

УДК 666.3-127:546.41

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАРБОНАТ-ГРУПП В КАРБОНАТГИДРОКСИАПАТИТОВОЙ КЕРАМИКЕ НА ЕЕ ПОВЕДЕНИЕ *IN VIVO*

© 2009 г. В. С. Комлев*, И. В. Фадеева*, А. Н. Гурин**, Е. С. Ковалева***, В. В. Смирнов*,
Н. А. Гурин**, С. М. Баринов*

*Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российская академия наук, Москва.

**Центральный научно-исследовательский институт стоматологии
и челюстно-лицевой хирургии Росмедтехнологий, Москва

***Московский государственный университет им. Ломоносова, химический факультет.
e-mail: komlev@mail.ru

Поступила в редакцию 13.05.2008 г.

С целью разработки материалов, предназначенных для реконструкции костных тканей, синтезированы карбонат-замещенные гидроксиапатиты с расчетным содержанием карбонат-групп до 9 мас. %, из которых изготовлены пористые гранулы. Применение спекающих добавок, формирующих жидкую фазу, позволило понизить температуру спекания гранул на 400–450°C. Установлено, что карбонат-группы входят в структуру по смешанному АБ-типу замещения, микроструктура гранул существенно зависит от содержания карбонат-групп, введение 6 мас. % карбонат-групп в апатит обеспечивает высокие биологические свойства гранул в экспериментах *in vivo*.

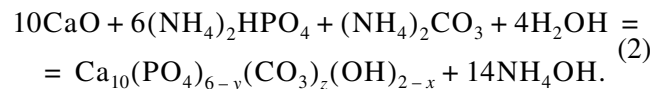
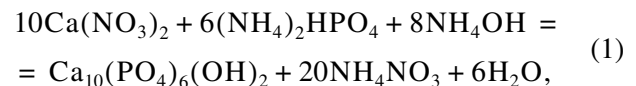
ВВЕДЕНИЕ

Кальций-фосфатные материалы используют в медицине для регенерации поврежденных костных тканей посредством постепенного замещения материала новообразующейся костной тканью. Применяемый в настоящее время для этой цели гидроксиапатит (ГА) имеет низкую скорость биологической резорбции, что является его существенным недостатком. Процесс резорбции может быть усилен посредством анионных замещений фосфат- и гидроксид-анионов в структуре апатита на карбонат-группы [1]. Карбонат-замещенные гидроксиапатиты (КГА) имеют сходство по составу и структуре с минеральными компонентами естественной костной ткани, содержащими до 8 мас. % карбонат-групп. Поведение керамики *in vivo* зависит от количества, размера и взаимосвязанности пор, которые способствуют биологическим потокам, повышению адсорбции протеинов, адгезии остеогенных клеток [2–6].

В данной работе представлены результаты сравнительного исследования структуры и биологического поведения гранул из КГА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтезировали порошки ГА и КГА с расчетным содержанием CO_3^{2-} 0,6, 6 и 9 мас. % согласно реакциям:



Из синтезированных порошков суспензионным методом получали гранулы сферической формы [4, 7]. В качестве добавок, понижающих температуру спекания и препятствующих разложению КГА, использовали карбонаты щелочных и щелочно-земельных элементов, которые вводили в порошок КГА в количестве до 8 мас. % перед его гранулированием. После спекания в печи с силитовыми нагревателями гранулы отсеивали по размерам.

Фазовый анализ образцов проводили на дифрактометре Shimadzu XRD-6000 в CuK -излучении. ИК-спектры поглощения образцов регистрировали на приборе Vertex-70 в диапазоне 400–4000 cm^{-1} . Растворимость гранул исследовали в изотоническом 0,9%-ном растворе NaCl с помощью анализатора Эксперт-001 в течение времени до 21 суток. Поверхность изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на приборе TemScan.

