

ПОЛУЧЕНИЕ БИОМИМЕТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА И ГИДРОКСИАПАТИТА

© В. Ж. Корокин, Е. Н. Буланов, А. В. Князев

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
E-mail: vit-korokin@yandex.ru

Поступила в Редакцию 30 октября 2018 г.
После доработки 10 декабря 2018 г.
Принята к публикации 10 декабря 2018 г.

*Описан новый подход к синтезу биомиметических материалов на основе наночастиц гидроксиапатита и суспензии коллагена, полученной из отходов рыбного производства. В результате одновременного совместного осаждения *in vitro* происходит образование частично минерализованных фибрилл коллагена. Процесс аналогичен стадии минерализации при образовании костной ткани, происходящей *in vivo*. Описанный способ получения биомиметического композитного материала коллаген–гидроксиапатит может служить основой получения материалов для регенеративной медицины.*

Ключевые слова: наногидроксиапатит, рыбный коллаген, золь-гель метод, минерализация, биокомпозитный материал.

DOI: 10.1134/S0044461819030113

В настоящее время производство синтетических аналогов костной ткани является особенно актуальной задачей химического материаловедения. Во-первых, число людей, страдающих заболеваниями костей (остеопороз, остеосаркома), растет с каждым годом. Ситуация осложняется также возрастающим количеством травм, связанных с нарушением функций костной ткани. Во-вторых, современное развитие медицины требует качественно новых типов биоматериалов. В отличие от широко применяемых в настоящее время титановых имплантатов такие материалы должны не только временно заменять костный участок, но и срастаться с собственной костной тканью пациента [1–3].

В связи с вышесказанным пристальное внимание уделяется биомиметическим материалам — материалам, имитирующим свойства биоматериалов или созданным на основе принципов, реализованных в живой природе. Костная ткань представляет собой органо-неорганический композит, состоящий в основном из коллагена первого типа, гидроксиапатита (ГАП) и воды. Создание наиболее полного аналога костной ткани человека является важнейшей целью современных исследований в данной области.

Коллаген представляет собой фибриллярный белок, который обеспечивает прочность и гибкость кости. В экспериментах по получению медицинских материалов обычно используют коллаген, полученный из дермы (соединительно-тканная часть кожи у позвоночных животных и человека, расположенная под эпидермисом) свиней, сухожилий крупного рогатого скота и хвостов крыс. Однако в последние годы все большее внимание уделяется рыбному коллагену: он гипоаллергенен, так как на 96% идентичен человеческому белку, обладает трансдермальными свойствами, т. е. способен проникать через эпидермальный барьер во внутренние слои кожи.

Кроме того, дальнейший рост интереса к рыбному коллагену обусловлен тем, что значительная часть крупного рогатого скота подвержена различным инфекционным заболеваниям, в частности губчатой энцефалопатии [4, 5].

Извлечение и использование рыбного коллагена решает еще одну важную отраслевую задачу — сокращение отходов рыбного производства, включающих помимо прочего большое количество белоксодержащих частей (костей, чешуи, внутренних органов), которые составляют от 30 до 70% сырья. Отсутствие рационального использования отходов приводит,

с одной стороны, к потере чрезвычайно важного белкового продукта, а с другой — к загрязнению окружающей среды и нарушению Международной конвенции о предотвращении загрязнения моря сбросами отходов и других материалов [6].

ГАП представляет собой неорганическое соединение идеализированного состава $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Будучи полным химическим и кристаллохимическим аналогом минерального компонента костной ткани, ГАП не вызывает иммунной реакции организма и поэтому широко используется в медицине (стоматология, хирургия, косметология) [7–9]. В настоящей работе представлен новый подход к извлечению суспензии коллагена из отходов производства рыбы, а также к *in vitro* получению биокомпозитных материалов (коллагеновых фибрилл, минерализованных ГАП) в качестве первой стадии производства материалов для замены костной ткани.

Экспериментальная часть

Приготовление суспензии рыбного коллагена. Для реализации метода получения суспензии рыбного коллагена использовали отходы рыбного производства — шкуры рыбы лосося атлантического *Salmo salar*. На первом этапе шкуры очищали от чешуи, мышечной ткани и жира, измельчали электрическим диспергатором с диаметром пор 3.5 мм. Коллагенсодержащее сырье 3 раза промывали водопроводной водой в течение 30–50 мин, что обеспечивало растворение минеральных солей исходного материала. После этого сырье заливали 3%-ным раствором ортофосфорной кислоты при жидкостном коэффициенте 5, оставляли на 15–18 ч (время, в те-

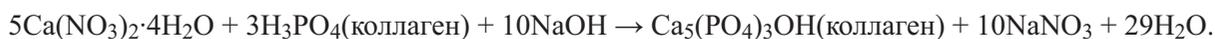
чение которого большая часть коллагена из исходного материала растворяется) и, периодически помешивая, отфильтровывали через два слоя капроновой ткани (размер пор 0.45 мкм).

