

УДК 46.542.06

КЕРАМИКА ИЗ БАРИЙЗАМЕЩЕННЫХ ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТОВ

© 2022 г. И. В. Фадеева¹, *, А. П. Рыков¹, Д. Д. Титов¹, Я. Ю. Филиппов²,
Ю. Б. Тютькова¹, Г. А. Давыдова³, С. М. Баринов¹

¹Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук,
Ленинский пр., 49, Москва, 119334 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Факультет наук о материалах,
Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,
ул. Институтская, 3, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: fadeeva_inna@mail.ru

Поступила в редакцию 15.06.2021 г.

После доработки 03.12.2021 г.

Принята к публикации 06.12.2021 г.

Методами механохимической активации и осаждения из водных растворов с последующей кальцинацией синтезированы барийзамещенные трикальцийфосфаты с содержанием бария 0.43 и 4.28 мас. %. Изучены фазовый состав полученных соединений, удельная поверхность порошков, активность к спеканию. Из синтезированных порошков при температурах 1100, 1150, 1200 °C получена керамика, исследованы ее линейная усадка при спекании, прочность при изгибе, микроструктура. Биологические свойства керамики исследованы *in vitro* на мезенхимальных стволовых клетках, выделенных из пульпы зуба. Показано, что керамика не является цитотоксичной и может использоваться в хирургии при лечении поврежденных костных тканей.

Ключевые слова: керамика, трикальцийфосфаты, биосовместимость, *in vitro* исследования

DOI: 10.31857/S0002337X22030034

ВВЕДЕНИЕ

С конца восьмидесятых годов керамика из фосфатов кальция активно используется при лечении дефектов костной ткани, возникших в результате травм или обширных операций [1]. Использование именно фосфатов кальция связано с подобием их химического и фазового состава костной ткани человека [2]. Наиболее простым и неинвазивным методом контроля за восстановлением костных тканей является рентгеновское исследование. Однако при этом материалы, используемые для лечения, должны иметь хороший рентгеновский контраст. Фосфаты кальция, используемые в настоящее время, обладают недостаточной рентгеноконтрастностью, поэтому в их состав необходимо вводить рентгеноконтрастные вещества, например барийсодержащие соли.

Существует небольшое количество публикаций, посвященных барийсодержащей кальцийфосфатной керамике [3]. Ранее установлено, что барий является активатором резорбции костной ткани [4].

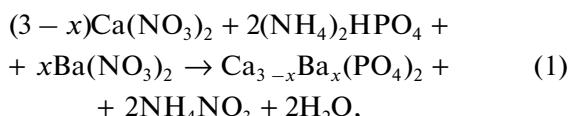
Целью данной работы являлось получение барийсодержащих трикальцийфосфатов (ТКФ) и керамики из них, а также исследование физико-

химических и биологических свойств барийсодержащей керамики.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Порошки барийзамещенных ТКФ синтезировали двумя методами: осаждением из водных растворов солей [5] и с использованием механоактивации [6].

Для синтеза барийзамещенного ТКФ методом осаждения из водных растворов солей (BaTKF_{oc}) использовали водные растворы нитрата кальция (0.5 моль/л), двухзамещенного фосфата аммония (0.5 моль/л), нитрата бария (0.1 моль/л). Все использованные реагенты имели квалификацию “ч. д. а.”. Объемы реагентов рассчитывали по реакции

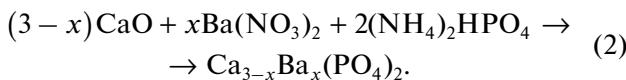


где $x = 0, 0.1, 0.01$.

В реактор с пропеллерной мешалкой и комбинированным стеклянным электродом помещали 290 мл раствора нитрата кальция и 50 мл раствора

нитрата бария, при постоянном перемешивании по каплям добавляли 200 мл раствора двухзамещенного фосфата аммония, рН реакционной смеси поддерживали на уровне 6.5. После добавления раствора двухзамещенного фосфата аммония перемешивание продолжали в течение 10 мин, после чего осадок отфильтровывали на воронке Бюхнера и выдерживали в сушильном шкафу при 110°C до полного высыхания в течение 15–20 ч. Высушенные осадки подвергали кальцинации при 900°C в течение 1 ч для формирования кристаллической структуры.

