводит к изменению толщины и шероховатости покрытия. Выявлено, что в процессе получения композитного покрытия методом электрохимического осаждения хитозан и Са-Р осаждаются на поверхность титановой подложки, хаотично чередуясь и взаимно дополняя друг друга, с образованием сетчатой структуры. Композиты СаР-Х модулируют *in vitro* и *in vivo* функциональную активность и дифференцировку стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении, благодаря чему они перспективны в плане разработки нового класса имплантатов для ортопедии и травматологии.

Ключевые слова: хитозан, гидроксипатит, электрохимическое осаждение, композитное покрытие, стромальные стволовые клетки, остеогенные свойства

ВВЕДЕНИЕ

Среди неорганических неметаллических материалов для изготовления имплантатов наиболее распространены материалы на основе гидроксипатита. Большой интерес к гидроксипатиту (ГА) вызван его сходством по физико-химическим свойствам с минеральной составляющей костной ткани и высокой биологической активностью. Предположено, что добавление хитозана будет увеличивать биосовместимость Са-Р покрытия, полученного электрохимическим методом [1].

Хитозан – это продукт деацетилирования хитина, часто встречающийся биополимер в скелетных тканях насекомых и ракообразных [2, 3].

Известно, что хитозан – гемостатик, фунгистатик, иммуномодулятор, обладает противоопухолевым эффектом, является природ-

ным биополимером и имеет полную биосовместимость с тканями организма, что позволяет использовать его в различных областях медицины [4–6]. Более того, хитозан метаболизируется рядом энзимов, в частности лисозомами, и считается биodeградируемым [7, 8]. Благодаря положительным зарядам при физиологическом рН, хитозан биоадгезивен, что повышает удержание клеток [9, 10]. Хитозан также стимулирует заживление ран [11, 12] и проявляет бактериостатический эффект [13, 14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение композитных покрытий на основе Са-Р с хитозаном (Са-Р/Х)

Композитные покрытия получали электрохимическим осаждением. В качестве под-

ТАБЛИЦА 1

Условия нанесения композитных Ca-P/хитозановых покрытий

Условия	Ca-P	Ca-P/X1	Ca-P/X2
Температура, °C	28-30	28-30	28-30
Время, мин	15	25	25
pH раствора электролита	2.8-3.2	3.0-3.2	3.0-3.2
Плотность импульсного тока, mA/cm ²	0.1-0.2	0.1-0.2	0.1-0.2
Частота следования импульсов, имп./мин	50-100	50-100	50-100
Концентрация хитозана, г/л	0	1.25	5

ложки для нанесения покрытий использовался титановый сплав марки ВТ 6. Были изготовлены диски диаметром 9 мм, толщиной 2 мм и шероховатостью 2.5 мкм. Перед нанесением покрытия диски очищались ультразвуком в дистиллированной воде. Хитозан (степень деацетилирования 85 %) в концентрациях 1.25, 2 и 5 г/л добавлялся в электролит, содержащий фосфаты кальция и ортофосфорную кислоту. Условия нанесения покрытия приведены в табл. 1.

После нанесения покрытий образцы промывались в дистиллированной воде и высушивались на воздухе в сухожаровом шкафу при температуре 60-70 °C в течение 10-15 мин.

В качестве модельной культуры для изучения взаимодействия искусственных покрытий и стромальных стволовых клеток *in vitro* применяли фибробластоидные клетки легкого человека (ООО "Банк стволовых клеток"), которые клонировали в остеогенной среде [15] на дисках с покрытием диаметром 9 мм в концентрации $5 \cdot 10^4$ клеток/см² в течение 4 сут. Препараты после 4-5 пассажей представляют собой морфологически и функционально однородную популяцию клеток с ограниченным сроком жизни, сохраняющую при пассажах стабильный кариотип. Клетки свободны от посторонних вирусных (ВИЧ, гепатит, герпес и др.) и бактериальных агентов (сифилис, микоплазмы, хламидии и др.). Жизнеспособность клеток, определяемая согласно ISO

10993-5 по исключению окрашивания в тесте с 0.4 % трипановым синим, составила 91-93 %.

