

УДК 542.06

Получение синтетического гидроксиапатита для формирования биопокровтий на имплантатах медицинского назначения

К. С. КУЛЯШОВА, Ю. П. ШАРКЕЕВ

*Институт физики прочности и материаловедения Сибирского отделения РАН, проспект Академический, 2/4, Томск 634021 (Россия)**E-mail: kseniya@ispms.tsc.ru*

(Поступила 18.01.11; после доработки 25.03.11)

Аннотация

Предложена модифицированная методика жидкофазного синтеза гидроксиапатита, позволяющая повысить стехиометрию продукта (соотношение Ca/P = 1.64) по сравнению со стандартной методикой (Ca/P = 1.31). Проведено сравнение основных физико-химических характеристик синтезированного гидроксиапатита и биологического. Получены кальцийфосфатные биопокровтия на основе синтезированного и биологического гидроксиапатита на поверхности циркония.

Ключевые слова: гидроксиапатит, синтез, биопокровтие, цирконий, имплантат

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в связи с ухудшением экологической обстановки возросло количество различных заболеваний, в том числе связанных с нарушением процессов костеобразования человека, с челюстными дефектами и с различными стоматологическими заболеваниями, приводящими к потере зубов. Для решения этой проблемы медики давно пытаются применять различные металлы и сплавы, полимеры и керамику [1]. Однако организм во многих случаях начинает активно “бороться” с установленными имплантатами, принимая их за инородные тела [2].

Как известно, костная ткань человека состоит из различных фосфатов кальция (гидроксиапатита, β-трикальцийфосфата), карбонатов кальция и других неорганических и органических соединений [3]. Известно множество работ, подтверждающих обоснованность выбора тех или иных материалов для различных медицинских приложений.

Наиболее перспективный материал для использования в медицине – гидроксиапатит (ГА), основной фосфат кальция состава

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ [4]. В 70-х годах прошлого столетия была обнаружена его уникальная биологическая совместимость и способность активно стимулировать образование и рост костных клеток [5].

Наиболее доступен и поэтому чаще применяется биологический ГА, который получают из натуральных костей крупнорогатого скота путем обжига и помола [6]. Однако применение такого ГА имеет ряд недостатков, основные из которых – риск передачи инфекций, потенциальная иммуногенность по причине чужеродного материала [3], а также содержание тяжелых металлов, которые накапливаются в костях в течение жизни.

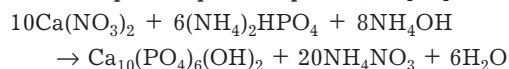
В последнее время наибольшим спросом пользуется не ГА, а биокомпозиционные материалы, где кальцийфосфатные покрытия наносят на поверхность различных металлических имплантатов. Получением таких покрытий занимаются в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН. С помощью метода микродугового оксидирования можно формировать биоактивные кальцийфосфатные или оксидные покрытия на подложках из титана [7], циркония [8] и их

сплавов, в частности циркония, легированного ниобием. Для медицинских приложений наиболее распространены титан и титановые сплавы, однако самыми высокими прочностными характеристиками обладает композиционный материал на основе циркония с добавлением небольшого количества ниобия (1–2,5 мас. %) [9].

В связи с вышеизложенным существует необходимость замены биологического ГА на синтезированный, который не уступает по своим свойствам биологическому ГА и имеет ряд преимуществ, в том числе в этическом и медицинском аспектах. Не менее актуально и получение композиционного материала “цирконий, легированный ниобием, – биоактивное кальцийфосфатное покрытие на основе синтезированного ГА”, который по своим физико-химическим и механическим свойствам наиболее приближен к костным тканям.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Нами получен ГА методом осаждения из водных растворов по реакции [10]



Для приготовления исходных растворов использовались реактивы квалификации “х. ч.”: кальций азотнокислый четырехводный $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, аммоний фосфорнокислый двузамещенный $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, водный раствор аммиака (плотность $\rho = 0.907 \text{ г/см}^3$) и дистиллированная вода. Синтез проходил при контролируемом уровне pH 11–12 с постепенным введением в водный раствор $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ раствора $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

В процессе синтеза изучено влияние времени выдерживания осадка в маточном растворе на стехиометрию полученного ГА, его дисперсность, элементный и фазовый составы. Определено практическое значение произведения растворимости и зависимости растворимости ГА от pH среды. Кроме того, проведен сравнительный анализ свойств полученных порошков ГА и характеристик биологического ГА.

