

УДК 616.7-57.002.1-07

Экспериментальное обоснование применения композитных материалов на основе хитозана и фосфатов кальция для замещения костных дефектов

С.Н. Данильченко¹, О.В. Калинкевич¹, М.В. Погорелов², А.М. Скляр³,
Т.Г. Калиниченко¹, А.Н. Калинкевич¹, В.В. Стариков⁴,
В.И. Бумейстер², В.З. Сикора², Л.Ф. Суходуб¹

¹Институт прикладной физики НАН Украины, Сумы

²Медицинский институт при Сумском государственном университете МОН Украины

³Сумской государственный педагогический университет МОН Украины

⁴Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», Украина

A number of chitosane/hydroxyl apatite composite materials were synthesized from aqueous solutions of a biopolymer and soluble salts-precursors. The composites were obtained in the dense and porous variants. The examinations conducted by the methods of X-ray diffraction analysis and infrared spectroscopy showed that apatite crystals in the composites had structural characteristics similar to those of biogenic apatite. Cylindrical rods, made of chitosane/hydroxyl apatite composite materials, were experimentally implanted into the tibial bone of linear laboratory rats in vivo. Histological and histomorphological studies for assessing osteoconductivity were performed 5, 10, 15 and 24 days after the implantation. The specimens were examined by the method of scanning electronic microscopy with X-ray microanalysis for comparing the elemental composition and morphological characteristics of the implant and bone during the integration. The results of the tests make it possible to conclude that chitosane/hydroxyl apatite composites are bioinert and biocompatible. The porous specimens also demonstrated satisfactory osteoconductive properties and were experimentally replaced in vivo by a newly formed bone tissue.

Проведено синтез ряду хітозан/гідроксилапатитних композитних матеріалів з водних розчин біополімеру та розчинних солей-прекурсорів. Композитні матеріали було одержано у щільному пористому варіантах. Проведені дослідження методом рентгенодифракційного аналізу ІЧ-спектроскопії показали, що кристали апатиту в композитах мають структурні характеристики близькі до характеристик біогенного апатиту. В експериментах in vivo у великогабрильову кістку лінійних лабораторних щурів імплантувати циліндричні стержні, виготовлені з хітозан/апатитних композитних матеріалів. На 5, 10, 15 та 24 днів після імплантації проводили гістологічні та гістоморфологічні дослідження для оцінки остеокондуктивності. Зразки досліджували методом сканувальної електронної мікроскопії з рентгенівським мікроаналізом для порівняння елементного складу та морфологічних характеристик імплантату й кістки впродовж інтеграції. За результат тестів можна зробити висновок, що хітозан/гідроксилапатитні матеріали є біоінертними, біосумісними. Пористі зразки показали таї задовільні остеокондуктивні властивості, оскільки були заміщені в експериментах in vivo и утвореною кістковою тканиною.

Введение

Композиты на основе фосфатов кальция и естественных биополимеров все более широко используются при изготовлении ортопедических биоматериалов [1–3]. Широкий спектр таких материалов для самых различных клинических применений

может быть создан на основе двух компонентов нанокристаллического апатита и хитозана [3].

Уже давно базовым компонентом синтетических материалов для ортопедии и стоматологии служит гидроксилapatит — $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{O}$ который с некоторыми допущениями можно

тять кристалло-химическим аналогом минеральной составляющей тканей скелета животных и людей [8].

Хитин и хитозан представляют собой аморфно-кристаллические биополимеры, для которых характерно явление полиморфизма. Хитозан — простейшее производное хитина, образующееся при его деацетилировании. В процессе деацетилирования хитина заметно уменьшается общая упорядоченность структуры (степень кристалличности снижается до 40–50%), количество структурных модификаций при переходе от хитина к хитозану увеличивается.

Хитин — второй (после целлюлозы) по распространенности в природе полисахарид, строение которого создает предпосылки для успешного применения его производных в самых разнообразных областях. Именно хитин является основой скелетной системы, поддерживающей клеточную структуру тканей в панцирях ракообразных, кутикуле насекомых, клеточной стенке грибов и бактерий. Твердость хитиновых структур в организмах ракообразных и насекомых обусловлена образованием хитин-карбонатного комплекса.