Синтез гетерофазным методом с использованием механоактивации (BaТКФ_{гф}) проводили в тефлоновых барабанах циркониевыми шарами в планетарной мельнице ПМ-1 при скорости оборотов 500 мин⁻¹. Количество исходных реагентов рассчитывали согласно схеме



Исходные реагенты загружали в барабан планетарной мельницы вместе с циркониевыми шарами, соотношение материала: шары = 1 : 5, помол проводили в течение 20 мин, после чего в барабан добавляли 200 мл воды и продолжали помол еще 20 мин. Образовавшуюся суспензию фильтровали и выдерживали в сушильном шкафу при 110°C до полного высыхания, в течение 10–15 ч. Высушенные осадки подвергали кальцинации при 900°C в течение 1 ч для формирования кристаллической структуры.

Фазовый состав продуктов реакции определяли методом рентгенофазового анализа на рентгеновском дифрактометре ДРОН-3М, источник излучения CuK_α с длиной волны 1.54 Å.

ИК-спектры регистрировали с помощью спектрометра Avatar Nicolet в области 400–4000 см⁻¹. Образцы готовили в форме таблеток с КBr.

Активность к спеканию определяли методом непрерывной усадки на дилатометре DIL 402 C с вакуум-плотной печью (Netzsch, Германия) в интервале температур 20–1200°C со скоростью нагрева 10°C/мин. Точки начала спекания рассчитывали методом экстраполяции. Температурные границы выбирали по графику первой производной: от горизонтального участка до точки минимума на первой производной, далее проводили касательные на кривой усадки, точка их пересечения соответствовала точке начала спекания.

Образцы в форме дисков диаметром 8, толщиной 3 мм и штабиков длиной 40 мм, сечением 4 × 4 мм получали методом двухстороннего одноосного прессования при удельном давлении 10 МПа в стальных пресс-формах. Образцы спекали в камерной печи с силитовыми нагревателями при температурах 1100, 1150, 1200°C на воздухе, нагревание до

указанной температуры осуществляли со скоростью 10°C/мин.

Микроструктуру керамики изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Tescan Vega II (Чехия). Изображения получали с помощью детектора вторичных электронов типа Эверхарта-Торнли при ускоряющем напряжении 20 кВ.

Прочность керамики изучали методом трехточечного изгиба на испытательной машине Instron ElectroPuls E3382 (Instron, Великобритания).

Исследование цитотоксичности материалов проводили с использованием вытяжек, приготовленных, согласно требованиям [7, 8], в культуральной среде DMEM/F12 на фибробластах линии NCTC clone L929 с применением MTT-теста, основанного на восстановлении бесцветной соли бромида 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, растворимого в диметилсульфоксиде.

Изучение адгезии и роста клеток на поверхности керамики проводили методом прямого контакта. Для исследования использовали первичную культуру мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток, выделенных из пульпы зачатка третьего моляра человека, извлеченного по ортодонтическим показаниям (клетки DPSC после подписания родителями пациента формы информированного согласия). Все эксперименты проводились в соответствии с принципами надлежащей клинической практики (GCP) и этическими принципами, содержащимися в текущей версии Хельсинской декларации.

Образцы материала помещали в ячейки 24-лучиного планшета и высевали клетки в концентрации 25 тыс. кл./см² (среда DMEM/F12 + 10% FBS). Оценку жизнеспособности клеток проводили через 1 и 7 сут методом дифференцированного флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток с применением красителей SYTO 9 (поглощение 420 нм, эмиссия 580 нм) и иода пропидия (поглощение 488 нм, эмиссия 640 нм) на инвертированном микроскопе Axiovert 200 (Цейсс, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основной фазой синтезированных методом осаждения образцов является витлокит, при этом в барийзамещенных ТКФ присутствует гидроксиапатит (ГА) в количестве, не превышающем 5 мас. % содержание которого увеличивается с ростом концентрации бария (рис. 1). Образование ГА может быть связано с локальным повыше-

* ГА (ICDD № 09-0432)

