

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

**Институт металлургии
и материаловедения
им. А.А. Байкова РАН**

80 лет

Москва

ИМЕТ РАН

2018 г.

УДК 669.1; 546.1; 546.3

Институт металлургии материаловедения им. А.А. Байкова РАН – 80 лет.
Сборник научных трудов.
М.: Интерконтакт Наука, 2018, 644 с.

ISBN 978-5-902063-58-2

Сборник подготовлен в связи с 80-летием создания Института Металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук. В статьях содержатся материалы по основным направлениям научной деятельности в области металлургии черных, цветных и редкоземельных металлов, материаловедения металлических, керамических, нанокристаллических, композиционных материалов, развития методов исследования состава, структуры и свойств материалов.

Материалы сборника могут представлять интерес для ученых и сотрудников научно-исследовательских и учебных институтов и университетов, промышленных предприятий, работающих в области металлургии черных, цветных и редких металлов, материаловедения неорганических материалов и методов исследования.

Редакционная коллегия

Академик К.А. Солнцев (ответственный редактор), академик О.А. Банных (зам. Ответственного редактора), академик В.М. Бузник, академик В.М. Иевлев, академик Ю.В. Цветков, чл.-корр. РАН М.И. Алымов, чл.-корр. РАН С.М. Баринов, чл.-корр. РАН Г.С. Бурханов, чл.-корр. РАН Григорович К.В., чл.-корр. РАН А.Г. Колмаков, чл.-корр. РАН В.С. Комлев, д.ф.-м.н. С.В. Симаков, к.т.н. О.Н. Фомина (ответственный секретарь)

ISBN 978-5-902063-58-2

© ИМЕТ РАН, 2018

Керамика из замещенных фосфатов кальция для восстановления поврежденной костной ткани

И.В. Фадеева, А.С. Фомин, С.М. Баринев

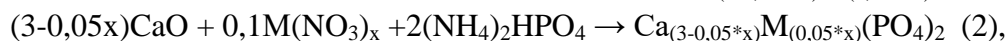
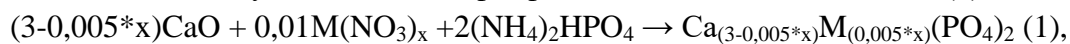
DOI: 10.30791/978-5-902063-58-2-343-357

Замещение обширных дефектов после хирургических вмешательств связано с разработкой новых материалов, способных замещать костную ткань или являться носителями факторов роста, стимулирующих образование собственной костной ткани. Данный подход к лечению получил название инженерия костной ткани [1]. Основными требованиями, предъявляемыми к таким материалам, являются биосовместимость с тканями организма, отсутствие отрицательных реакций со стороны иммунной системы, а также наличие пор различных размеров, необходимых для адсорбции протеинов и прорастания клеток и сосудов. Носителям клеточных культур отводится роль временной конструкции, которая должна заполнить костный дефект на то время, пока происходит формирование новой костной ткани. Поэтому материал носителя должен быть биodeградируемым, причем кинетика биodeградации материала носителя в организме должна быть совместима со скоростью образования новой костной ткани [2]. Материалы, производящиеся в настоящее время (гидроксиапатит ГА, трикальцийфосфат ТКФ), имеют ряд существенных недостатков, связанных прежде всего с низкой скоростью биodeградации в организме, в результате чего в новообразованной костной ткани остаются нерезорбированные остатки материала носителя. Одним из способов увеличения скорости биodeградации материала является увеличение дефектности его кристаллической решетки, возникающее при внедрении в кристаллическую решетку катионов и анионов, вызывающих напряжения решетки [3].

Трикальцийфосфат и керамика из него характеризуются большей скоростью биорезорбции по сравнению с ГА, однако и резорбция ТКФ оказывается недостаточно высокой по сравнению со скоростью образования новой костной ткани. В связи с этим проведение изоморфных катионных замещений в структуре ТКФ является более перспективным для получения новых материалов. Учитывая медико-биологические показатели, в качестве катионов-заместителей мы использовали катионы меди, серебра, цинка, железа, стронция. Внедрение этих ионов в структуру ТКФ позволит также придать материалам из них антибактериальные свойства, а внедрение ионов

стронция позволит улучшить пролиферацию остеобластов на поверхности таких материалов [4]

Порошки катионзамещенных ТКФ (где катион – серебро, цинк, медь, железо) со степенью замещения 0,1 и 0,01 моль получали, как описано в [5]. Синтезы проводили осаждением аморфного фосфата кальция (АФК, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) из водных растворов нитратов кальция и серебра, цинка, меди, железа и двухзамещенного фосфата аммония, согласно схеме (1):



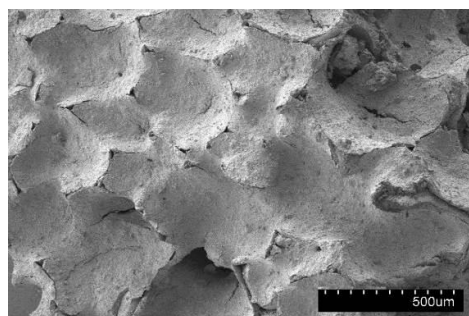
где М - катионы – серебра ($x = 1$), цинка, меди, стронция ($x = 2$), железа ($x = 3$).

Для формирования кристаллической структуры проводили термическую обработку порошков при температуре 900°C в течение 1 часа. Катионы-заместители входят в состав замещенных трикальцийфосфатов в количествах, соответствующих предложенным брутто-формулам.

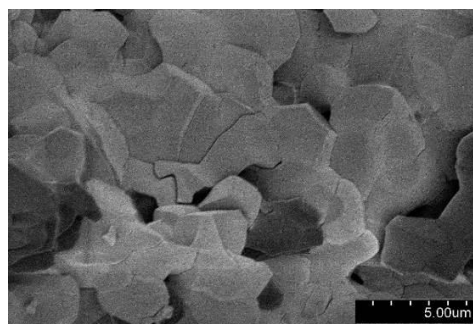
Согласно данным РФА, все синтезированные катионзамещенные ТКФ являются однофазными соединениями со структурой витлокита. Данный вывод подтверждается также результатами ИК спектроскопии.