Благодаря биосовместимости с тканями человека, способности усиливать регенеративные процессы при заживлении ран, бактериостатическим/бактерицидным свойствам, биodeградируемости хитин и хитозан представляют большой интерес для медицины.

К сожалению, среди опубликованных работ, посвященных синтезу и аттестации биокомпозиов на основе апатита и хитина/хитозана, лишь малая часть описывает полный цикл исследований, включающий тесты *in vivo* [9]. Для оптимизации

технологий получения и расширения спектра клинических применений этих материалов необходимы систематизированные исследования как физико-химических и структурных характеристик на микронном и нанометровом уровне, так и установление влияния этих характеристик на функциональные свойства в ходе предклинических испытаний. Настоящей публикацией открывается ряд работ, посвященных всесторонним исследованиям концентрационных рядов композитивных биоматериалов на основе апатита кальция и хитозана. Здесь и в последующих публикациях будут описаны механизмы влияния базовых и модифицированных условий синтеза и последующей обработки на структурные, субструктурные и функциональные свойства данного класса биокомпозиов.

Материал и методы

В настоящей работе синтезированы и исследованы концентрационные ряды нанокомпозитивных материалов на основе хитозана и апатита кальция (ChAp), предназначенные для заполнения дефектов кости. Материалы получали путем добавления водных растворов CaCl_2 и NaH_2PO_4 (при соотношении $\text{Ca/P}=1,67$) в 0,2% раствор хитозана в уксусной кислоте (1%) [3]. Необходимый уровень pH поддерживали добавлением NaOH . Продукты синтеза подвергали старению, интенсивной промывке, сушке. Для получения пористых материалов применяли лиофильную сушку. ИК спектры были получены на инфракрасном спектрометре "Spectrum One" ("Perkin Elmer"). Перед измерениями измельченные образцы смешивали с порошком KBr (2,5–3,0 мг ChAp и 300 мг KBr) и прессовали в твердую таблетку.

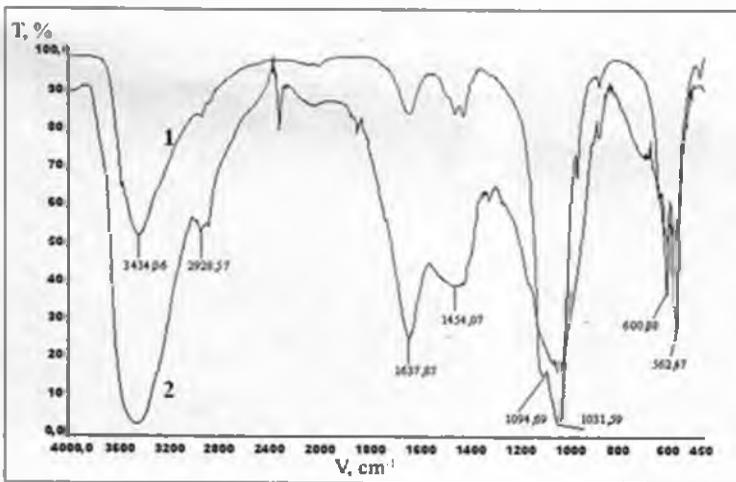


Рис. 1. Кривые инфракрасных спектров гидроксилапатита (1) и ChAp (2)

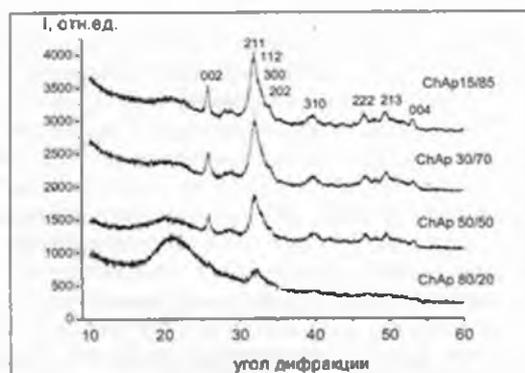


Рис. 2. Кривые рентгенодифракционных характеристик образцов ChAp с разным исходным соотношением компонентов