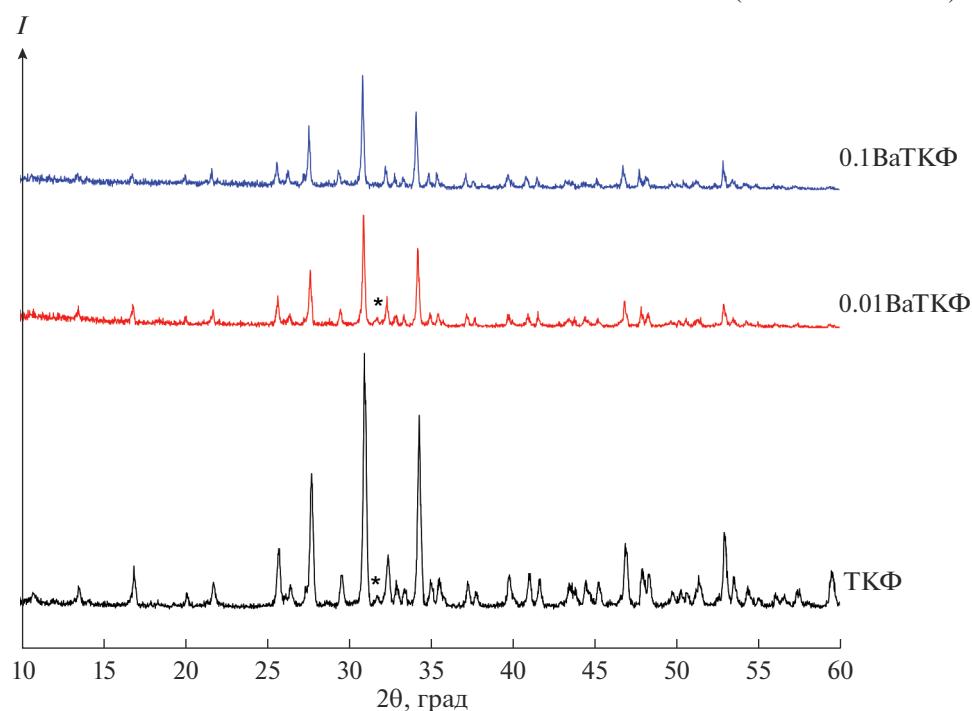


Рис. 1. Дифрактограммы порошков барийсодержащих ТКФ, полученных методом осаждения из водных растворов.

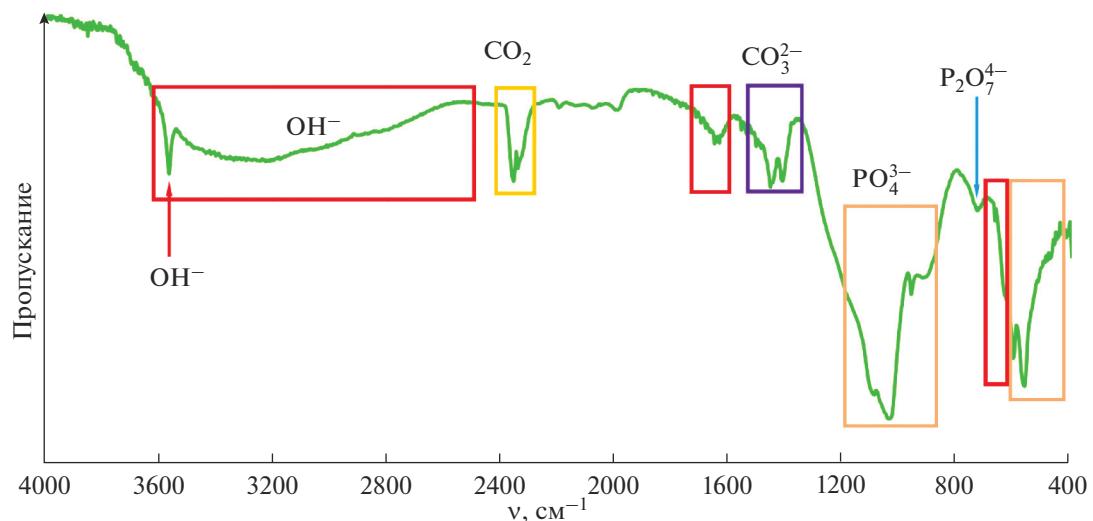


Рис. 2. ИК-спектр образца 0.1BaTKF, полученного осаждением из водных растворов, снятый после термообработки при 400°C в смеси с бромидом калия.

