

На правах рукописи



КЛИМАШИНА ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА

**СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И СВОЙСТВА
КАРБОНАТЗАМЕЩЁННЫХ ГИДРОКСИАПАТИТОВ ДЛЯ
СОЗДАНИЯ РЕЗОРБИРУЕМЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ**

02.00.01 – неорганическая химия

02.00.21 – химия твердого тела

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2011

Работа выполнена на Факультете наук о материалах и кафедре неорганической химии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Научные руководители: Доктор химических наук, академик РАН
Третьяков Юрий Дмитриевич

Кандидат химических наук, доцент
Путляев Валерий Иванович

Официальные оппоненты: Доктор химических наук
Кецко Валерий Александрович

Доктор химических наук, профессор
Калмыков Степан Николаевич

Ведущая организация: **Российский химико-технологический университет им. Д.И.Менделеева**

Защита состоится 1 апреля 2011 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета Д 501.002.05 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, Лабораторный корпус Б (строение 73), факультет наук о материалах, ауд.235.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Автореферат разослан 1 марта 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совет Д 501.002.05,
кандидат химических наук,

 Еремина Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одним из важных направлений современного неорганического материаловедения является разработка биоматериалов на основе фосфатов кальция. Синтетический гидроксипатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГА) – широко распространенный материал, применяемый в медицине для лечения поврежденных костных тканей благодаря химическому и фазовому подобию неорганической составляющей костной ткани.

Со времени первых попыток использования фосфатов кальция в медицине концепция применения биоматериалов претерпела серьезные изменения. На первый план вышел так называемый регенерационный подход, в рамках которого акцент делается на замещение биоматериала нативной растущей костью, а материалу отводят роль (активного) источника необходимых для построения костной ткани элементов, лишь первоначально осуществляющего опорную функцию. В настоящее время считается, что материалы на основе гидроксипатита имеют следующие недостатки: низкая скорость биорезорбции *in vivo*, слабое стимулирующее воздействие на рост новой костной ткани (остеоиндукция), низкая трещиностойкость (K_{Ic}) и малая усталостная прочность в физиологических условиях. Регенерационный подход требует от современных биоматериалов, прежде всего, ускорения процесса срастания, замены имплантата новой костной тканью и остеостимулирующего действия материала имплантата, в то время как механические нагрузки во время лечения можно исключить.

Одним из известных способов повышения резорбируемости материалов на основе ГА является переход к химическому модифицированию гидроксипатита. Известно, что в качестве изоморфных примесей в кристаллическую решетку ГА могут входить различные катионы и анионы. По медико-биологическим причинам круг возможных допантов ограничен. С кристаллохимической точки зрения замена катиона или аниона эффективна для изменения энергии решетки кристалла (следовательно, и изменения произведения растворимости) и кислотно-основных свойств поверхности (т.е. кинетики процесса растворения). Поэтому в настоящей работе подход к контролю скорости резорбции базируется на идее использования анионного и катионного замещения ГА. В качестве основного объекта исследования был выбран гидроксипатит, модифицированный карбонат-ионом и ионом натрия, с различными степенями замещения. Следует отметить, что интерес к карбонатгидроксипатиту (КГА), как к остеозамещающему материалу, не спадает. Это связано и с более общей перспективой использования карбонатсодержащих биоматериалов. Увеличение содержания карбонат-иона приводит как к увеличению растворимости материала (и, следовательно, к увеличению резорбции), так и к активному воздействию на энергетику остеосинтеза вследствие снижения содержания кислорода, поскольку процессы дыхания в костной ткани анаэробны (гликолиз).

Разработка новых резорбируемых материалов сдерживается рядом проблем в химии КГА, относящихся как к направленному синтезу дисперсных карбонатпатитов, так и к их консолидации в компактный материал. КГА, как другие карбонатсодержащие соли, разлагается с выделением CO_2 при высокой температуре, поэтому использование обычного твердофазного спекания малоперспективно. В качестве альтернативных методов консолидации следует рассматривать варианты жидкофазного спекания или формирование композитов КГА/(термопластичный) полимер.

Целью настоящей работы является разработка основ направленного синтеза порошков КГА с заданным составом и структурой для создания компактных

резорбируемых биоматериалов нового поколения, предназначенных для замены костной ткани человека. Подобные материалы должны первоначально играть роль опорного и направляющего элемента, и, следовательно, обладать достаточной прочностью и способствовать росту костной ткани, а в дальнейшем – растворяться (резорбироваться) в межклеточной жидкости организма с заданной скоростью. *Фундаментальной проблемой*, поставленной в работе, явился поиск взаимосвязи состав – (реальная) структура - функциональные свойства многокомпонентных фаз переменного состава с ионным типом химической связи, содержащих гетеровалентную лабильную примесь. Представителем таких фаз выступают фосфаты кальция со структурой апатита.

Для достижения указанной цели в работе решали следующие задачи:

- 1) разработка способов получения КГА с заданным уровнем содержания карбонат-иона;
- 2) установление корреляции между степенью замещения и характером распределения карбонат-иона между 2-мя энергетически неэквивалентными позициями структуры ГА;
- 3) выявление характера искажения кристаллической решетки, вызываемого примесным анионом;
- 4) установление корреляции между характером распределения карбонат-иона, параметрами реальной структуры (размером кристаллитов, микродеформациями решетки) нанокристаллов и растворимостью КГА в модельных средах;
- 5) получение биорезорбируемых материалов на основе порошков КГА и подготовка их к биологическим испытаниям.

Научная новизна работы состоит в следующих положениях, которые выносятся на защиту:

1) комплексом физико-химических методов анализа (среди которых ИК- и радиоспектроскопия) установлено, что при увеличении содержания карбонат-иона происходит следующая последовательность замещения: встраивание карбонат-иона в каналные позиции вместо гидроксид-ионов (А-тип замещения) и далее замещение в позициях ортофосфатных ионов (Б-тип);

2) методами радиоспектроскопии впервые показано, что при низких степенях замещения возможна конкуренция между CO_3^{2-} и NO_3^- ионами за позиции замещения А-типа в структуре ГА;

3) впервые отмечены две особенности микроморфологии КГА кристаллов, полученных осаждением из раствора: морфологическое разнообразие кристаллов в пределах образцов одинакового брутто-состава и мезопористость;

4) предложена модель строения смешанного КГА АБ-типа, позволяющая описать неоднородность состава и морфологии кристаллов;

5) показано, что увеличение содержания CO_3^{2-} -ионов и уменьшение температуры синтеза приводит к уменьшению размера кристаллов КГА и росту начальной скорости его растворения и растворимости; разнонаправленное действие факторов размера кристаллов и степени заполнения А-позиций приводит к немонотонному изменению скорости растворения по мере увеличения содержания CO_3^{2-} -ионов.

Практическая значимость работы обусловлена: 1) разработкой методики оценки содержания карбонат-иона и его распределения по неэквивалентным позициям решетки ГА с помощью ИК-спектроскопии, 2) разработкой метода консолидации КГА порошка с использованием приема горячего прессования с термопластичной добавкой на основе Na-Ca-фосфатного стекла при температурах не выше 500 °С, что позволяет сохранить содержание карбонат-иона в

консолидированном КГА; 3) полученные в работе резорбируемые неорганические материалы на основе КГА являются биосовместимыми и могут применяться в работах по тканевой инженерии.

Личный вклад автора в представляемую работу состоит в: критическом обзоре имеющихся литературных данных относительно взаимосвязи условий синтеза, состава и свойств КГА; синтезе всех использованных в работе составов и приготовлении образцов для исследований; самостоятельном проведении электронной микроскопии, ИК-спектроскопии, рентгенографического исследования, ионометрии и химического анализа; анализе и обработке экспериментальных данных, обобщении и систематизации результатов.

Настоящая работа является частью систематических исследований биоматериалов, проводимых на Факультете наук о материалах МГУ и кафедре неорганической химии Химического факультета МГУ в рамках приоритетной научной темы «Создание новых типов функциональных материалов». Работа была выполнена в лаборатории неорганического материаловедения кафедры неорганической химии Химического факультета МГУ. В работу вошли результаты исследований, выполненных при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ 09-03-01078, 10-03-00866), Минобрнауки (госконтракты №№ 02.513.11.3159, 02.513.12.3008, П-403).

Публикации и апробация работы. По теме работы имеется 16 публикаций, включая 7 статей в российских и международных журналах. Отдельные части работы представлены на 9 российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов, в том числе на I, II и III Международном форуме по нанотехнологиям «RUSNANOTECH-2008, 2009 и 2010» (Москва), Всероссийском совещании «Биоматериалы в медицине» (Москва, 2009), 22 Европейской конференции по биоматериалам (Лозанна, 2009), Немецко-Украинском симпозиуме по науке и нанотехнологиям (Дуйсбург-Эссен, 2008), восьмой Международной конференции по химии твёрдого тела (Братислава, 2008), V Международной научной конференции «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация для нанотехнологий, техники и медицины» (Иваново, 2008), а также на VIII, IX, X Конференции молодых учёных «Актуальные проблемы современной неорганической химии и материаловедения» (Звенигород, 2008, 2009, 2010), Международных конференциях студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2008, 2009, 2010» (Москва).

Структура работы. Диссертационная работа изложена на 130 страницах машинописного текста, иллюстрирована 70 рисунками и 13 таблицами, включая приложение. Список цитируемой литературы содержит 125 ссылок. Работа состоит из 7 глав, включая введение, литературный обзор, описание методов синтеза и исследования материалов, обсуждение результатов, а также выводов, списка литературы и приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

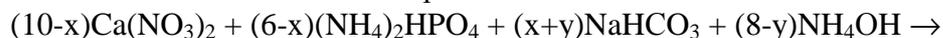
Во введении кратко обоснована актуальность работы, сформулированы цели и задачи, показаны научная новизна и практическая значимость работы, обозначены основные этапы исследования.