Оценка влияния керамических гранул на процессы *in vivo* в костной ткани была проведена на мышечках крыс линии Вистар весом 180–200 г. Моделировали дырчатый дефект диаметром 1,5, длиной 3 мм, который заполняли исследуемыми материалами. Сроки наблюдения эксперимента составили 2, 4 и 8 недель. После выведения живот-

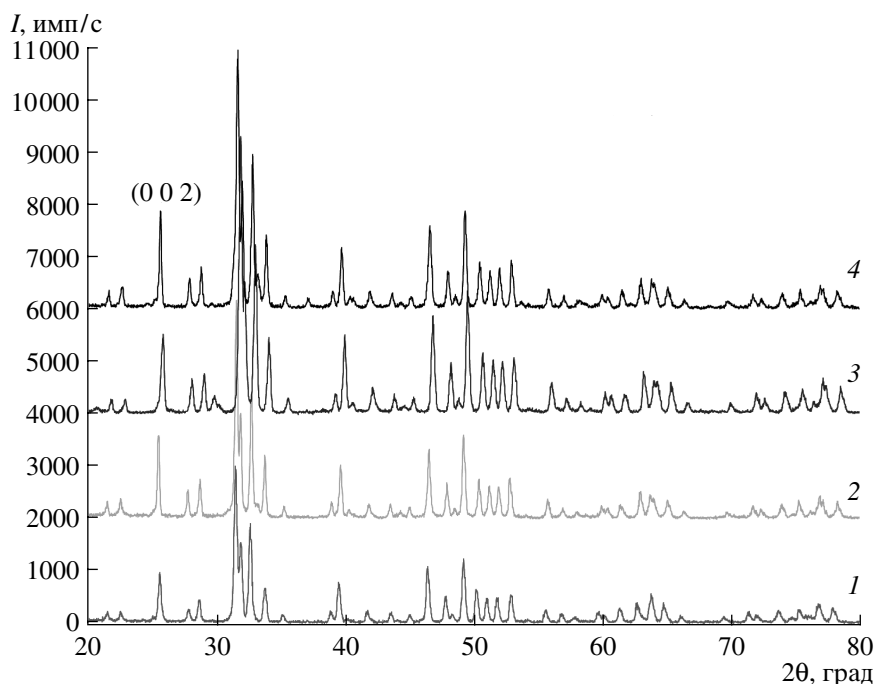


Рис. 1. Дифрактограммы гранул фосфатов кальция.

ных из опыта образцы фиксировали в формалине, декальцинировали, обезвоживали, заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 5–7 мкм. Полученные срезы окрашивали гематоксилин-эозином и изучали на микроскопе Motic Digital Microscopу (DM-111) с цифровой камерой Macintosh. В данной работе представлены результаты двухнедельных наблюдений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рентгенофазовый анализ порошков КГА (рис. 1) показал близость спектров с таковыми для ГА, с незначительным смещением положения рефлексов за счет вхождения карбонат-ионов в структуру апатита, что связано с решеточными деформациями в результате замещений CO_3^{2-} на группы PO_4^{3-} и OH^- .

Характеристики гранул приведены в табл. 1. Использование легкоплавких карбонатных добавок, формирующих жидкую фазу при спекании, позволило понизить температуру спекания гранул до

700–750°C, что примерно на 400°C ниже температуры спекания КГА без добавок, и избежать тем самым термического разложения КГА.

ИК-спектроскопия гранул ГА и КГА выявила наличие в спектрах характерных для этих соединений полос поглощения (рис. 2). Положение полос поглощения приведено в табл. 2. При содержании 0.6 мас. % CO_3^{2-} -групп в КГА значительно снижается интенсивность колебаний OH^- -групп при 636 см^{-1} и $\nu_4 \text{ PO}_4^{3-}$ при 603 и 568 см^{-1} , а также уменьшается интенсивность полосы OH^- -групп при 3570 см^{-1} . Появляются слабые полосы поглощения $\nu_3 \text{ CO}_3^{2-}$ при 1460 и 1417 см^{-1} . Для КГА с 6 мас. % CO_3^{2-} не наблюдается полос поглощения OH^- -групп (636 см^{-1}), происходит некоторое увеличение интенсивности полос $\nu_2 \text{ CO}_3^{2-}$ при 870 см^{-1} и $\nu_3 \text{ CO}_3^{2-}$ при 1460 и 1420 см^{-1} (рис. 2в). У КГА с 9%-ным замещением (рис. 2г) происходит снижение интенсивно-