Рентгеноструктурные исследования были выполнены на дифрактометре ДРОН4-07 («Буревестник», Россия). Использовали излучение $\text{CuK}\alpha$ (длина волны 0,154 нм) при условиях фокусировки по Брэггу — Брентано (θ - 2θ) (2θ — 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 8 до 50° . Все процедуры обработки экспериментальных данных были выполнены с помощью программного пакета поддержки эксперимента и обработки результатов (DIFWIN-1, ТОО «Эталон ПТЦ»).

Исследования методом растровой электронной микроскопии с рентгеновским микроанализом выполнены на приборе РЭММА-102 (SELM, Украина). Прибор позволяет визуализировать исследуемую поверхность образца в широком диа-

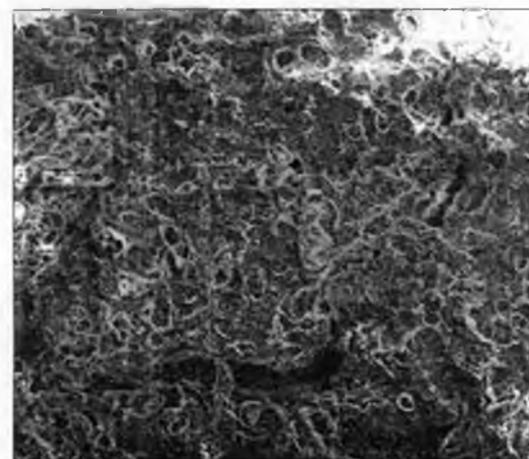


Рис. 3. Электроннограмма микроструктуры пористого ChAp

пазоне увеличений с разрешением порядка 10 нм и получать данные об элементном составе из анализа характеристических рентгеновских спектров, возбуждаемых электронным зондом. В данной работе ускоряющее напряжение для электронного зонда было 20 кВ, ток зонда 2 нА, зона возбуждения характеристического рентгеновского излучения, формирующего аналитический сигнал, составляла около 4 мкм. Аналитический сигнал накапливался при сканировании поверхности образца 50×50 мкм.

Для предотвращения накопления поверхностного заряда при электронно-зондовом эксперименте образцы покрывали тонким слоем (30–50 нм) серебра в вакуумной установке ВУП-5М (SELM, Украина).

Для экспериментов *in vivo* использовали 48 линейных лабораторных крыс. В верхней трети правой большеберцовой кости всех животных в стерильной операционной стоматологическим бором наносили сквозной дефект диаметром 2 мм. В экспериментальной группе в дефект были имплантированы цилиндрические хитозан/апатитные стержни, диаметр стержней соответствовал диаметру травмы. Контрольная группа состояла из животных с аналогичными дефектами большеберцовой кости, которые не заполняли исследуемым материалом. Животных выводили из эксперимента на 5, 10, 15 и 24 сутки после имплантации. Сроки изъятия соответствовали основным стадиям репаративного остеогенеза согласно Н.В. Дедух и Н.А. Коржу [10]. Извлеченные кости с дефектами фиксировали в 10% формалине и затем помещали в парафин для приготовления гистологических препаратов. Некоторые образцы кости были обработаны глутаровым альдегидом для электронной



