

Композиционный материал на основе поли-2-гидроксиэтилметакрилата с включением микрочастиц гидроксиапатита

Аннотация

В целях создания костных трансплантатов получен и исследован физико-химическими методами органо-минеральный композиционный материал (КМ), в котором синтетический гидроксиапатит (ГАП) (30...60 % вес.) структурно интегрирован в матрицу гидрогеля поли-2-гидроксиэтилметакрилата (ПГЭМА). КМ обладает однородной и изотропной микроструктурой, механической прочностью ≈ 11 МПа, высокой степенью водонабухания, достигающей 34 %, и эластичностью в физиологических условиях (деформация при разрушении – 57 %).

Введение

Заболевания костной системы и травматизм представляют собой глобальную медико-социальную проблему, поэтому существует необходимость в высокотехнологичных и недорогих методах производства массово доступных имплантатов. Синтетические имплантаты пока еще уступают природным по своим механическим и структурным свойствам, что, однако, не мешает рассматривать их как более перспективные. Так, было показано, что искусственно полученный гидроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГАП) практически идентичен по биосовместимости, биоинертности и остеокондуктивности гидроксиапатиту нативной кости. Вследствие этого, ГАП начал широко применяться в композиционных материалах (КМ) биомедицинского назначения. В качестве органической связующей этих материалов используют полимерные гидрогели.

Поли-2-гидроксиэтилметакрилат (ПГЭМА) – один из наиболее широко распространенных в медицине гидрогелей. ПГЭМА входит в состав клеевых композиций для костной ткани и имплантатов в офтальмологии, стоматологии, пластической хирургии. В настоящее время ведутся исследования по минерализации ПГЭМА гидроксиапатитом; в частности, разработаны методики введения ГАП в объеме (3D) как электрохимическим путем [1], так и полимеризацией *in situ* [2]. В последнем случае получен механически прочный КМ с высоким отношением ГАП/ПГЭМА (до 50 % ГАП). Материалу было присвоено название FlexBon, и он стал базой для дальнейшей модификации с целью получения частично биоразлагаемого КМ [3].

Ранее нами синтезирован ГАП [4], имеющий средний гидродинамический диаметр частиц $\approx 2,0$ мкм. Размер частиц наполнителя имеет большое значение для свойств КМ, прежде всего для его остеокондуктивной активности, поскольку именно на частицах ГАП формируется особое биохимическое микроокружение благодаря сорбции их поверхностью белков, индуцирующих остеогенез. Кроме того, известно, что частицы малого размера лучше интегрируются в полимерную матрицу. Поэтому использование полученных образцов микроразмерного ГАП для создания материалов для имплантатов представлялось перспективным.

Нами также разработан новый способ синтеза гидрогеля ПГЭМА с использованием катализатора – комплексного соединения ванадия [5]. Методика синтеза характеризуется простотой, высокой (практически 100%-й) полнотой полимеризации, возможностью проведения реакции в аэробных условиях как в блоке, так и в растворителях (вода, спирты) при невысокой температуре.

Цель настоящего исследования состояла в разработке простого способа получения КМ на основе ПГЭМА и ГАП по реакции полимеризации *in situ*. Дополнительным преимуществом предлагаемого метода представлялось применение соединения ванадия, поскольку известно [6], что инсулин-миметические агенты, к которым относится используемый катализатор, оказывают стимулирующее действие на регенерацию костной ткани.

Материалы и методы

Синтез ГАП осуществляли реакцией конденсации путем механоакустической активации реакционного водного раствора $\text{CaHPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ и $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [4].

Катализатор $\text{VO}(\text{DMSO})_5 \times (\text{ClO}_4)_2$ синтезировали по методике [7]. Мономер 2-гидроксиэтилметакрилат (ГЭМА) (ФГУП «Научно-исследовательский институт», г. Дзержинск) очищали от примесей дистилляцией в вакууме, отделяя фракцию с температурой кипения 67°C при давлении 3,5 мм рт. ст.

Реакцию полимеризации проводили методом полимеризационного наполнения в смеси мономера с добавкой пластификатора (3 % вес. глицерина) в присутствии частиц наполнителя (ГАП), на поверхность которого предварительно был нанесен катализатор в количестве 3 % вес.