Первая глава посвящена обзору литературы. В ней рассмотрены структура, состав и свойства костной ткани, описаны основные кристаллохимические особенности апатитов, приведены данные по фазовым равновесиям ортофосфатов кальция и краткие характеристики соединений. В обзоре приводится описание основных методов синтеза гидроксиапатита (ГА), включая данные о форме и

размерах получаемых частиц. Отдельно рассмотрены вопросы, связанные с получением и исследованием КГА. Определенная часть литературного обзора посвящена получению компактных материалов и анализу биоактивности.

Вторая глава содержит описание основных экспериментальных методик, использованных в работе. Для получения КГА использовали метод осаждения из раствора и твердофазный синтез.

Синтез КГА *методом осаждения* проводился по схеме:

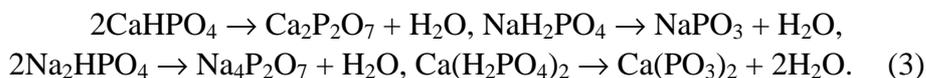


$\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y + (20-2x-y)\text{NH}_4\text{NO}_3 + y\text{NaNO}_3 + (6+y)\text{H}_2\text{O}$, (1)
 где $x+y = 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2$. Стехиометрическое количество NaHCO_3 добавляли к раствору, содержащему 0,3 М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Затем доводили pH раствора с помощью концентрированного раствора аммиака до значений $\text{pH} \sim 11 \pm 1$. После чего смесь по капельно добавляли к 0,5 М раствору $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ при интенсивном перемешивании при $T = 20, 40, 60, 80$ °С. Осадок оstarивали при постоянной температуре в течение 24 часов. Полученные осадки отделяли от маточного раствора фильтрованием на воронке Бюхнера. Промывали дистиллированной водой для более полного удаления побочных продуктов реакции. Затем сушили при комнатной температуре на воздухе до полного высыхания.

КГА с замещением А-типа был получен *твердофазным синтезом* путем отжига незамещенного гидроксипатита при температуре 1050 °С в токе CO_2 , прошедшего дополнительное осушение путем пропускания через трубку с P_2O_5 , согласно приведенной схеме:



Фосфатное стекло, состоящее из 54 мас. % $\text{Na}_4\text{CaP}_6\text{O}_{18}$ и 46 мас. % $\text{Na}_2\text{CaP}_2\text{O}_7$ получали посредством закаливания расплава, состоящего из 4 фаз, взятых в необходимом соотношении, а именно NaPO_3 , $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ и $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Данные реагенты были синтезированы при $T=600$ °С по приведенным ниже уравнениям реакций:



Для синтеза *композиита КГА/фосфатное стекло* порошки КГА смешивали с фосфатным стеклом, взятым в количестве 40 мас. %, в планетарной мельнице, а затем применяли «теплое» прессование при $T=250$ °С и $P=450$ МПа в течение 6 ч. или «горячее» прессование при $T=450$ °С и $P=200$ МПа в течение 1 и 3 ч. Помимо фосфатного стекла в качестве термопластичной матрицы использовали *биodeградируемый полимер* - поли-3-оксибутират (ПОБ), полученный в клетках культуры азобактера. Получение композиционного материала на основе КГА осуществляли посредством теплового прессования предварительно приготовленной смеси КГА/полимер в соотношении 2 : 3 по массе при $T=120$ °С и $P=400$ МПа в течение 1 часа.

Методы исследования образцов. *Рентгенографические исследования* проводили на дифрактометре Rigaku D/Max-2500 с вращающимся анодом (Япония). Съёмку проводили в режиме на отражение с использованием Cu K_α излучения, в интервале углов $2\theta = 10 - 110$ °, шаг по 2θ 0,02 °, скорость регистрации спектров 5°/мин. В качестве внутреннего стандарта использовали порошок кремния. Профильный анализ спектров, определение значений параметров решетки, размеров областей когерентного рассеяния (ОКР) и микродеформаций решетки осуществляли в программе WinXPow.

Электронномикроскопические исследования образцов проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEM-2000 FXII, Jeol (Япония).

Исследование микроструктуры образцов проводили на сканирующем электронном микроскопе с автоэмиссионным источником LEO SUPRA 50VP (Carl Zeiss, Германия), снабженном системой энергодисперсионного микроанализа INCA Energy+ (Oxford Instruments, Великобритания). Для рентгеноспектрального микроанализа были выбраны Ca K-, Na K-, P K-линии спектра. Для расчета количественного состава применялась процедура $\rho\rho$ -ZAF коррекции.

Химический анализ. Содержание CO_3^{2-} в КГА определялось волюмометрическим методом в микроэвдиометре собственной конструкции, основанным на измерении объема выделившегося CO_2 после обработки пробы кислотой. Объем приводился к стандартным температуре и давлению. Количественное определение *содержания фосфора* осуществлялось с использованием метода Вилсона кислотно-основного титрования осадка молибдофосфата хинолина. Количественное *определение Ca* в КГА проводилось методом прямого комплексонометрического титрования его ионов стандартным раствором ЭДТА в щелочной среде в присутствии индикатора эриохрома чёрного Т. Количественное *определение Na, Ca* для КГА проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС ИСП) на спектрометре Optima 5300DV (Perkin-Elmer, США). Для анализа количественных соотношений элементов использовали стандартные растворы ГОС известной концентрации ионов Ca и Na.

Термогравиметрический (ТГ) и дифференциальный термический анализ (ДТА) проводились на термоанализаторах Pyris Diamond (Perkin Elmer, США) и STA 409 PC Luxx (Netzsch, Германия). Скорость нагрева составляла 5-10 °С/мин; также измерения проводились в квазиизотермическом режиме нагрева (со скоростью потери массы до 10 мкг/мин), интервал температур 20 – 1200 °С.

Ионометрия растворов (рН и рСа) проводилась на многоканальном иономере Эконикс-Эксперт-001 (Россия).

Распределение частиц по размерам проводили методом динамического рассеяния света на приборе Fritsch Analysette-22 в диапазоне 0,2 мкм – 100 мкм.

ИК-спектры поглощения образцов регистрировали на спектрометре Spectrum One (Perkin Elmer, США) в диапазоне 400-4000 см^{-1} с шагом сканирования 1 см^{-1} .

Испытания для определения *прочности при сжатии* проводили на испытательной машине Instron 5581 (Великобритания) со скоростью деформации 1 мм/мин.

*Исследование КГА методами радиоспектроскопии (ЭПР, ДЭЯР, ЯМР)*¹. Для создания парамагнитных центров исследуемые образцы облучались рентгеновскими лучами при комнатной температуре на установке УРС-55 (U=55 кВ, I=16 мА, W антикатод), доза облучения для всех образцов составляла порядка 100 кГр. Для исследования *спектров ЭПР* использовался спектрометр X и W-диапазона (9,6; 94 ГГц) Elexsys 680 фирмы Bruker, с применением стационарного и импульсного режимов. Использовались стандартные двух- и трехимпульсные последовательности при измерении времен релаксации и спектров ЭПР и ДЭЯР. Исследования проводились при температурах 50 и 300 К. Образцы изучались до и после рентгеновского облучения. *Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР)* на ядрах ^1H , ^{13}C , ^{31}P регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 при частоте вращения образца под магическим углом (ВМУ) 5555 Гц; спектры улучшенного качества и

¹ Радиоспектроскопическое исследование проведено на наших образцах д.ф.-м.н. Н.И.Силкиным на кафедре квантовой электроники и радиофизики физического факультета Казанского (Приволжского) Федерального Университета

разрешения были записаны на спектрометре Bruker Avance 500 при частоте ВМУ образца 12000 Гц.

Исследование биоактивности материалов проводили с использованием раствора, моделирующего ионный состав межтканевой жидкости человеческого организма (SBF – Simulated Body Fluid): pH = 7,4 (трис-буфер). Образцы массой 0,1 г помещали в 10 мл раствора SBF на 7-20 суток при 37 °С.

Для определения *цитотоксичности* материалов был применен МТТ-тест, основанный на восстановлении бесцветной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде (ДМСО).

Долгосрочное сокультивирование фибробластов, выделенных из пуповины человека путем ферментативной обработки, поддерживаемых в культуре перед опытом до 20-го пассажа, и порошков КГА со степенью замещения $x+y=0,25$ и 2 проводили в стандартных условиях в инкубаторе с 95 % влажностью и 5% содержанием CO_2 при 37 °С в течение 3-х недель на кафедре эмбриологии биологического факультета МГУ.

В третьей главе представлены полученные результаты и их обсуждение.

Фазовый состав синтезированных образцов

Выбранный в работе метод синтеза позволяет получать однофазные нанокристаллические образцы в широком диапазоне концентраций карбонат-анионов, характерном для каждой температуры (рис. 1). КГА принадлежат той же пространственной группе, что и гидроксиапатит - P_63/m , по характерному смещению пиков в сторону больших или меньших углов можно сделать вывод об изменении объёма элементарной ячейки за счет встраивания в решетку карбонат-ионов. При пересечении границы области гомогенности по карбонат-иону, появляется вторая фаза – кальцит.

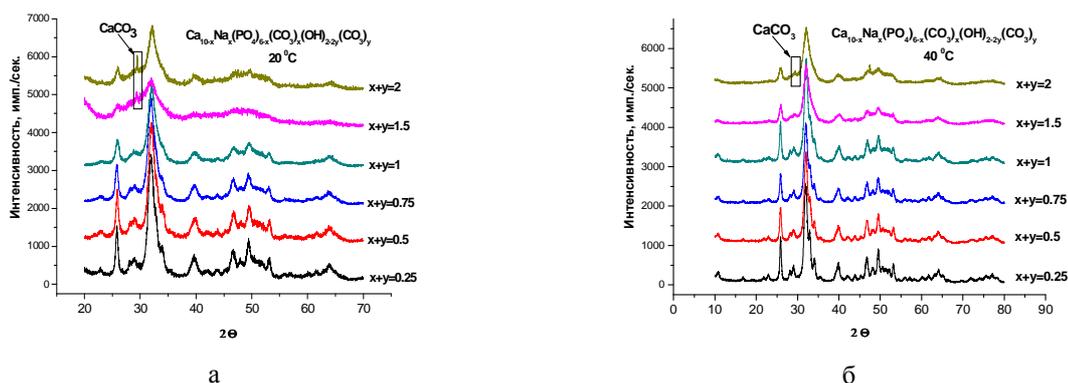


Рис. 1. Рентгенограммы серии порошков КГА, полученных по реакции (1) с рассчитанными значениями $x+y=0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2$ после остаривания при температурах 20 и 40 (а и б, соответственно) и послесинтетической термической обработки 260 °С/1 час

Содержание CO_3^{2-} - анионов

Содержание карбонатных групп в КГА было определено по данным микроволнометрического анализа. При повышении температуры синтеза с 20 до 80 °С увеличивается максимальное содержание CO_3^{2-} в КГА с 3,9 до 13,6 мас. % (рис. 2), что указывает на эндотермический характер изоморфного замещения $\text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow \text{OH}$, $\text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow \text{PO}_4^{3-}$ и свидетельствует о дестабилизации структуры апатита.