По окончании культивирования имплантаты сушили на воздухе, прилипший клеточный материал фиксировали в течение 30 с в парах формалина, окрашивали на щелочную фосфатазу (ЩФ) по методике, описанной в работе [16].

В эксперименте *in vivo* самцам мышей линии Balb/c под эфирным наркозом подкожно вводили по одному имплантату (диаметр 9 мм, толщина 2 мм), с нанесенным в асептических условиях столбиком сингенного костного мозга, взятого из бедренной кости (тест эктопического костеобразования). Для адгезии клеток органную культуру костного мозга на подложке культивировали в течение 45 мин в культуральной среде, содержащей 95 % среды RPMI-1640 (ICN) и 5 % эмбриональной телячьей сыворотки (ICN). Костный мозг служил источником мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и ростовых факторов. При раздельном подкожном введении мышам подложек или фрагментов костного мозга образования тканевых пластинок не наблюдалось.

Через 45 сут имплантаты извлекали, фотографировали в отраженном свете с фиксированными параметрами. Для проведения гистологического анализа применяли стандартные методы световой микроскопии тонких срезов. После декальцинации тканевых пластинок, выросших на имплантатах, осуществ-

ТАБЛИЦА 2

Характеристики поверхности образцов (n = 5)

Условия	Ca-P	Ca-P/X1	Ca-P/X2
Концентрация хитозана в растворе электролита, г/л	0	1.25	5
Толщина покрытия, мкм	85 ± 3.0	81 ± 2	60 ± 2.0
Шероховатость поверхности, мкм	5.5 ± 0.2	4.7 ± 0.1	4.0 ± 0.1

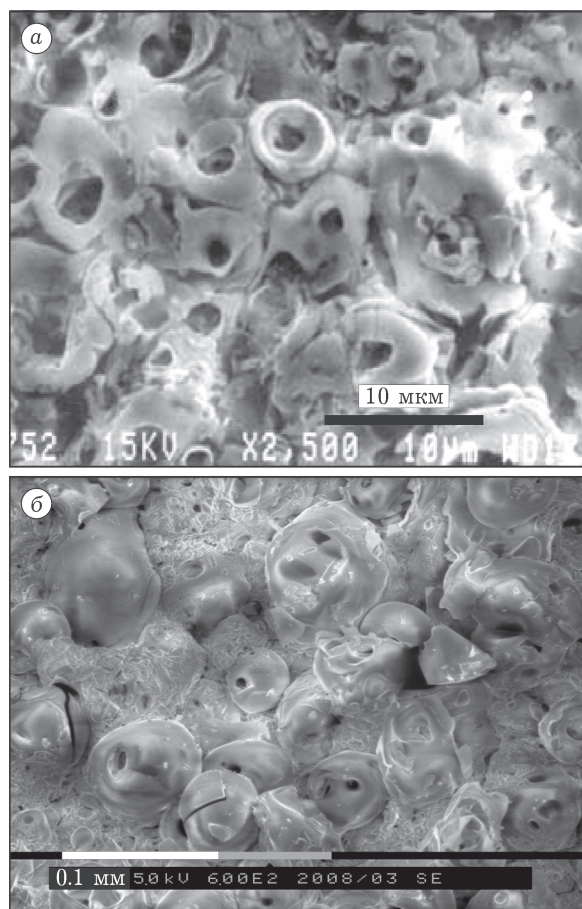


Рис. 1. Микрофотографии покрытий Са-Р (а) и Са-Р/Х (5 г/л хитозана в растворе) (б), полученные по данным РЭМ.

