



**Конкурс работ молодых ученых «Просто о сложном»  
Научно-популярная статья призера III степени Архаровой Натальи  
Андреевны (м.н.с., ИК РАН, ФНИЦ "Кристаллография и фотоника"  
РАН, г. Фрязино)**

**Костная ткань на основе бактериальной целлюлозы<sup>1</sup>**

*Нет ничего более изобретательного, чем сама природа  
Цицерон*

В настоящее время созданию новых материалов для лечения, а также восстановления костной ткани организма уделяется большое внимание.

*– Сегодня поговорим о заменителях костной ткани на основе бактериальной целлюлозы. Что представляют из себя подобные материалы?*

– Речь идет о целлюлозе, которую создают бактерии. Они подобно маленьким “ткачам” плетут микрофибриллы целлюлозы, рисуя на поверхности питательной среды, тканый рисунок. Как только верхний слой полностью “нарисован” он приподнимается над поверхностью среды, а под ним маленькие “ткачи” принимают плести целлюлозу снова. Важно, что между микрофибриллами остаются нанопоры, позволяющие бактериям дышать под образовавшимся слоем. Конечный продукт такой работы – это нанопористая гель-пленка, состоящая на 99% из воды, и напоминающая медузу, плавающую на поверхности моря. За несколько дней толщина пленки достигает несколько миллиметров, а за две недели – порядка двух сантиметров. Влажная гель-пленка интересна в качестве раневого покрытия при насыщении ее лекарственными препаратами. Это своего рода вторая кожа, защищающая рану от внешних микроорганизмов, а главное она не прилипает к ране и не мешает процессу естественного заживления кожи.

Совсем другое дело, если гель-пленку высушивать, тогда она выглядит как пергамент.

*– Чем обусловлен выбор такого необычного материала в качестве материала для имплантата?*

– Посмотрим на строение костной ткани. Она состоит из коллагеновых волокон и расположенными на ней фосфатами кальция. Коллаген – это каркас, который придает кости гибкость и способность к разного рода деформациям, а минеральная компонента, основную часть которого составляет гидроксиапатит, придает костям прочность. Вы когда-нибудь видели, что представляет из себя чистый коллаген? Это поролоновая губка, гибкая и при этом достаточно прочная. Гель-пленка БЦ также обладает эластичностью и при этом очень прочная. Она способна выдерживать до 10 ГПа на разрыв. Это вполне подходящий каркас

---

<sup>1</sup> Научно-популярная статья основана на материалах публикаций:

1. Arkharova N.A., Suvorova E.I., Severin A.V., Khripunov A.K., Krashennnikov S.V., Klechkovskaya V.V. SEM and TEM for Structure and Properties Characterization of Bacterial Cellulose/Hydroxyapatite Composites. Scanning, 2016, 38, 757 – 765.
2. Романов Д.П., Хрипунов А.К., Баклагина Ю.Г. и др. Нанотекстуры композитов, образующихся при взаимодействии гидроксиапатита и целлюлозы *Gluconacetobacter xylinus*. Физика и химия стекла, 2014, 40 (3), 485 – 495.
3. Баклагина Ю.Г., Лукашева Н.В., Хрипунов А.К. и др. Взаимодействие между наноразмерными кристаллическими компонентами композита на основе целлюлозы *Acetobacter Xylinum* и фосфатов кальция. Высокомолекулярные соединения, серия А, 2010, 52 (4), 615 – 627.

для разного рода композитных материалов. В случае создания материалов для костной имплантации наполнителем гель-пленки могут служить фосфаты кальция.

– *Существуют ли другие полимерные материалы, способные заменить коллаген?*

– Природных и синтетических полимерных материалов достаточно много. Это и хитин, получаемый из панцирей ракообразных, хитозан, шелк, синтетический коллаген и др. В отличие от большинства природных полимеров, а также целлюлоз других источников (например, растительной, древесной), бактериальная целлюлоза проста в получении. Это наиболее чистый материал, который не содержит примесей, и поэтому не требует сложной очистки. А за счет небольших затрат на ее получение, это еще и один из экономически выгодных материалов.