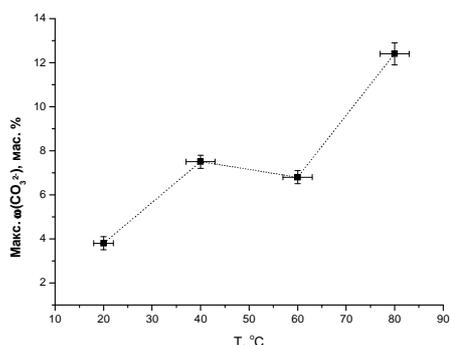


Рис. 2. Зависимость максимального содержания карбонат-анионов в КГА в зависимости от температуры синтеза

Наблюдается потеря части CO_3^{2-} -анионов в процессе отжига при температуре $T=260$ °C, что говорит об их присутствии в адсорбированном виде, а также в форме сокристаллизующегося (захваченного при кристаллизации) $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, который разлагается ниже заданной температуры. В наиболее дисперсных образцах, полученных при температуре 20 °C, содержание карбонат-ионов заметно превосходит таковое для образцов, полученных при более высоких температурах. При последующем отжиге содержание карбонат-иона для 20 °C-образцов становится минимальным по сравнению с другими температурами синтеза. Лабильный CO_3^{2-} , удаленный отжигом, дает моду при 866 см^{-1} в ИК-спектрах, сдвигая максимум ν_2 колебаний карбонатных групп в сторону меньших волновых чисел, и локализован, таким образом, в поверхностном слое кристалла КГА.

Распределение CO_3^{2-} - анионов по неэквивалентным позициям А- и Б-типа

Исследование распределения карбонат-ионов по неэквивалентным позициям А- и Б-типа проводилось с использованием ИК-спектроскопии, и радиоспектроскопии (ЭПР, ЯМР и ДЭЯР), термогравиметрии и химического анализа.

ИК-спектроскопия. Обзорные ИК-спектры поглощения КГА приведены на рис. 3. Интенсивность характерных для гидроксиапатита полос колебаний ионов OH^- при 3575 и 1620 см^{-1} уменьшается с увеличением содержания CO_3^{2-} . Это связано с уменьшением количества ионов OH^- в структуре за счет его замещения на CO_3^{2-} -группу.

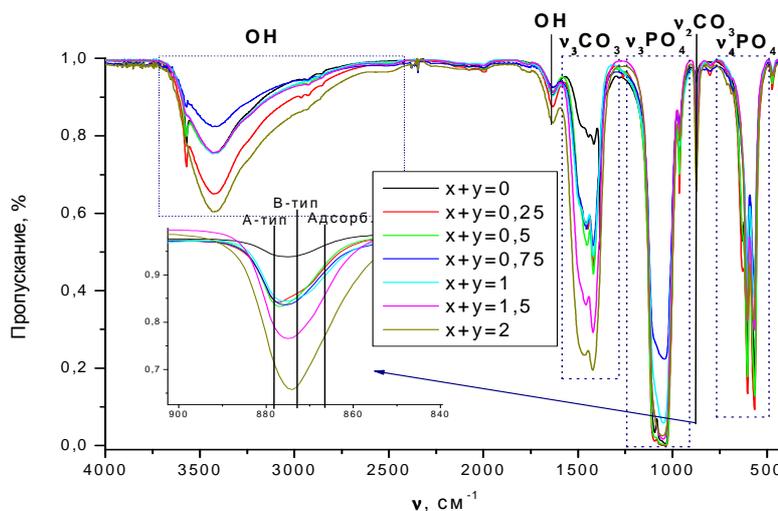


Рис. 3. Общий вид ИК-спектров КГА, полученных при температуре 80 °C (при 20, 40 и 60 °C спектры аналогичны)

Колебания ν_3 при $1650\text{-}1300\text{ см}^{-1}$ и ν_2 при $880\text{-}870\text{ см}^{-1}$ относятся к карбонатным группам: пики при $870, 1430, 1450\text{ см}^{-1}$ относятся к КГА Б-типа, а пики при $880, 1450$ и 1540 см^{-1} - к А-типу.

Характеристические колебания CO_3^{2-} в синтетических КГА, использованные в качестве аналитических пиков, находятся в области $880\text{-}866\text{ см}^{-1}$. Мода при 880 см^{-1} отнесена к КГА А-типа, мода при 870 см^{-1} к КГА Б-типа, широкая мода с максимумом при 866 см^{-1} к адсорбированной (поверхностной форме) CO_3^{2-} .

Определение долей указанных форм карбонат-анионов в КГА проводилось путем разложения аналитического пика в области $880\text{-}866\text{ см}^{-1}$ на компоненты с указанными выше максимумами и определения вклада каждого компонента, исходя из его интегральной интенсивности. Профили пиков аппроксимированы функцией Гаусса, линия фона описывалась прямой линией (рис. 4). Для привязки интенсивности аналитического колебания к содержанию карбонат-ионов в КГА, определенному по данным микроволнометрии, проводили калибровку. Для этого твердофазным методом (уравнения (2)) был получен КГА с замещением А-типа и содержанием карбонат-анионов $4,5 \pm 0,3$ мас. %.

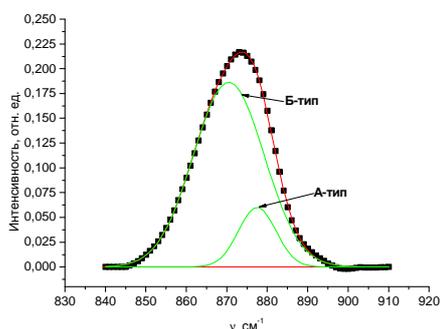
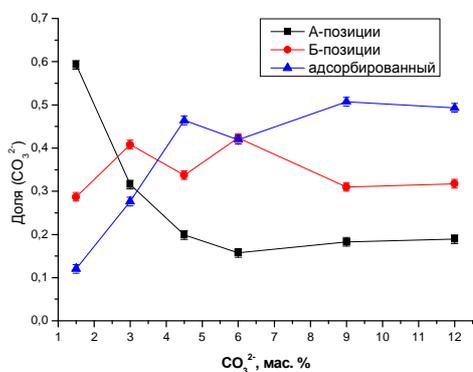
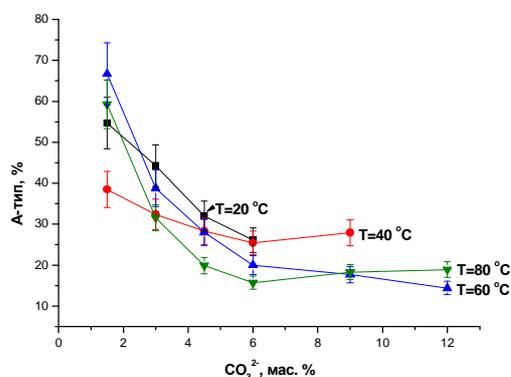


Рис. 4. Пример разделение пиков термообработанного при $260\text{ }^\circ\text{C}$ КГА А- и Б - типа в ИК-спектре

Построение калибровочного графика осуществлялось путем приготовления смеси ГА/КГА с известным соотношением компонентов и определением интенсивности пика на частоте 880 см^{-1} в ИК-спектре. Зависимость была аппроксимирована линейной функцией $y=(0,59 \pm 0,09)x$. Вычисление содержания карбонат-анионов в позициях Б-типа и в адсорбированной форме (для неотожженных образцов) осуществлялось исходя из значения общего содержания CO_3^{2-} , полученного с помощью микроволнометрии, и вычисленного по результатам ИК-спектроскопии – в позициях А-типа. Были вычислены площади пиков и по соотношению площадей найдены соотношения между различными формами карбонат-иона в КГА (рис. 5 а). При малом содержании CO_3^{2-} (менее 5 мас. %) происходит преимущественное заполнение А-позиций в каналах структуры ГА, дальнейшее увеличение содержания карбонат-ионов приводит к замещению PO_4^{3-} -анионов (Б-позиции) (рис. 5 б).



а



б

Рис. 5. а) Количественные соотношения А/Б-тип/адсорбированный CO_3^{2-} характерных колебаний CO_3^{2-} - групп для образцов, синтезированных при $T=80\text{ }^\circ\text{C}$, б) Зависимость доли CO_3^{2-} - анионов в позициях А-типа от их общего содержания в КГА

ЯМР-спектроскопия. ^1H ЯМР спектры КГА содержит две линии с химическими сдвигами $\delta=4,31$ м.д. и $\delta=1,39$ м.д., которые незначительно смещаются в сторону более слабых полей при увеличении степени замещения (рис. 6). Линия, отвечающая резонансу в более слабых полях, относится к молекулам слабосвязанной воды, включенной в кристаллы КГА; ее интегральная интенсивность, как видно из спектра, практически не изменяется. Вторая линия относится к OH^- -ионам в каналах КГА (А-позициях); с увеличением степени замещения меняется отношение интенсивностей этих линий, что связано с заменой части гидроксид-ионов на CO_3^{2-} .

