

БЕЗОТХОДНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ГИДРОКСИАПАТИТА МЕДИЦИНСКОГО И БИОЛОГИЧЕСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

В. А. Фомичев¹, А. В. Лобанов^{1,2}*

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский педагогический государственный университет», Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия, *e-mail: av.lobanov@mpgu.su

Поступила в редакцию 22.07.2019 г.

Аннотация – Предложена процедура безотходного получения в лабораторных условиях гидроксиапатита (ГАП) медицинского и биологического назначения, предназначенного для изготовления костных имплантатов. Способ состоит из двух стадий: синтеза ГАП в роторно-пульсационном аппарате ионообменным способом, что обеспечивает полноту синтеза и наноразмеры частиц, и стадии последующей очистки продукта. Ключевым моментом разработанной процедуры является дальнейшая утилизация образующихся на стадии очистки промывных вод, которые могут быть использованы как минеральный комплекс, обогащенный азотом, фосфором и кальцием, для подкормки сельскохозяйственных растений. Показано, что полученный минеральный комплекс способствует ускоренному росту растений в агрессивных почвах.

Ключевые слова: безотходное получение, наноразмерный гидроксиапатит, очистка, стимуляторы роста растений.

NON-WASTE PROCEDURE FOR PRODUCING HYDROXYAPATITE FOR MEDICAL AND BIOLOGICAL USE

V. A. Fomichev¹, and A. V. Lobanov^{1,2}*

¹Moscow State Pedagogical University, Moscow, Russia

²N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, *e-mail: av.lobanov@mpgu.su

Received July 22, 2019

Abstract – A procedure has been proposed for non-waste laboratory-scale production of hydroxyapatite (HAP) which can be applied for medical use, i.e. for manufacturing bone implants. The procedure involves 2 steps: synthesis of HAP in a rotary pulsation apparatus by ion-exchange method providing sufficiently good yields of nano-scale particles followed by subsequent purification of the product. The key point of the developed procedure is further utilization of the wash waters from the purification step with their use as a mineral complex additive enriched with nitrogen, phosphorus, and calcium for feeding agricultural plants. It has been demonstrated that the resulting mineral complex contributes to the accelerated growth of plants in aggressive soils.

Keywords: non-waste production, nanoscale hydroxyapatite, purification, plant growth stimulants.

ВВЕДЕНИЕ

В современной медицине актуальной задачей является разработка новых композиционных материалов, способных восстанавливать функции опорно-двигательной системы человека. Наиболее стремительно в этой области развивается научно-техническое направление, которое занимается внедрением в медицинскую практику гибридных материалов для замещения дефектной костной ткани.

Получение гибридных материалов в имплантологии (имплантатов) реализуется по двум основным направлениям [1, 2]: полная или частичная деминерализация донорских тканей растворами кислот; совмещение кальций-фосфатных соединений с синтетическими или природными полимерами, склонными к биodeградации в различных средах.

Важным требованием к биокомпозиту для изготовления имплантатов является его соответствие медико-биологической чистоте. Поэтому возможность универсального использования первого технологического направления ограничена выбором подходящих донорских тканей и методами их очистки. Второе направление более перспективно, так как позволяет получать не только унифицированные остеокондуктивные и остеоиндуктивные материалы с четко заданными свойствами (прочностью, формой, размерами и распределением пор), но и способные контролируемо связывать биоактивные субстанции, например, лекарственные препараты, морфогенетические белки и факторы роста, стимулирующие регенерацию костной ткани [3–7].

ВЫБОР МАТЕРИАЛА И ПРОЦЕДУРЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

Особый интерес представляет использование в качестве минеральной фазы имплантата – гидроксиапатита (ГАП), представителя кальций-фосфатных соединений, имеющего формулу $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ и являющегося главным компонентом костей (45–70 масс.%), а также дентина (70 масс.%), цемента (65 масс.%) и эмали зубов (96 масс.%) [8]. В организме человека ГАП встречается в виде пластинчатых нанокристаллов высотой 2–3 нм, длиной 50 нм и шириной 25 нм [8].