– *Где в нашей стране делают такую гель-пленку БЦ?*

– Первые работы по проведению синтеза этил- и ацетил-целлюлоз были начаты в Санкт-Петербургском Государственном Университете в 60-х годах прошлого века и продолжают до сих пор. В настоящее время работы по синтезу целлюлозы GX ведутся на кафедре микробиологии СПбГУ под опытным руководством Ткаченко А.А. Кафедра располагает своими собственными штаммами целлюлозы GX.

– *Вы упомянули о фосфатах кальция. Какие именно фосфаты кальция используются для создания композитов?*

– Могут использоваться абсолютно любые фосфаты кальция. Это может быть трикальцийфосфат, октакальцийфосфат, и наконец, гидроксипатит, как основная минеральная компонента костной ткани.

– *Когда появилась идея о создании таких материалов?*

– Первые данные о создании композитов на основе ЦГХ и фосфатов кальция, в том числе и гидроксипатита, появились в 2006 году. Всероссийское совещание «Биокерамика в медицине», на котором А.К. Хрипунов и его коллеги представляют устный доклад «Композиты на основе целлюлозы и аморфных фосфатов кальция – перспективные материалы для медицины». Этот момент можно считать отправной точкой в создании и исследовании материалов на основе целлюлозы для замещения костной ткани. Параллельно такие исследование активно ведут наши китайские коллеги. В этот период начинается “бум” на создание композитных материалов на основе полимеров, в том числе и на основе целлюлозы GX. Гель-пленку ЦГХ активно насыщают наночастицами металлов и неметаллов, добавляют разные компоненты в процесс синтеза для возможности придания необходимых свойств и.т.д. И все это для создания композита, свойства которого были бы приближены к естественной костной ткани.

– *Какими способами можно получать материал на основе целлюлозы GX и фосфатов кальция?*

– Методы приготовления композитов ЦГХ с наполнителем из фосфатов кальция разнообразны. Здесь и механическое смешивание целлюлозы и фосфатов кальция, осаждение кристаллов на поверхность БЦ, синтез бактериальной целлюлозы с добавлением гидроксипатита в питательную среду и др. Возможность управлять синтезом самой гель-пленки ЦГХ, менять условия ее получения, открывает огромные возможности в исследовании новых материалов на ее основе. Безусловно, данная область привлекательна и сегодня.

Один из наиболее привлекательных методов получения – это, так называемый, биомиметический подход, то есть имитация процесса образования костной ткани *in vitro*.

До недавнего времени было очень трудно понять, как образуется костная ткань. Однако с развитием современных методов исследования, особенно методов электронной микроскопии удалось изучить ее субструктуру вплоть до атомного уровня. И все же до конца еще не ясны элементы механизма ее образования и существуют лишь теоретические предположения. Это довольно сложный процесс: в образовании костной ткани участвуют огромное количество белков, клеток и разнообразных ферментов. В настоящее время криогенная электронная микроскопия позволяет приоткрыть тайны этих процессов, благодаря возможности исследовать замороженные участки костной ткани в разные периоды ее формирования. Известно, что клетки проникая через каналы костной ткани доставляют ионы кальция и фосфора к волокнам коллагена, где и образуется гидроксиапатит.

Данные исследования привели к идее осуществления синтеза гидроксиапатита в среде целлюлозы и предположению, что в данном случае нанокристаллы ГАП будут не осаждаться, а образовываться на поверхности целлюлозы, как это происходит в костной ткани.

– *То есть нанокристаллы ГАП будут образовываться на поверхности гель-пленки?*

– Не совсем... Дело в том, что если использовать саму гель-пленку, то нанокристаллы будут расти на ее поверхности, не проникая глубоко внутрь. Для получения более однородного материала целлюлозу превращают в суспензию путем дробления гель-пленки в лабораторном блендере при 2000 об.мин.

– *Это может привести к потере целлюлозой своих уникальных механических свойств?*

– Такой режим дробления довольно мягкий, все равно, что делать коктейль из фруктов. Целостность гель-пленки нарушается, но структура целлюлозы сохраняется. Фрагменты гель-пленки достаточно крупные и могут достигать 0,5 мм. В дальнейшем они способны соединяться друг с другом и образовывать довольно крепкую связь и, в конечном итоге, при высыхании формируют пленку аналогичную высушенной гель-пленке.