Таблица 1. Характеристики гранул, полученных в результате синтеза

Гранулы	Размер гранул, мм	Поверхность гранул	Наружные поры, мкм	Внутренние поры, мкм
ГАП	0.5–1.0	Дендридная	<10	30–400
КГА 0.6%	0.5–1.0	Игольчато-пластинчатая	<10	до 500
КГА 6%	0.6–1.0	Гексагональные кристаллы	<10	≈300
КГА 9%	0.3–0.8	Гексагональные кристаллы	<10	30–400

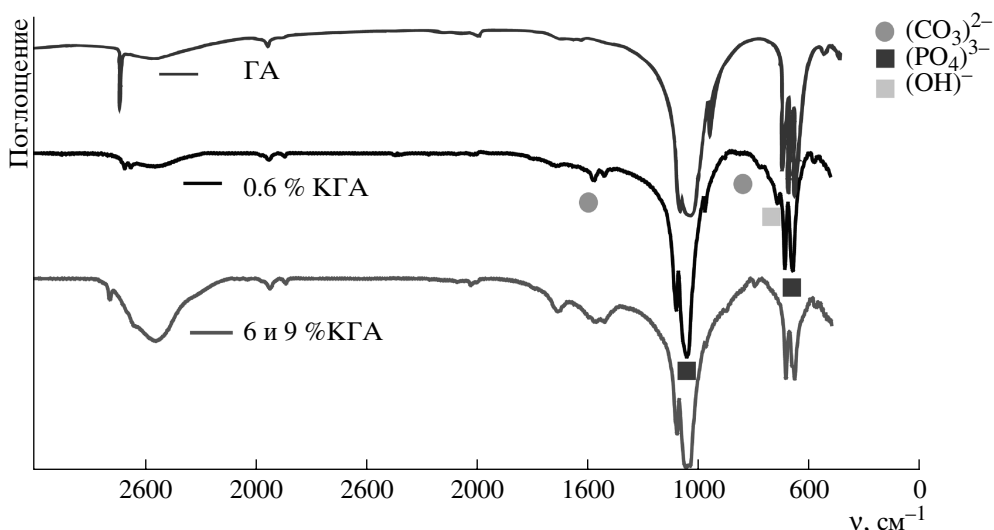


Рис. 2. ИК-спектры ГА (отсутствие полос поглощения CO_3^{2-} -групп), КГА 0.6 мас. % (появление слабых полос поглощения при 870, 1417, 1460 cm^{-1}), КГА 6 и 9 мас. % (отсутствие полосы при 632 cm^{-1} , возрастание интенсивности поглощения при 870, 1417, 1460 cm^{-1}).

сти $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ при 1090 и 1045 cm^{-1} и $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ при 455 и 443 cm^{-1} , возрастание интенсивности полосы $\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$ при 870 cm^{-1} и $\nu_3 \text{CO}_3^{2-}$ при 1460 и 1417 cm^{-1} , отсутствие полосы OH^- -групп при 636 cm^{-1} . Анализ ИК-спектров гранул КГА с различной степенью замещения показал, что с увеличением содержания карбонат-групп в структуре происходит постепенное замещение OH^- и PO_4^{3-} -групп на CO_3^{2-} и проявление характерных для АВ-типа КГА частот поглощения.

Исследование растворимости полученного материала в 0.9%-ном растворе NaCl показало наибольшую растворимость КГА с 9 мас. % CO_3^{2-} (рис. 3). По истечению 14 дней концентрация Ca^{2+} для всех образцов выходит на плато, т.е. активный период растворения заканчивается. Карбонат-группы вызывают решеточные деформации, что приводит к увеличению растворимости [7, 8]. Спеченные гранулы ГА остаются практически нерастворенными.