После смешения исходных растворов проводили две серии синтеза. В первом случае образовавшийся осадок отстаивали в течение 15 ч, затем многократно промывали, отцентрифугировали и подвергали фильтрации (син-

тез № 1). Во втором случае осадок дополнительно оставляли для старения в маточном растворе на 48 ч (синтез № 2), после чего выполнялись все перечисленные операции.

Для идентификации полученного ГА проведены исследования их элементного состава и дисперсности (растровый электронный микроскоп Philips SEM 515 с приставкой для энергодисперсионного микроанализа). Энергодисперсионный рентгеновский анализ образцов ГА проводили с использованием метода Standardless EDAX, основанного на внутренних стандартах прибора. Фазовый состав определяли с помощью рентгеновского дифрактометра Shimadzu XRD 6000 с использованием CuK_α -излучения. Рентгеновская съемка осуществлялась с фокусировкой по Брэггу – Брентано. Для фазового анализа использовались стандартные карточки ASTM.

Химическим методом определены практические значения произведений растворимости ГА (ПР) в воде (pH 7) и в растворе 0.1 М NaCl с добавлением HCl для регулирования pH среды при 298 К. Далее с помощью трилометрического титрования определяли концентрацию ионов Ca^{2+} . Согласно уравнению $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \leftrightarrow 10\text{Ca}^{2+} + 6\text{PO}_4^{3-} + 2\text{OH}^-$ выражение для ПР ГА принимает вид

$$\text{ПР} (\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2) = [\text{Ca}^{2+}]^{10} \cdot [\text{PO}_4^{3-}]^6 \cdot [\text{OH}^-]^2$$

Таким образом, определив концентрацию ионов кальция в насыщенном растворе, мы рассчитали соответствующие значения ПР и показатели произведения растворимости рПР.

Полученный ГА использован для нанесения кальцийфосфатных покрытий на поверхность циркония, легированного ниобием (1 мас. % Nb). Образцы для нанесения покрытия представляли собой прямоугольные пластинки размером $10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$. Покрытия формировали методом микродугового оксидирования на установке MicroArc-3.0 [11] в электролитах на основе 30 % раствора ортофосфорной кислоты, ГА (синтезированного или биологического) и карбоната кальция [7]. Режим обработки: напряжение 250 В, длительность импульса 100 мкс, частота следования импульсов 50 Гц, время нанесения покрытия 5 мин. Морфологию поверхности покрытий изучали методом растровой электронной микроскопии (микроскоп Carl Zeiss EVO-50). Ше-