Механические испытания на одноосное растяжение образцов КМ шириной 9 мм, длиной 90 мм и толщиной 2 мм проводили на приборе фирмы «Instron 1122». База испытаний составляла 26 мм, скорость траверсы – 1 мм/мин для твердых образцов КМ; для равновесно набухших в воде образцов – 28 мм и 10 мм/мин соответственно. Из кривых растяжения были рассчитаны механические характеристики: предел пропорциональности $\sigma_{\text{п}}$ – наибольшее напряжение, при котором выполняется закон Гука; предел прочности σ – напряжение, соответствующее наибольшему значению нагрузки, предшествующей разрушению образца; относительная деформация при разрушении ϵ и модуль упругости E . Предел прочности определяли как отношение разрушающей нагрузки к площади поперечного сечения образца. Модуль упругости рассчитывали по формуле $E = \Delta P \cdot l_0 / (\Delta l_{\text{ср}} \cdot S_0)$, где ΔP – нагрузка; l_0 , S_0 – начальные длина и площадь поперечного сечения образца; $\Delta l_{\text{ср}}$ – среднее значение удлинения образца на упругом участке диаграммы. Образцы КМ готовили следующим образом: для испытаний в высокоэластичном состоянии их доводили до равновесного набухания в воде; твердые образцы получали после отмывки примесей водой с последующим длительным высушиванием в вакууме.

ИК-спектры регистрировали в отражательном режиме с помощью Фурье спектрометра «Nicolet 380» («Thermo Electron Corporation») на кристалле ZnSe. Содержание непрореагировавшего мономера в КМ определяли по электронному спектру ГЭМА, диффундировавшего в воду из размолотых образцов. Спектры регистрировали на спектрофотометре «Beckman DU-8», использовали пик с $\lambda_{\text{max}} = 209$ нм и коэффициентом экстинкции $1,05 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Кинетику равновесного водонабухания исследовали для образцов КМ в форме прямоугольного параллелепипеда с размерами 10 x 10 x 2 мм. Водопоглощение α рассчитывали из отношения $\alpha = (\Delta W / W_0) \cdot 100 \%$, где W_0 – начальный вес образца; ΔW – его изменение в процессе набухания в воде. Содержание солей в воде после экспозиции цилиндрического образца КМ высотой 35 мм и диаметром 9 мм с массовой долей ГАП 45 % в течение 4 суток определяли гравиметрией.

Микроструктура композита была изучена методом сканирующей электронной микроскопии на приборе «Tescan Mira LMU» при значениях ускоряющего напряжения 5 кВ и тока 100 пА в режиме высокого вакуума без напыления.

Результаты

Полимеризацию ГЭМА проводили методом полимеризационного наполнения, варьируя массовую долю ГАП в диапазоне 30...60 % вес., что близко к содержанию минерального компонента природной костной ткани [8]. Полноту полимеризации контролировали по полосе поглощения двойных связей мономера ν 1636 см^{-1} . На рис. 1 представлены спектры ИК исходных веществ и полученного КМ. Спектр исходного ГАП (2) аналогичен приведенному в литературе [9]. Сравнение спектров мономера (1) и КМ (4) показывает относительное уширение полосы поглощения ОН-групп в диапазоне 3200...3700 см^{-1} , обусловленное дополнительным вкладом сигнала гидроксильных групп ГАП. В спектре КМ (4) наблюдается практически полное расходование двойной связи мономера, так же как и в продукте полимеризации ГЭМА в отсутствие ГАП (спектр 2). Высокая полнота полимеризации, достигающая при синтезе КМ величины, близкой к 100 %, подтверждена опытами по определению остаточного количества ГЭМА. Оказалось, что содержание непрореагировавшего мономера в КМ, содержащем 60 % вес. ПГЭМА, не превышает $(0,27 \pm 0,08)$ % от первоначального. Аналогичные значения получены нами для блочной каталитической полимеризации ГЭМА [5]. Интересно отметить, что присутствие ГАП, по-видимому, не оказывает существенного влияния на механизм полимеризации. В целом ИК-спектр КМ (4) представляет собой суперпозицию спектров ГАП (3) и ПГЭМА (2) и не содержит новых полос поглощения, что указывает на отсутствие химической связи между органической и минеральной компонентами КМ.