– *Что же представляет из себя полученный материал? Как его можно использовать?*

– В конечном итоге это белая пластилиноподобная масса. Из нее можно, в прямом смысле, лепить объект любой формы, например: недостающий участок кости или даже целую кость, цементировать костные дефекты.

Однако, перед применением любого материала в медицине необходимо учитывать его структуру, а также определить ее взаимосвязь со свойствами. Здесь на помощь приходят методы электронной микроскопии, благодаря которым можно визуализировать объекты любой природы, находить взаимосвязь между ними, определять их размеры и, наконец, провести диагностику перед доклиническими испытаниями. Это достаточно важно, так как с ее помощью удастся предупредить тот или иной исход, выявить ненужные артефакты. И, в конце концов, провести сравнительный анализ структуры полученного материала со структурой своего естественного аналога.

– *Насколько материал на основе бактериальной целлюлозы соответствует естественной кости?*

– Посмотрим на высушенный композит на основе целлюлозы *Glucanacetobacter xylinum* и нанокристаллов гидроксиапатита изнутри, то есть его внутреннюю структуру при разломе.

Уже при увеличении 30 000 – 40 000 на изображениях в сканирующем электронном микроскопе можно увидеть отдельные волокна целлюлозы размерами 100 – 200 нм, а на них агломераты из наночастиц гидроксиапатита. Чем больше гидроксиапатита в материале, тем агломераты нанокристаллов становятся больше и структура композита в целом – более рыхлая. Для последующих увеличений, чтобы представляет из себя материал на наноуровне, перейдем к просвечивающему электронному микроскопу. Для этого возьмем каплю приготовленной суспензии и позволим ей высохнуть. При небольших увеличениях мы также видим волокна, а теперь и нанофибрилы размерами от 10 до 100 нм с нанокристаллами гидроксиапатита.

Известно, что в костной ткани нанопластины гидроксиапатита имеют размер от 1 – 2 до 20 нанометров и лежат на поверхности волокон коллагена своими плоскими гранями, обволакивая их со всех сторон.

Теперь перейдем к размерам нанокристаллов гидроксиапатита, образовавшихся на поверхности фибрилл целлюлозы, при биомиметическом подходе. При этом можно варьировать количество целлюлозы в растворе для наилучшего понимания процесса. Вообще говоря, определение размеров нано-объектов, особенно если они образуют агломерат, не тривиальная задача.

– *Разве нельзя просто померить размер кристаллов на изображении?*

– Можно. Вопрос только в том, что вы измерите. Представьте маленькие пластинки хаотично расположенные друг относительно друга, и на изображении в микроскопе вы видите их проекцию. Как тут определить их действительные размеры? На помощь приходит метод темнопольного изображения, при использовании которого можно получать изображения от кристаллов лежащих определенной плоскостью. Кристаллы гидроксиапатита вытянуты вдоль оси с и можно измерить их длину. Для этого выбираем на дифракции рефлекс, который отвечает нужной плоскости и получаем изображение.

– *Теперь поле стало темным, а все кристаллики светлыми?*

– Не совсем... Теперь видны только те кристаллы, которые лежат вдоль оси с. И мы можем смело их измерить. Полученный размер будет соответствовать длине кристаллов. Также этот метод незаменим и при статистическом анализе размеров нанокристаллов. А вот и получившиеся размеры: в композитах с небольшим содержанием целлюлозы (меньше 50%) размеры кристаллов от 1 – 2 до 30 нм, в композите с большим содержанием целлюлозы (равно 50%) размеры нанокристаллов составляют от 1 – 2 до 15 нм. Таким образом, большое содержание БЦ в растворе, где образуются нанокристаллы, приводит к уменьшению частиц ГАП, и их размеры вполне соотносятся с данными о размерах ГАП в естественной костной ткани. Размеры нанокристаллов ГАП, синтезированных без целлюлозы достигают в своем линейном размере до 100 нм.

– *А что с другими размерами, толщина и ширина?*

– Для определения ширины нужно также выбрать рефлексы на дифракции, которые будут отвечать ширине пластинок. Для определения толщины в электронной микроскопии существует метод моделирования, основанный на сравнении высокоразрешающего электронно-микроскопического (ВРЭМ) изображения получаемого от кристалла, лежащего плоской гранью, с моделированным ВРЭМ изображением.