ляли обычную окраску гематоксилином-эозином парафиновых срезов, выполненных перпендикулярно поверхности дисков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение топографии поверхности

Толщина покрытия определялась с помощью многофункционального прибора “Константа К5”. Результаты измерений ($n = 5$) показали, что увеличение концентрации хитозана в растворе приводит к уменьшению толщины покрытий (табл. 2). Шероховатость поверхности определялась с помощью оптического микроскопа со встроенным профилометром ОМР-0360G. Результаты измерений свидетельствуют о том, что она также уменьшалась с увеличением концентрации хитозана (см. табл. 2).

Микро- и макрорельеф поверхности покрытий исследовался посредством растрового электронного микроскопа Philips SEM 515. Покрытия Са-Р и Са-Р/Х формировались из глобул Са-Р диаметром от 80 нм до 150 мкм. Покрытие Са-Р состояло из сферолитоподобных кристаллов, образующих макрорельеф поверхности покрытия с размером пор в диапазоне 5–100 мкм. Изолированные поры локализовывались в сферолитах, сквозные

ТАБЛИЦА 3

Фазовый состав покрытий Са-Р и Са-Р/Х2

Образец	Обнаруженные фазы	Объемная доля фазы, %	Параметры решетки, Å	Средний размер частиц, нм	$\Delta d/(d \cdot 10^{-3})$
Са-Р	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	66.3	$a = 9.4083$ $c = 6.8777$	300	0.5
	Ti	1.5	$a = 2.9354$ $c = 4.6571$	16	2.7
	TiO_2 – брукит	2.2	$a = 9.1139$ $b = 5.4729$ $c = 5.1679$	9	8.5
Са-Р/Х2	Аморфная	30	–	–	–
	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	25	$a = 9.4083$ $c = 6.8777$	30	19
	TiO_2 – брукит	15	$a = 9.1139$ $b = 5.4729$ $c = 5.1679$	22	10
	Аморфная	60	–	–	–

поры располагались на границах сферолитов. Покрытия Са-Р/Х также формировались из сферолитов, но рельеф поверхности выглядит более сглаженным в силу окутывания хитозаном глобул фосфатов кальция со средним размером пор около 15 мкм. На покрытии Са-Р/Х большинство полимерных агрегатов как сосредотачиваются вокруг глобул Са-Р, так и обволакивают их. Иногда происходит связывание Са-Р и хитозана с образованием сетчатой структуры (рис. 1, б). В покрытии Са-Р отмечаются глобулы Са-Р, имеющие вид сферолитов. В покрытии Са-Р/Х2 обнаружены хитозановые агрегаты, сосредоточенные вокруг глобул Са-Р и связанные между собой с образованием сетки.

Исследование фазового состава и параметров структуры покрытий проводилось с использованием дифрактометра XRD-6000, $\text{CuK}\alpha$ -излучение. Анализ фазового состава, размеров областей когерентного рассеяния, внутренних упругих напряжений проведен с использованием баз данных PCPDFWIN, а также программы полнопрофильного анализа POWDER CELL 2.4.

Покрытие Са-Р имеет типичные апатитовые пики с кристаллическостью около 66.3 % и примесью аморфной фазы (30 %). Добавление хитозана (покрытие Са-Р/Х2) приводит к уменьшению содержания кристаллической апатитовой фазы до 25 % и увеличению содержания как аморфной (60 %), так и брешитовой (15 %) фаз. При введении хитозана размеры кристаллитов, формирующих сферолиты, значительно уменьшаются (табл. 3).

Состав и структура покрытия

Состав покрытий исследован методом ИК-спектроскопии на ИК-спектрофотометре Specord M 80 (рис. 2). На ИК-спектре хитозана имеются широкие полосы поглощения между 1079 и 1032 см^{-1} , соответствующие гликозидной связи С-О-С, и пик при 1260 см^{-1} , приписываемый свободной первичной аминогруппе (NH_2) в позиции С₂ глюкозамина. Пик при 3439 см^{-1} относится к колебаниям групп -ОН в адсорбированной воде. Пик при 1655 см^{-1} (амид 1) с небольшим “плечом” и пик при 1605 см^{-1} (амид 2) относятся к ацетилированной аминогруппе и подтверждают, что образец деацетилирован не полностью. Пик при