На рис. 1 представлены микрофотографии пористой керамики из катионзамещенных ТКФ, изготовленной из полимера с содержанием пор 15 пор/см. Керамика сложена кристаллами преимущественно округлой формы. После выгорания во время обжига образец состоит из крупных кластеров материала и крупных взаимосоединяющихся пор среднего размера 200-400 мкм; а также более мелких, межзеренных пор нанометрового размера. Такие размеры пор позволяют проникать внутрь керамической матрицы биологическим потокам, клеткам, необходимым для последующего образования и нарастания новой костной ткани. По возрастанию размера кристаллов керамики из замещенных ТКФ можно расположить в ряд: $\text{Ag} < \text{Fe} < \text{Cu} < \text{Zn}$.

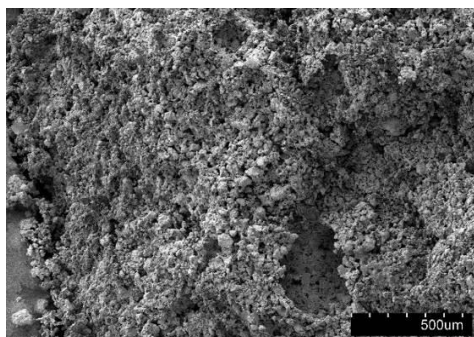
При выдерживании керамики из ТКФ замещенных в модельной жидкости (в физиологическом растворе) наблюдалось увеличение концентрации допирующих ионов в растворе (рис.2, табл.1), что связано с высвобождением этих ионов при растворении керамики. Через сутки после начала эксперимента концентрация ионов отличалась незначительно ($15 \pm 1 \text{ppm}$), однако через 30 суток после начала эксперимента концентрации ионов меди и железа отличались от концентраций серебра и цинка на порядок.



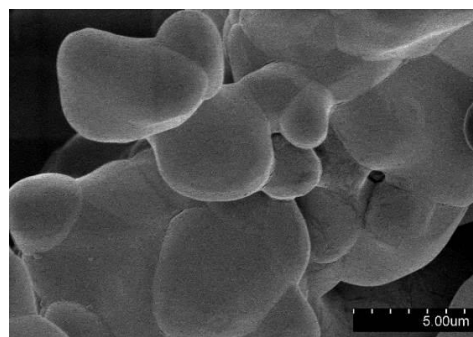
а



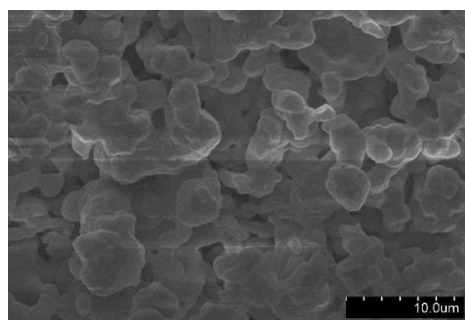
б



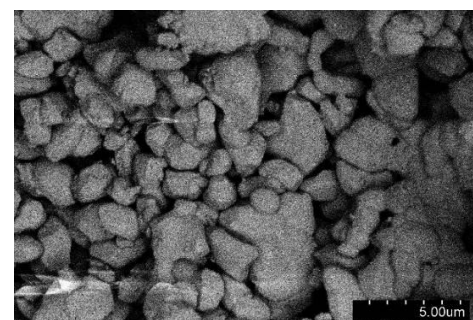
в



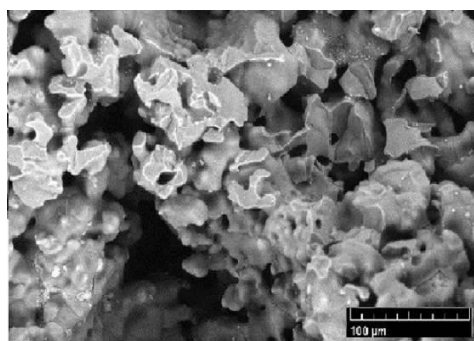
г



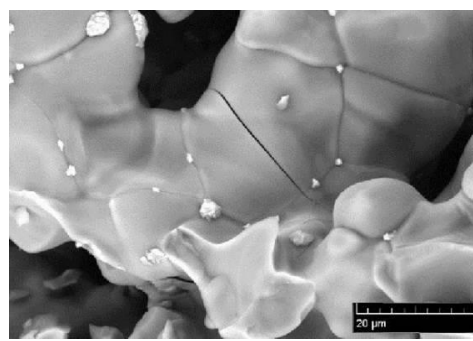
д



е



ж



з

Рис.1. Микроструктура керамических гранул после спекания при 1150⁰С: а, б – железосодержащий ТКФ; в, г – цинксодержащий ТКФ; д, е – серебросодержащий ТКФ; ж, з – медьсодержащий ТКФ.

Такое существенное различие нельзя объяснить влиянием только ионных радиусов этих катионов, на растворимость также оказывает влияние пористость керамик.

Таблица 1

Изменение концентрации допирующих ионов при растворении керамики в физиологическом растворе

Концентрация (мг/л, ppm) определяемого иона	Время выдержки в физиологическом растворе, сут.			
	1	3	16	30
Ag	0,16	2,40	3,20	5,52
Cu	0,14	0,18	0,22	0,30
Zn	0,16	1,00	2,19	7,72
Fe	0,14	0,22	0,33	0,56

Сплошной рост бактерий и зоны диаметром менее 10 мм (табл.2) свидетельствуют об отсутствии антимикробной активности исследуемого образца к данному штамму микроорганизма, зоны диаметром 10-15 мм свидетельствуют о слабой активности, 15-20 мм - умеренно выраженной, более 20 мм – выраженной.