нием pH при добавлении двухзамещенного фосфата аммония в процессе синтеза.

Присутствие в ИК-спектрах полос при 729 см⁻¹ (рис. 2, табл. 1) связано с колебаниями групп пи-рофосфата, которые могут образовываться при термическом разложении дигидрата дикальций-фосфата (ДКФД). ДКФД образуется при смеши-

вании растворов кальция и фосфата при соотношении Ca : P = 1 [9].

Изучение спекаемости образцов, полученных двухсторонним одноосным прессованием, выявило, что процесс интенсивного спекания происходит в температурном интервале 1040–1060°C. Введение бария приводит к значительному смещению кривой усадки, даже при его низком содержании.

Таблица 1. Данные ИК-спектроскопии образца 0.1BaTKФ

Полоса, см ⁻¹	Отнесено к колебаниям	Примечание
492, 434, 552, 607, 945, 973, 1121, 1073, 1044	PO ₄ ³⁻	
631, 3571	OH ⁻	Узкие интенсивные полосы
729	P ₂ O ₇ ⁴⁻	Валентные колебания P—O—P
1450—1500	CO ₃ ²⁻	Дублет
2350—2370	CO ₂	Дублет
2800—3600	H ₂ O	Широкая полоса

Усадка для чистого ТКФ составляет 7.9%, при добавлении бария, независимо от содержания, усадка увеличивается в 2.5 раза — до 20% от начальной при 1200°C (рис. 3). Более детальное поведение образцов при спекании характеризует первая производная от усадки, она показывает скорость усадки образца в зависимости от температуры (рис. 3, пунктирные линии). Введение бария усложняет процесс спекания: наблюдаются два дополнительных минимума на кривой — в области 685 и 806°C. Максимальная скорость усадки соответствует минимальному значению на графике, с ростом содержания бария происходит смещение в область более низких температур — до 1150 и

1100°C для 0.01BaTKФ и 0.1BaTKФ соответственно. Данный факт можно объяснить тем, что с увеличением содержания бария увеличивается напряжение в кристаллической решетке ТКФ, что приводит к уменьшению размера кристаллитов. Как известно из теории спекания [8], температура спекания снижается при уменьшении размеров частиц.

Для исследования влияния температуры обжига на линейную усадку и микроструктуру образцов ТКФ и BaTKФ, а также для установления влияния бария на спекание был проведен обжиг при температурах 1000, 1100, 1200°C. Обжиг при температурах выше 1200°C приводит к формиро-