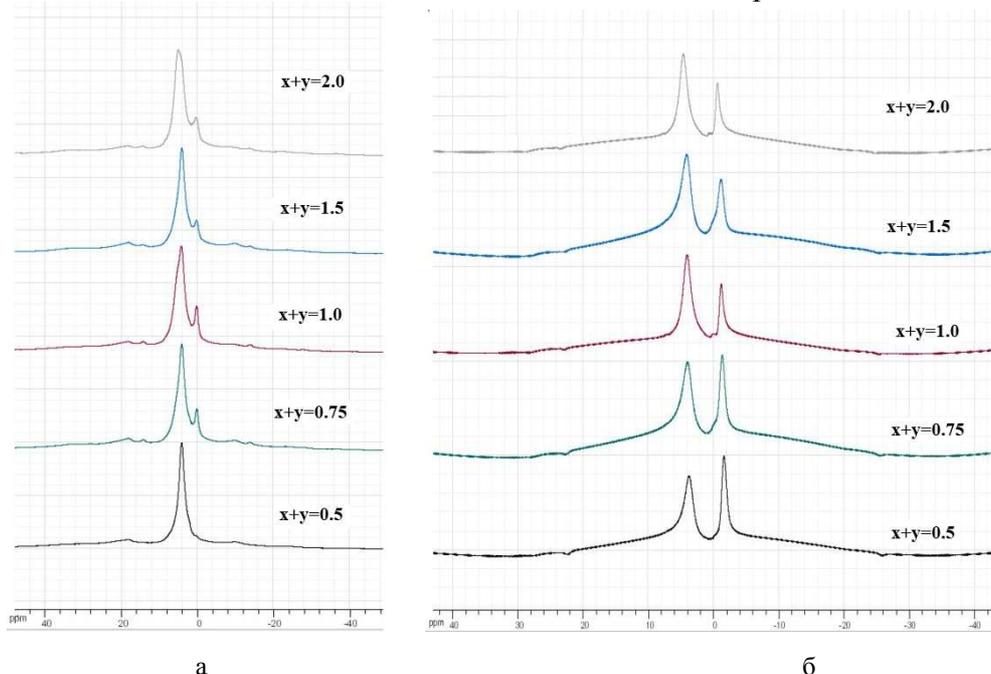


Рис. 6. ^1H ЯМР с ВМУ спектры гидроксиапатита: а) – спектры, полученные при частоте вращения образца 5555 Гц, б) – спектры, полученные при частоте вращения образца 12000 Гц

Спектр ЯМР ^{13}C КГА, содержит одну уширенную линию в области $\delta \sim 168...173$ м.д., относящуюся к CO_3^{2-} группе. Несмотря на невысокое отношение сигнал/шум, можно отметить систематическое смещение линии в стороны меньших химических сдвигов при увеличении степени замещения, при этом интегральная интенсивность CO_3^{2-} линий увеличивается.

^{31}P ЯМР с ВМУ спектр содержит единственную линию при $\delta = 1,08$ м.д., химический сдвиг которой практически не меняется при изменении степени замещения. Интенсивность линий ^{31}P заметно уменьшается с увеличением содержания карбонат-иона, что говорит об образовании КГА Б-типа. Было установлено, что резонансные линии ^{31}P обусловлены суперпозицией линий гауссовой и лоренцевой форм, причем с увеличением степени замещения увеличивается и вклад гауссовой линии в полученный резонансный сигнал. Можно предположить, что рост вклада лоренцевой составляющей в форму линии ^{31}P ЯМР спектров при низких содержаниях карбонат-иона связан с преимущественным вкладом замещения А-типа, приводящего к более разупорядоченной структуре с вакансиями, допускающей трансляционные и вращательные движения CO_3^{2-} в каналах, которые могут усиливать либрацию PO_4 -тетраэдров.

Термогравиметрический анализ. Для составов КГА, полученных при 80 °С, сравнивалось содержание карбонатных групп, определенное по результатам микровольнометрического анализа, с рассчитанными значениями мас. % ($\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O}$)

по данным ТГ (табл.1). Экспериментальные данные сравнены с 4 моделями гетеровалентного замещения: моделью А – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y$, моделью Б1 – $\text{Ca}_{(10-x)}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$, моделью Б – $\text{Ca}_{(10-x/2)}(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$, моделью АБ – $\text{Ca}_{(10-x/2)}(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y$. Содержание карбонат-ионов в структуре гидроксиапатита по данным волюмометрического анализа практически соответствует теоретическому содержанию (вычисленному исходя из предположения о вхождении в состав твердой фазы всех карбонат-ионов, содержащихся в растворе) для составов с высокой степенью замещения ($x=1\dots 2$); четкой дискриминации всех указанных моделей замещения, на основании только приведенных в таблице 1, не удастся провести, несомненно, что модели строения Б-типа или смешанного АБ-типа лучше всего подходят под экспериментальные результаты. В области малых степеней замещения ($x=0\dots 1$) содержание карбонат-ионов и воды в апатитах значимо превосходит теоретические значения, полученные исходя из любой из 4 анализируемых моделей замещения. Мы полагаем, что разумное объяснение может быть дано исходя из того факта, что реальные кристаллы апатита представляют собой мезопористые тела, содержащие, возможно, поровый флюид, т.е. маточный раствор. Повышенное содержание свободной или слабосвязанной воды, а также карбонат-ион в адсорбированной форме, в нанодисперсных КГА подтверждают рассмотренные выше ИК-спектры порошков.

Таблица 1. Содержание (в мас. %) CO_3^{2-} по данным микроволнометрии и суммарного количества ($\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O}$) по данным ТГ в образцах КГА по сравнению с теоретическими значениями, рассчитанными исходя из следующих моделей гетеровалентного замещения: модель А – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y$, моделью Б1 – $\text{Ca}_{(10-x)}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$, моделью Б – $\text{Ca}_{(10-x/2)}(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$, моделью АБ – $\text{Ca}_{(10-x/2)}(\text{PO}_4)_{(6-x)}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y$.

x+y	% CO_3^{2-} волно- метрия	% ($\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O}$) по ТГ ($\pm 0,5$)	Модель А		Модель Б		Модель Б1		Модель АБ	
			CO_3^{2-} , %	($\text{CO}_2+\text{H}_2\text{O}$), %						
0	1,5 \pm 0,05	3,4	0	1,79	0	1,79	0	1,79	0	1,79
0,25	3,8 \pm 0,15	3,2	1,48	2,42	1,51	2,93	1,51	2,92	1,53	2,73
0,5	3,86 \pm 0,24	не измер.	2,95	3,05	3,07	4,09	3,07	4,09	3,13	3,70
0,75	6,09 \pm 0,40	6,3	4,39	3,66	4,67	5,29	4,66	5,28	4,81	4,73
1	7,1 \pm 0,33	6,5	5,82	4,27	6,32	6,53	6,30	6,51	6,58	5,81
1,5	9,67 \pm 0,61	8,9	8,63	5,46	9,76	9,11	9,72	9,07	10,39	8,14
2	13,36 \pm 0,02	10,9	11,36	6,63	13,42	11,85	13,33	11,77	14,63	10,73

Механизм замещения согласно данным химического анализа. На рис. 7 а экспериментальные данные химического анализа КГА в виде зависимости отношения Са/Р от CO_3/P сравнены с теоретическими зависимостями, построенными на основании двух моделей:

1) модели КГА Б-типа, которой отвечает квазихимическое уравнение дефектообразования $\text{Ca}^{2+} + 2\text{PO}_4^{3-} = \text{V}_{\text{Ca}} + 2\text{CO}_3^{2-}$;

2) модели КГА А-типа, которой соответствует квазихимическое уравнение $2\text{OH}^- = \text{V}_{\text{OH}} + \text{CO}_3^{2-}$.

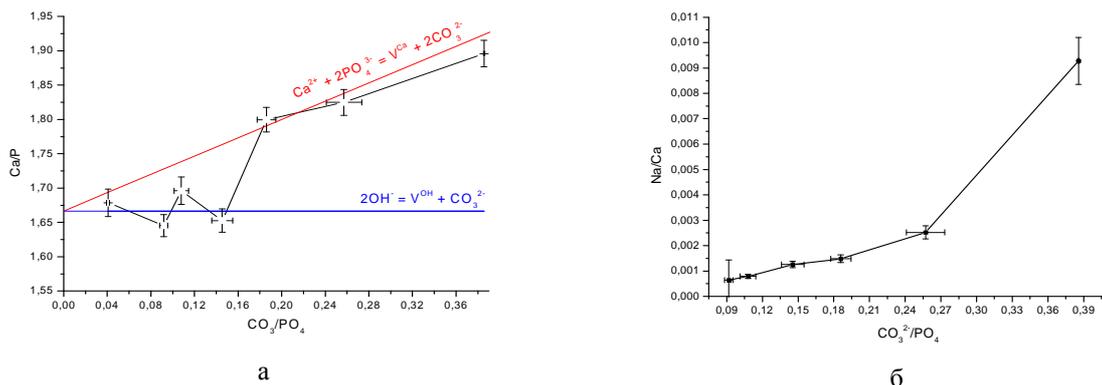
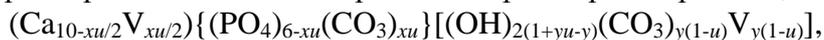


Рис. 7. а) Определение механизма замещения по результатам химического анализа, б) степень замещения кальция натрием по результатам химического анализа

Наклон экспериментальной зависимости для составов с высоким содержанием карбонат-ионов совпадает с таковым для модели Б, что согласуется с предположением о преимущественном Б-типе замещения в области $x+y > (0,25...0,5)$. Данные АЭС ИСП (рис. 7 б) свидетельствуют о том, что до $x+y=1,5$ содержание натрия в КГА пренебрежимо мало (в пределах ошибки метода), и лишь при высоких степенях замещения карбонат-ионов можно заметить вклад механизма двойного гетеровалентного замещения $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{Ca}^{2+}$, $\text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow \text{PO}_4^{3-}$.