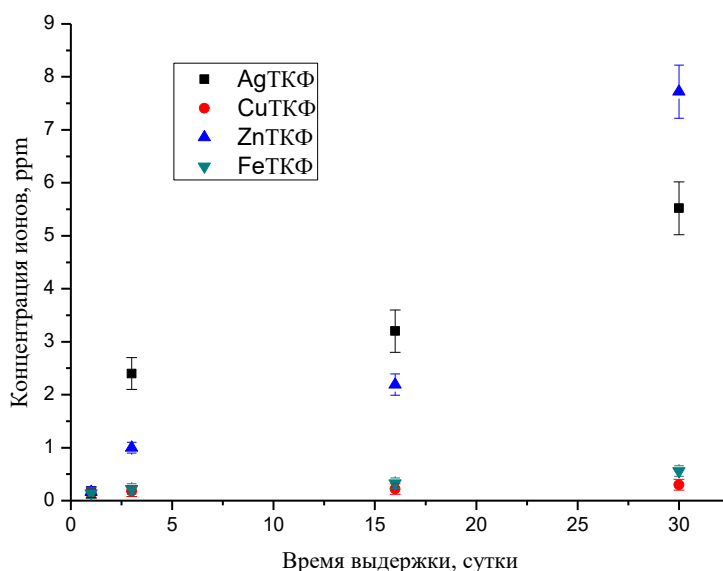


Рис.2. Изменение концентрации ионов при выдержке керамик в физиологическом растворе.

Таблица 2.

Результаты изучения антимикробной активности образцов катионзамещенных ТКФ.

Образец	Зона задержки роста, мм
ТКФ	0
FeТКФ1	21±2
ZnТКФ	30±2
AgТКФ	26±2
CuТКФ	27±2

Как видно из табл.2, все образцы катион-замещённых ТКФ, в отличие от чистого ТКФ, проявляют выраженную антимикробную активность. Наибольшую антимикробную активность показали образцы цинкзамещенного ТКФ.

Изучение характеристик материалов методом прямого контакта с клетками человека (рис.4) показало отсутствие значимых различий с контролем материала ТКФ и значительное увеличение клеточной активности у материалов CuТКФ, ZnТКФ, AgТКФ, SrТКФ. Наибольшая скорость нарастания клеточной массы наблюдалась для керамики, содержащей 0,28% масс. стронция.

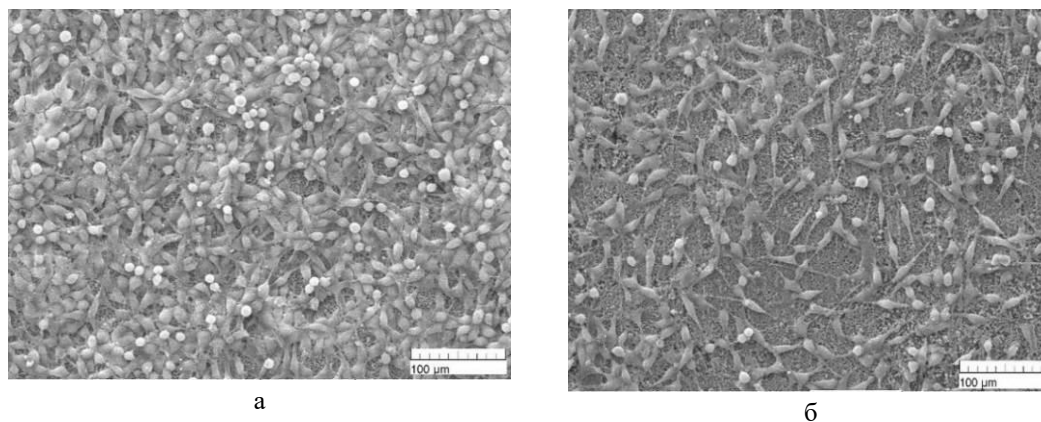
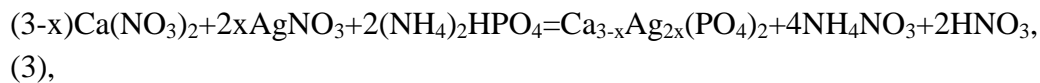


Рис.3. Клетки фибробластов человека на керамике: а – из CuТКФ; б – ZnТКФ

Таким образом, разработанная пористая керамика из медь-, серебро-, цинк-, железо-содержащих ТКФ с пористостью не менее 65% проявляет выраженные антимикробные свойства, а также поддерживает рост фибробластов человека, благодаря чему разработанная керамика перспективна для использования в остеопластической хирургии.

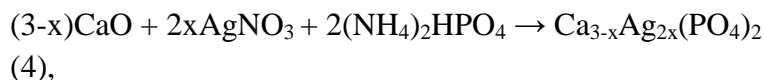
Разработана керамика на основе сереброзамещенного ТКФ [6] Получение сереброзамещенных трикальциевых фосфатов (AgТКФ)

осуществляли двумя методами – методом осаждения из растворов и гетерофазным синтезом [7]. Метод осаждения из растворов происходит по следующей схеме:



где $x = 0,1; 0,15; 0,2$.

В основе гетерофазного метода синтеза лежит механохимическая активация. Активация реагентов проводилась с использованием планетарной мельницы корундовыми шарами в тефлоновых барабанах. Взаимодействие реагентов происходит согласно схеме:



где $x = 0,1; 0,15; 0,2$.

Согласно данным элементного химического анализа содержание серебра в AgТКФ при $x=0,15$ составляет 0,50 %; что соответствует предложенной брутто-формуле – $\text{Ca}_{2,993}\text{Ag}_{0,014}(\text{PO}_4)_2$. Методом РФА установлено, что все синтезированные соединения, независимо от способа синтеза, имеют структуру, сходную со структурой β -ТКФ. Данные ИК-спектроскопии подтверждают вывод об образовании соединений со структурой витлокита (ТКФ).