После проведения ВРЭМ моделирования для отдельных кристаллов в разных композитах мы получаем, что толщина кристаллов в композитах с разным соотношением целлюлозы и

гидроксиапатита составляет от 2 до 7 нм. Нанопластинки ГАП в костной ткани имеют толщину от 2 до 10 нм. Таким образом, размеры нанокристаллов, полученных биомиметическим способом, совпадают с размерами в костной ткани организма.

Теперь обратимся к свойствам. Известно, что костная ткань неоднородна по своей структуре и свойствам. В объеме одной кости существует участки с более плотной структурой (компактная костная ткань) и соответственно более прочные, другие – довольно пористые (трабекулярная костная ткань) и более хрупкие. Кроме того, распределение фосфатов кальция в объеме одной кости также неравномерно. Причиной этому не только разные нагрузки, которые несут разные участки костной ткани, а также множество факторов – это возраст, пол, физические нагрузки и т. д. Представляете, сколько факторов необходимо учитывать, чтобы заменить часть или целую кость в организме, чтобы организм ее не только не отторг, а признал за свою.

– *Возможно ли это сделать...*

– Нужен управляемый процесс с прогнозируемыми структурой и свойствами. Это возможно осуществить путем изменения методов приготовления композитов, а также соотношения компонентов. В случае бактериальной целлюлозы это еще и возможность управления синтезом, изменяя условия ее получения. Безусловно, данная область привлекательна и сегодня.

Известно, что ГАП является хрупким материалом и, если в материале его много, то и материал будет более хрупким. Давайте посмотрим, какие предельные данные пористости и упругости можно получить для материалов ЦГХ/ГАП. Для этого композитные блоки размерами 1x1 см<sup>2</sup> и пленки размерами 1x5 см<sup>2</sup> испытывали на одноосное сжатие и растяжение соответственно при скорости 1мм/мин. Действительно, увеличение ГАП в материале приводит к уменьшению прочности образцов практически независимо от способа приготовления. В зависимости от соотношения целлюлозы и гидроксиапатита модуль упругости лежит в пределах от 0,7 МПа до 10 ГПа, перекрывая при этом большой диапазон данных об упругости костной ткани – от 0,5 МПа до 17 ГПа.

Плотность композитов с разным содержанием БЦ также различна и возрастает при увеличении целлюлозы в композите, в отличие от пористости, за которую несут ответственность агломераты ГАП, чем их больше, тем материал более пористый.

Особенностью композитов является тот факт, что композиты с разным соотношением ЦГХ/ГАП способны достаточно прочно связываться между собой. Это позволяет скопировать структуру и свойства участка костной ткани, который необходимо заменить.

– *Что касается биологических исследований?*

– Прежде всего мы проводили клеточные исследования, в которых было показано, что образцы не токсичны. А затем вшивали пластинку размером 1x1 см белым беспородным мышам под кожу. Данный материал не только не был отторгнут, но и воспринят организмом мыши своей частью.

Таким образом, использование разных методов приготовления, разных соотношений компонентов позволяет приблизиться к созданию костного материала на основе ЦГХ с управляемой структурой и свойствами. А композиты на основе суспензии ЦГХ открывают новые возможности для 3D принтирования.