Полученный КМ представляет собой однородный твердый материал, набухающий в воде. Его гидрогелевые свойства достаточно выражены: поглощение воды образцами с содержанием ГАП 40 % вес. через 50 ч практически достигает своего предела и составляет около 34 %. Следует подчеркнуть, что гидрогелевые свойства и формирование сшивок обеспечиваются в отсутствие сшивающих реагентов, что отличает предлагаемый нами способ от других. Для сравнения нами был изучен образец, дополнительно содержащий 3 % вес. сшивающего агента – диметакрилата этиленгликоля. Оказалось, что возрастание числа сшивок существенно – до 22 % – снижает, как и ожидалось, способность КМ сорбировать воду. То есть разработанный метод позволяет регулировать плотность сетки и обусловленные этим параметром свойства путем введения сшивающих добавок. Ранее мы [5] определили максимальную величину степени водопоглощения $\alpha_{\text{max}} \approx 40$ % трехмерного продукта каталитической полимеризации ГЭМА. Сравнение данного значения с α_{max} КМ с учетом доли полимера в нем говорит о том, что присутствие ГАП приводит к относительному

увеличению массы поглощенной воды, что говорит об участии в процессе гидратации молекулярных агрегатов апатита.

Исследуемый материал при набухании в H_2O и в физиологическом растворе проявляет свойства эластомера. На это указывают сравнительные реологические характеристики набухших в воде и исходных сухих образцов КМ (табл. 1). При этом в набухом состоянии прочность КМ более чем вдвое превышает прочность набухшего ПГЭМА без наполнителя: $\sigma = 0,32$ МПа (данные работы [10]). Кроме того, материал характеризуется высокой эластичностью: деформация при разрушении достигает 57 %.

Таблица 1

Физико-механические свойства набухших и твердых образцов КМ состава ПГЭМА/ГАП = 60 / 40 (вес)

	Сухой образец	Набухший образец
Прочность σ , МПа	11	0,795
Модуль упругости E , МПа	1210	–
Деформация при разрушении ϵ , %	1,34	57
Предел пропорциональности σ_p , МПа	4,29	–

Значения σ , ϵ , E , определенные для сухих образцов КМ, близки к реологическим характеристикам керамических материалов, которые широко используются для мелкой костной пластики, в стоматологии и т. д. Сравнивая полученный результат с приведенными в литературе значениями предела прочности костной ткани, следует иметь в виду, что последние сильно разнятся и находятся в диапазоне 40...100 МПа. Так, в работе [11] приводятся следующие значения: $\sigma = 80$...90 МПа; $\sigma_p = 27$ МПа; $E = 230$ МПа; $\epsilon = 1$ %.

Таким образом, синтезированный КМ представляет собой достаточно жесткий и прочный материал, характеризующийся повышенным сопротивлением при упругой деформации. Меньшая по сравнению с нативной костной тканью прочность КМ ($\sigma = 11$ МПа) вероятно обусловлена относительно крупным размером зерен ГАП, поэтому использование наноразмерного минерала может быть одним из путей улучшения механических характеристик КМ.

Следует подчеркнуть, что в процессе набухания материала практически не происходит десорбции ГАП: содержание солей в воде составляет менее 1 % от его исходного веса. Отсюда можно заключить, что минерал достаточно прочно связан полимерной матрицей, что, однако, не свидетельствует о химическом взаимодействии. Так, авторы работы [2] объясняют превосходное связывание ГАП в материале FlexBon специфи-