Установлено, что степень замещения и способ синтеза AgТКФ практически не влияют на их термическую устойчивость. Выбор способа синтеза сказывается лишь на морфологии образующихся частиц: использование метода осаждения приводит к образованию более мелкодисперсных продуктов.

На основании данных РФА керамики из AgТКФ, спеченной при 1300°C , установлено, что во всех соединениях основной фазой является α -ТКФ.

На рис. 4 представлены микрофотографии керамики из AgТКФ, изготовленной из полимера с пористостью $15 \text{ пор}/\text{см}^2$. Керамика сложена кристаллами преимущественно округлой формы. После выгорания во время обжига образец состоит из крупных кластеров материала и крупных сообщающихся пор среднего размера 400-200 мкм; а также более мелких, межзеренных пор нанометрового размера. Такие размеры пор позволяют проникать внутрь керамической матрицы биологическим потокам, клеткам, необходимым для последующего образования и нарастания новой костной ткани.

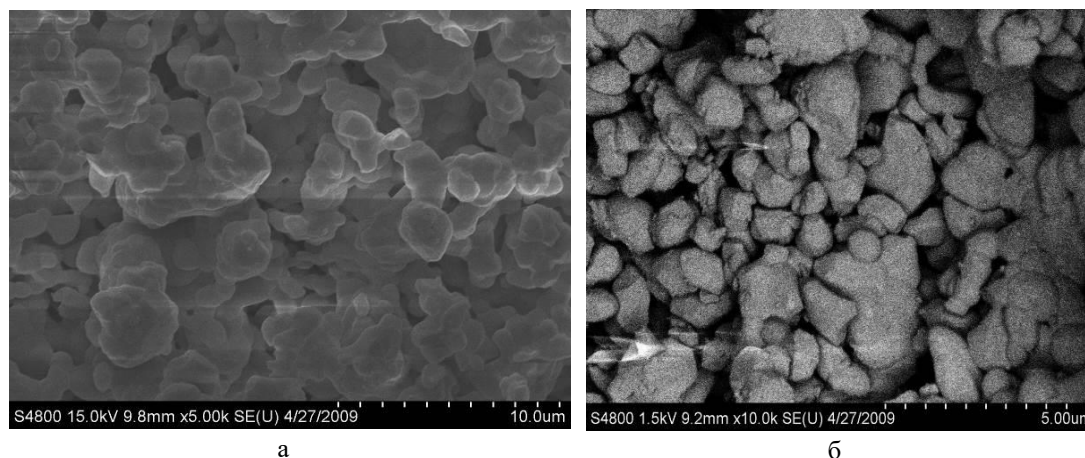


Рис.4. Микроструктура керамики из AgTKF, полученной спеканием при 1300 °С.

По диаметру зоны ингибирования установлено, что с увеличением содержания серебра от 1,39 масс.% до 3,38 масс. % возрастает активность по отношению к штаммам стафилококка и кишечной палочки (табл. 3).

Таблица 3.

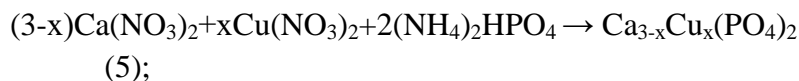
Зона ингибирования роста *E.coli* и *St.h* вокруг образцов керамики.

Образец	Бактериальная культура	Зона ингибирования роста, мм
AgTKF - 1,39 масс. % Ag	<i>E.coli</i>	0,5
AgTKF - 1,39 масс. % Ag	<i>St.h</i>	1,5
AgTKF – 3,38 масс. % Ag	<i>E.coli</i>	1
AgTKF – 3,38 масс. % Ag	<i>St.h</i>	2
TKF без Ag	<i>E.coli</i>	0
TKF без Ag	<i>St.h</i>	0

На основании исследований *in vitro* на культуре ФЧ, отмечается доза-зависимый эффект, проявляющийся в усилении тормозящего эффекта на размножение вегетативных форм изученных видов бактерий и острой токсичности при увеличении содержания ионов серебра в материале. Из изученных AgTKF степень замещения $x=0,15$ (0,5% Ag) является оптимальной, при которой наблюдается умеренные токсические свойства и сохраняется антибактериальные свойства в отношении представителей грамположительной и грамотрицательной флоры.

Фосфаты кальция, содержащие ионы меди, приобретают антибактериальные свойства так же, как ТКФ с ионами серебра [8]. Синтез медь-замещенных трикальцийфосфатов осуществляли кальцинацией

аморфных медьсодержащих фосфатов кальция, полученных осаждением из растворов [5]. Осаждение из растворов CuТКФ происходит по реакции (5):



Были выбраны степени замещения меди в ТКФ (x), равные 0,1 и 0,01. Методом РФА установлено, что основной фазой синтезированных соединений является витлокит (β -ТКФ) (рис.1)

Значения ОКР, рассчитанные для ТКФ и медьсодержащих ТКФ (табл.1) дают основания считать, что ионы меди входят в структуру ТКФ, замещая ионы кальция.

Таблица 4.

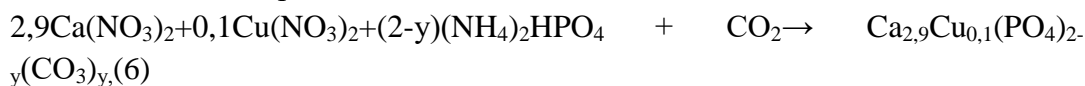
Данные ОКР для синтезированных трикальцийфосфатов.

Соединение	ТКФ	0,01CuТКФ	0,1CuТКФ
ОКР, нм	100	112	84

Погрешность вычисления ОКР не превышает 5%, в связи с чем различие полученных параметров ОКР, рассчитанных для ТКФ и медьсодержащих ТКФ, превосходят погрешность в 2-3 раза и подтверждают предположение о вхождении ионов меди в структуру ТКФ.

Данные ИК-спектроскопии подтверждают вывод об образовании соединений со структурой витлокита.