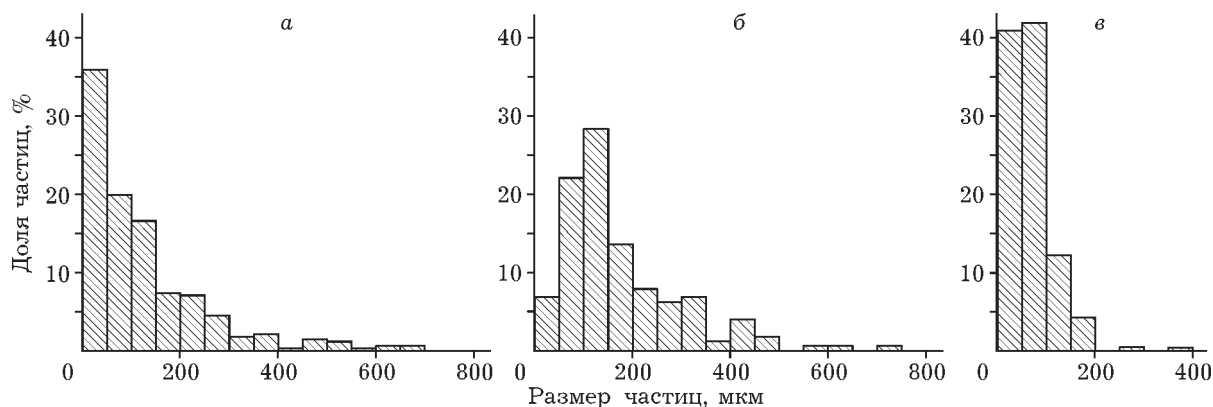


Рис. 1. Гистограммы распределения по размерам частиц образцов гидроксиапатита: а, б – полученных в ходе синтезов № 1 и 2 соответственно, в – биологического.

роховатость поверхности измеряли с помощью профилометра модели 296 по R_a (ГОСТ 2789–73). Параметр шероховатости R_a определяется как среднее арифметическое отклонение профиля в пределах базовой длины:

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^l |y(x)| dx \quad \text{или} \quad R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i|$$

где x – абсцисса профиля, отсчитываемая вдоль базовой линии; L – базовая длина; $y(x)$ или y_i – функция, описывающая профиль; n – количество разбиений базовой длины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 приведены гистограммы распределения частиц ГА по размерам. Размеры частиц измеряли методом секущей [12] по РЭМ-изображениям. Во всех случаях распределение частиц ГА по размерам носит одномодальный характер. Для ГА, полученного синтезом № 1, пик локализован в диапазоне 0–50 мкм.

Для ГА с дополнительным старением осадка (синтез № 2) максимум распределения приурочен к интервалу 100–150 мкм. В обоих случаях наблюдаются вытянутые “хвосты” в сторону больших значений. Для биологического ГА распределение локализовано в узком интервале 0–200 мкм, а максимум находится в интервале 50–100 мкм.

Одно из основных требований к ГА – приближенность к истинной стехиометрии соединения, когда атомное соотношение $Ca/P = 1.67$. На рис. 2 приведены энергодисперсионные рентгеновские спектры для ГА, полученного различными способами. Видно, что в составе ГА преобладают кислород, фосфор и кальций; примесей других элементов, не свойственных ГА, не обнаружено. Данные элементного анализа (табл. 1) позволяют судить о степени стехиометричности полученных порошков.

Наиболее близким к стехиометрическому соотношением Ca/P , равным 1.64, обладает ГА, полученный в результате синтеза с до-

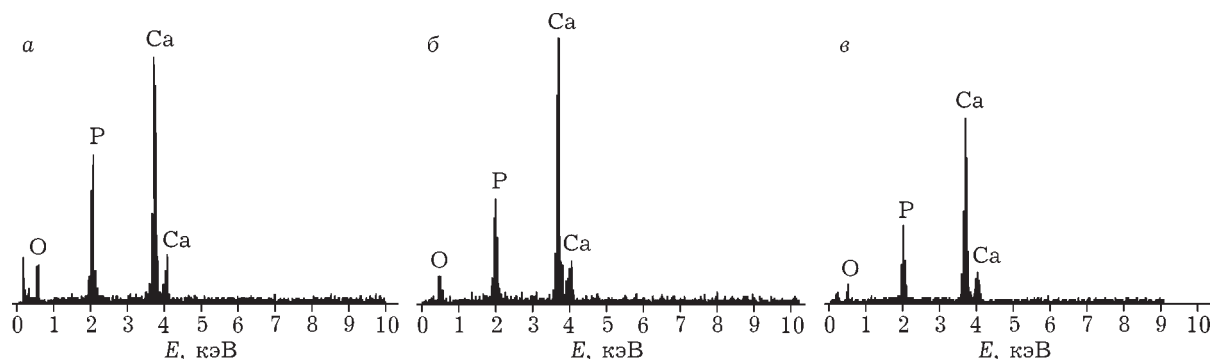


Рис. 2. Энергодисперсионные рентгеновские спектры образцов гидроксиапатита: а, б – полученных в ходе синтезов № 1 и 2 соответственно, в – биологического.