В результате была получена коллагеновая дисперсия с содержанием коллагена 6–8% и молекулярной массой 300–350 кДа, которую можно хранить в течение нескольких месяцев в холодильнике при температуре 2–8°C. Выход коллагена составляет 40–70% относительно массы обезвоженного сырья [10].

Получение композитного материала на основе коллагена и ГАП. Процесс минерализации представляет собой «сборку» нанокристаллов ГАП непосредственно на поверхности фибрилл коллагена. В связи с вышесказанным процесс проводили следующим образом: 0.15 М раствор нитрата кальция в бидистиллированной воде смешивали с дисперсией коллагена в ортофосфорной кислоте (концентрация кислоты 1.47 моль·л⁻¹) для достижения значения $\text{Ca/P} = 1.67$, соответствующего стехиометрическому составу.

Поскольку фибриллогенезис коллагена происходит при температуре тела человека (37–40°C), а ГАП начинает формироваться при значении кислотности среды выше $\text{pH} > 5$, данные условия были воспроизведены в текущем эксперименте с помощью нагрева системы в термостате Lauda Alpha A24 и добавления 1 М раствора NaOH.

Полученную смесь термостатировали в течение 1 ч, затем центрифугировали и высушивали без дополнительного термического воздействия. Химический процесс, происходящий при получении первичной гомогенной смеси, можно описать следующим уравнением реакции:



Фазовую индивидуальность полученного неорганического вещества контролировали с помощью рентгеновского дифрактометра XRD-6000 Shimadzu (CuK_α -излучение, геометрия θ - 2θ) в интервале $2\theta = 10$ – 60° с шагом сканирования 0.02° . Регистрацию ИК-спектров образцов, приготовленных в виде таблеток с бромидом калия, проводили на ИК-Фурье-спектрометре FTIR-8400S Shimadzu в области 4000 – 400 см⁻¹ с разрешением 1 см⁻¹ и накоплением сигнала 20 сканов.

Для аттестации параметров структуры и морфологии образцов использовался растровый электронный микроскоп JEOL JSM-IT300LV Jeol с энерго- и волнодисперсионными приставками Oxford Inst.

Анализ проб на общее содержание углерода, водорода и азота осуществляли с использованием элементного анализатора Vario EL cube для одновременного определения углерода, водорода и азота.

Обсуждение результатов

В результате проведения реакции по описанной выше методике были получены образцы биокомпозитных материалов — минерализованных фибрилл коллагена. В синтезированном композитном материале, как следует из рис. 1, основным неорганическим компонентом является ГАП, а наличие сопутствующих или примесных фаз не выявлено.

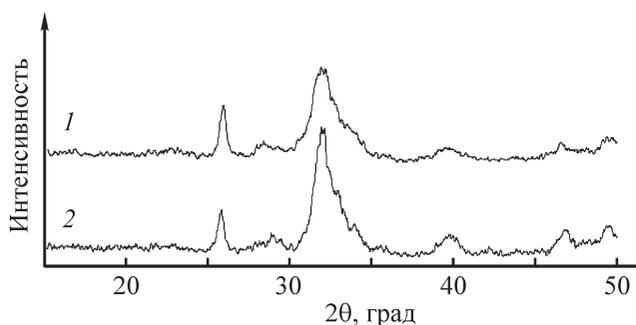


Рис. 1. Порошковая рентгенограмма биокompозита на основе коллагена и гидроксиапатита (1) и материала природного происхождения (2).

Другим подходом к определению фазового состава исследуемых материалов была ИК-спектроскопия. ИК-спектроскопические исследования подтвердили сходство функционального состава полученного композитного материала и материала имплантата природного происхождения (рис. 2).