Ионы CO_3^{2-} не вводили в реакционную смесь, однако, они по данным ИК спектроскопии входят в состав медьзамещенного ТКФ. Можно предположить, что в связи с проведением синтеза в атмосфере воздуха, где присутствует углекислый газ, молекулы последнего вовлекаются в синтез и входят в состав продукта реакции. В таком случае, схему получения 0,1CuТКФ можно предположить в таком виде:



Сравнивая микрофотографии (рис.5а и 5б), соответствующие микроструктуре керамики из незамещенного ТКФ и 0,1CuТКФ, можно отметить, что введение меди в ТКФ приводит к уменьшению размеров кристаллов.

С целью определения природы парамагнитных центров в медьсодержащих образцах 0,01CuТКФ была проведена симуляция спектра ЭПР при низких температурах (рис.6). Идеальное согласие экспериментальных и расчетных данных позволяет утверждать, что наблюдаемый спектр обязан одиночным (изолированным) ионам Cu^{2+} в

структуре ТКФ. Из измерения и сравнения интегральных интенсивностей следует, что концентрация ионов Cu^{2+} в образце 0,1CuТКФ ($\approx 19,4 \cdot 10^{19}$ центров на грамм образца) в 10 раз больше, чем в образце 0,01CuТКФ ($\approx 2,0 \cdot 10^{19}$ центров на грамм образца). Это означает, что более 90 % меди в исследованных медьсодержащих образцах ТКФ (учитывая наличие посторонних примесей) находится в состоянии Cu^{2+} . Структура спектра ЭПР для образца 0,1CuТКФ является менее разрешенной, ввиду влияния обменного взаимодействия между медными парамагнитными центрами и подробно не изучалась.

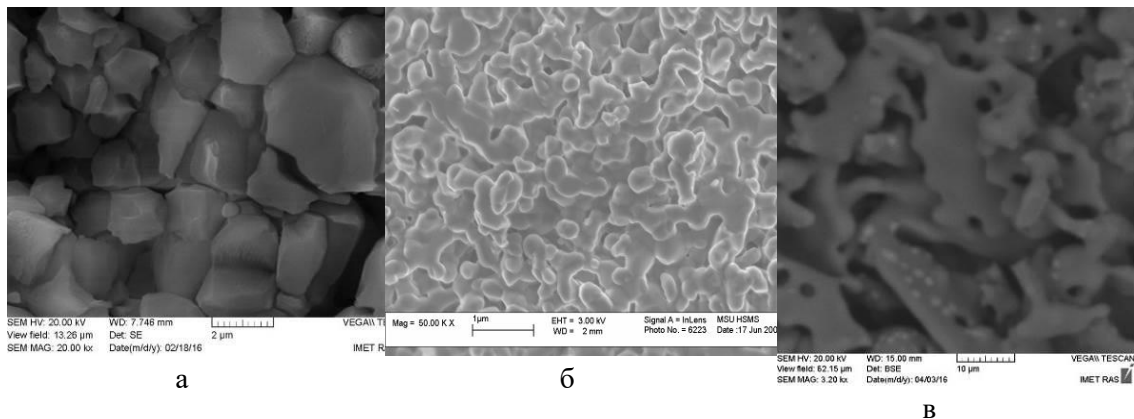


Рис.5. Микроструктура керамики, полученной спеканием образцов при 850°C : а – ТКФ, б - 0,1CuТКФ, в - 0,01CuТКФ.

Посев клеток на поверхность исследуемых материалов и исследование их жизнеспособности (метод прямого контакта) позволил установить отсутствие токсического действия у образцов материалов медьзамещенных ТКФ (рис.7).

Зона подавления роста бактерий *E.Coli* составила 27 мм, что свидетельствует о выраженной антибактериальной активности керамики 0,1CuТКФ. Аналогичные исследования, проведенные для керамики из ТКФ, выявили отсутствие антимикробной активности у керамики из ТКФ.

Таким образом, керамика из медьсодержащего ТКФ проявляет выраженную антибактериальную активность по отношению к штамму *E.Coli* и, в то же время обладает матриксными свойствами.

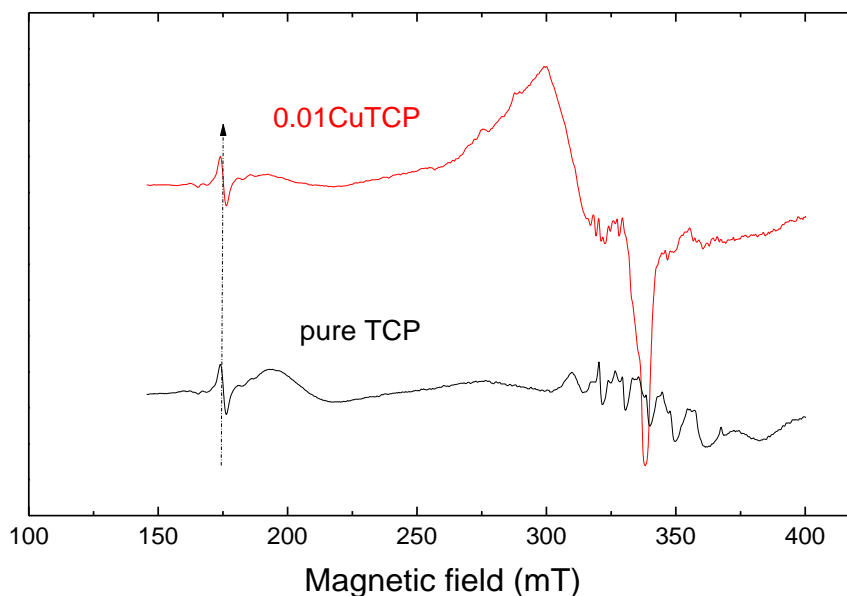


Рис.6. ЭПР спектры 0,01CuТКФ (верхняя, красная линия) и ТКФ (нижняя, черная линия) при комнатной температуре. Стрелкой обозначен сигнал от ЭПР резонатора..