Рис. 4. Электроннограмма имплантированного ChAp

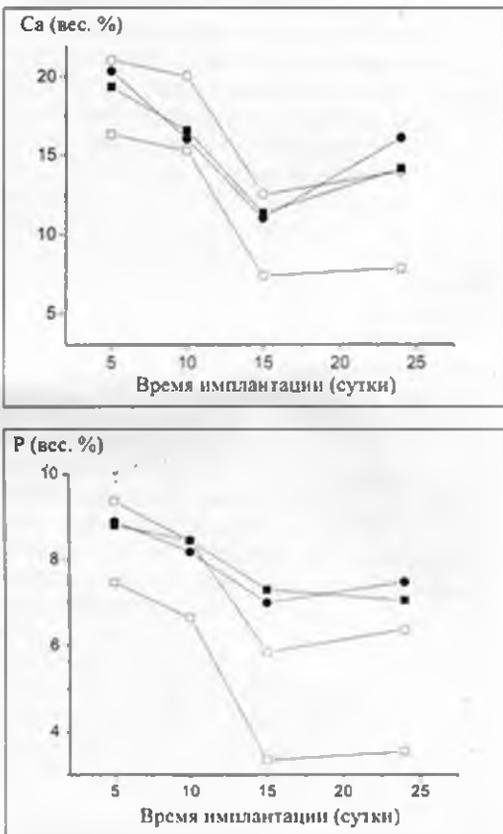


Рис. 5. Кривые содержания Ca и P в костной ткани вблизи места имплантации (квадраты) и на удалении (15 мм) (кружки) в зависимости от времени (незакрашенные символы соответствуют контрольному эксперименту: дефект без имплантата); нулевое время — интактная кость

микроскопии. После 5, 10, 15 и 24 суток имплантации проводили гистологический и гистоморфологический анализ извлеченных тканей. Элементный состав и морфологические характеристики тканей изучали с помощью электронной микроскопии с рентгеновским микроанализом. В это же время из хвостовой вены отбирали кровь для биохимического анализа. Определяли уровень кальция в сыворотке, активность щелочной фосфатазы и общее содержание белка.

Для приготовления гистологических препаратов выделяли участок кости с дефектом, который фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили декальцинацию в растворе трилона Б на протяжении двух месяцев, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Готовили гистологические срезы толщиной 10–12 мкм и окрашивали их гематоксилин-эозином и по Ван-Гизон. Полученные препа-

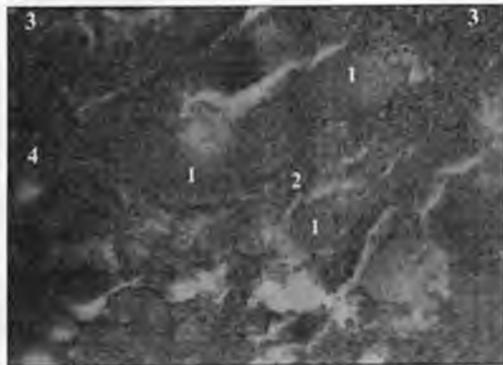


Рис. 6. Микрофотография области дефекта большеберцовой кости крысы через 5 суток после нанесения травмы: 1) СbAr; 2) пора с клетками посттравматической гематомы; 3) грануляционная ткань; 4) капилляр

раты изучали с помощью светового микроскопа "OLIPUS". Изображения сохраняли на винчестере со следующей печатью цветных иллюстраций.

Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерных программ «Видео Тест 5.0» и «Видео размер 5.0». Через 5 суток после нанесения дефекта изучали клеточный состав регенерата, который описывали в виде процента отдельных популяций клеток от их общего количества в участке дефекта. Проводили подсчет фибробластов, макрофагов, лимфоцитов, плазмочитов, нейтрофилов и малодифференцированных клеток. В гистологических препаратах, полученных в следующие стадии репаративного остеогенеза, проводили определение процентного содержания грануляционной, фиброретикулярной, грубоволокнистой и пластинчатой костной ткани, а также красного костного мозга. Проводили также измерение толщины костных трабекул на периферии и в центральном участке дефекта, а также общую площадь сосудов в регенерате.