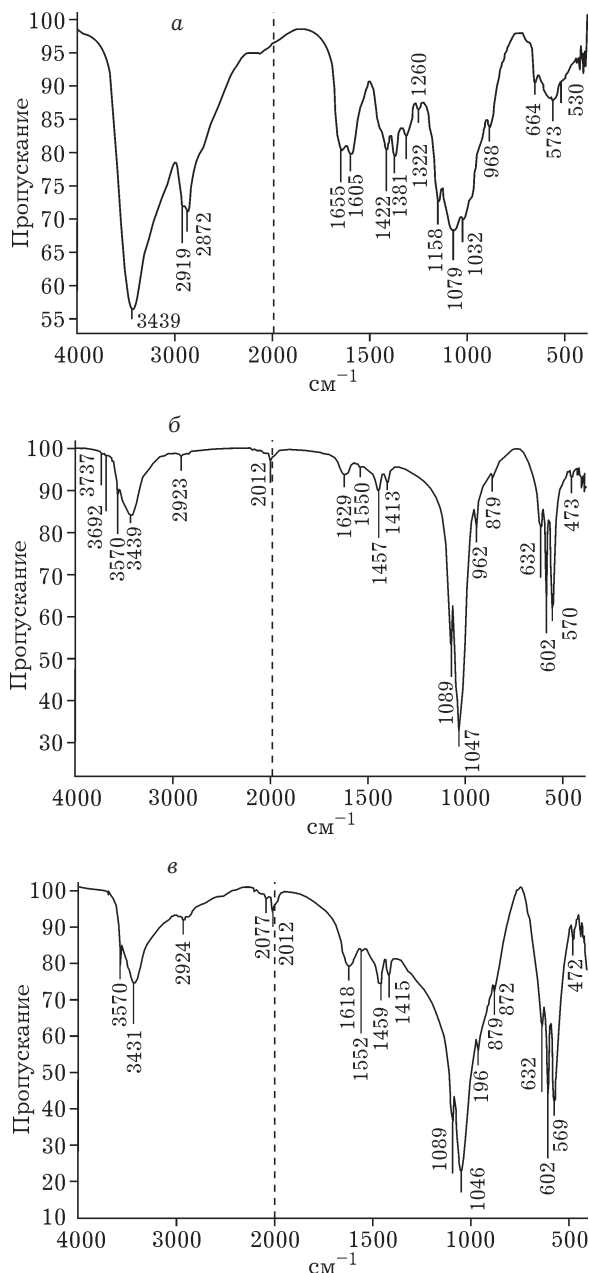


Рис. 2 ИК-спектры хитозана (а), гидроксиапатита (б), СаР-Х2 (в).

1381 см^{-1} соответствует связи С-О группы первичного спирта ($-\text{CH}_2-\text{OH}$). Кроме того, присутствуют слабые полосы поглощения при 896 и 664 см^{-1} , которые можно отнести к деформационным колебаниям группы С₁-Н и колебаниям пиранозного кольца в β-сахарах соответственно. В спектрах также присутствуют полосы поглощения алифатических групп CH_2 (2919 см^{-1}) и CH_3 (2872 см^{-1}), на что указывает наличие полос, соответствующих деформационным колебаниям этих групп при 1422 и 1322 см^{-1} .

В ИК-спектре гидроксиапатита наблюдаются полосы поглощения в области частот 570, 602 см^{-1} , которые отнесены к деформационным колебаниям связей Р-О, полоса 632 см^{-1} – это деформационные колебания группы ОН на оси ν_3 , полоса при 962 см^{-1} относится к ν_1 -колебаниям связей Р-О. Полосы, расположенные при 1047–1089 см^{-1} , – это характеристические колебания фосфата.