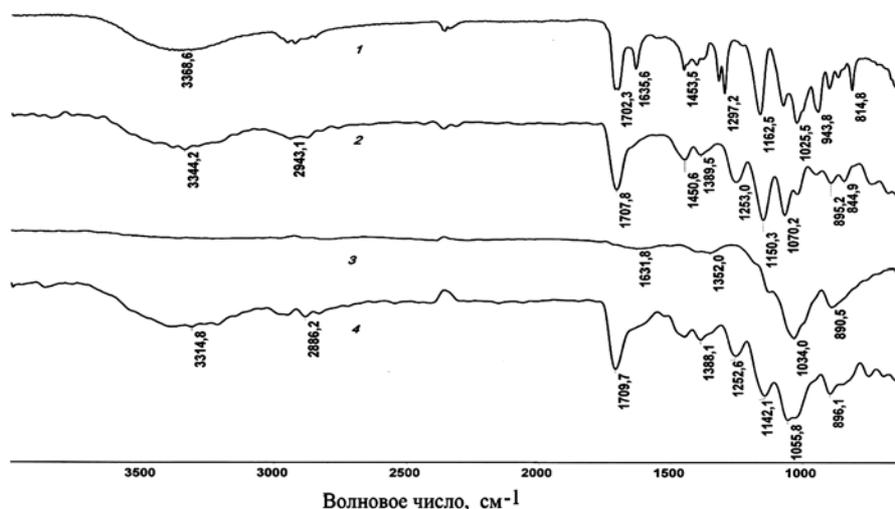


Рис. 1. ИК-спектры: 1 – ГЭМА; 2 – ПГЭМА, полученного в присутствии катализатора в концентрации 1 мМ; 3 – поверхности микрокристаллического ГАП; 4 – композита с массовой долей ГАП 40 %

кой строения гидрогеля ПГЭМА, а именно высоким содержанием гидроксильных групп. Действительно, представляется вполне очевидным, что взаимодействие ГАП и ПГЭМА обусловлено возникновением водородных связей между частицами этих соединений. Кроме того, имеет место структурная интеграция ГАП в сетке полимера. Интеграция ГАП обеспечена собственно методом полимеризационного наполнения, при котором реакция начинается непосредственно на поверхности минеральных частиц с нанесенным катализатором. Известно, что КМ, полученные таким образом, характеризуются более тесным контактом между матрицей и наполнителем за счет физических сил и равномерным распределением последнего в дисперсионной среде.

Морфологию полученного КМ исследовали методом СЭМ (рис. 2).

Как видно из рис. 2б, материал имеет однородное и изотропное строение, т. е. СЭМ подтверждает предопределенную способностью синтеза равномерность распределения кристаллических зерен ГАП в полимере. Кристаллиты минерала имеют преимущественно кубическую форму, их размер варьирует от 0,5 до 3,0 мкм, средний размер составляет $\approx 1,5$ мкм (рис. 2а).

Выполненное ранее [5] электронно-микроскопическое исследование гидрогеля ПГЭМА показало, что основным элементом его надмолекулярной структуры являются глобулы, ассоциированные в структуры более высокого порядка (цепи). Воздействие дисперсионной фазы приводит к утрате полимером вторичной структуры – на микрофотографиях полученного КМ не обнаруживаются глобулярные образования. Кроме того, следует отметить, что в отличие от ПГЭМА [5] образцы КМ, высушенные после набухания, не содержат следов воздействия воды – их микрофотографии совершенно идентичны рис. 2б.

Как следует из сравнения микрофотографий рис. 2б, в, в противоположность полимерной матрице строение дисперсионной фазы (ГАП) не изменяется в процессе синтеза КМ, что свидетельствует скорее о структурной совместимости ГАП и ПГЭМА, чем о химическом взаимодействии. Таким образом, несмотря на прочность связи между полимером и минералом исследования методами ИК-спектроскопии и СЭМ не обнаружили доказательств ее ковалентной природы.

В заключение следует отметить, что при синтезе КМ не были использованы токсические вещества. Так, известно, что ПГЭМА и ГАП не представляют опасности для здоровья, а комплексы ванадия с органическими лигандами применяются для коррекции сахарного диабета [12]. Результаты исследования токсичности катализатора приведены в [7] и показывают безопасность его использованных концентраций. Напротив, для материала FehVon [2] стоит задача очистки от радикального инициатора полимеризации и растворителя – высокотоксичного соединения – этиленгликоля.

Заключение

Получен органоминеральный КМ на основе синтетического гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГАП) и поли-2-гидроксиэтилметакрилата (ПГЭМА) с массовой долей ГАП 30...60 %. Синтез КМ осуществлен методом полимеризационного наполнения. Методом СЭМ доказана однородность и изотропность микроструктуры материала. Обнаружено, что кристаллиты ГАП равномерно распределены в матрице полимера и тесно контактируют с ней за счет нековалентного взаимодействия, которое, по-видимому, обусловлено водородными связями между частицами ГАП и ПГЭМА. Полученный водонабухающий композиционный материал, сочетающий ГАП и ПГЭМА, характеризующийся выраженной эластичностью и достаточно высокой механической прочностью, несомненно имеет перспективу использования при восполнении дефектов и поврежденной костной ткани.

Работа выполнялась при поддержке проекта РФФИ 13-08-01006.