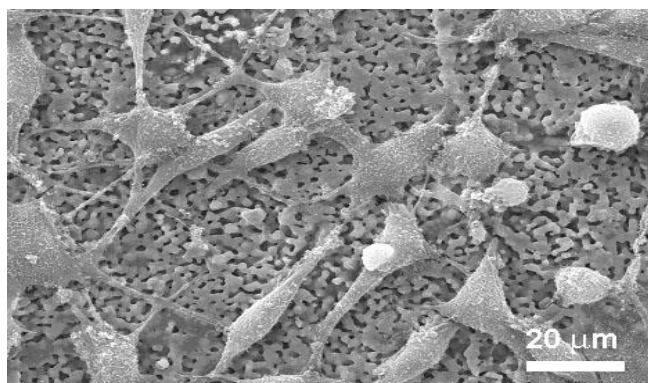


Рис.7. Клетки фибробластов человека на керамике из 0,1CuТКФ..

Нами была разработана также керамика из железозамещенных трикальцийфосфатов [9]. Порошки железозамещенных ТКФ со степенью замещения кальция на железо 1% мольн. (FeТКФ1) и 0,5% мольн. (FeТКФ2) получали, как описано в [8]. Основной кристаллической фазой синтезированных порошков, по данным РФА, является витлокит. В качестве примесной фазы определяется до 3% масс. α -Fe₂O₃. Значение ОКР, рассчитанное для FeТКФ, составляет 10,6 нм. Это значение несколько ниже, по сравнению с ТКФ керамикой – 12 нм, что свидетельствует об уменьшении размера кристаллов керамики при введении железа. Уменьшение размера

кристаллов связано с искажениями кристаллической решётки, происходящим при замещении атомов кальция атомами железа с большим ионным радиусом.

Микроструктура керамики FeТКФ1 неоднородна: присутствуют две разновидности кристаллов – крупные, хорошо огранённые кристаллы с оплавленными рёбрами размером 1-2 мкм и мелкие кристаллы, менее 0,1 мкм (рис.8). Микроструктура керамики FeТКФ2 более однородная, размер кристаллов 1-3 мкм. Неоднородность структуры FeТКФ1 связана с тем, что при большом содержании железа оксид железа выделяется в виде отдельной фазы α -Fe₂O₃. Согласно EDX анализу, железо в объёме керамик FeТКФ1 и FeТКФ2 распределено равномерно.

Посев клеток на поверхность исследуемых материалов и исследование их жизнеспособности (метод прямого контакта) позволил установить отсутствие токсического действия у образцов материалов, содержащих железо.

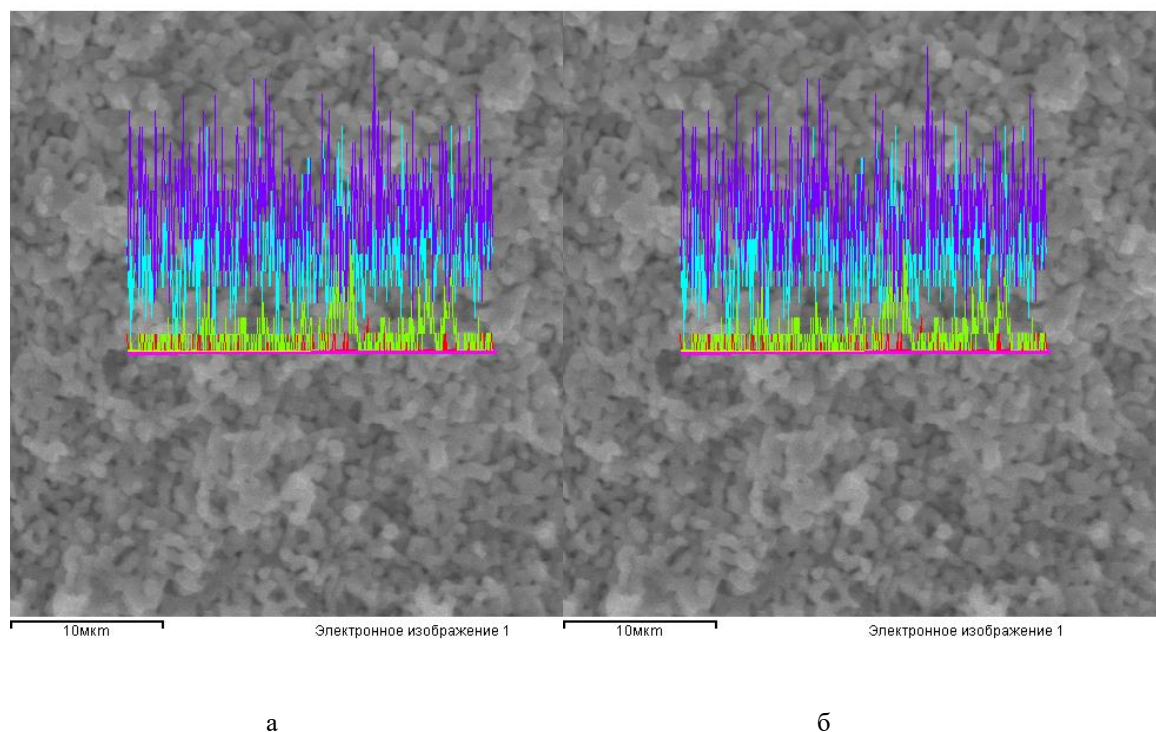
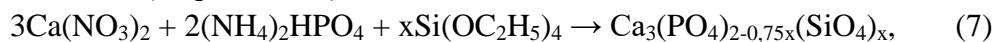
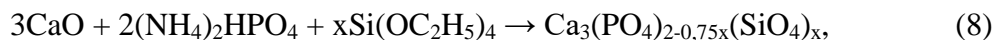


Рис.8 Распределение элементов в ТКФ на сколе керамических образцов а -FeТКФ2; б – FeТКФ1 (красный – железо, фиолетовый – кальций, голубой – фосфор, зелёный – кислород)..

