

## 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-

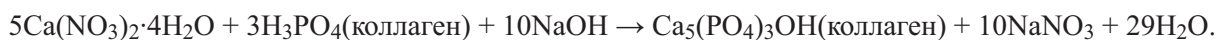
чение которого большая часть коллагена из исходного материала растворяется) и, периодически помешивая, отфильтровывали через два слоя капроновой ткани (размер пор 0.45 мкм).

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<sup>-1</sup>) 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 ( $\text{CuK}_\alpha$ -излучение, геометрия  $\theta$ - $2\theta$ ) в интервале  $2\theta = 10$ – $60^\circ$  с шагом сканирования  $0.02^\circ$ . Регистрацию ИК-спектров образцов, приготовленных в виде таблеток с бромидом калия, проводили на ИК-Фурье-спектрометре FTIR-8400S Shimadzu в области  $4000$ – $400$  см<sup>-1</sup> с разрешением 1 см<sup>-1</sup> 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.

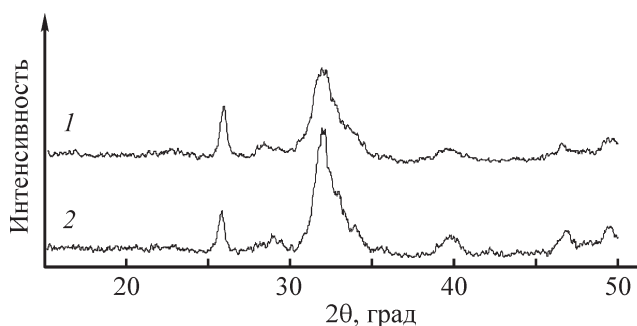


Рис. 1. Порошковая рентгенограмма биокompозита на основе коллагена и гидроксиапатита (1) и материала природного происхождения (2).

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  $1650\text{ см}^{-1}$ , 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  $1547\text{ см}^{-1}$  соответствуют амиду II. Обнаруженные полосы поглощения характеризуют колебания пептидной связи белка и подтверждают коллагеновую природу изучаемых образцов [11]. Типичные полосы поглощения при  $2930$ ,  $2852$ ,  $1740\text{ см}^{-1}$ , которые относятся к валентным колебаниям метиленовой ( $-\text{CH}_2-$ ), метильной ( $-\text{CH}_3$ ) и ацетильной ( $-\text{C}=\text{O}$ )

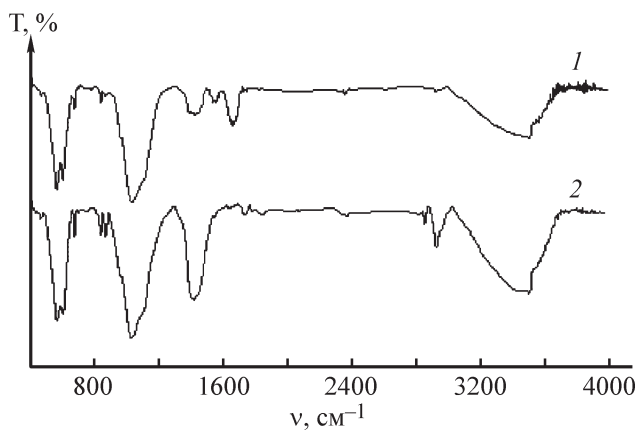


Рис. 2. ИК-спектр материала природного происхождения (1) и биокompозита на основе коллагена и гидроксиапатита (2).

групп соответственно, также были идентифицированы в спектрах.

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

Кроме того, в дополнение к полосам, характерным для коллагена, в спектрах также наблюдаются полосы, типичные для ГАП. Полосы поглощения при  $1030$  ( $\nu_3$ ),  $561$  ( $\nu_4$ ) и  $606\text{ см}^{-1}$  ( $\nu_4$ ) соответствуют валентным асимметричным колебаниям групп  $\text{PO}_4$ . Широкая полоса при  $3505\text{ см}^{-1}$  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  $873\text{ см}^{-1}$  и [ $\nu_3(\text{C}-\text{O})$ ] при  $1550\text{ см}^{-1}$ , подтверждающие образование карбонатгидроксиапатита. Таким образом, исследованные образцы содержали некоторое количество групп  $\text{CO}_3^{2-}$ . Согласно литературным данным, карбонат-ионы частично замещают фосфат-ионы, т. е. образуются карбонатгидроксиапатиты типа Б [14].