ИК-спектр композита Са-Р/Х2 демонстрирует все характеристические полосы поглощения для гидроксиапатита и хитозана. Широкая полоса поглощения при 3431 см^{-1} соответствует валентным колебаниям ОН-групп, а пики поглощения при 2924 см^{-1} – алифатическим группам С-Н. В спектре композита не наблюдается сдвига полос поглощения, следовательно, химических связей между хитозаном и гидроксиапатитом не образуется, т. е. они соединены механическим образом.

Биологические свойства покрытий

Результаты культивирования стромальных стволовых клеток на исследуемых имплантатах показали, что клетки, положительно окрашивающиеся на ЩФ, располагаются в порах покрытия (рис. 3). Щелочная фосфатаза считается маркером остеобластов [17], дифференцирующихся в процессе культивирования из стромальных стволовых клеток. Наши

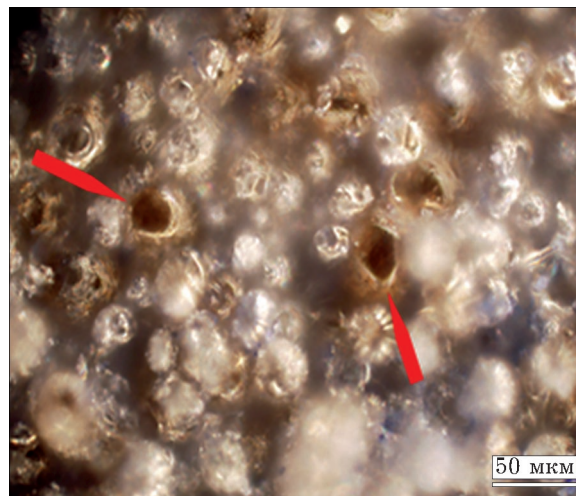


Рис. 3. Поверхность композитов Са-Р/Х2 при окраске на щелочную фосфатазу. Стрелками указаны места расположения позитивно окрашенных клеток.

результаты показывают, что большинство стромальных клеток костного мозга присоединяются к покрытию Са-Р/Х2 после первых 3 сут культивирования.

Нами установлено, что клетки преимущественно связываются с хитозаном. Эти данные указывают на то, что покрытие Са-Р/Х2 более эффективно для присоединения стромальных клеток костного мозга, чем покрытие Са-Р. Полученные результаты также подтверждают нашу гипотезу о том, что биосовместимость, несомненно, возрастает при добавлении хитозана. Данный факт связан со

ТАБЛИЦА 4

Тест эктопического костеобразования покрытий Са-Р и СаР-Х2

Номер образца	Воспаление	Инкапсуляция имплантата	Тканевая пластинка	Гистология
Са-Р/Х2				
1	–	–	+	Кость с костным мозгом
2	–	–	+	Кость с костным мозгом
3	–	–	+	Кость (балки) с костным мозгом
4	–	–	+	Кость слабая
Са-Р				
1	–	–	+	Соединительная ткань
2	–	–	+	Грубоволокнистая кость + костный мозг.
3	–	–	+	На покрытии основное вещество кости незрелое
4	–	–	+	Грубоволокнистая кость + костный мозг.
				На покрытии основное вещество кости незрелое



Рис. 4. Поперечный срез тканевой пластинки, выросшей на покрытии Ca-P/X2 в тесте эктопического гистогенеза: 1 – костная ткань, 2 – костномозговые полости, заполненные костным мозгом (3). Окраска гематоксилином-эозином.

структурными изменениями покрытия Ca-P. Есть предположение, что химическая структура хитозана схожа с гликозаминогликаном – ключевой молекулой внеклеточной жидкости, регулирующей морфологию и функцию клеток [18]. Благодаря этому сходству хитозан может обеспечивать присоединение клетки. Результаты тестирования эктопического костеобразования показали, что введение хитозана увеличивает вероятность роста кости до 100 % (табл. 4). Результаты гистологического анализа имплантатов, проведенного после их извлечения из мышей, указывают на образование костной ткани (рис. 4).