ТАБЛИЦА 1

Результаты элементного анализа порошков ГА

| Элементы | Атомная доля, % | | |
|----------|-----------------|------------|------------------|
| | Синтез № 1 | Синтез № 2 | Биологический ГА |
| O | 67.05 | 65.08 | 64.27 |
| P | 14.26 | 13.22 | 13.96 |
| Ca | 18.69 | 21.7 | 21.77 |
| Ca/P | 1.31 | 1.64 | 1.56 |

полнительным отстаиванием осадка в маточном растворе (синтез № 2). В ходе синтеза № 1 получено соединение с дефицитом ионов Ca^{2+} и соотношением $\text{Ca/P} = 1.31$.

Методом рентгеноструктурного анализа определен фазовый состав ГА, полученного различными способами. На рис. 3 приведены рентгенограммы порошков ГА. Установлено, что помимо основной фазы гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) присутствует фаза β -трикальцийфосфата ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\beta$). Ее содержание в образце ГА, полученном без дополнительного отстаивания в маточном растворе (синтез № 1) превышает 50 %, согласно данным количественного фазового анализа. В образце ГА, полученном в ходе синтеза № 2, оно составляет около 4 %. Наличие фазы β -трикальцийфосфата в синтезированных порошках объясняет заниженное соотношение Ca/P и несоответствие стехиометрии соединения. Структурный анализ порошка биологического ГА выявил только наличие основной фазы $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Важным фактором в исследовании свойств ГА является определение его величины ПР. Известно, что растворимость фосфатов кальция в воде зависит от соотношения Ca/P : чем оно выше, тем ниже растворимость [3]. В табл. 2 приведены значения ПР и рПР для образцов синтезированного и биологического ГА.

ТАБЛИЦА 2

Произведения растворимости (ПР) и показатели произведения растворимости (рПР) для исследуемых образцов гидроксиапатита (ГА)

| Образцы ГА | ПР | рПР |
|---------------|------------------------|-------|
| Синтез № 1 | $4.174 \cdot 10^{-21}$ | 20.38 |
| Синтез № 2 | $9.075 \cdot 10^{-41}$ | 40.04 |
| Биологический | $2.870 \cdot 10^{-36}$ | 35.54 |