Для исследуемых материалов в ИК-спектрах наблюдались типичные амидные полосы, характерные для коллагена. Полоса при 1650 см^{-1} , соответствующая амиду I, обусловлена валентными колебаниями связи $\text{C}=\text{O}$ карбонильных групп и является чувствительным маркером вторичной структуры пептида. Деформационные колебания связи $\text{N}-\text{H}$ при 1547 см^{-1} соответствуют амиду II. Обнаруженные полосы поглощения характеризуют колебания пептидной связи белка и подтверждают коллагеновую природу изучаемых образцов [11]. Типичные полосы поглощения при 2930 , 2852 , 1740 см^{-1} , которые относятся к валентным колебаниям метиленовой ($-\text{CH}_2-$), метильной ($-\text{CH}_3$) и ацетильной ($-\text{C}=\text{O}$)

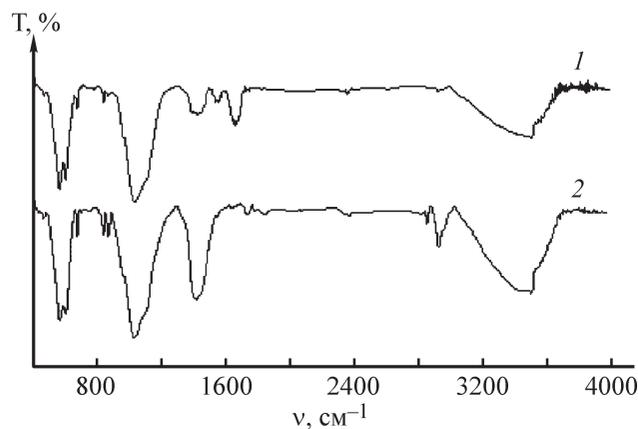


Рис. 2. ИК-спектр материала природного происхождения (1) и биокompозита на основе коллагена и гидроксиапатита (2).

групп соответственно, также были идентифицированы в спектрах.

Полоса поглощения при 675 см^{-1} соответствует колебаниям амидных групп в белке. Колебания связи $\text{C}-\text{N}$ в пирролидиновом кольце пролина и гидрокси-пролина обнаружены при 1443 см^{-1} [12].

Кроме того, в дополнение к полосам, характерным для коллагена, в спектрах также наблюдаются полосы, типичные для ГАП. Полосы поглощения при 1030 (ν_3), 561 (ν_4) и 606 см^{-1} (ν_4) соответствуют валентным асимметричным колебаниям групп PO_4 . Широкая полоса при 3505 см^{-1} относится к колебаниям гидроксильной группы [13].

Также в спектрах композита и имплантата природного происхождения были обнаружены полосы поглощения карбонатной группы [$\nu_2(\text{C}-\text{O})$] при 873 см^{-1} и [$\nu_3(\text{C}-\text{O})$] при 1550 см^{-1} , подтверждающие образование карбонатгидроксиапатита. Таким образом, исследованные образцы содержали некоторое количество групп CO_3^{2-} . Согласно литературным данным, карбонат-ионы частично замещают фосфат-ионы, т. е. образуются карбонатгидроксиапатиты типа Б [14].

Слабая полоса при 750 см^{-1} относится к колебаниям связи $\text{Ca}-\text{O}$ [15]. Наличие данной полосы в композитном материале свидетельствует о том, что между ионами кальция Ca^{2+} ГАП и ионами $-\text{COO}^-$ карбонильной группы аминокислот в коллагене образуется химическая связь.

Данный факт подтверждает наличие химического взаимодействия двух фаз с образованием органо-неорганического композиционного материала, который играет важную роль в улучшении механических свойств конечного материала [16].

Результаты CHN-анализа показали общее количество органического компонента на уровне $20\text{ мас}\%$ в материале имплантата природного происхождения и около $10\text{ мас}\%$ в полученном композите. Общий элементный состав исследуемых образцов был установлен с использованием микронзондового анализа. Молярное отношение кальция к фосфору составило 1.58 для композитного материала, что меньше соответствующей величины для стехиометрического апатита 1.67.