Иллюстрации

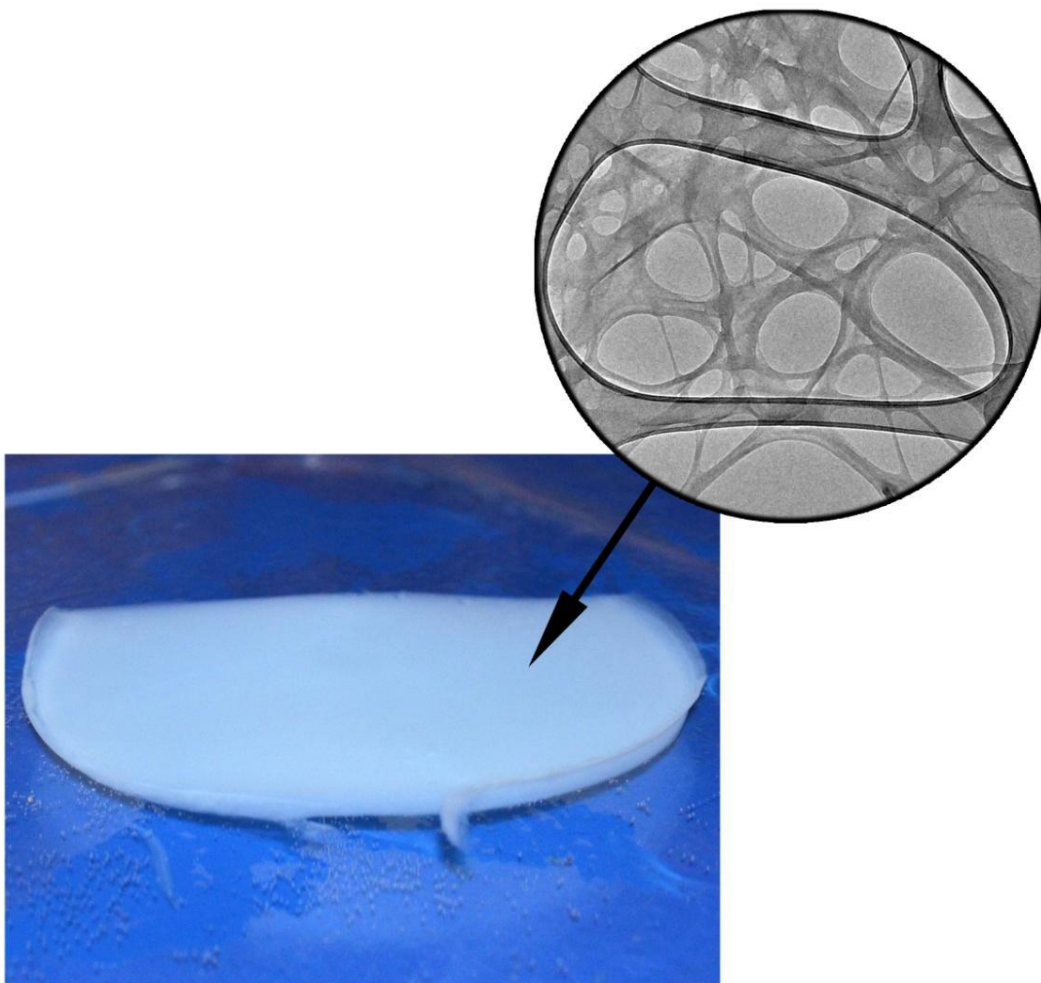