Результаты и их обсуждение

Исследования концентрационных рядов СbAr методами инфракрасной спектроскопии, рентгеновской дифракции и растровой электронной микроскопии с микроанализом показали:

- все полосы поглощения инфракрасных спектров соответствуют гидроксилapatиту, хотя их ширина значительно увеличивается с увеличением доли хитозана (рис. 1);
- картины рентгеновской дифракции свидетельствуют о присутствии нанокристаллического апатита, и его кристалличность с увеличением доли хитозана уменьшается (рис. 2);
- соотношение Ca/P в образцах СbAr примерно

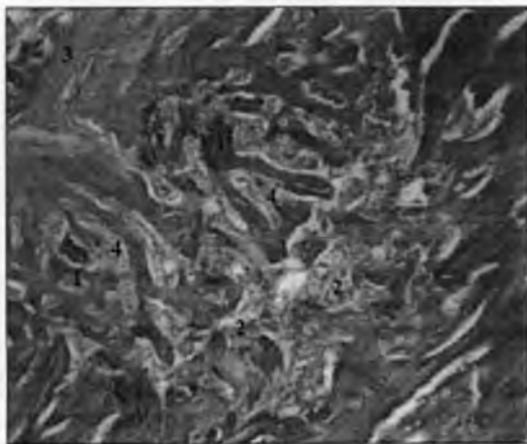


Рис. 7. Микрофотография области дефекта большеберцовой кости крысы через 10 суток после нанесения травмы: 1) ChAp ; 2) грануляционная ткань; 3) фиброретикулярная ткань; 4) костные балочки

равно апатитному (1,67), материалы после лиофильной сушки имеют сеть пор микронного и субмикронного масштаба (рис. 3).

Из уширения линий рентгеновской дифракции (прибор ДРОН4-07), обратно пропорционального размерам кристаллитов, следует, что чем больше хитозана в композите, тем меньше средний размер кристаллитов апатита. Качественные оценки ширины профиля основных дифракционных линий указывают на то, что при соотношении хитозан/апатит, равном 50/50, размеры кристаллитов в композите сравнимы с размерами кристаллитов биоапатита костной ткани (~20 нм) [8,11]. Несколько завышенная интенсивность пиков (002) и (004), по сравнению со справочными данными (JCPDS



Рис. 8. Микрофотография области дефекта большеберцовой кости крысы через 15 суток после нанесения травмы: 1) ChAp ; 2) фиброретикулярная ткань; 3) костные балочки; 4) «материнская» кость

№9-432), свидетельствует о вытянутости кристаллитов апатита вдоль кристаллографической оси c , что характерно и для биоапатита костной ткани.

Применение лиофильной сушки непосредственно после промывки и старения образцов позволяло получать пористые материалы, на микроскопических изображениях которых (рис. 3) морфологически различимы две системы пор. Измерение и статистическая обработка показали, что «малые» поры имеют средний размер 29,9 мкм, «большие» — 51,0 мкм. Такие поры должны способствовать прорастанию костной ткани в имплантированный материал.

В ходе экспериментов *in vivo* цилиндрические штифты были внедрены в искусственные дефекты берцовой кости лабораторных крыс (рис. 4). Методом электронно-зондового микроанализа (прибор РЭММА-102) были определены локальные концентрации кальция и фосфора в костной ткани. На рис. 5 представлены результаты определения Ca и P в костях модельных животных после имплантации биоматериала ChAp с соотношением компонентов 50/50. В данной серии экспериментов были использованы материалы, не подвергавшиеся лиофильной сушке, т.е. не имеющие специально созданной пористости. Однако и в этом случае хорошо видно (рис. 5), что в присутствии имплантированного ChAp восстановление концентраций Ca и P в костной ткани вблизи дефекта происходило значительно быстрее, чем в контрольном эксперименте (искусственный дефект не заполнен имплантатом). Характеристические рентгеновские спектры исходных образцов ChAp не содержали пиков Na и Cl , что свидетельствовало о том, что в результате синтеза получен апатит, не имеющий

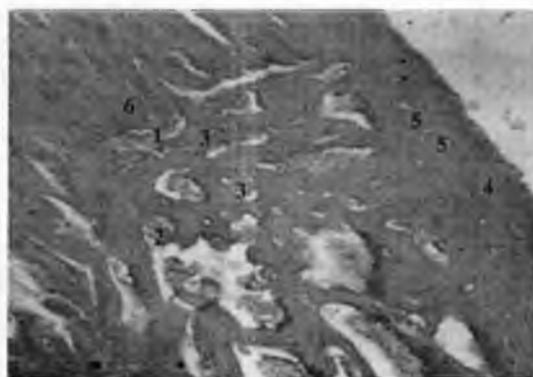


Рис. 9. Микрофотография области дефекта большеберцовой кости крысы через 24 суток после нанесения травмы: 1) ChAp ; 2) фиброретикулярная ткань; 3) грубоволокнистая костная ткань; 4) пластинчатая костная ткань; 5) остеон; 6) «материнская» кость

замещений в катионной ($\text{Na} \rightarrow \text{Ca}$) и анионной ($\text{Cl} \rightarrow \text{OH}$) подрешетках.