Кремнийсодержащие фосфаты кальция [10] получали двумя способами – осаждением из водных растворов (по реакции 7) и гетерофазным синтезом (по реакции 8).

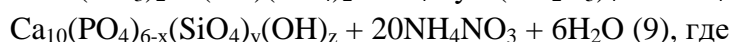


где $x=0,01; 0,1; 0,2$.



где $x=0,01; 0,1; 0,2$.

Согласно данным РФА, фазовый состав полученных порошков зависит от содержания кремния: в присутствии малых концентраций кремния ($x=0,01$) формируется апатитовая структура:



$$2-z+y = 0$$

При увеличении количества вводимых силикат-ионов ($x=0,1$ или $0,2$) они включаются в структуру фосфата кальция, замещая фосфат-ионы (реакции 7,8).

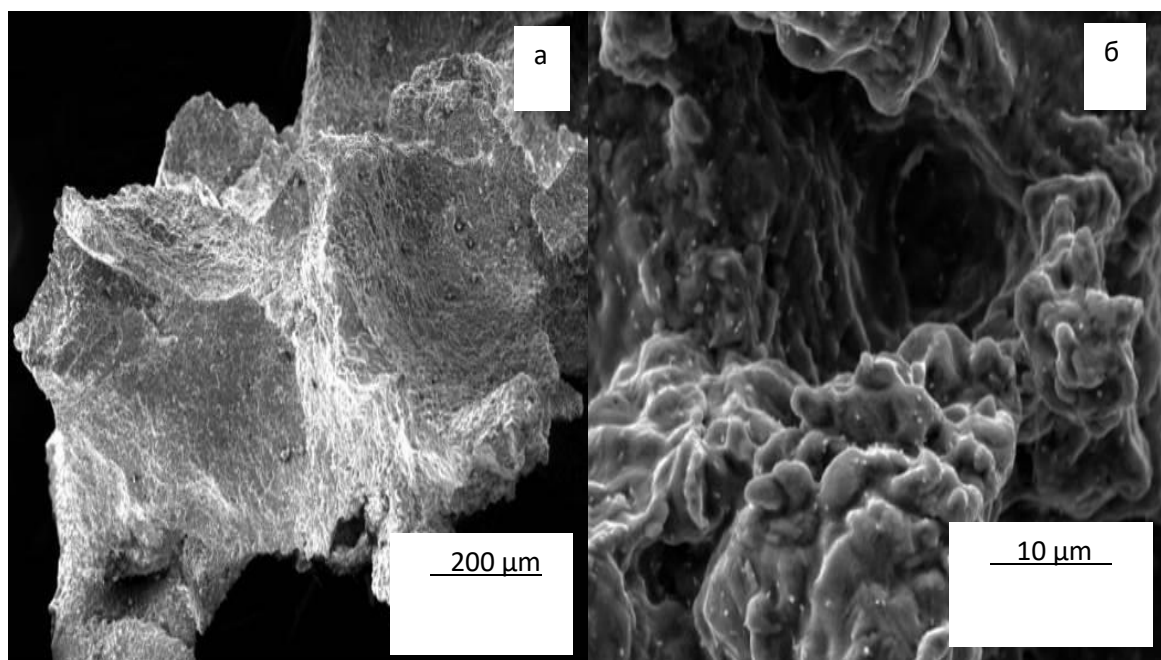


Рис.9 Микроструктура пористой керамики из SiTKФ: а – фрагмент образца, полученного методом негативных реплик; б – образец, полученный методом выгорающих добавок.

С увеличением содержания кремния в полученных фосфатах кальция их термическая стабильность возрастает: разложение соединений с выделением воды наблюдается в интервале 250-290⁰С.