Таким образом, при увеличении степени замещения происходит *независимое* заполнение А- и Б-позиций в структуре КГА карбонат-ионами, причем доля А-позиций снижается незначительно, а доля Б-замещения существенно возрастает. Дополнительная термодинамическая степень(и) свободы твердой фазы КГА возникает вследствие того, что рассматриваемая в работе многокомпонентная физико-химическая система содержит только две фазы (раствор и осадок КГА) и, потому, является многовариантной. Это нашло отражение в предложенной нами трехпараметрической модели строения твердого раствора КГА, смешанного АБ-типа



где () – позиции Ca, { } – позиции Б-типа, [] – позиции А-типа,

V - вакансия

параметр $0 < x < 6$ описывает замещение Б-типа,

параметр $0 < y < 1$ описывает замещение А-типа,

параметр $0 < u < 1$ отражает переход между Б- и А-позициями (аналог степени обращенности в шпинелях);

Указанные три степени свободы описывают *независимое* заполнение А- и Б-типа позиций карбонатных ионов в структуре КГА (при заданных, например, Ca/P и CO_3/P). Одни и те же значения Ca/P и CO_3/P могут быть достигнуты различными наборами параметров x , y , u . При фиксированных параметрах синтеза (p , T , pH , состав исходного раствора) состав (т.е. соотношения Ca/P и CO_3/P) и структура осадка (вклады А- и Б-типов замещения) однозначно не определены. Следовательно, небольшие локальные вариации состава раствора, pH способны изменить состав осадка КГА. Это может быть причиной невоспроизводимости синтеза в смысле однородности состава и морфологии кристаллов КГА и значительного разброса литературных данных относительно концентрационных зависимостей параметров решетки. Описанная ситуация многовариантности подразумевает *неоднородность распределения карбонат-иона* как между отдельными кристаллами, так и в пределах одного кристалла (например, разное содержание карбонат-иона у поверхности и в объеме каждого кристалла КГА).

Микроструктура КГА по данным электронной микроскопии

По данным просвечивающей электронной микроскопии (рис. 8) наблюдается закономерное уменьшение размера частиц с увеличением содержания CO_3^{2-} , при этом габитус кристаллов КГА изменяется с игольчатой формы (характерной как для чистого ГА, так и для КГА А-типа) на равноосную (характерную для замещения Б-типа). Описанные наблюдения согласуются с имеющимися в литературе данными. Нами обнаружены, два не упоминавшихся ранее явления.

1) Сосуществование двух различных морфологических типов кристаллов в пределах одного образца. Это хорошо различимо на образцах с промежуточными степенями замещения. Мы полагаем, что это может быть связано как с вариацией общего содержания карбонат-иона, так и с вариацией его распределения между А- и Б-позициями в различных кристаллах при одном и том же брутто-составе.

2) Практически все образцы являются мезопористыми с размерами пор не более 10 нм. Наиболее отчетливо пористость наблюдается в игольчатых кристаллах (как при оптимальном дефокусе, так и при пере- и недофокусировке) при больших увеличениях (рис. 9). Нагрев образца электронным пучком приводит к коалесценции пор, их вскрытию, и потере образцом первоначального габитуса. Поры, заполненные побочным продуктом реакции – раствором NH_4NO_3 , представляют серьезную опасность для медико-биологических применений материала в силу высокой токсичности нитрат-ионов. В нашей работе мы уделяли пристальное внимание этому вопросу. Осадок тщательно промывали, была проведена термообработка КГА.

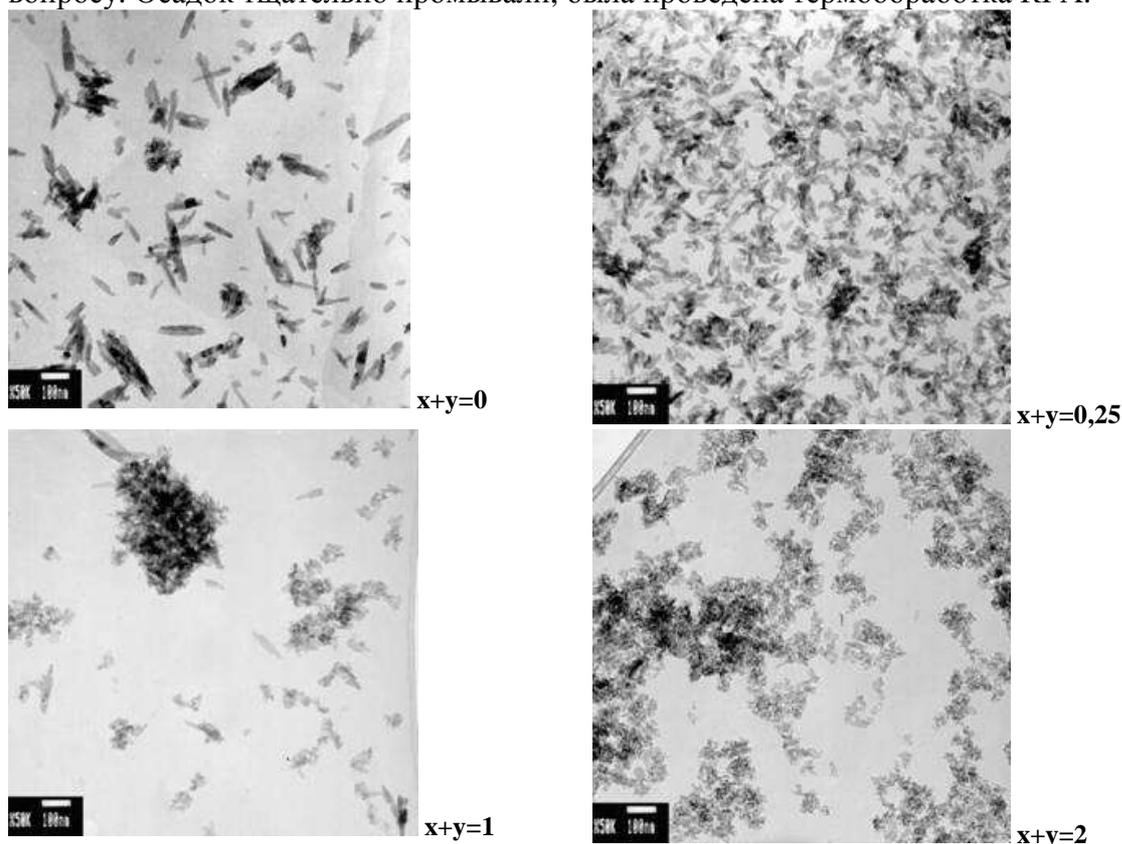


Рис. 8. Микрофотографии образцов КГА, отожженных при 260 °С (x50000).

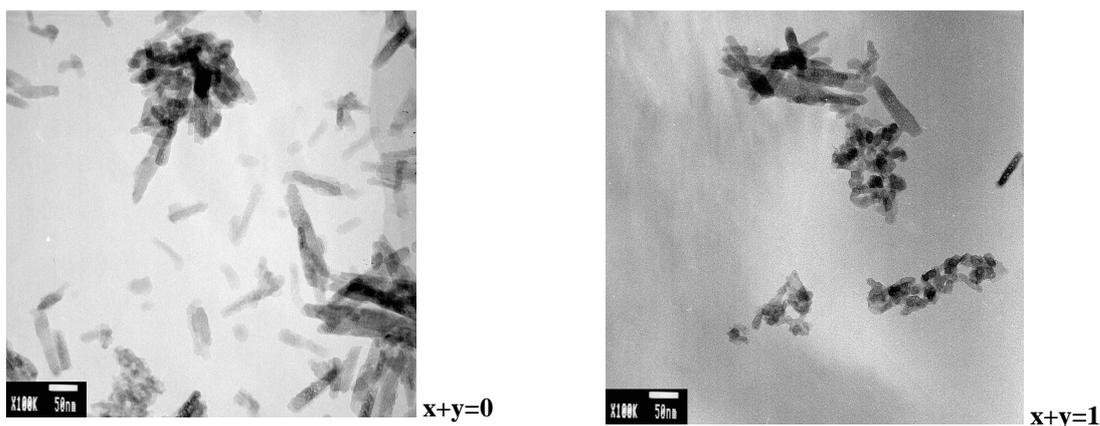


Рис. 9. Увеличенные изображения образцов КГА (x100000).

Конкуренция между CO_3^{2-} и NO_3^- за А-позиции в структуре КГА

Спектры ЭПР облученных нанокристаллов КГА представлены на рисунке 10 а. Для определения природы наблюдаемых новых парамагнитных центров в X-диапазоне была использована более информативная методика импульсного ЭПР, с детектированием амплитуды первичного электронного спинового эха (рис. 10 б). Спектр ЭПР образцов с $x=0$ описывается спиновым гамильтонианом аксиальной симметрии:

$$H = g_{\parallel} \beta H_z S_z + g_{\perp} \beta (H_x S_x + H_y S_y) + A_{\parallel} S_z I_z + A_{\perp} (S_x I_x + S_y I_y),$$

где $S=1/2$, $I=1$; с параметрами гамильтониана $g_{\parallel}=2,005$, $g_{\perp}=2,009$, $A_{\parallel}=6,65$ мТл, $A_{\perp}=3,4$ мТл.

Параметры наблюдаемого спектра ЭПР (g – тензор и тензор сверхтонкого взаимодействия A) близки к соответствующим характеристикам радикала NO_3^{2-} в облученном кристалле KNO_3 и других кристаллических матрицах. Характерной особенностью спектра радикала NO_3^{2-} является аксиальная симметрия. Такие радикалы впервые наблюдаются в образцах синтетического гидроксиапатита.