ГАП и коллаген получили широкое применение в имплантологии в качестве компонентов костного матрикса. Хорошо известна эффективность коллаген-ГАП композиции для замещения поврежденной костной ткани и активизации репаративного остеогенеза. В то же время остается нерешенной проблема оптимальной технологической схемы получения композита, что связано с формированием его биомеханической структуры. Крайне важной является задача управления степенью дисперсности ГАП, соразмерной биогенному ГАП, что оказывает существенное влияние на механическую прочность и биосовместимость всей композиции. Для решения данных проблем предлагается использовать специальные промышленные агрегаты (роторно-пульсационный аппарат) или разрабатываются новые комбинации веществ, например, в работах [1, 2, 4] кальций-фосфатные соединения совмещали с природными (альгиновая кислота, желатин, хитозан) и синтетическими полимерами (полигидроксиэтилметакрилат, полилактид).

Одним из наиболее распространенных жидкофазных методов получения ГАП медицинского назначения является химическое осаждение из раствора. Метод имеет следующие преимущества: хорошо изучен, эргономичен, имеет широкий спектр возможностей менять условия синтеза и концентрацию веществ. Для осаждения используют ГАП с $pH > 9$, который предварительно синтезируют двумя известными способами: «конденсационным», где в качестве реагентов выступают гидрофосфат кальция и гидроксид кальция; и «ионообменным», основанным на реакции обмена между тетрагидратом нитрата кальция и гидрофосфатом аммония в водно-аммиачной среде. С точки зрения простоты синтеза и очистки продукта наиболее доступным является «ионообменный» способ.

Известно, что наночастицы ГАП могут в большей степени способствовать остеобластной дифференцировке мезенхимальных клеток – одних из главных клеток остеогенеза [8]. Поэтому крайне желательно в процессе получения ГАП обеспечить получение частиц с размерами в нанодиапазоне. Размеры частиц дисперсной фазы в основном определяются технологией их синтеза. Например, в условиях механоакустической обработки реакционной смеси, состоящей из водно-аммиачных растворов гидрофосфата аммония и нитрата кальция, имеет место образование частиц с диаметром около 20 нм [9]. Механоакустический эффект может достигаться с помощью промышленно значимого роторно-пульсационного аппарата, который было решено применить в данной работе.

Важным этапом получения ГАП медицинского назначения является очистка наноразмерного ГАП, обычно состоящая в его десятикратной промывке после центрифугирования и декантации. Для придания ГАП медико-биологической чистоты его подвергают термообработке при 350°C в течение 30 мин. Дальнейшая промывка связана с большим расходом воды и не может быть признана эффективной. В то же время, 10-кратная промывка снижает влияние загрязнителя, способствуя формированию устойчивой гидратной оболочки вокруг наноразмерных частиц. Анализ промывных вод показал, что в них содержатся нитрат аммония, остатки фосфорной кислоты, катионы металлов, что наводит на мысль о возможности использовать промывные воды качестве минеральных источников питания растений в сельском хозяйстве, что позволило бы расширить ассортимент применяемых минеральных удобрений.

Таким образом, цель настоящей работы состояла в том, чтобы разработать простую и эффективную процедуру получения наноразмерного ГАП медицинского назначения с потенциальным применением его для изготовления костных имплантатов. При этом синтез ГАП предполагалось провести ионообменным способом и рассмотреть возможность практического использования промывных вод, образующихся на стадии очистки ГАП с целью обеспечения безотходной технологии получения конечного продукта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Роторно-пульсационный аппарат (РПА)

В качестве реактора для синтеза был выбран перспективный роторно-пульсационный аппарат (РПА) или S-эмульгатор с приводом от

электродвигателя, предназначенный для получения ультратонких дисперсий (суспензий и эмульсий), гомогенизации, низкотемпературной пастеризации и стерилизации жидких сред, пищевых продуктов и полупродуктов (рис. 1). Благодаря конструкционным особенностям РПА, жидкотекучие среды в зоне обработки подвергаются комплексному механоакустическому воздействию, возникающему за счет больших градиентов скоростей, вихреобразования и высокочастотных пульсаций [10].

Рабочими органами РПА являются титановые диски – два статора и находящийся между ними ротор (рис. 1).