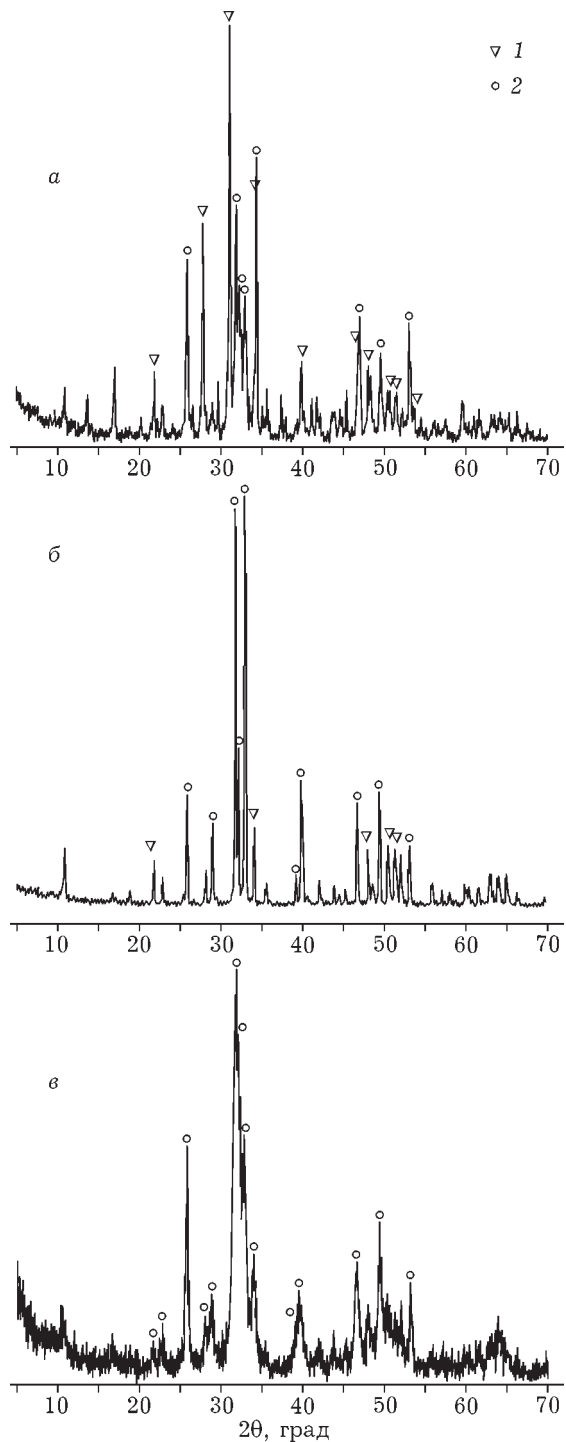


Рис. 3. Рентгенограммы образцов гидроксиапатита, полученных в результате синтезов № 1 (а) и 2 (б) соответственно, и образца биологического гидроксиапатита (в): 1 – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 2 – $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\beta$.

Видно, что наименьшим значением ПР характеризуется ГА, полученный при дополнительном отстаивании в маточном растворе (синтез № 2), а это согласуется с данными

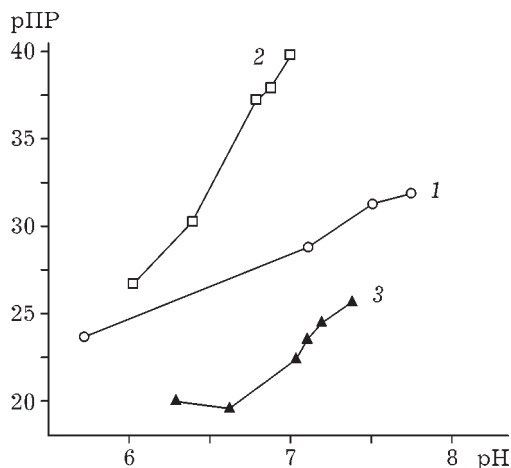


Рис. 4. Зависимость показателя произведения растворимости (рПР) гидроксиапатита от pH среды: 1, 2 – образцы гидроксиапатита, полученные в ходе синтезов № 1 и 2 соответственно; 3 – биологический гидроксиапатит.

по элементному анализу (см. табл. 1, Ca/P = 1.64). Для биологического ГА этот параметр оказался выше (ПР ~ 10^{-36}), так как соотношение Ca/P для него меньше и составляет 1.56. Самой высокой растворимостью обладает ГА, полученный без отстаивания в маточном растворе (синтез № 1), что обусловлено высоким содержанием фазы β -трикальцийфосфата (более 50 %).

На рис. 4 приведена зависимость величины рПР ГА от значений pH среды. Видно, что с уменьшением кислотности среды растворимость всех исследуемых образцов ГА возрастает. Наибольшее влияние pH среды оказывает на ГА, полученный в синтезе № 2. Так, при увеличении кислотности на одну единицу величина ПР возрастает на 14 порядков (с 10^{-40} до 10^{-26}). Растворимость же биологического ГА зависит от pH среды в меньшей степени, что, по-видимому, связано с более высокой кристалличностью (обжиг образцов биологического ГА является обязательной частью технологического процесса).