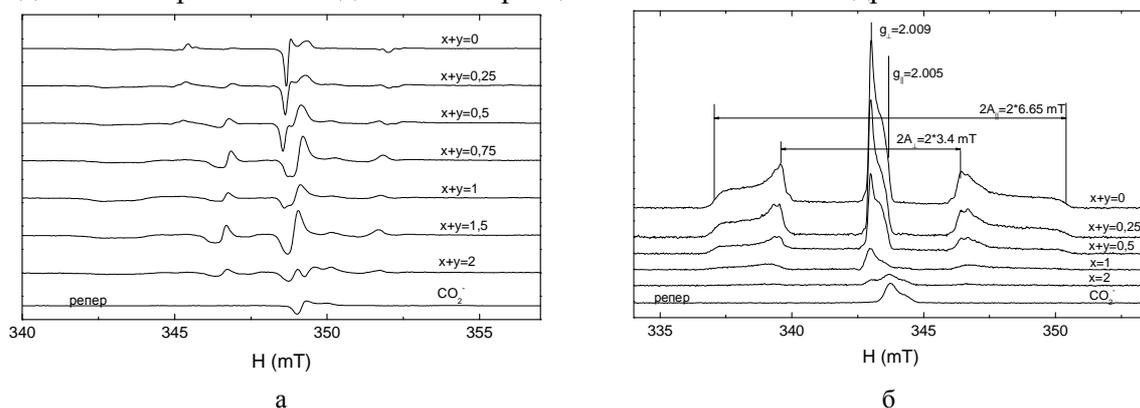


Рис. 10. а) Спектры ЭПР нанокристаллов гидроксиапатита $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y$ с различными степенями карбонизации $x+y=0 - 2$. Частота СВЧ 9,6 ГГц, $T=300\text{K}$, б) Спектры ЭПР, полученные при детектировании амплитуды электронного спинового эха, нанокристаллов гидроксиапатита $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-2y}(\text{CO}_3)_y$ с различными степенями карбонизации $x+y=0 - 2$. Частота СВЧ 9.6 ГГц, $T=300\text{K}$

Происхождение парамагнитных центров NO_3^{2-} может быть двояким: (1) нитрат-ионы маточного раствора, инкапсулированного в мезопорах, (2) изоморфизм в А-позициях. Для удаления маточного раствора, находящегося в мезопорах синтезированного гидроксиапатита, исследуемые образцы помимо послесинтетической термообработки при $260\text{ }^\circ\text{C}$, были подвергнуты отжигу при

400 °С в вакууме ($P < 10^{-4}$ мбар) с последующим рентгеновским облучением. Значительных изменений в спектре ЭПР NO_3^{2-} не произошло. Это показывает, что при синтезе нанокристаллов группы NO_3^{2-} не остаются в маточном растворе, а внедряются в кристаллическую решетку.

Для уточнения локализации нитрат-иона были исследованы спектры двойного электронно-ядерного резонанса (ДЭЯР) (рис. 11). В спектре ДЭЯР наблюдались линии соответствующие ларморовским частотам фосфора и водорода. Результаты измерений спектров ДЭЯР и оценка расстояний до ближайших лигандов, в приближении только магнитного диполь-дипольного взаимодействия, представлены в таблице 2. Анализируя данные о кристаллографической структуре гидроксиапатита и сравнивая межатомные расстояния для различных позиций в структуре гидроксиапатита и ближайших к ним ионов фосфора и водорода в структуре гидроксиапатита можно предположить, что парамагнитный комплекс NO_3^{2-} занимает позицию А-типа в ОН-каналах.

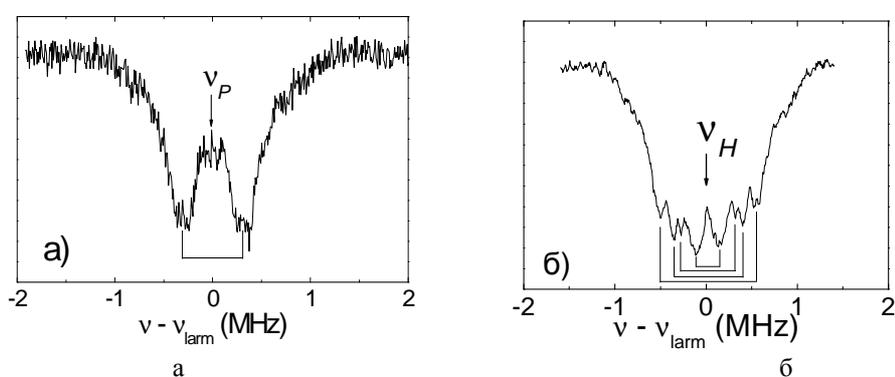


Рис. 11. Спектры ДЭЯР нанокристаллов КГА. а) область ларморовской частоты фосфора. б) область ларморовской частоты протонов. Частота СВЧ 93.8 ГГц, T=300К

С увеличением степени замещения, спектр ЭПР трансформировался, и происходило значительное уменьшение интенсивности спектра NO_3^{2-} . При значениях $x+y=2$, в спектре ЭПР начинали преобладать линии характерные для спектров радикала CO_2^- . Такую трансформацию спектра можно объяснить, во-первых, тем, что группа NO_3^{2-} является более эффективной электронной ловушкой, чем CO_2^- , и, во-вторых, с увеличением содержания карбонат-иона происходит уменьшение внедрения группы NO_3^{2-} в кристаллическую решетку гидроксиапатита, поскольку с увеличением степени замещения возрастает вклад замещения Б-типа.

Таблица 2. Параметры спектра ДЭЯР и рассчитанные расстояния до ближайших лигандов

ядро	Частота, КГц	Рассчитанное расстояние, Å
H1	1058	4,2
H2	755	4,7
H3	595	5,1
H4	261	6,7
P	635	3,7

Строение КГА по данным рентгеновской дифракции

Зависимость объема элементарной ячейки от состава имеет немонотонный характер вследствие возможности независимого замещения параллельно в две позиции (А- и Б-типа). При этом следует отметить, что CO_3^{2-} -анионы, находящиеся в позициях А-типа, приводят к увеличению объема элементарной ячейки (при этом параметр a растет, c падает), а в Б-типа – к уменьшению (параметр a падает, c растет),

что объясняется разницей в размере между CO_3^{2-} , OH^- и PO_4^{3-} -анионами. Таким образом, некоторое увеличение объема элементарной ячейки в области небольших степеней замещения обусловлено преимущественным замещением в позиции А-типа (позиции OH^- -анионов), в то время как при увеличении степени замещения наблюдается уменьшение объема элементарной ячейки, связанное со сменой преимущественного типа замещения на Б-тип (рис. 12).

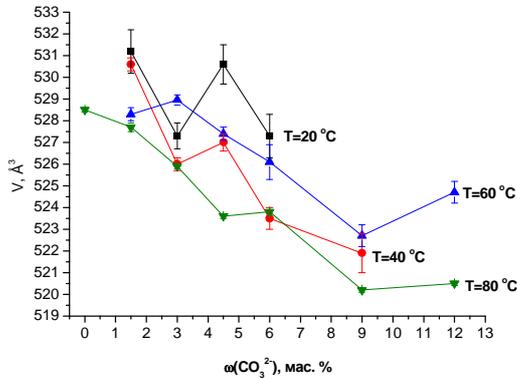


Рис. 12. Рассчитанные объемы элементарных ячеек образцов КГА синтезированных при температурах 20, 40, 60, 80 °C после термической обработки 260 °C/1 час

Поскольку различный состав приводит к различным параметрам решетки, то сосуществование таких областей в пределах одного кристаллита вызывает возникновение напряженного состояния с уравниванием напряжений в пределах объема кристаллита. Соответствующие им значения микродеформации решетки получены анализом зависимости ширины рентгеновской линии в зависимости от дифракционного угла θ в приближении изотропной деформации и равноосного изменения блоков мозаики.

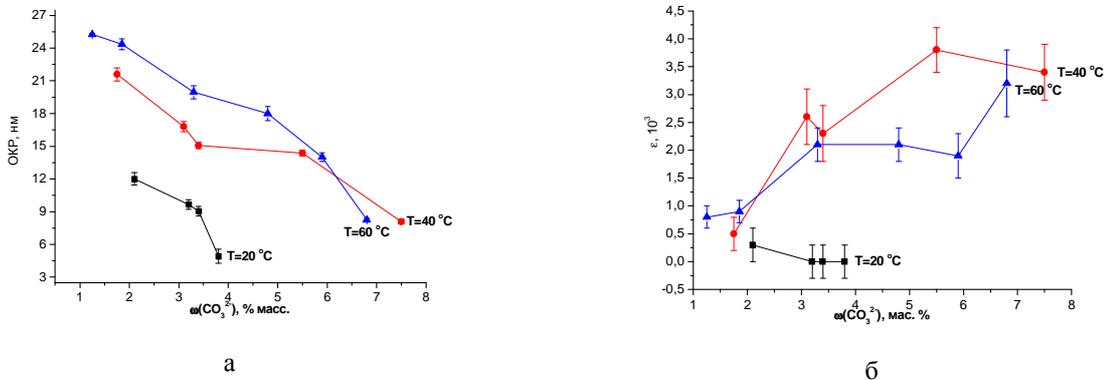


Рис. 13. Зависимость ОКР (а) и микродеформаций решетки (б) в зависимости от содержания CO_3^{2-} - анионов

Как видно из приведенных зависимостей, наблюдается закономерное уменьшение размеров ОКР с увеличением содержания CO_3^{2-} -анионов (рис. 13), при этом размеры ОКР систематически ниже размера частиц, определяемого по данным РЭМ и ПЭМ. Эти различия могут быть связаны с мезопористостью кристаллов КГА в полученных порошках.

Термическая устойчивость карбонатгидроксиапатитов

Анализ термограмм образцов КГА, записанных в квазиизотермическом режиме, позволяет выделить три области, отвечающие определенным процессам, происходящим при нагревании КГА:

1) интервал температур до 300 °C, связанный с удалением слабосвязанной воды, адсорбированных побочных продуктов реакции синтеза;

2) область температур в районе 600 – 850 °С (в зависимости от состава), где наблюдается резкая «ступенька» потери массы, связанная с удалением значительных количеств воды и CO₂; подобный элемент на квазиизотермической кривой соответствует формально реакции нулевого порядка, скорость которой лимитируется лишь теплоподводом; мы полагаем, что именно в этом интервале происходит вскрытие пор и начинается *разложение* КГА;

3) высокотемпературная область выше 850 °С, связанная с дальнейшим удалением воды и углекислого газа; изменение массы в интервале 500-1200 °С соответствует прогнозируемому на основании одной из Б-моделей составу КГА. Заметное появление примесных фаз при разложении КГА наступает при температурах более 800 °С.