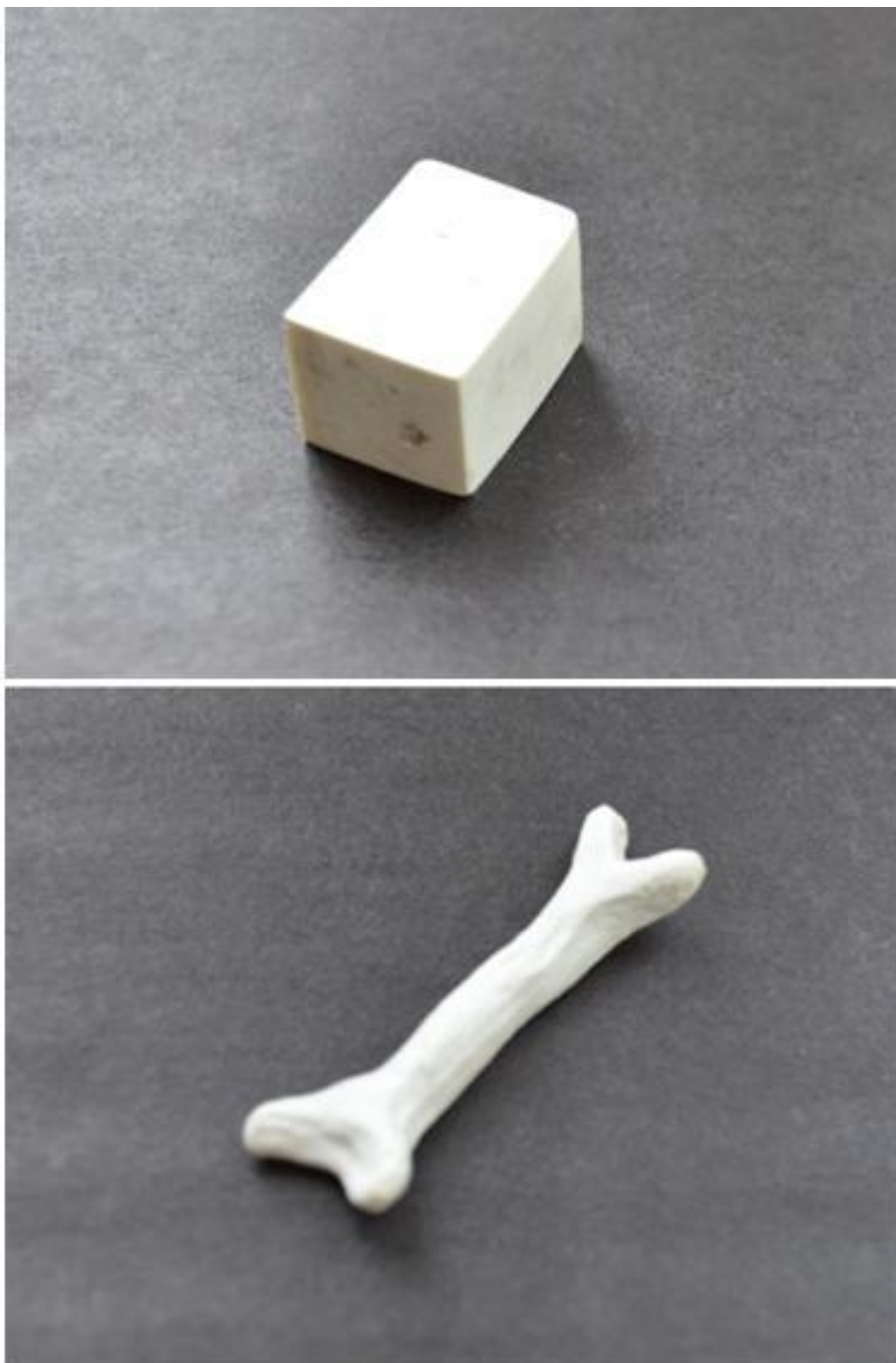