Исследования методом СЭМ поперечных срезов спеченных гранул ГА выявили внутри большие макропоры размерами около 300 мкм, которые имеются во всех образцах (рис. 4а, вставка). Микроструктура гранул изменяется в зависимости от содержания карбонат-групп. Гранулы КГА с 0.6 мас. % CO_3^{2-} представлены прочными образованиями с открытыми микропорами размером около 2–4 мкм с неоднородной поверхностью. На одних участках образуется игольчато-пластинчатая структура (рис. 4б), на других – поверхность с кристаллами нерегулярной формы. Исследование

наружных и внутренних участков гранул показало, что они состоят из небольших конгломератов, которые, соединяясь между собой, образуют гранулу. На поперечных срезах видны макропоры размером около 300 мкм и мелкие микропоры размером

Таблица 2. Частоты поглощения ИК-спектров исследуемого материала

Исследуемый материал	Частоты поглощения, cm^{-1}			
	PO_4^{3-}		CO_3^{2-}	OH^-
ГАП	ν_1 963	ν_4 602	–	632
		572		
КГА 0.6%	ν_1 962	ν_4 603	ν_2 873	636
		568	1417	
КГА 6%	ν_1 962	ν_3 1092	ν_3 1460	3434
		1044	3571	
КГА 6%	ν_1 962	ν_4 603	ν_2 873	3435
		568	1416	
КГА 9%	ν_1 963	ν_3 1092	ν_3 1460	3435
		1045	1455	
КГА 9%	ν_1 963	ν_4 455	ν_2 870	–
		443	1420	
КГА 9%	ν_1 963	ν_3 1094	ν_3 1420	3437
		1045	1455	

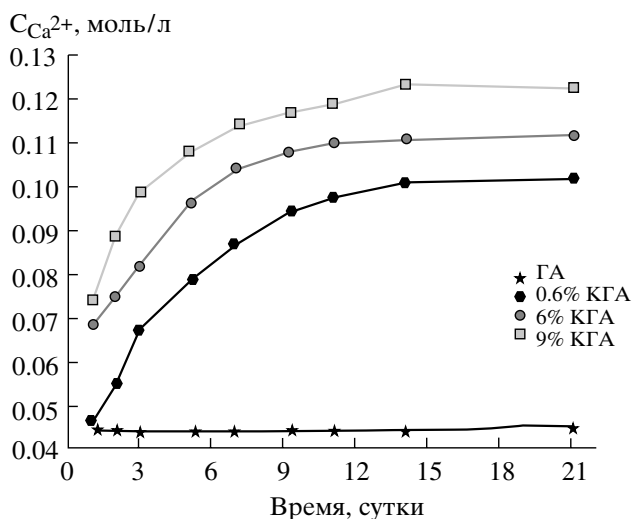


Рис. 3. Измерение концентрации ионов Ca^{2+} в изотоническом растворе при растворении гранул фосфатов кальция.

около 3 мкм. Внутренние центральные участки содержат четко ограниченные кристаллы гексагональной формы.

Гранулы КГА с 6 и 9 мас. % CO_3^{2-} имеют в микроструктуре открытые поры размером до 10 мкм. Поверхность представлена однородными гексагональными кристаллами правильной формы (рис. 4в, 4г). Для всех гранул характерны макрополости различных размеров. Внутреннее строение этих макрополостей также представлено кристаллами гексагональной формы (размер граней около 2 мкм).

Общей тенденцией является изменение микроструктуры гранул от плотной дендритной к пластинчато-игольчатой и, далее, к образованию кристаллов гексагональной формы по мере увеличения содержания карбонат-групп в КГА. Подобные результаты были получены в [9, 10] при исследовании КГА с различной степенью замещения.