Растворение КГА в модельных средах in vitro

Исследование растворимости КГА в слабощелочной среде (рН=7,4; трис-буфер) было проведено для моделирования пассивной фазы резорбции материала в организме. Наблюдается закономерное увеличение растворимости (асимптотического значения на кривой накопления ионов Ca²⁺ в растворе при временах более 3000 с) с ростом степени замещения в каждой серии. При этом наилучшая растворимость среди однофазных образцов наблюдалась у образца в случае КГА со значениями $x+y=1,5$, полученного при температуре 40 °С, который и был выбран для дальнейших экспериментов по консолидации порошка (рис. 14 а).

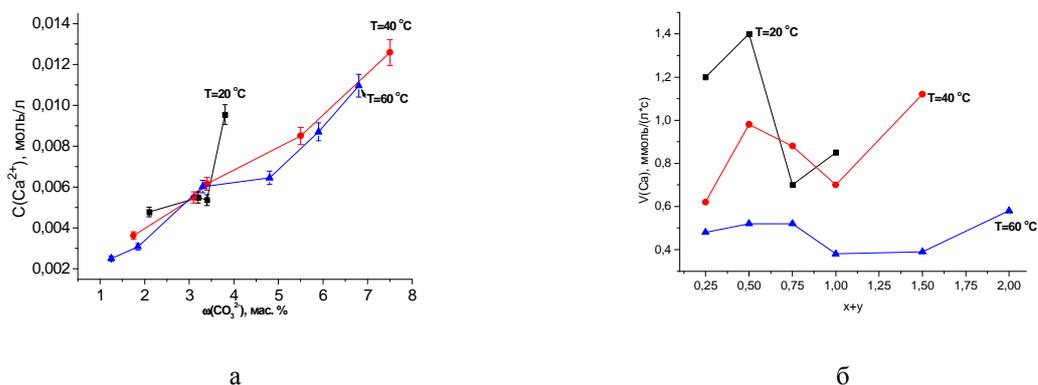


Рис. 14. Растворимость (а) и начальная скорость растворения (б) порошков КГА, полученных при температуре 20, 40 и 60 °С в трис-буфере при рН=7,4

Из ионометрических кривых накопления Ca²⁺ в растворе были определены начальные скорости растворения. Падение начальной скорости растворения в области значений $x+y=0,5...1$ можно объяснить сменой преимущественного типа замещения. На начальных этапах замещения происходит дестабилизация структуры апатита путем замещения в позиции преимущественно А-типа, что сопровождается увеличением объема элементарной ячейки и начальной скорости растворения. Далее происходит переход карбонат-ионов в позиции Б-типа, что сопровождается возвращением объема элементарной ячейки к своим прежним значениям и уменьшением скорости растворения, несмотря на рост микродеформаций решетки. На заключительном этапе продолжается замещение в позиции Б-типа, что приводит к уменьшению объема элементарной ячейки и *уменьшению размера кристаллов* КГА. Последнее, по-видимому, и является причиной роста интегральной скорости растворения при дальнейшем увеличении степени замещения. Влияние *микронапряжений*, возникающих в кристалле КГА в процессе внедрения в него допанта, выражено менее сильно. С точки зрения начальной скорости растворения,

отнесенной к единице поверхности, более значимым фактором становится *лабильность* карбонат-иона в соответствующей позиции, поэтому данная скорость изменяется симбатно степени заполнения А-позиций.

Исследование растворимости карбонатгидроксиапатитов в слабокислой среде (рН=5,5; ацетатный буфер) было проведено для моделирования активной фазы резорбции материала остеокластами. Получаемый при растворении КГА раствор является метастабильным, поскольку содержание кальция в нем (рСа=3,3) превышает таковое, определенное исходя из ПР (СаНРО₄·2Н₂О) (фазы стабильной в данном интервале рН). Визуально раствор остается опалесцирующим, а по истечению длительного времени значение рСа падает к величине порядка 3,5 (т.е. происходит кристаллизация брусита СаНРО₄·2Н₂О. На основании кривых накопления Са были

определены приведенные начальные скорости растворения $w = \frac{d(pCa) / dt|_{t=0}}{(pCa_0 - pCa_\infty)}$ (в с⁻¹)

и представлены на рис. 15 вместе с данными по удельной поверхности образцов. Значения скоростей имеют тенденцию к росту с увеличением степени замещения, однако немонотонно и, практически, симбатно, с изменениями размеров ОКР и удельной поверхности.

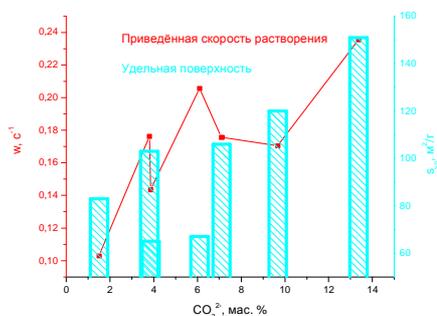


Рис. 15. Изменение приведенной начальной скорости растворения и удельной поверхности порошков КГА, синтезированных при 80 °С, от содержания CO₃²⁻

Таким образом, с увеличением содержания CO₃²⁻ наблюдается немонотонное увеличение скорости растворения КГА как в слабокислой среде, так и в средах близких к нейтральным. Установлено два значимых фактора, влияющих на скорость растворения КГА – *размер кристаллов ГА* и *степень заполнения позиций А-типа*. Разнонаправленное действие указанных факторов при увеличении содержания CO₃²⁻ и обуславливает немонотонное изменение скорости растворения. Поскольку в процессе растворения могут высвобождаться нитрат-ионы из мезопор, содержащих маточный раствор, или из А-позиций в случае малых степеней замещения, следует обратить внимание на цитотоксичность полученных порошков.

Биологические испытания порошков КГА in vitro

Результаты исследований жизнеспособности клеток, культивируемых в присутствии вытяжек КГА, методом МТТ показали, что не наблюдалось достоверных отличий между жизнеспособностью клеток в средах, содержащих вытяжки КГА различного состава и жизнеспособностью клеток в среде, не содержащей добавок исследуемых материалов. Жизнеспособность клеток во всех семи представленных случаях составила 100-120 %, таким образом, данные материалы не являются цитотоксичными. В то же время в среде, содержащей 10 % ДМСО, наблюдалась практически 100 % гибель клеток (рис. 16).

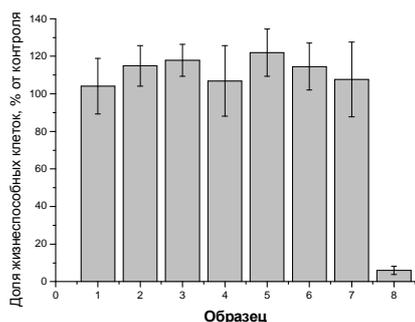


Рис. 16. Зависимость оптической плотности в МТТ - тесте от вида образца, где 1– 0 КГА; 2 – 0,25 КГА; 3 – 0,5 КГА; 4 образец – 0,75 КГА, 5 – 1 КГА; 6 – 1,5 КГА; 7 - 2 КГА; 8 – 10 % ДМСО

Результаты исследований показали, что внешний вид клеточного монослоя, степень расплывания и жизнеспособность клеток, культивируемых в присутствии исследуемых материалов, не отличался от такового в контроле. Можно говорить о том, что исследуемые в течение 24 часов образцы в данных концентрациях не содержат компонентов, негативно влияющих на адгезию, расплывание и пролиферативную активность фибробластов человека. Было проведено долгосрочное сокультивирование фибробластов, выделенных из пуповины человека, и порошков КГА со степенью замещения $x+y=0,25$ и 2. Показано, что уже после нескольких дней культивирования наблюдается адгезия клеток к поверхности агломератов карбонатгидроксиапатита в обоих образцах. Таким образом, КГА являются биосовместимыми и могут применяться в работах по тканевой инженерии.

Консолидация КГА

Посредством спекания в токе CO_2 были получены керамические образцы КГА. Однофазная керамика получается при $1000\text{ }^\circ\text{C}$, 12 часов при малом содержании карбонат-ионов в структуре ($x+y=0; 0,25$), в случае образцов с большим содержанием карбонат-иона, наблюдается появление примесных фаз карбоната и оксида кальция, кроме того, происходит значительное расширение образца за счет выделения CO_2 газа в случае максимального содержания карбонат-ионов ($x+y=2$).

Получение композитов КГА/фосфатное стекло методом горячего прессования.

Решением проблемы разложения КГА в условиях высокотемпературной консолидации является введение в КГА легкоплавкой биорезорбируемой добавки, в качестве которой было предложено легкоплавкое фосфатное стекло, состоящее из 54 мас. % $\text{Na}_4\text{CaP}_6\text{O}_{18}$ и 46 мас. % $\text{Na}_2\text{CaP}_2\text{O}_7$.

Термограмма фосфатного стекла приведена на рисунке 17. Как видно, при температуре $\sim 450\text{ }^\circ\text{C}$ наблюдается размягчение стекла, при котором происходит уменьшение его вязкости. При $550\text{ }^\circ\text{C}$ наблюдается кристаллизация стекла, а при $750\text{ }^\circ\text{C}$ - его плавление.