Рис.1. Гель-пленка целлюлозы *Glucosacetobacter xylinum* в воде и ее внутренняя микроструктура.



Рис.2. Высушенная гель-пленка ЦГХ напоминает пергамент



*Рис.3. Готовые композитные материалы на основе водных суспензий целлюлозы *Glucanacetobacter xylinum* и нанокристаллов ГАП*

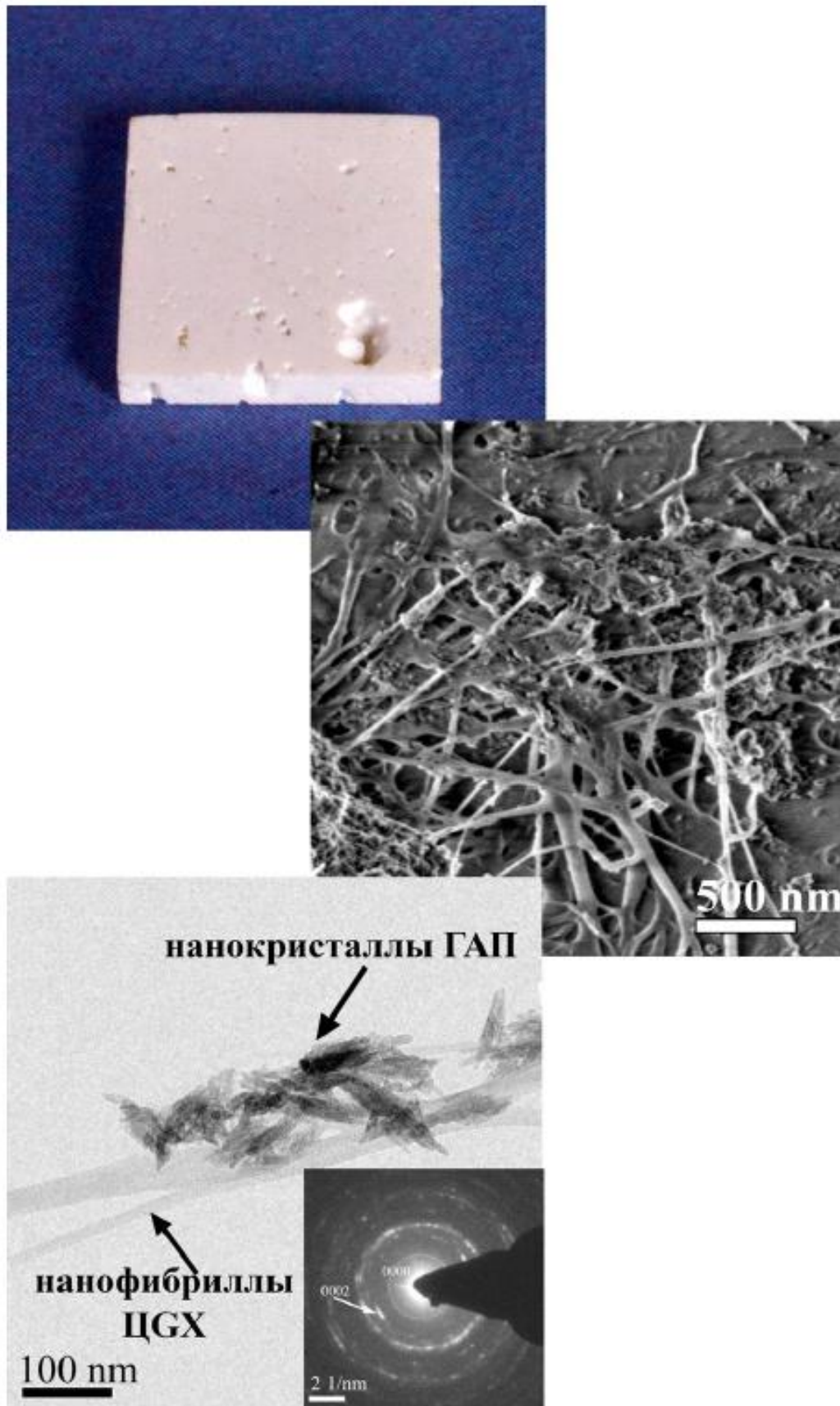


Рис.4. Морфология и внутренняя структура композита на основе целлюлозы GX и нанокристаллов ГАП.