Исследование гистологических срезов гранул ГА показало, что формирование костного матрикса на

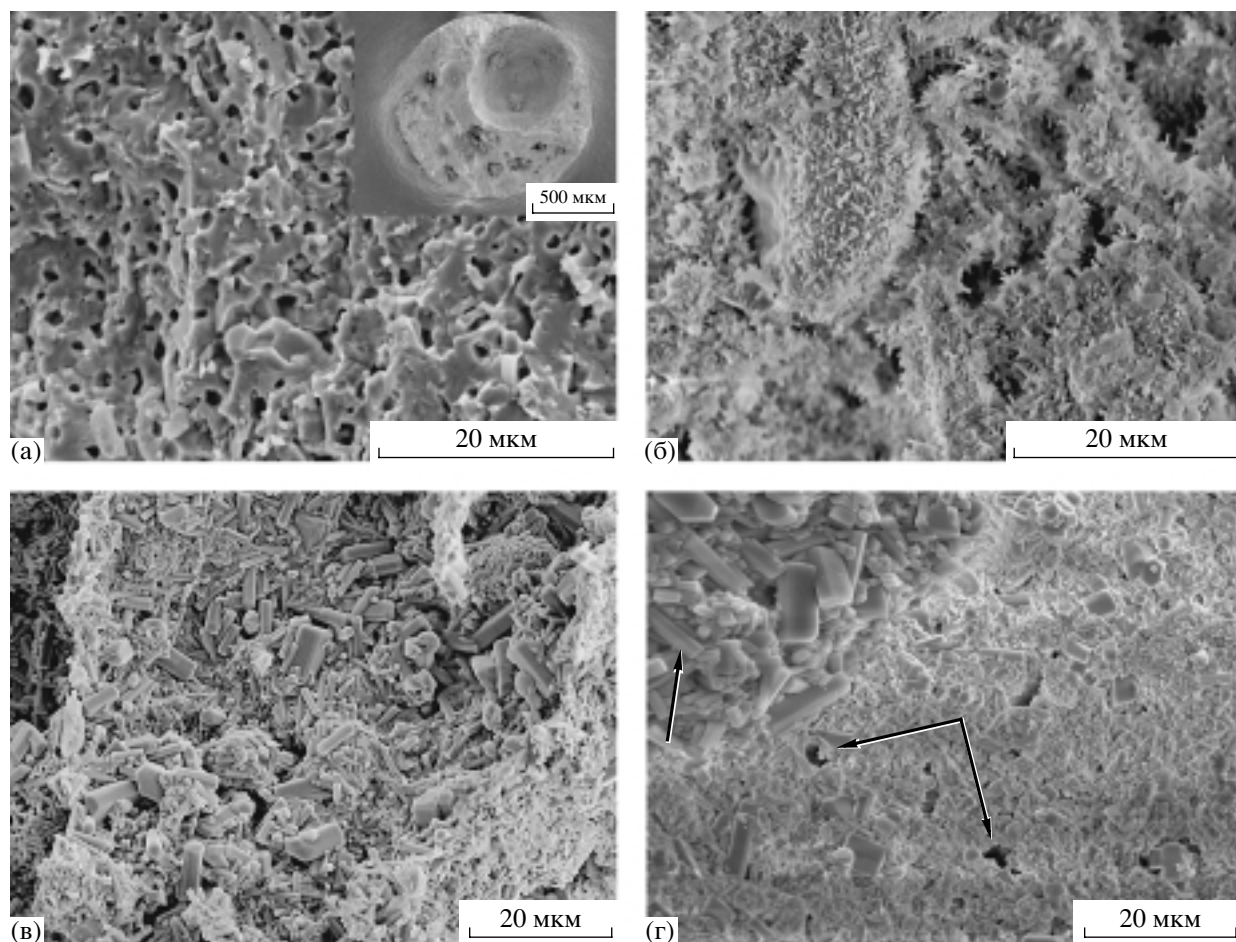


Рис. 4. Результаты СЭМ гранул фосфатов кальция: А – ГА (плотная мелкопористая дендритная структура), на вставке – поперечный срез с макрополостями, характерными для всех исследуемых гранул; б – КГА 0.6 мас. % (игольчато-гексагональная структура поверхности); в, г – КГА 9 мас. % (структура гексагональных кристаллов указана одиночной стрелкой, двойными стрелками показаны микропоры).