Эти данные свидетельствуют о том, что наноразмерные кристаллы апатита, инкорпорированные в хитозановую матрицу, при имплантации *in vivo* принимают непосредственное участие в восстановительных биохимических процессах живой костной ткани. Как видно, именно Ca и P из кристаллов апатита имплантированного материала используются для построения регенерата, что снижает необходимость мобилизации этих элементов из костной ткани как в областях, прилегающих к дефекту, так и удаленных от него.

При имплантации ChAr композита в область дефекта с первых сроков наблюдаются выраженные остеокондуктивные свойства материала. На рис. 6 отчетливо видны поры, заполненные типичным для данной стадии регенерации клеточным и тканевым составом. В регенерате преобладает молодая грануляционная ткань (ГТ), содержание которой составляет $25,25 \pm 5,14\%$. Мы не наблюдали тесной связи тканевых компонентов с материалом имплантата, что, возможно, связано с малым сроком наблюдения и высокой скоростью образования грануляционной ткани. ГТ занимает периферические отделы дефекта, что соответствует подобной картине у контрольных животных. Центральные поры имплантата заполнены в основном клетками посттравматической гематомы, среди которых встречаются макрофаги, лимфоциты, фибробласты, плазмочиты и малодифференцированные клетки. Процентный состав клеток соответствовал таковому у контрольной группы животных. В одном поле зрения наблюдались различные фенотипы клеток — молодые секреторные, зрелые, переполненные детритом макрофаги, клетки в состоянии гибели. Во внутренних порах наблюдалась размытость краев материала, что может свидетельствовать о начале интеграции ChAr и большей активности клеток в данном участке дефекта. Как в периферических, так и в центральных порах наблюдается прорастание сосудов, в основном синусоидного типа, окруженных слоем периваскулярных клеток и секреторных фибробластов, количество которых больше в периферических отделах.

Через 10 дней после введения имплантата происходит его интенсивная биодеградация и формирование тканеспецифических структур регенерата. Как видно на рис. 7, в области дефекта наблюдается активный рост фиброретикулярной ткани (ФТ) с более упорядоченным расположением волокон и начало образования костных балочек, сформированных грубоволокнистой костью. ФТ распо-

ложена в основном по периферии дефекта, в то время как его центральные отделы выполнены остатками грануляционной ткани с большим количеством фибробластов, макрофагов и синусоидных капилляров. Впервые наблюдается формирование грубоволокнистой костной ткани (КТ), что свидетельствует о протекании репаративных процессов по остеобластическому типу. Процентное содержание КТ соответствует контрольной серии животных ($34,58 \pm 9,27\%$), поэтому мы не можем говорить о наличии остеондуктивных свойств имплантата. В то же время прослеживается интеграция материала в структуру регенерата и тесные взаимосвязи формирующихся костных балочек и ChAr.

Гистологическая картина регенерата через 15 суток близка к таковой на 10 сутки (рис. 8). Тканевый состав представлен фиброретикулярной и костной тканями. Последняя формирует более плотную сеть балочек, нежели в предыдущем сроке наблюдения. Полностью отсутствует грануляционная ткань. Происходит активная перестройка грубоволокнистой кости в пластинчатую и ее минерализация, о чем свидетельствует увеличение интенсивности окрашивания костных трабекул. Процентное отношение ФТ, грубоволокнистой и пластинчатой кости составляет соответственно $28,43 \pm 7,97\%$, $40,21 \pm 9,65\%$ и $10,87 \pm 3,22\%$, что соответствует контрольной серии животных. Остатки имплантата в основном расположены в центре дефекта, тесно связаны с формирующимися костными балочками и имеют неоднородную окраску, что свидетельствует об их интеграции в новообразованной матрикс кости.