При образовании нестехиометрических кристаллов может потребоваться более длительное время для встраивания ионов кальция в кристаллическую решетку апатита для достижения стехиометрического состава. Этот факт может объяснить дефицит кальция в полученных композитных материалах, т. е. полученный ГАП представляет собой дефектный гидроксиапатит с размером кристаллов около 30 нм . Это обуславливает более низкую кристалличность

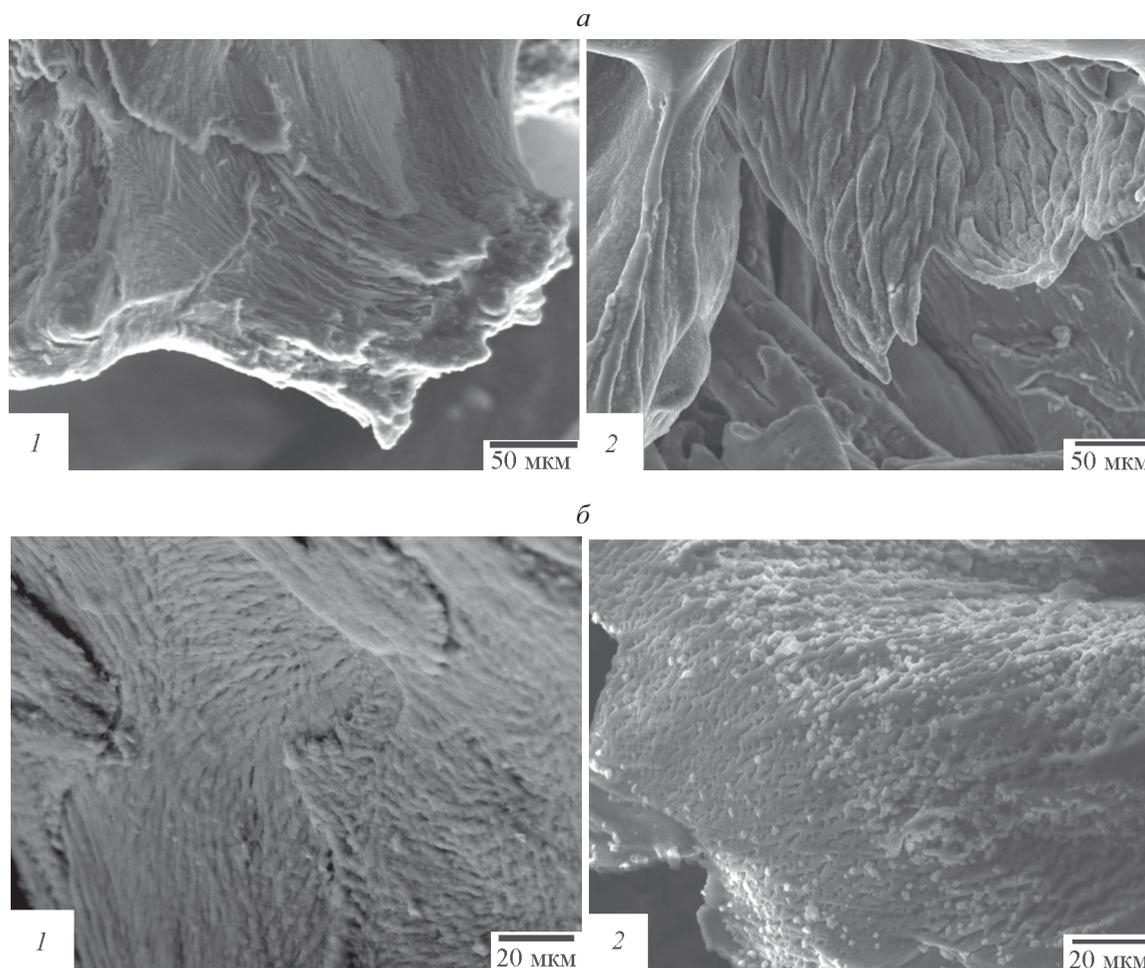


Рис. 3. Микрофотографии образцов природного материала (1) и биокompозита (2).

Увеличение: *а* — 400, *б* — 800.

и более высокую растворимость по сравнению со стехиометрическим ГАП и делает его аналогичным ГАП нативной кости человека [17].

Следует также отметить, что коллагеновые фибриллы выступают в роли каркаса для осаждения кристаллов ГАП. Образование коллагеновых фибрилл и их дисперсия будут определять гомогенность композитного материала. Когда раствор коллагена в фосфорной кислоте контактирует с Са-содержащим раствором, образование коллагеновых фибрилл происходит в результате локального увеличения значения pH на дне реакционного сосуда. Одновременно происходит осаждение кристаллов ГАП на поверхности коллагеновых волокон с образованием наногранул. В случае проведения синтеза при перемешивании локальная концентрация, размер и форма гранулы могут варьироваться.

В живых организмах костная ткань формируется при выходе минеральных компонентов и коллагена в межклеточное пространство [18]. При этом в местах

разрыва фибрилл коллагена, которые формируют волокна ткани, возникают точки роста кристаллов ГАП.