Слабая полоса при  $750\text{ см}^{-1}$  относится к колебаниям связи  $\text{Ca}-\text{O}$  [15]. Наличие данной полосы в композитном материале свидетельствует о том, что между ионами кальция  $\text{Ca}^{2+}$  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  $30\text{ нм}$ . Это обуславливает более низкую кристалличность

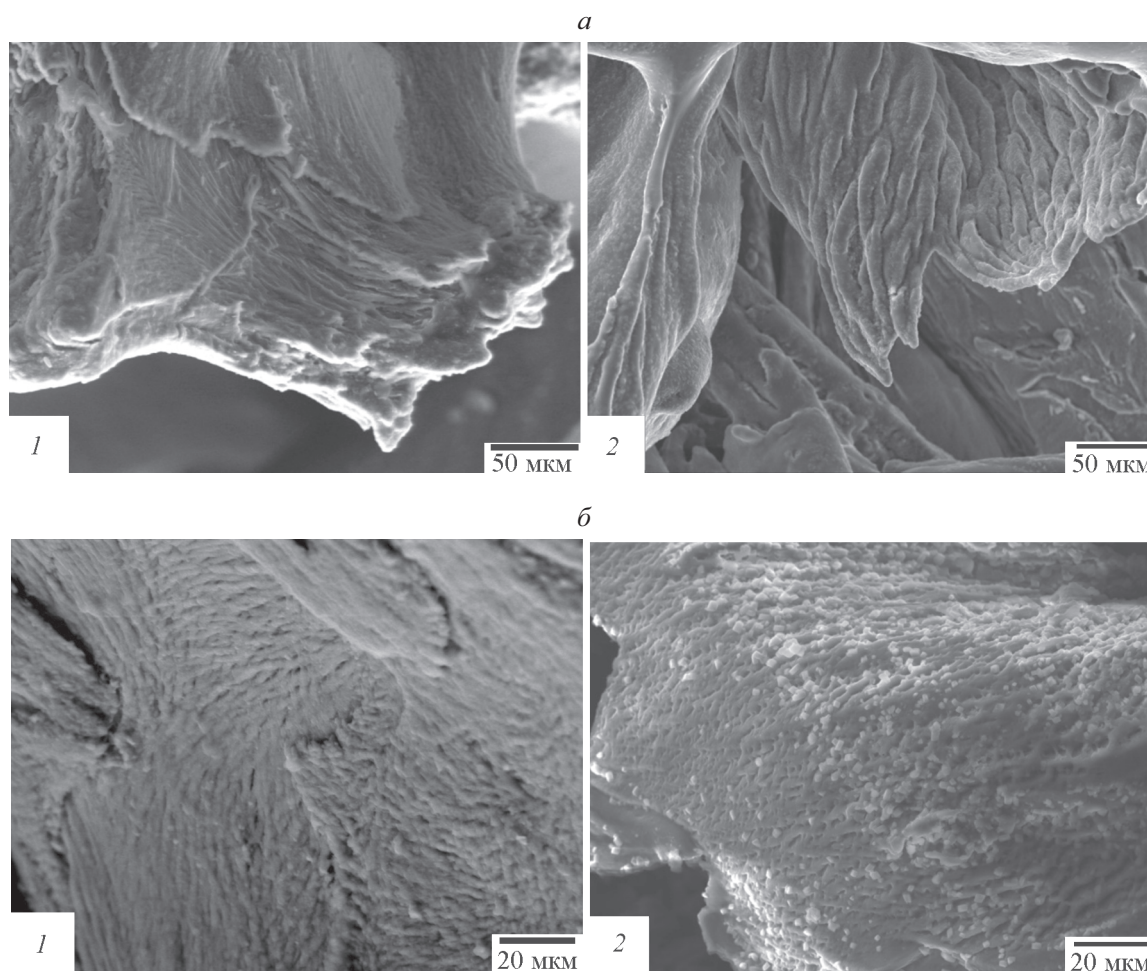


Рис. 3. Микрофотографии образцов природного материала (1) и биокompозита (2).

Увеличение: *a* — 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.* *Biomineralization and Biomaterials: Fundamentals and Applications.* Woodhead Publ., UK, 2015. 482 p.