На 24 сутки наблюдения основную площадь дефекта занимает костная ткань (рис. 9). Глубокие отделы регенерата сформированы грубоволокнистой КТ, интенсивность восприятия красителей которой приближается к «материнской» кости. Уменьшается количество остеобластов на поверхности трабекул, что свидетельствует о прекращении интенсивных процессов образования костного матрикса и начале процессов ремоделирования. Остатки недеградировавшего ChAr отщесняются к периферии и находятся на границе с «материнской» костью. Наблюдается тесная связь имплантата с новообразованным костным матриксом, менее заметная — с «материнской» костью. Кортикальная пластинка в месте дефекта образована в основном пластинчатой костью, в которой наблюдаются интенсивные процессы ремоделирования, о чем свидетельствует наличие как вторичных, так и первичных остеонов. Количество последних в данный срок наблюдения

значительно больше. Таким образом, можно говорить о завершении первичного формирования новообразованной кости и начале процессов ремоделирования. Остатки имплантата тесно интегрированы в новообразованный матрикс и подлежат биодеградации в процессе перестройки кости.

Выводы

Результаты работы демонстрируют высокие потенциальные возможности хитозан/апатитных композитов в качестве материалов для ортопедии и стоматологии. Как плотные, так и пористые материалы являются биоинертными и биосовместимыми, а пористые хитозан/гидроксилапатитные материалы показывают также хорошие остеокондуктивные свойства. Полное замещение пористых хитозан/гидроксилапатитных имплантатов новой формирующейся костной тканью в эксперименте происходит на 24 сутки после имплантации.

Литература

1. Wahl D.A. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair / D.A. Wahl, J.T. Czernuszka // *European Cells and Materials*. — 2006. — №11. — P.43–56.
2. Chang M.C. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite / M.C. Chang, C.C. Ko, W.H. Douglas // *Biomaterials*. — 2003. — №24. — P.2853–2862.
3. Rusu V.M. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles

- as self-organized organic-inorganic composite materials / V.M. Rusu, C.H. Ng, M. Wilke [et al.] // *Biomaterials*. — 2005. — №26. — P.5414–5426.
4. Yamaguchi I. Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites / I. Yamaguchi, K. Tokuchi, H. Fukuzaki et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2001. — №55. — P.20–27.
 5. Hu Q. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture / Q. Hu, B. Li, M. Wang [et al.] // *Biomaterials*. — 2004. — № 25. — P.779–785.
 6. Zhang Y. Synthesis and characterization of macro-porous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering / Y. Zhang, M.Q. Zhang // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2001. — №55. — P.304–312.
 7. Ito M. In vitro properties of a chitosan-bonded hydroxyapatite bone-filling paste / M. Ito // *Biomaterials*. — 1991. — №12. — P.41–45.
 8. Elliott J.C. Calcium Phosphate // *Biominerals* / In Kohn M.J., Rakovan J., Hughes J.M. (eds) *Phosphates: geochemical, geobiological and materials importance. Series: "Reviews in mineralogy and geochemistry"*: vol. 48 [Mineralogical Society of America]. — Washington, DC, 2002. — P. 427–454.
 9. Ge Z. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes / Z. Ge, S. Bagueard, L.Y. Lim [et al.] // *Biomaterials*. — 2004. — №25. — P.1049–1058.
 10. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации. (Сообщ. 1) / Н.А. Корж, Н.В. Дедух // *Ортопед. травматол.* — 2006. — №1. — С.77–84.
 11. Danilchenko S.N. Determination of the Bone Mineral Crystallite Size and Lattice Strain from Diffraction Line Broadening / S.N. Danilchenko, O.G. Kukharenko, C. Moseke [et al.] // *Cryst. Res. Technol.* — 2002. — Vol. 37, №11. — P. 1234–1240.