Такие разрывы, как и точки роста ГАП, встречаются периодически и обуславливают кристаллические домены, повторяющиеся на протяжении всего волокна (рис. 3). Такие минерализованные коллагеновые волокна сами формируют различные ткани, в том числе костную и другие соединительные ткани.

Выводы

Композитные материалы на основе коллагена и гидроксиапатита были получены с использованием метода совместного осаждения *in vitro*. Этот метод позволяет объединить процесс образования коллагеновых фибрилл и гидроксиапатита в одностадийном процессе, где обе реакции протекают одновременно. Коллагеновые фибриллы выступают в качестве каркаса для осаждения наногидроксиапатита в процессе совместного осаждения. Описанный способ может

приводить к образованию гомогенного костно-имитационного коллаген-апатитного композита. Однако точное управление такими параметрами, как гомогенность и дефектность гидроксиапатита на поверхности коллагеновых фибрилл, остается актуальной задачей, заслуживающей дальнейшего изучения. Используя современные методы исследования, мы доказали, что процесс его образования аналогичен процессу минерализации коллагена в живом организме.

Благодарности

Автор выражает благодарность сотрудникам комбината питания ННГУ Л. А. Пановой и Н. И. Федянцева за предоставленные материалы для исследования, а также Е. А. Потаниной за предоставление приборов во временное пользование и техническую помощь в оформлении статьи.

Финансирование работы

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии» (Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского), а также при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-33-601721 мол_а_дк).

Список литературы

- [1] *Ben-Nissan B.* // *Current Opinion Solid State Mater. Sci.* 2003. V. 7. P. 283–288.
- [2] *Wei D., Zhou Y., Jia D., Wang Y.* // *Surface Coatings Technol.* 2007. V. 201. P. 8715–8722.
- [3] *Best S. M., Porter A. E., Thian E. S., Huang J.* // *J. Eur. Ceram. Soc.* 2008. V. 28. P. 1319–1327.
- [4] *Heidaria F., Razavib M., Ghaedid M., Forooghia M., Tahririe M., Tayebie L.* // *J. Alloys Compd.* 2017. V. 693. P. 1150–1156.
- [5] *Zahn D., Hochrein O., Kawska A., Brickmann J., Kniep R.* // *J. Mater. Sci.* 2007. V. 42. P. 8966–8973.
- [6] <http://www.imo.org/en/OurWork/Environment/LCLP/Documents/LC1972.pdf> (дата обращения: 30.10.2018).
- [7] *Weiner S., Wagner H. D.* // *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998. V. 28. P. 271–298.
- [8] *Yano K., Namikawa T., Uemura T., Wakitani S., Takaoaka K., Nakamura H.* // *Bone.* 2011. V. 48. P. s166.
- [9] *Bulanov E. N., Boldin M. S., Knyazev A. V., Korokin V. Zh., Popov A. A.* // *High Temperature Mater. Processes.* 2018. V. 37. P. 613–617.
- [10] Пат. РФ 2567171 (опубл. 2015). Способ получения уксуснокислой дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена.
- [11] *Vidal B.* // *Acta Histochem.* 2014. V. 116 (8). P. 1359–1366.
- [12] *Lacerda C., Plepis A. M. G., Goissis G.* // *Quím. Nova.* 1998. V. 21. P. 267–271.
- [13] *Knyazev A. V., Chernorukov N. G., Bulanov E. N.* // *Mater. Chem. Phys.* 2012. V. 132. P. 773–781.
- [14] *LeGeros R. Z., LeGeros J. P., Trautz O. R., Shirra W. P.* // *Adv. X-ray Anal.* 1971. V. 14. P. 57–65.
- [15] *Socrates G.* *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts.* Wiley, England, 2001. 347 p.
- [16] *Alonso-Sierra S., Velázquez-Castillo R., Millán-Malo B., Nava R., Bucioc L., Manzano-Ramírez A., Cid-Luna H., Rivera-Muñoz E. M.* // *Mater. Sci. Eng. C.* 2017. V. 80. P. 45–53.
- [17] *Wang J., Liu C.* // *J. Bionic Eng.* 2014. V. 11. P. 600–609.
- [18] *Aparicio C., Ginebra M. P.* *Biomaterialization and Biomaterials: Fundamentals and Applications.* Woodhead Publ., UK, 2015. 482 p.