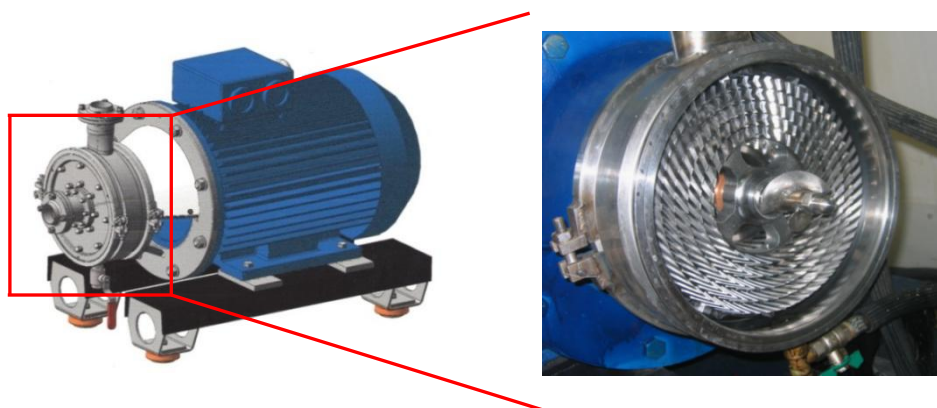


Рис. 1. Общий вид РПА (слева); рабочие компоненты РПА без переднего статора (справа).

В отличие от известных способов синтеза ГАП новый подход позволяет быстро и полно сформировать в водной среде дисперсию ГАП с размерами частиц, соответствующими нанодиапазону.

Синтез ГАП

Процесс синтеза ГАП «ионообменным» способом осуществлялся с включением в технологическую схему РПА. Общая схема обвязки РПА приведена на рис. 2. Использовали реагенты фирмы квалификации ч.д.а. («Химмед», Россия).

Предварительно готовили водно-аммиачные растворы реагентов: тетрагидрат нитрата кальция в количестве 450 г растворяли в 5 л дистиллированной воды, добавляли концентрированный раствор аммиака до pH 10 (раствор № 1). Для приготовления раствора № 2 гидрофосфат аммония в количестве 151 г растворяли в 2 л дистиллированной воды и концентрированным раствором аммиака довели величину pH до 10.

Синтез ГАП с помощью РПА осуществляли следующим образом [5]: При включенном охлаждении в загрузочную емкость РПА (рис. 2) помещали раствор № 1 и запускали двигатель аппарата (2500 об/мин). Далее со скоростью 1–0,5 л/мин в загрузочную емкость вводили раствор № 2. Смесь обрабатывали в рабочем режиме аппарата в течение 2 мин, после выключали охлаждение и выводили дисперсию через сливной кран. Параметры работы двигателя РПА были следующими: мощность 23%, скорость 83%, ток 45 А.

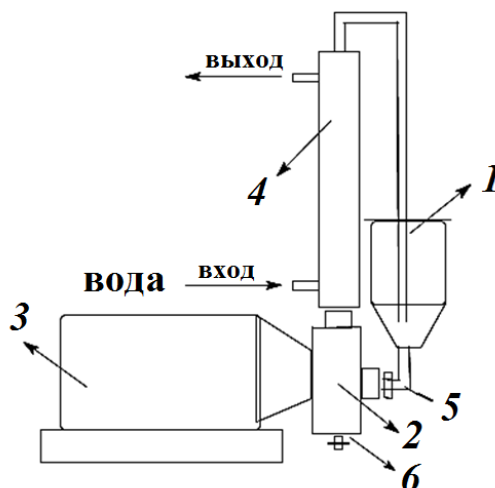
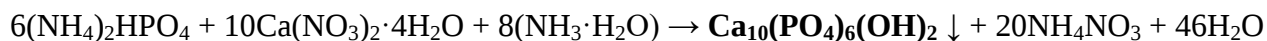


Рис. 2. Схема обвязки РПА: 1 – загрузочная емкость; 2 – РПА; 3 – электродвигатель; 4 – холодильник «труба в трубе»; 5 – термopapa; 6 – сливной кран.

Синтез ГАП проводили согласно уравнению реакции:



Получали белую, однородную, подвижную жидкость, которую разбавляли в 10 раз дистиллированной водой, проводили усреднение интенсивным перемешиванием в течение 1 мин и регистрировали распределение по размерам частиц дисперсной фазы на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Англия).