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что введение хитозана приводит к сглаживанию рельефа поверхности покрытия в силу окутывания хитозаном глобул фосфатов кальция. Иногда происходит связывание Ca-P и хитозана с образованием сетчатой структуры.

2. Добавление хитозана приводит к уменьшению содержания кристаллической апатитовой фазы и увеличению содержания как аморфной, так и бруситовой фаз. При введении хи-

тозана размеры кристаллитов, формирующих сферолиты, значительно уменьшаются.

3. В спектре композита не наблюдается сдвига полос поглощения, следовательно, химических связей между хитозаном и гидроксиапатитом не образуется, т. е. они соединены механическим образом.

4. Композиты Ca-P/X модулируют *in vitro* и *in vivo* функциональную активность и дифференцировку стромальных стволовых клеток в остеогенном направлении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Жоголев К. Д., Никитин В. Ю., Цыган Е. Н., Князькин И. В., Котик Н. С., Егоров В. Н., Пахомов Е. Ю. Регуляция остеогенеза и иммуногенеза репаративных процессов. СПб.: Изд-во ВМА, 2003. С. 54–60.
- 2 Sorlier P., Denuziere A., Viton C., Domard A. // *Biomacromol.* 2001. Vol. 2. P. 765–772.
- 3 Dong Y. M., Qiu W. B., Ruan Y. H., Wu Y. S., Wang M. A., Xu C. Y. // *Polym. J.* 2001. Vol. 33. P. 387–389.
- 4 Felt O., Furrer P., Mayer J. M., Plazonnet B., Buri P., Gurny R. // *Int. J. Pharm.* 1999. Vol. 180. P. 185–193.
- 5 Patashnik S., Rabinovich L., Golomb G. // *J. Drug Targ.* 1997. Vol. 4. P. 371–380.
- 6 Song J. S., Such C. H., Park Y. B., Lee S. H., Yoo N. C., Lee J. D., Kim K. H., Lee S. K. // *Eur. J. Nucl. Med.* 2001. Vol. 38. P. 489–497.
- 7 Muzzarelli R. A. A. // *Cell Mol. Life Sci.* 1997. Vol. 53. P. 131–140.
- 8 Koga D. // *Adv. Chitin Sci.* 1998. Vol. 3. P. 16–23.
- 9 He P., Davis S. S., Illum L. // *Int. J. Pharm.* 1998. Vol. 166. P. 75–88.
- 10 Calvo P., Vila-Jato J. L., Alonso M. J. // *Int. J. Pharm.* 1997. Vol. 153. P. 41–50.
- 11 Biagini G., Muzzarelli R. A. A., Giardino R., Castaldini C. Biological Materials for Wound Healing // *Advances in Chitin and Chitosan.* / C. J. Brine, P. A. Sandford, J. P. Zikakis (Eds.). Barking: Elsevier Sci., 1992. Vol. 1. P. 16–24.
- 12 Ueno H., Mori T., Fujinaga T. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. Vol. 52. P. 105–115.
- 13 Felt O., Carrel A., Baehni P., Buri P., Gurny R. // *J. Ocul. Pharm. Ther.* 2000. Vol. 16. P. 261–270.
- 14 Liu X. F., Guan Y. L., Yang D. Z., Li Z., Yao K. D. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2001. Vol. 79. P. 1324–1335.
- 15 Bruijn J. D. de, Dekker D., Brink I. van der // 23rd Annual Meeting of the Soc. for Biomaterials. April 30–May 4, New Orleans, Louisiana, USA. 1997. P. 51.
- 16 Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 320 с.
- 17 Риггз Б. Л., Мелтон Л. Дж. III. Остеопороз. Пер. с англ. СПб.: БИНОМ, Невский диалект, 2000. 560 с.
- 18 Lahiji A., Sohrabi A., Hungerford D. S., Frondoza C. G. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. Vol. 15. P. 586–595.