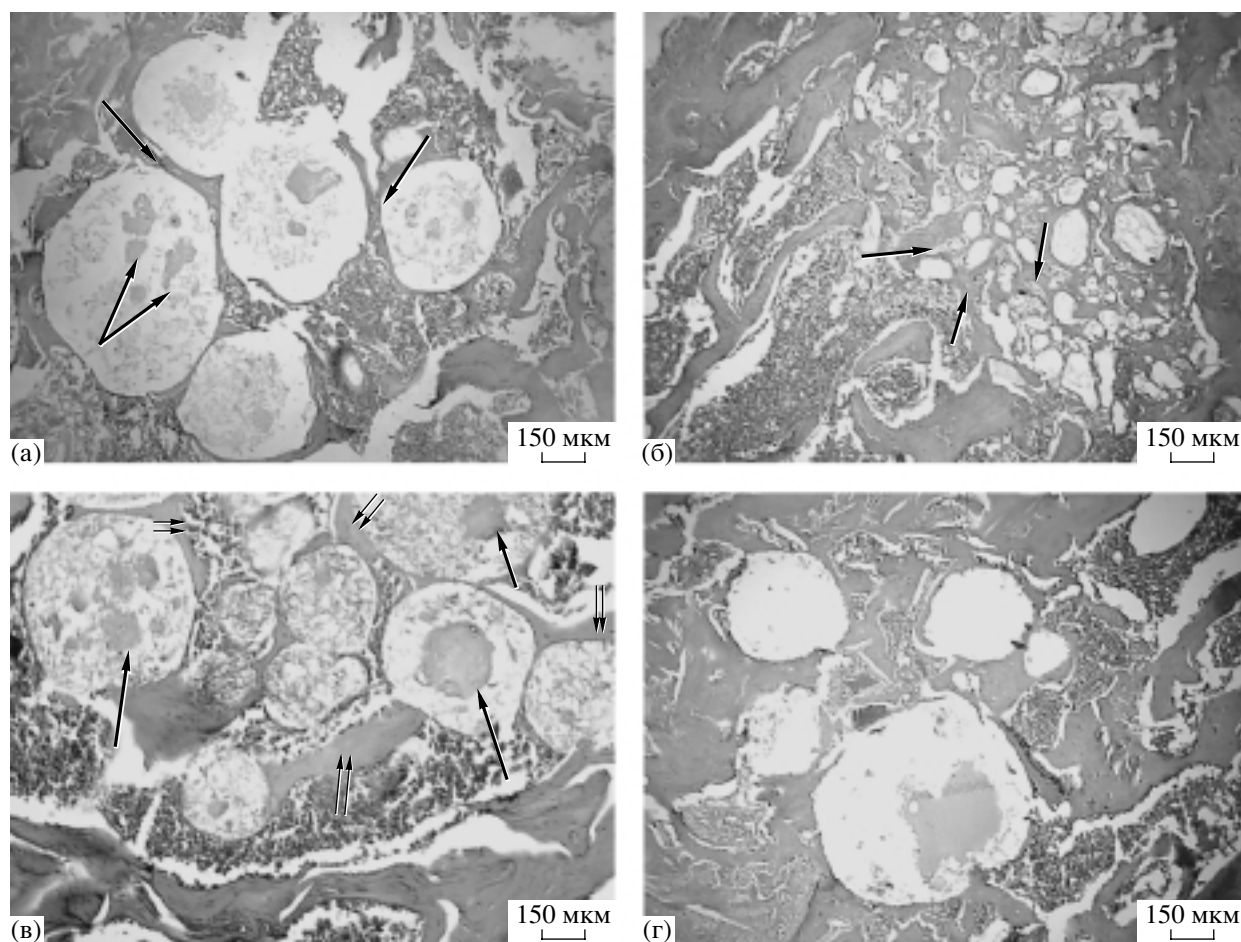


Рис. 5. Микрофотогистограмма (2 недели опыта, центр дефекта): а – ГА (начало формирования костных трабекул по поверхности гранул отмечено одиночными стрелками, двойными стрелками показан тканевой экссудат внутри гранул); б – КГА 0.6 мас. % (резорбция гранул на мелкие фрагменты, их ассимиляция костной тканью, указано стрелками); в – КГА 6 мас. % (образование остеоидной ткани внутри гранул с клеточными элементами (одиночные стрелки), молодые формирующиеся костные трабекулы (двойные стрелки)); г – КГА 9 мас. %.

их поверхности происходит медленно. Отсутствие клеточной инфильтрации внутрь имплантатов связано с небольшим размером пор (менее 10 мкм). Однако происходит диффузия тканевой жидкости, которая скапливается во внутренних макрополостях. На рис.5а стрелками указаны тонкие формирующиеся прослойки новообразований костной ткани как между гранулами, так и на их поверхности.

При изучении гистологических срезов гранул КГА с 0.6 мас. % CO_3^{2-} установлено, что происходит резорбция гранул (рис. 5б). Это может быть связано с понижением кристалличности и, соответственно, с повышением растворимости апатита [7, 8]. Инфильтрация клеточных элементов внутрь небольших гранул почти не наблюдалась, а диффузия тканевой жидкости слабо выражена, возможно, за счет закрытия пор на поверхности.

При имплантации гранул КГА с 6 мас. % CO_3^{2-} наблюдается инфильтрация тканевой жидкости и

клеточных элементов внутрь материала с формированием остеоидного вещества (рис. 5в). Между гранулами образуется костная ткань в виде трабекул.