Список литературы:

1. Huang J., Liu G., Song C., Saiz E., Tomsia A.P. Role of molecular chemistry of degradable pHEMA hydrogels in three-dimensional biomimetic mineralization // Chem. Mater. 2012. Vol. 24. PP. 1331-1337.
2. Song J., Xu J., Fillion T., Saiz E., Tomsia A.P., Lian J.B., Stein G.S., Ayers D.C., Bertozzi C.R. Elastomeric high-mineral content hydrogel-hydroxyapatite composites for orthopedic applications // J. Biomed. Mater. Res. A 2009. Vol. 89A (4). PP. 1098-1107.
3. Huang J., Ten E., Liu G., Finzen M., Yu W., Lee J.S., Saiz E., Tomsia A.P. Biocomposites of pHEMA with HA/ β -TCP (60/40) for bone tissue engineering: Swelling, hydrolytic degradation, and in vitro behavior // Polymer. 2013. Vol. 54. PP. 1197-1207.
4. Горшенев В.Н., Еришов Ю.А., Телешев А.Т., Склянчук Е.Д., Просвирин А.А., Григорьев С.А. Гидроксиапатитовые биоконпозиаты медицинского назначения // Медицинская техника. 2014. № 1. С. 30-32.
5. Холуйская С.Н., Филатова А.Г., Дубровский С.А. Исследование морфологии сетчатого материала, полученного каталитической полимеризацией 2-гидроксиэтилметакрилата // Поверхность. Рентген-, синхротр. и нейтрон. исслед. 2014. № 9. С. 27-32.
6. Pat. WO2013082295 A1 (PCT/US2012/067087).
7. Патент РФ № 2559894 (10.09.2014).
8. An Y.H. Mechanical properties of bone / In: An Y.H., Draughn R.A. (editors) Mechanical testing of bone and the bone-implant interface. – Boca Raton CRC Press, 2000. PP. 41-46.

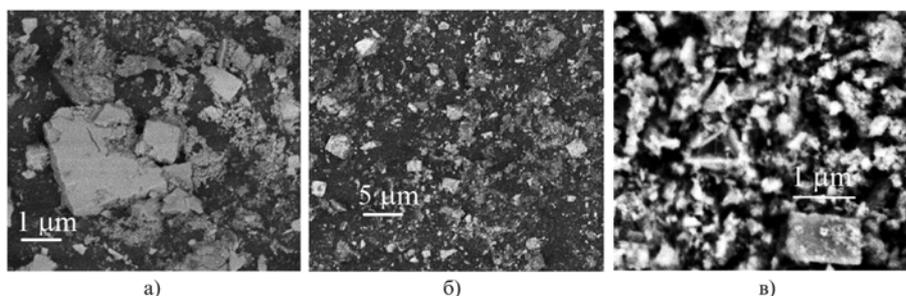


Рис. 2. Электронные микрофотографии КМ на основе ПГЭМА и ГАП при различных разрешениях (а), (б) и исходного синтетического ГАП после нанесения катализатора (в)

9. Голощапов Д.Л., Каишаров В.М., Румянцева Н.А., Середин П.В., Леньшин А.С., Агапов Б.Л., Домашевская Э.П. Получение нанокристаллического гидроксипатита методом химического осаждения с использованием биогенного источника кальция // Конденсированные среды и межфазные границы. 2011. № 4. С. 427-441.
10. Kolarik J., Migliaresi C. Mechanical properties of hydrophilic polymers of 2-hydroxyethyl methacrylate with ethyl acrylate, n-butyl acrylate, and dodecyl methacrylate // J. Biomed. Mater. Res. 1983. Vol. 17. № 5. PP. 757-767.
11. Кирилова И.А., Подорожная В.Т., Легостева Е.В. Костно-пластические биоматериалы и их физико-механические свойства // Хирургия позвоночника. 2010. № 1. С. 80-87.
12. Crans D.C., Smee J.J., Gaidamauskas E., Yang L. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. // Chem. Rev. 2004. Vol. 104. PP. 849-902.