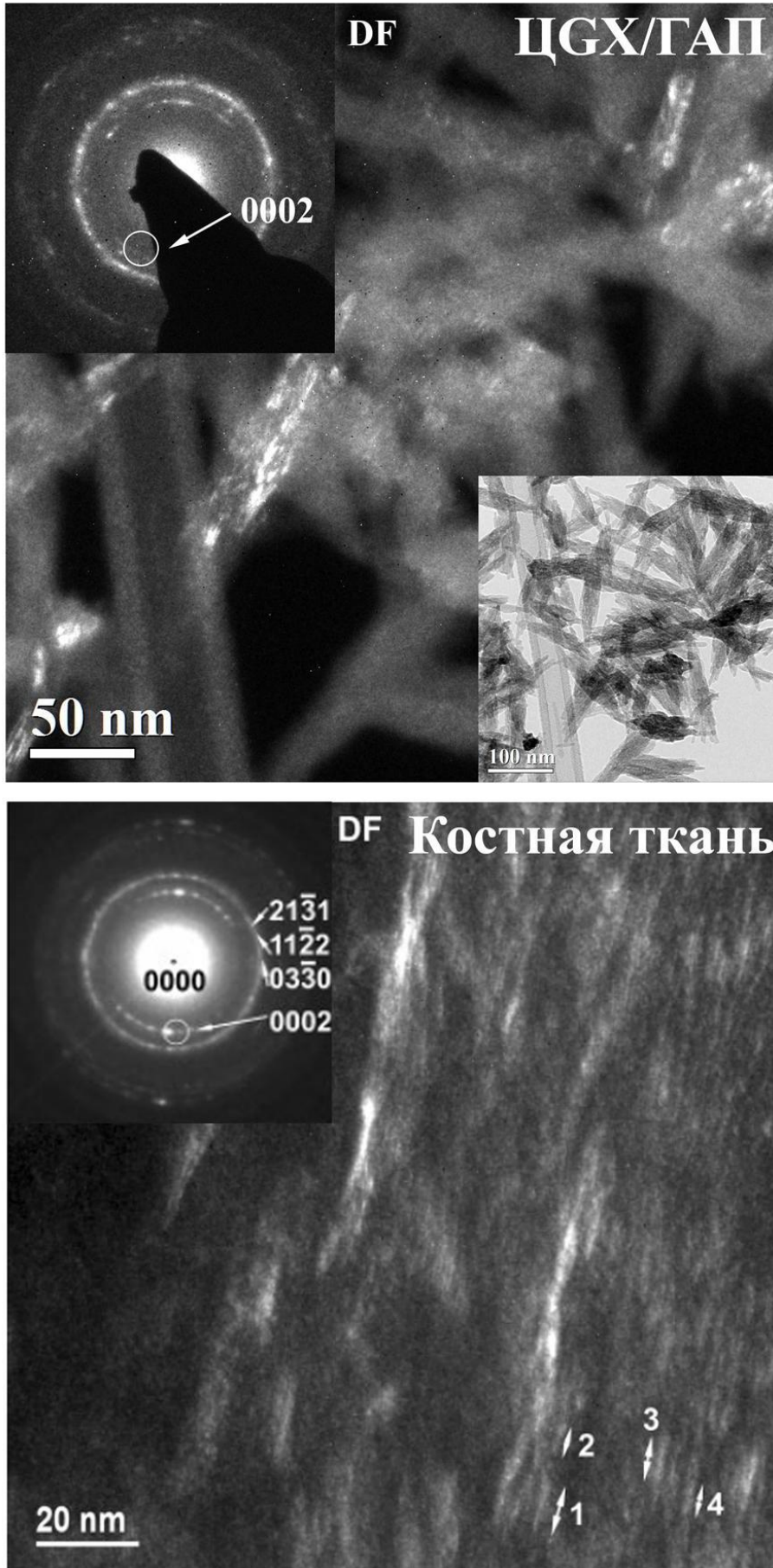


Рис.5. Метод темнопольного изображения и определение размеров нанокристаллов ГАП в композите ЦГХ/ГАП вдоль направления [0002], Сравнение с результатами для костной ткани (Suvorova, et al., 2007).

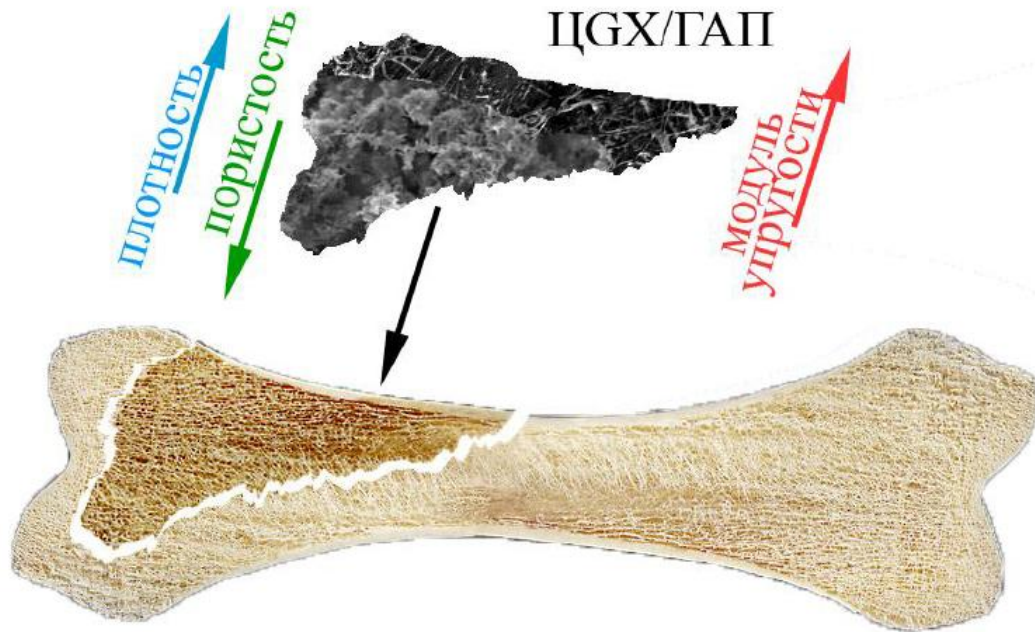


Рис.6. Модель замены дефекта костной ткани на композит ЦГХ/ГАП, соответствующий структуре и свойствам костному дефекту.