При исследовании КГА с 9 мас. % CO_3^{2-} гистологическая картина сходна с таковой для гранул с 6 мас. % CO_3^{2-} (рис. 5г). Большинство гранул инфильтрированы тканевой жидкостью. Клеточные элементы почти не определяются. Между гранулами активно формируется новообразованная костная ткань. Исходная (нативная) костная ткань ассимилирует прилежащие к ней депозиты. Однако предварительные гистологические результаты показали, что формирование костного матрикса в наибольшей степени выражено для образцов с 6 мас. % CO_3^{2-} , в которых наиболее активно происходит прорастание клеточных элементов внутрь гранул (рис. 5г). Высокий уровень концентрации кальция и фосфора вблизи гранул способствует их диффу-

зии в центр имплантата, что необходимо для формирования остеоидного вещества. При недостаточной концентрации ионов кальция и фосфора апатитовая фаза появляется, в основном, на поверхности гранул, которая за счет нерегулярной поверхности адсорбирует преципитаты фосфата кальция – прекурсоры [7, 11, 12]. На увеличение костного матрикса влияет объем гранул, больший процент замещения карбонат-групп неорганические белки, которые, адсорбируясь на пористой поверхности, стимулируют процесс остеоинтеграции материала – его соединения с нативной костью [13].

Ранее в исследовании *in vitro* было установлено, что наибольшая активность остеобластов – клеток, строящих костную ткань, обнаруживается на поверхности КГА, содержащего 8.2 мас. % CO_3^{2-} (исследование на образцах с 5.4–11.3 мас. % CO_3^{2-} [14]), что примерно соответствует полученным в настоящей работе результатам.