Очистка ГАП

Полученную дисперсию распределяли по центрифужным пробиркам и разделяли в условиях центробежных сил. После жидкость декантировали, в ультразвуковом поле добавляли новую порцию дистиллированной воды и повторяли центрифугирование, декантацию и промывку. Надосадочную жидкость (Раствор № 3) собирали в отдельную емкость. Очистка ГАП в режиме центрифугирования проводилась на установке Allegro 64R («Beckman», США) в режиме 6000 об/мин по 15–20 мин при 10°C. Ультразвуковое поле создавалось диспергатором МОД МЭФ 391 («Мэлфиз», Россия) с рабочей частотой 22,4 кГц.

Дальнейшую очистку проводили термической обработкой ГАП при 350°C в течение 30 мин. Для этого осадки предварительно переносили на инертную мембрану и фильтровали при пониженном давлении. Фильтрат также собирали в емкость с раствором № 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Размеры частиц дисперсной фазы оценивались с помощью метода динамического светорассеяния. Результаты распределения объемной (массовой) доли частиц в зависимости от их размеров свидетельствуют, что в условиях механоакустической обработки реакционной смеси имеет место

образование наночастиц ГАП с диаметром около 20 нм. После очистки ГАП практический выход составил 185 г (97%) от теоретического 191 г. Таким образом, существует возможность получения наночастиц ГАП медицинского назначения, однако представлялось важным стремление к безотходности предложенного синтеза, а именно к практическому использованию промывных вод.

Дальнейшие испытания проводили с целью оценки возможной утилизации промывных вод, образующихся на стадии очистки (раствор № 3). Раствор содержит соединения трех основополагающих элементов – азота, кальция и фосфора. При этом азот находится в виде двух активных форм – аммонийной и нитратной. Полученный жидкий минеральный комплекс был использован в качестве стимулятора роста растений как подкормочное средство корневой системы и стабилизатор кислотно-щелочного баланса в отношении растений родов *Iris*, *Potentilla*, *Euphorbiaceae*, представителями которых является ирис, лапчатка и молочай.

Растения были посажены в кислых торфяных почвах с pH 4. Отбор почвы проходил на глубине 15 см от поверхности. Стебли были зафиксированы линейкой и обозначены стартовой линией.

Минеральный комплекс готовили путем десятикратного разбавления раствора № 3. Объем раствора, пошедшего на разовую обработку растения, не превышал 150 мл.

Через 24 ч после начала посева ростков в почву вводили минеральный комплекс. Для контрольной группы использовали чистую воду. Далее через каждые 5 дней проводили измерение динамики роста растений и добавляли новую порцию влаги (рис. 3).

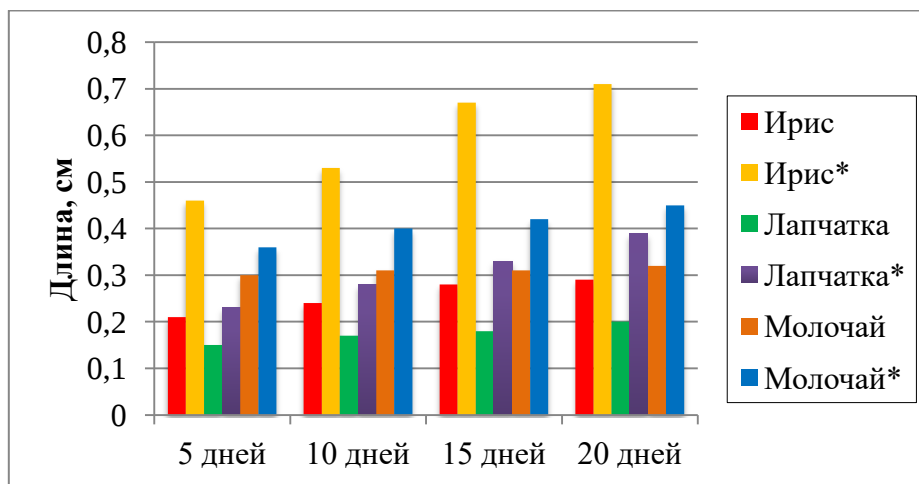


Рис. 3. Диаграмма роста растений в кислых почвах при поливе водой, не содержащей (без *) и содержащей минеральный комплекс (*).