Светлана Николаевна Холуйская,
канд. хим. наук, ст. научный сотрудник,
Институт химической физики
им. Н.Н. Семенова РАН,
Владимир Николаевич Горшенин,
канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН,
Анна Георгиевна Филатова,
канд. хим. наук, научный сотрудник,
Институт химической физики
им. Н.Н. Семенова РАН,
Андрей Терентьевич Телешев,
д-р хим. наук, профессор,
Московский педагогический
государственный университет,
г. Москва,
e-mail: s_n_khol@mail.ru

**А.В. Евтушенко, В.В. Евтушенко, А.Н. Быков, В.И. Сырякин,
Ю.В. Кистенев, Я.Д. Анфиногенова, К.А. Смышляев, И.О. Курлов**

Экспериментальное исследование эффективности радиочастотной деструкции миокарда с применением орошаемого и сухого пенетрирующего активных электродов

Аннотация

В статье отражены физические и биологические принципы радиочастотных систем для абляции миокарда. Показано влияние температуры тканей на их электрическое сопротивление и глубину радиочастотного повреждения, описано различие между орошаемой радиочастотной системой и неорошаемой пенетрирующей при проведении воздействия в различных температурных условиях. Установлено, что неорошаемое пенетрирующее воздействие имеет статистически значимо большую глубину радиочастотного повреждения, чем классическое орошаемое воздействие, за счет более равномерного нагрева всех слоев миокарда, в том числе и на его участках, покрытых жировой тканью. Таким образом, пенетрирующая методика способна обеспечить гарантированную трансмуральность повреждения миокарда при сокращении времени, площади и энергии радиочастотного воздействия, что повышает эффективность хирургического лечения нарушений ритма сердца и снижает риск повреждения окружающих структур сердца.

Введение

В настоящее время основным методом лечения фибрилляции предсердий является хирургический. В эволюции этой техники было сделано много шагов. Принципом каждого из них было создание электрического блока на пути патологического распространения возбуждения в предсердии. Сначала была предложена модификация атрио-вентрикулярного соединения, а затем операции изоляции левого предсердия, процедура «коридор» и пересечение предсердий. Недостатком всех этих методов было отсутствие предсердного вклада в сердечный выброс [1]-[3]. Новая эра в лечении фибрилляции предсердий началась в 1987 году, когда J. Cox предложил операцию «Лабиринт» [4]. Суть этой операции и ее последующих модификаций сводится к нанесению множества определенным образом ориентированных разрезов стенки предсердий с их последующим ушиванием (техника «cut and sew») [2]-[5]. Эта технология позволяет значительно повысить эффективность хирургического лечения фибрилляции предсердий, однако имеет ряд ограничений. Основными недостатками являются трудоемкость, длительность процедуры и высокий риск кровотечения [2], [4], [6]. В связи с этим начался поиск альтернативных методов воздействия на миокард предсердий, которые заменили бы скальпель хирурга и позволили достичь трансмурального повреждения. Наибольшее распространение получили радиочастотные (РЧ) системы. Принцип их действия – резистивный нагрев кардиомиоцитов до 50...55 °С, что гарантирует необратимое повреждение [7]-[9].

Повышение эффективности воздействия радиочастотных систем на миокард остается одной из важнейших проблем со-

временной сердечно-сосудистой хирургии. При использовании переменного тока в диапазоне от 100 до 1000 кГц происходит необратимое повреждение клеток сердечной мышцы, однако структура их при этом не нарушается, что позволяет сохранить целостность полостей сердца [7]. Повреждение кардиомиоцитов с использованием РЧ-систем, проведенное по определенным линиям, вызывает блокирование проведения патологических импульсов, что, в свою очередь, препятствует развитию жизнеугрожающих нарушений ритма сердца. Обязательным условием развития такого блока проведения является повреждение стенки полости сердца на всю толщину, от эпикарда до эндокарда [5], [7], [10]-[12]. Для этого используются различные модификации радиочастотных систем, в основе которых лежит один и тот же принцип воздействия, однако применяются разные схемы работы этих систем или же различные алгоритмы. Так, выделяют монополярное воздействие на миокард, когда активный электрод находится непосредственно в месте воздействия, а пассивный располагается под спиной пациента, либо биполярное воздействие, когда обе бранши электрода располагаются непосредственно в зоне воздействия – одна на эпикарде, а вторая на эндокарде [13]. Тем не менее остается открытым вопрос о том, при каких характеристиках внешней среды воздействие получается максимально эффективным.

Материалы и методы

Мы исследовали сопротивление миокарда и глубину радиочастотного повреждения при различных температурах и воздействии двумя типами монополярных электродов. Были использованы сердца свиней, на которых проводилось РЧ-воз-