Можно также отметить, что слабая клеточная инфильтрация внутрь гранул может быть связана с малым размером приповерхностных пор (меньше 10 мкм), тогда как наиболее оптимальны для остеогенеза поры размером 300–400 мкм [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показали, что при увеличении содержания карбонат-групп в апатите происходит перестройка от плотной однородно-дендритной к пластинчато-иглообразной микроструктуре и к появлению кристаллов гексагональной формы, что сопровождается повышением растворимости гранул. Это способствует более активному формированию костной ткани *in vivo*. Гистологические исследования при длительных сроках наблюдения формирования костной ткани подтверждают биологическую активность гранул КГА, причем наиболее благоприятное поведение проявляют гранулы, содержащие 6 мас. % карбонат-групп. Такие гранулы могут быть использованы как самостоятельно в качестве матриксов, так и в композиционных материалах на основе цементов и биополимеров.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, (грант 06-03-32192) и гранта МК-4047.2008.3 Президента РФ “молодые российские ученые – кандидаты наук и их руководители”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *LeGeros R.Z., Tung M.S.* Chemical Stability of Carbonate- and Fluoride-Containing Apatites // *Caries Res.* 1983. V. 17. P. 419–429.
2. *Dziedzic D.M., Savva I.H., Wilkinson D.S., Davies J.E.* Osteoconduction on, and Bonding to, Calcium Phosphate Ceramic Implants // *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 1996. V. 414. P. 147–156.
3. *Hasegawa M., Sudo A., Komlev V.S. et al.* High Release of Antibiotic From a Novel Hydroxyapatite With Bimodal Pore Size Distribution // *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2004. V. 70. P. 332–339.
4. *Komlev V.S., Barinov S.M.* Porous Hydroxyapatite Ceramics of Bi-Modal Pore Size Distribution // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2002. V. 13. P. 295–299.
5. *Komlev V.S., Peyrin F., Mastrogiacomo M. et al.* Kinetics of *in vivo* Bone Deposition by Bone Marrow Stromal Cells Into Porous Calcium Phosphate Scaffolds: an X-ray Computed Microtomography Study // *Tissue Eng.* 2006. V. 12. P. 3449–3458.
6. *Ong J.L., Hoppe C.A., Cardenas H.L. et al.* Osteoblast Precursor Cell Activity on HA Surfaces of Different Treatments // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. V. 39. P. 176–183.
7. *Баринов С.М., Комлев В.С.* Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005.
8. *Murugan R., Sampath T., Yang F., Ramakrishna S.* Hydroxyl Carbonateapatite Hybrid Bone Composites Using Carbohydrate Polymer // *J. Compos. Mater.* 2005. V. 39. P. 1159–1166.
9. *LeGeros R.Z., Trautz O.R., Le Geros J.P. et al.* Apatite Crystallites: Effects of Carbonate on Morphology // *Science.* 1967. V. 155. P. 1409–1411.
10. *Porter A., Patel N., Brooks R. et al.* Effect of Carbonate Substitution on the Ultrastructural Characteristics of Hydroxyapatite Implants // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2005. V. 16. P. 899–907.
11. *Kruyt M.C., de Bruijn J.D., Yuan H. et al.* Optimization of Bone Tissue Engineering in Goats: a Peroperative Seeding Method Using Cryopreserved Cells and Localized Bone Formation in Calcium Phosphate Scaffolds // *Transplantation.* 2004. V. 77. P. 359–365.
12. *Radin S.R., Ducheyne P.* The Effect of Calcium-Phosphate Ceramic Composition and Structure on *In vitro* Behavior. II. Precipitation // *J. Biomed. Mater. Res.* 1993. V. 27. P. 35–45.
13. *Hing K.* Bone Repair in the Twenty-First Century: Biology, Chemistry or Engineering? // *Phil. Trans. R. Soc. London A.* 2004. V. 362. P. 2821–2850.
14. *Merry J.C., Gibson I.R., Best S.M. et al.* Synthesis and Characterization of Carbonate Hydroxyapatite // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1998. V. 9. № 12. P. 779–783.
15. *Tsuruga E., Takita H., Itoh H. et al.* Pore Size of Porous Hydroxyapatite as the Cell-Substratum Controls BMP-Induced Osteogenesis // *J. Biochem.* 1997. V. 121. P. 317–324.