Установлено, что введение в микрофлору почвы минерального комплекса приводит к значительному росту растений в сравнении с обычной водой. Подобная динамика была отмечена для всех образцов. Однако следует отметить, что существенный прирост происходит в первые 5 дней после посева растений, что может быть обусловлено подвижностью ионов в среде почвы.

Дальнейший прирост связан с ботанико-географическими особенностями растений и оптимальным уровнем кислотно-щелочного баланса наиболее благоприятного для их роста и развития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложена технология получения в роторно-пульсационном аппарате гидроксипатита медицинского назначения с частицами в наноразмерном масштабе, предназначенного для изготовления костных имплантатов. Технология является безотходной, так как промывные воды, образующиеся на стадии очистки, предлагается использовать в качестве минерального комплекса, обогащенного азотом, кальцием и фосфором, для подкормки сельскохозяйственных растений. Испытания, проведенные на растительных объектах, подтверждает перспективность использования данной процедуры.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема 0082-2018-0006, рег. номер № АААА-А18-118020890097-1).

ACKNOWLEDGEMENT

This work was carried out as part of the Government Task of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Subject 0082-2018-0006, Reg. No. АААА-А18-118020890097-1).

Список литературы:

1. Theresa A., Holland T.A., Mikos A.G. // Adv. Biochem. Engin./Biotech. 2006. V. 102. P. 161. DOI: 10.1007/b137205.
2. Lakshmi S.N., Cato T.L. // Adv. Biochem. Engin./Biotech. 2006. V. 102. P. 47. DOI: 10.1007/b137240.
3. Varghese S., Elisseeff J.H. // Adv. Polym. Sci. 2006. V. 203. P. 95. DOI: 10.1007/12_072.
4. Sierpowska J., Lammi M.J. et al. // Medical Engineering and Physics. 2007. V. 29. No. 8. P. 845. DOI: 10.1016/j.medengphy.2006.09.007.
5. Boivin G., Meunier P.J. // J. Musc. Neur. Int. 2002. V. 2. No. 6. P. 538.
6. Favus M.J. // Met. Amer. Soc. Bone and Min. Res. 2003. No. 5. P. 129.
7. Supova M. // Nan. and Nanotech. 2014. P. 546. DOI: 10.1016/j.ceramint.2015.03.316.
8. Teleshev A.T., Fomichev V.A. et al. // Biomed. Eng. 2018. V. 52. No. 1. P. 19. DOI: 10.1007/s10527-018-9773-4.
9. Harada S.I., Rodan G.A. // Nature. 2003. V. 423. No. 6937. P. 349. DOI: 10.1038/nature01660.
10. Пат. 2166986 РФ, 2006.

References:

1. Theresa A., Holland T.A., Mikos A.G. // Adv. Biochem. Engin./Biotech. 2006. V. 102. P. 161. DOI: 10.1007/b137205.
2. Lakshmi S.N., Cato T.L. // Adv. Biochem. Engin./Biotech. 2006. V. 102. P. 47. DOI: 10.1007/b137240.
3. Varghese S., Elisseeff J.H. // Adv. Polym. Sci. 2006. V. 203. P. 95. DOI: 10.1007/12_072.

4. *Sierpowska J., Lammi M.J. et al.* // Medical Engineering and Physics. 2007. V. 29. No. 8. P. 845. DOI: 10.1016/j.medengphy.2006.09.007.
5. *Boivin G., Meunier P.J.* // J. Musc. Neur. Int. 2002. V. 2. No. 6. P. 538.
6. *Favus M.J.* // Met. Amer. Soc. Bone and Min. Res. 2003. No. 5. P. 129.
7. *Supova M.* // Nan. and Nanotech. 2014. P. 546. DOI: 10.1016/j.ceramint.2015.03.316.
8. *Teleshev A.T., Fomichev V.A. et al.* // Biomed. Eng. 2018. V. 52. No. 1. P. 19. DOI: 10.1007/s10527-018-9773-4.
9. *Harada S.I., Rodan G.A.* // Nature. 2003. V. 423. No. 6937. P. 349. DOI: 10.1038/nature01660.
10. Pat. 2166986, Russian Federation, 2006.