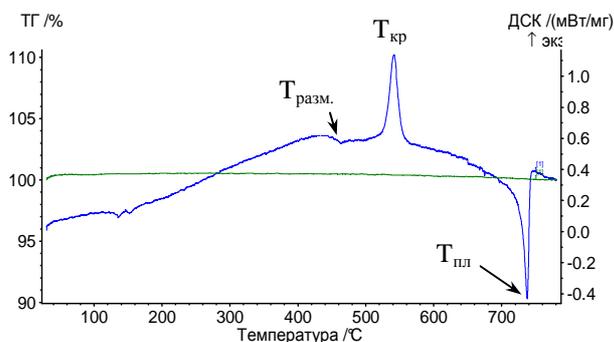


Рис. 17. ДТА-кривая фосфатного стекла

Взаимодействие КГА со стеклом, отмечаемое по выделению примесной фазы трикальцийфосфата, начинается при температурах выше 500 °С. Поэтому для консолидации было выбрано «теплое» (250 °С) и «горячее» прессование (450 °С) под давлением 400 МПа. При использовании методов «теплого» и «горячего» прессования не наблюдается заметной потери CO_3^{2-} -анионов (табл. 3), а значение их содержания остается неизменным с точностью до ошибки.

Таблица 3. Содержание CO_3^{2-} -анионов в композитах КГА/фосфатное стекло до и после прессования при повышенной температуре в пересчете на чистый КГА

	КГА (исходный)	КГА/стекло (Т=250 °С)	КГА/стекло (Т=450 °С)
Содержание CO_3^{2-} , мас. %	7,5 ± 0,3	7,2 ± 0,5	6,9 ± 0,5

Образцы, полученные методом горячего прессования, показали достаточную для практических применений прочность на сжатие до 25 МПа. Невысокая относительная плотность (88,5%) не является серьезным недостатком, т.к. пористость материала обычно благоприятствует резорбции *in vivo*. Следует отметить, что композиты достаточно эффективно подвергаются механической обработке, что необходимо для придания имплантату формы соответствующего костного дефекта. В качестве альтернативы фосфатному стеклу может выступать термопластичный полимер, например, примененный нами биосовместимый полимер, поли-3-оксибутират.

ВЫВОДЫ

1. Повышение температуры синтеза с 20 до 80°С приводит к увеличению содержания CO_3^{2-} в КГА с 3,9 до 13,6 мас. %, при этом степень замещения Са на Na пренебрежимо мала. Для анализа распределения CO_3^{2-} по неэквивалентным позициям замещения в структуре ГА разработана и апробирована методика количественной оценки степени заполнения позиций, основанная на использовании ИК-спектроскопии. Совокупность данных позволяет утверждать, что происходит преимущественное заполнение А-позиций в каналах структуры ГА при малом содержании CO_3^{2-} (менее 5 мас. %), увеличение содержания карбонат-ионов приводит к замещению PO_4^{3-} -анионов (Б-позиции), что сопровождается заметным сжатием кристаллической решетки КГА.
2. Предложена трехпараметрическая модель строения смешанного КГА АБ-типа, которая допускает неоднородность состава кристаллов КГА при заданном брутто-составе раствора при синтезе. Это соображение положено в основу трактовки морфологического разнообразия кристаллов КГА в пределах образца одного брутто-состава. Показано, что исследованные в работе апатиты являются мезопористыми телами с размерами пор не более 10 нм, в которых может быть инкапсулирован содержащий токсичные NO_3^- -ионы маточный раствор.
3. Исследования КГА методами ИК- и радиоспектроскопии указывают на возможность изоморфного замещения NO_3^- -ионами позиций в каналах апатитной структуры и конкуренцию между NO_3^- и CO_3^{2-} за позиции А-типа.

При высоких содержаниях карбонат-иона внедрение нитратного иона в решетку КГА пренебрежимо мало. Поэтому использование радиоспектроскопии представляется практически важным для оценки токсичности наногидроксиапатита, синтезируемого для медико-биологических целей, а также для разработки приемов очистки апатита от токсичных примесей.

4. С увеличением содержания CO_3^{2-} наблюдается немонотонное увеличение скорости растворения КГА как в кислой среде (рН~5), так и в средах близких к нейтральным (рН~7,4). Установлено два значимых фактора, влияющих на скорость растворения КГА – размер кристаллов ГА и степень заполнения позиций А-типа. Разнонаправленное действие указанных факторов при увеличении содержания CO_3^{2-} обуславливает немонотонное изменение скорости растворения.
5. Для получения компактного материала на основе КГА (с относительной плотностью до 90 %) методом «горячего» прессования в качестве термопластичной матрицы предложено фосфатное стекло. Показана практическая возможность получения композита КГА/стекло с прочностью на сжатие до 25 МПа при температурах не выше 500 °С, в котором сохраняется уровень содержания карбонат-ионов, соответствующий исходному порошку КГА.
6. Полученные в работе КГА являются биосовместимыми и могут применяться в работах по тканевой инженерии. МТТ-тест на культуре клеток фибробластов человека показал, что данные материалы не являются цитотоксичными и не содержат компонентов, негативно влияющих на адгезию, распластывание, пролиферативную активность и жизнеспособность клеток. При долгосрочном сокультивировании порошки КГА проявляют высокую адгезивную способность к клеткам типа фибробластов.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Е.С. Ковалёва, Я.Ю. Филиппов, В.И. Путляев, Ю.Д. Третьяков, В.К. Иванов, Н.И. Силкин, Л.Ф. Галиуллина, А.А. Родионов, Г.В. Мамин, С.Б. Орлинский, М.Х. Салахов, Биорезорбируемые порошковые материалы на основе $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$ // Ученые записки Казанского государственного университета, 2010, 152(1), 79-98
2. В.С. Комлев, И.В. Фадеева, А.Н. Гурин, Е.С. Ковалёва, В.В. Смирнов, С.М. Баринов, Влияние содержания карбонат-групп в карбонатгидроксиапатитовой керамике на ее поведение *in vivo* // Неорганические материалы, 2009, 45(3), 373-378
3. E.S. Kovaleva, M.P. Shabanov, V.I. Putlyaev, Yu.D. Tretyakov, V.K. Ivanov, N.I. Silkin, Bioresorbable carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$ powders for bioactive materials preparation // Cent. Eur. J. Chem., 2009, 7(2), 168–174
4. E.S. Kovaleva, M.P. Shabanov, V.I. Putlyaev, Ya.Yu. Filippov, Yu.D. Tretyakov, V.K. Ivanov, Carbonated hydroxyapatite nanopowders for preparation of bioresorbable materials // Mat.-wiss. u. Werkstofftech., 2008, 39(11-12), 1-8
5. Е.С. Ковалёва, А.Г. Вересов, А.В. Соин, В.И. Путляев, Ю.Д. Третьяков, Сравнительный анализ биоактивности материалов // Поверхность.

- Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, 2007, 11, 72-76
6. Е.С. Ковалёва, А.В. Кузнецов, А.В. Соин, А.Г. Вересов, Исследование биоактивности материалов с использованием модельных сред // Доклады Академии Наук, 2005, 405(1), 1-4
 7. О.В. Синицина, А. Г. Вересов, Е.С. Ковалёва, Ю.В. Коленько, В.И. Путляев, Ю.Д. Третьяков, Получение гидроксиапатита гидролизом α -Ca₃(PO₄)₂ // Известия Академии наук, 2005, Серия химическая, 1, 78-85
 8. E.S. Klimashina, Ya.Yu. Filippov, V.I. Putlyaev, Synthesis and investigation of nanosized carbonated hydroxyapatite for in vitro tests // III Nanotechnology International Forum «RUSNANOTECH-2010», Moscow, Exprocentre, November 1-3, ISBN 978-5-9902492-1-9
 9. Е.С. Климашина, Керамика из наноразмерного карбонатгидроксиапатита для *in vitro* тестов // Открытая школа-конференция стран СНГ «Ультрамелкозернистые и наноструктурные материалы (УМЗНМ)-2010», Уфа, Россия, 11-15 октября, 2010, стр. 119
 10. Я.Ю. Филиппов, Е.С. Ковалёва, В.И. Путляев, Синтез и исследование порошковых материалов на основе Ca_{10-x}Na_x(PO₄)_{6-x}(CO₃)_x(OH)₂ // Всероссийское совещание «Биоматериалы в медицине», Москва, Россия, 4 декабря 2009, стр. 87-88
 11. E.S. Kovaleva, Ya.Yu. Filippov, V.I. Putlyaev, Yu.D. Tretyakov, Bioresorbable carbonated hydroxyapatite nanopowders // 22nd European Conference on Biomaterials, Switzerland, Lausanne, 07-11 September, 2009, p. 465-877
 12. Е.С. Ковалёва, Я.Ю. Филиппов, В.И. Путляев, Карбонатзамещенный гидроксиапатит – перспективный материал с улучшенной биорезорбцией // II Международный форум по нанотехнологиям, проводимый «Российской корпорацией нанотехнологий», Россия, Москва, 6-8 октября, 2009, стр. 778
 13. E.S. Kovaleva, M.P. Shabanov, V.I. Putlyaev, Ya.Yu. Filippov, Yu.D. Tretyakov, V.K. Ivanov, Carbonated hydroxyapatite nanopowders for preparation of bioresorbable materials // German-Ukrainian Symposium on Nanoscience and Nanotechnology, Germany, University of Duisburg-Essen, 22-25 September, 2008, p.126
 14. E.S. Kovaleva, M.P. Shabanov, V.I. Putlyaev, Yu.D. Tretyakov, V.K. Ivanov, N.I. Silkin, Bioresorbable carbonated hydroxyapatite Ca_{10-x}Na_x(PO₄)_{6-x}(CO₃)_x(OH)₂. Powders for bioactive materials preparation // The 8th conference on solid state chemistry - SSC 2008, Slovak Republic, Bratislava, July 6-11, 2008, p.137
 15. Е.С. Ковалёва, М.П. Шабанов, В.И. Путляев, Ю.Д. Третьяков, Нанокристаллические биорезорбируемые материалы на основе карбонатгидроксиапатита // V Международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация для нанотехнологий, техники и медицины», Россия, Иваново, 23-26 сентября 2008, стр.212
 16. E.S. Kovaleva, M.P. Shabanov, V.I. Putlyaev, Yu.D. Tretyakov, Bioresorbable carbonated hydroxyapatite nanopowders for bioactive materials preparation // The Second Saint-Petersburg International Conference on NanoBiotechnologies «NanoBio'08», Russia, Saint-Petersburg, June 16-18, 2008, p. 161-162