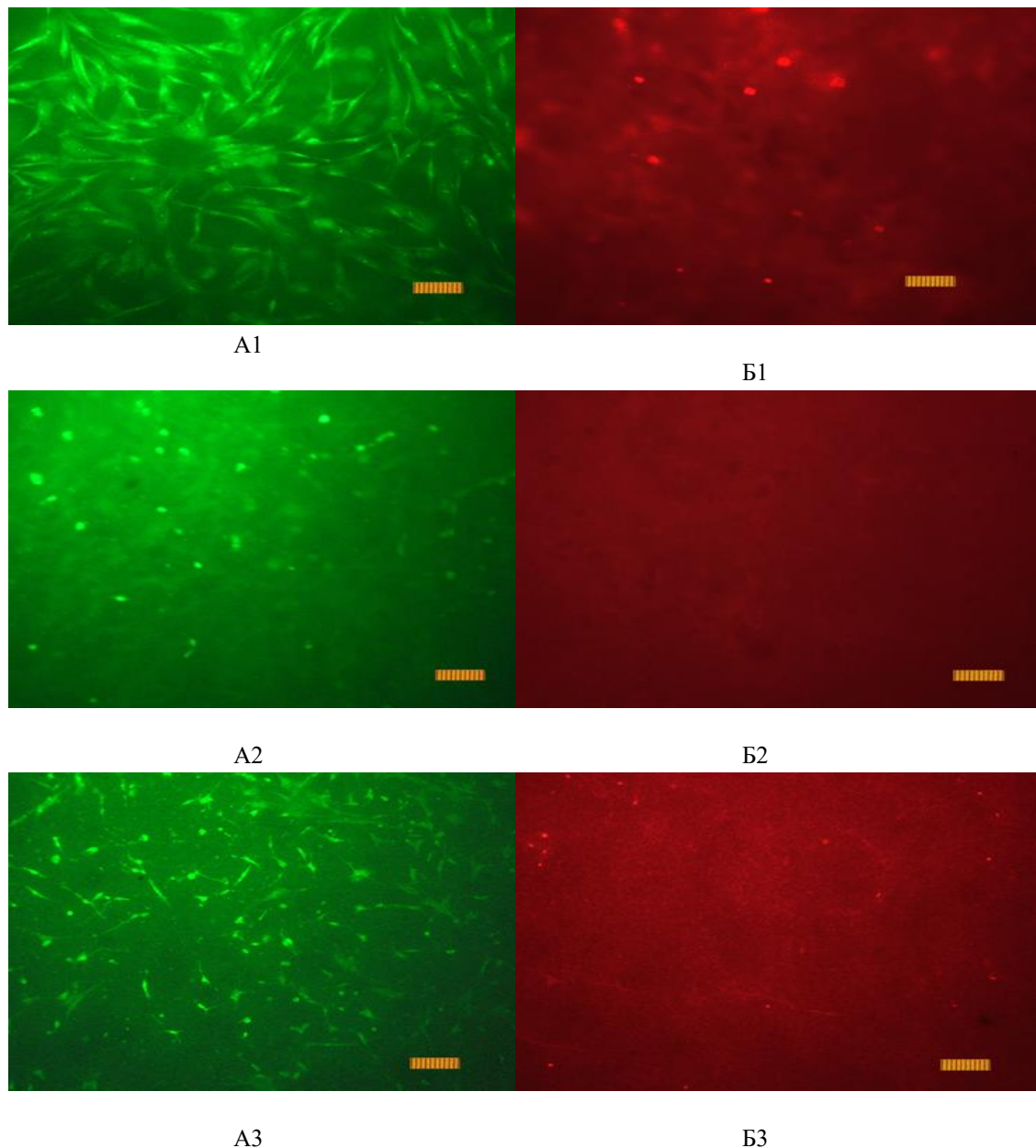


Рис.10. Внешний вид клеток при инкубации на исследуемых материалах на первые сутки после посева. Окраска SYTO 9 (А) и PI (Б), линейка 100 мкм. 1- Si₀,1, 2 – Si₀,2, 3 – ТКФ,

Методом негативных реплик (с использованием в качестве темплата пористых полиуретановых губок) и методом выгорающих добавок получена пористая керамика (рис.9). Использование метода негативных реплик позволило получить керамику с большей пористостью и большим размером пор – размер пор 200-300 мкм по сравнению с порами, полученными при использовании метода выгорающих добавок.

Причиной подавления роста клеток на поверхности кремнийзамещённого ТКФ может также являться наличие водорастворимых фракций, наличие которых можно детектировать по антибактериальной активности. Так зона подавления роста бактерий *E.Coli* образцом кремнийзамещённого ТКФ с содержанием кремния 0,9% составила 17 мм, что свидетельствует о выраженной антибактериальной активности кремнийзамещённой керамики (рис.10). Аналогичные исследования, проведенные для керамики из ТКФ выявили отсутствие антимикробной активности у керамики из ТКФ.

Благодаря сочетанию антимикробных свойств и наличия матричных свойств разработанные керамики из замещённых ТКФ перспективны в качестве материалов для заполнения костных дефектов в остеопластической хирургии, а также в качестве исходного компонента для кальцийфосфатных цемента.

Работа выполнялась по государственному заданию №007-00129-18-00.

Литература

1. Hench L.L., Polak J.M. Third-generation biomedical materials. // Science. 2002. Vol. 295. P. 1014-1017
2. Баринов С.М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины // Успехи химии. 2010. Т.79, №1. С.15–32
3. Vallet-Regi M. Ceramics for medical applications // J. Chem. Soc., Dalton Trans. 2001. С.97-108.
4. Capuccini C., Torricelli P., Sima F., Boanini E., Ristoscu C., Bracci B. & Bigi, A. (2008). Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response. Acta Biomaterialia, 4(6), 1885-1893.
5. Fadeeva I.V., Gafurov M.R., Kiiieva I.A., Orlinskii S.B., Filippov Ya.Yu., Fomin A.S., Davydova G.A., Selezneva I.I., Barinov S.M. Silver, Copper, Zinc and Iron (III) Doped Tricalcium Phosphate Ceramics For Bone Tissue Regeneration // Bionanoscience. 2016. №6. P.1-5.
6. Хон В. Э., Загородний Н. В., Комлев В. С., Фадеева И. В., Булгаков В. Г., Сергеева Н. С., ... & Диденко Л. В. (2013). Влияние степени замещения кальция серебром в трикальцийфосфате на его биологические свойства in vitro. Вестник травматологии и ортопедии им. НН Приорова, (4), 23-28.

7. Фадеева И.В., Шворнева Л.И., Баринов С.М., Орловский В.П. Синтез и структура магнийсодержащих гидроксиапатитов // Неорганические материалы . 2003. Т. 39. № 9. С. 1102-1105.
8. Фадеева И.В., Гафуров М.Р., Филиппов Я.Ю., Давыдова Г.А., Селезнева И.И., Фомин А.С., Антонова О.С., Габбасов Б.Ф., Изотов В.В., Орлинский С.Б., Баринов С.М. Медь-замещенные трикальцийфосфаты // ДАН. 2016. Т. 471. N 6, С. 682–685.
9. Фадеева И.В., Баринов С.М., Селезнева И.И., Давыдова Г.А., Фомин А.С., Антонова О.С., Филиппов Я.Ю. Керамика из железозамещённых трикальцийфосфатов // ДАН. 2016. Т. 468. №2. С. 171-175.
10. I.V. Fadeeva, Ya.Yu. Filippov, A.S. Fomin, M.E. Shaposhnikov, G.A. Davydova, O.S. Antonova, I.I. Selezneva, A.Yu. Mikheev, L. I. Akhmetov, S. M. Barinov, E. I. Zaraiskii, R. À. Poltavtseva Synthesis of micro- and nanosized bioresorbing silicon-substituted tricalcium phosphates for bone tissue engineering and their biological safety // Nanomechanics Science and Technology: An International Journal. 2016. V. 6. Is.4. P.1–13.