Ранее в качестве компонента электролита микродугового оксидирования для формирования кальцийфосфатных покрытий на титане и цирконии, как правило, применялся биологический ГА [7, 13]. Однако по ряду свойств биологический ГА значительно уступает образцу ГА, синтезированному с дополнительным отстаиванием в маточном растворе (синтез № 2). При этом по фазовому и элемент-

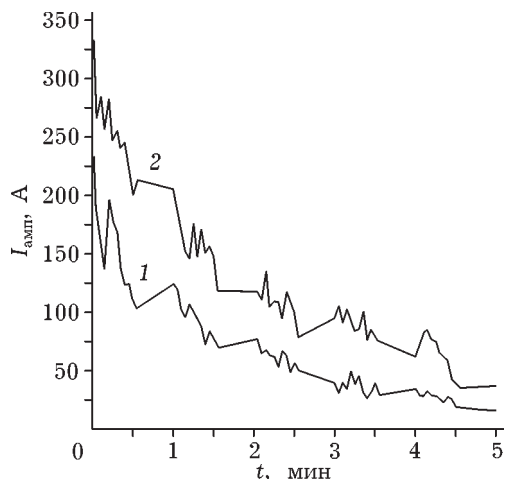


Рис. 5. Зависимость амплитудного тока от времени нанесения кальцийфосфатного покрытия на цирконий в электролитах на основе биологического (1) и синтезированного (2) гидроксиапатита.

ному составу данный образец синтезированного ГА близок к биологическому аналогу.

Для объективного сравнения покрытия получали в одном режиме с использованием электролитов одинакового состава, только в первом случае электролит приготавливали с использованием биологического ГА, во втором – синтезированного ГА.

На рис. 5 приведена зависимость силы амплитудного тока от длительности нанесения кальцийфосфатного покрытия на поверхность образцов циркония в электролитах на основе биологического и синтезированного ГА. Видно, что начальное значение силы амплитудного тока для электролита на основе биологического ГА составляет 330 А, а это почти на 100 А выше по сравнению с таковым для электролита на основе синтезированного ГА (240 А). Общий вид зависимости силы амплитудного тока от времени нанесения покрытий для двух электролитов подобен: сила тока постепенно уменьшается со временем нанесения покрытия и к концу процесса достигает 35 и 15 А для электролитов, содержащих биологический и синтезированный ГА соответственно. По виду этой зависимости можно оценить время нанесения покрытий на поверхность образца: выход кривых на стационарное значение свидетельствует об окончании формирования на поверхности циркония второго диэлектрического (кальцийфосфатного) слоя. Это время и было определено из экс-

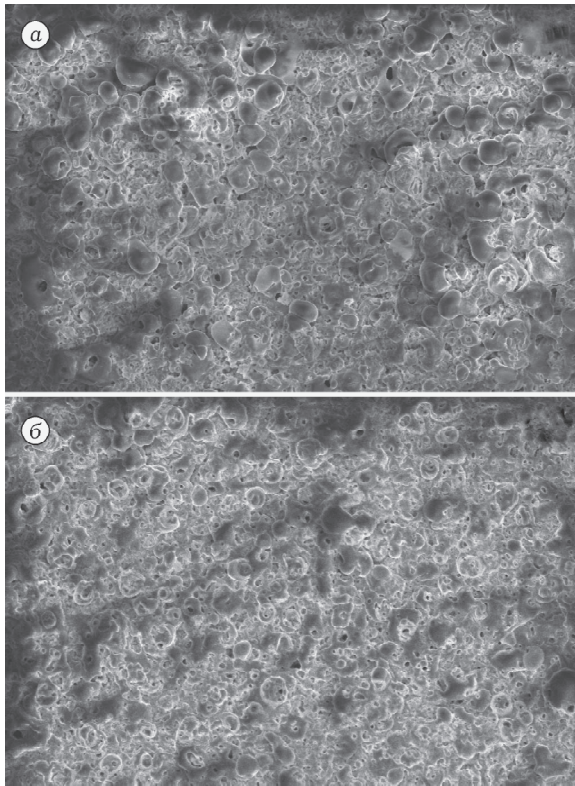


Рис. 6. Кальцийфосфатное покрытие на поверхности циркония, полученное в электролитах на основе биологического (а) и синтезированного (б) гидроксиапатита.

периментальных кривых рис. 5. При использовании электролита как на основе биологического, так и синтезированного ГА, оно составило 5 мин.

При использовании биологического ГА рельеф покрытия содержит участки со скоплениями сферолитов, образующихся на более плотном подслое покрытия, которое представляет собой наслоение “чешуек” фосфатов кальция (рис. 6, а). Сферолиты в электролите на основе синтезированного ГА формируются с меньшей вероятностью (см. рис. 6, б). По-видимому, указанные различия в нанесении покрытий связаны с различной природой ГА, которая влияет на его свойства (стехиометрию, растворимость, дисперсность). Для покрытия на основе синтезированного ГА характерна более равномерная поверхность. Шероховатость таких покрытий R_a составляет 3.0–3.5 мкм, что меньше по сравнению с покрытиями на основе биологического ГА (4 мкм). Следует отметить, что шероховатость – важный фактор в процессах остеоинтеграции имплантата в окружающие ткани. Известно,

что для успешной адгезии стволовых клеток к поверхности покрытия и их дальнейшей дифференцировки в костную ткань оптимальное значение шероховатости R_a составляет 2.5–5 мкм [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирован гидроксиапатит методом осаждения из водных растворов нитрата кальция и фосфата аммония. Показано, что выдерживание осадка в маточном растворе в течение 48 ч позволяет получать ГА, близкий к стехиометрическому как по элементному, так и по фазовому составу. Гидроксиапатит, синтезированный по предложенной методике, может быть рекомендован в качестве основного компонента электролита для нанесения биоактивных кальцийфосфатных покрытий микродуговым оксидированием на поверхность вентильных металлов, в том числе на цирконий, легированный ниобием. Применение синтезированного ГА в качестве основного компонента электролита позволяет получить биопокрытия с параметрами, необходимыми для успешной остеоинтеграции имплантата в окружающие ткани при введении его в организм.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине” (проект № 5ФНМ-27) и интеграционного проекта фундаментальных исследований СО РАН № 126.

Авторы выражают благодарность сотруднице лаборатории физики наноструктурных биокомпонитов ИФПМ СО РАН Е. В. Легостаевой за внимание к работе и обсуждение результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Хэнч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. М.: Техносфера, 2007. 304 с.
- 2 Григорьян А., Топоркова А. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты). М.: Техносфера, 2007. 128 с.
- 3 Эппле М. Биоматериалы и биоминерализация. Пер. с нем. / под ред. В. Ф. Пичугина, Ю. П. Шаркеева, И. А. Хлусова. Томск: Ветер, 2007. 137с.
- 4 Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine / B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons (Eds). 2nd ed. Elsevier Inc., 2004. 851 p.
- 5 Jarcho M., Kay J., Gumaer K., Doremus R., Drobeck H. // J. Bioengineering. 1977. Vol. 1. P. 79–92.
- 6 Пат. № 2233177 РФ, 2002.

- 7 Шаркеев Ю. П., Колобов Ю. Р., Карлов А. В., Хлусов И. А., Легостаева Е. В., Шашкина Г. А. // Физ. мезомеханика. 2005. Т. 8. С. 83–86.
- 8 Куляшова К. С., Уваркин П. В. // Тр. VI Междунар. конф. студентов и молодых ученых “Перспективы развития фундаментальных наук”. Томск, 26–29 мая, 2009. С. 143–145.
- 9 Добромислов А. В., Талуц Н. И. Структура циркония и его сплавов. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 1997. 227 с.
- 10 Баринов С. М., Комлев В. С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005. 204 с.
- 11 Legostaeva E. V., Sharkeev Yu. P., Tolkacheva T. V., Piguzov A. I. // Proc. of 9th Int. Conf. on Modification of Materials with Particle Beams and Plasma Flows. Russia, Tomsk, September 21–26, 2008. P. 600–603.
- 12 Тушинский Л. И., Плохов А. В., Токарев А. О., Синдеев В. И. Методы исследований материалов: структура, свойства и процессы нанесения неорганических покрытий. М.: Мир, 2004. 384 с.
- 13 Карлов А. В., Шахов В. П. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики. Томск: STT, 2001. 480 с.