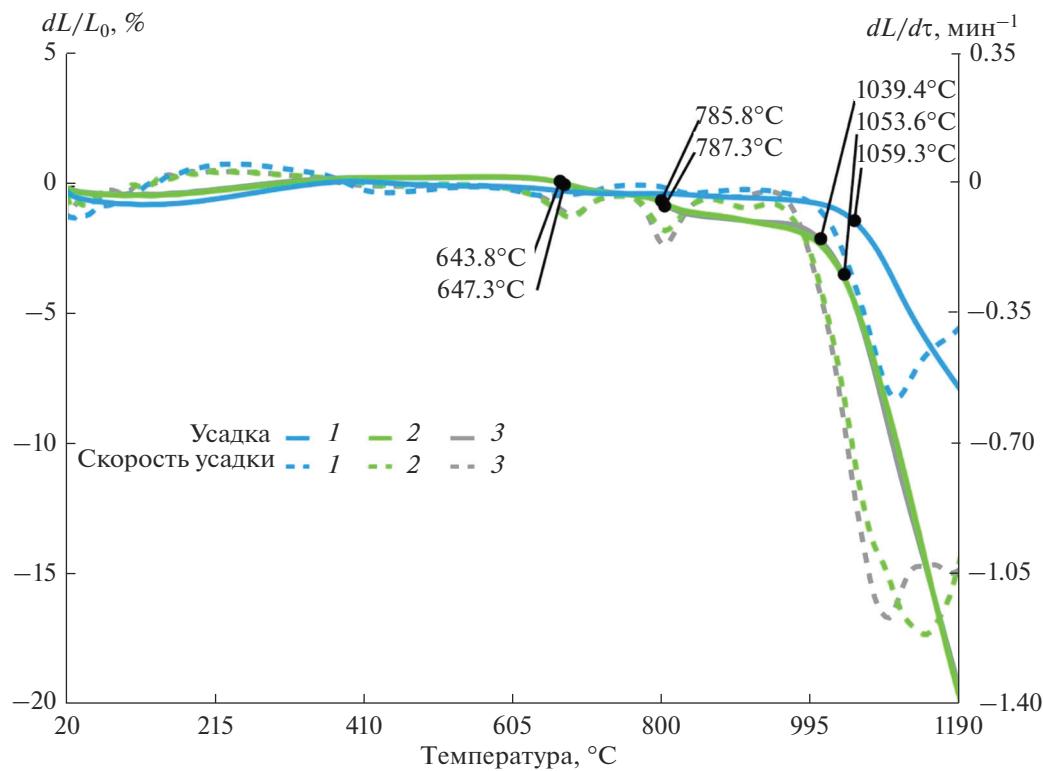


Рис. 3. Зависимости линейной усадки и скорости усадки от температуры: 1 — ТКФ_{гф}; 2 — 0.1BaTKФ_{гф}, 3 — 0.01BaTKФ_{гф}.

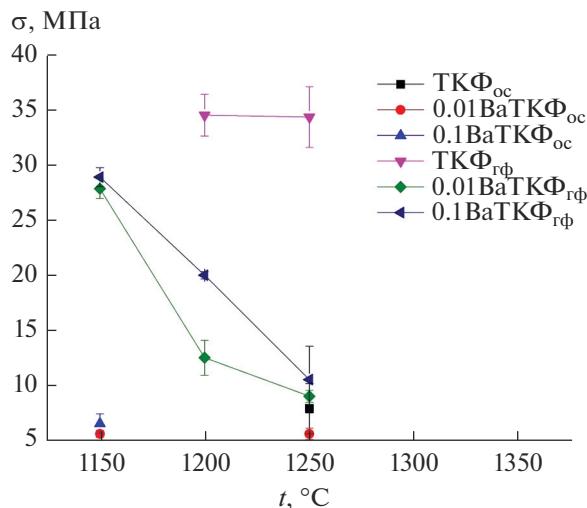
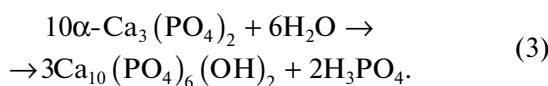


Рис. 4. Прочность при изгибе керамических образцов с различным содержанием бария, полученных при температуре 1150–1250°C.

ванию высокотемпературной формы α -ТКФ [9], которая не используется в медицине в виде керамики. Это связано с тем, что в среде организма, содержащей много воды, происходит гидролиз α -ТКФ (уравнение (3)) с образованием ГА ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), сопровождающийся выделением ортофосфорной кислоты, которая вызывает воспаление окружающих тканей,



Известно [10], что процесс спекания сопровождается усадкой, которая увеличивается с ростом температуры. На рис. 3 приведена зависимость линейной усадки от температуры обжига для образцов ТКФ, 0.01BaTKФ и 0.1BaTKФ, полученных с использованием механоактивации при скорости нагревания 10°C/мин. Приведенные данные не противоречат теории спекания: с ростом температуры для всех образцов увеличивается линейная усадка.

Согласно полученным данным, прочность образцов, синтезированных с использованием гетерофазного метода, значительно выше, чем в случае метода осаждения из растворов. Действительно, по данным СЭМ, в первом случае наблюдается образование перешейков между соседними зернами, что, несомненно, приводит к увеличению прочностных характеристик (рис. 4). Также следует обратить внимание на падение прочности при изгибе образцов, полученных с использованием гетерофазного метода, по мере роста температуры обжига и увеличения содержания бария. На первый взгляд это кажется странным, так как, согласно данным дилатометрии, усадка образцов из чистого ТКФ начинается при более высоких температурах, однако выбранный диапазон температур спекания (1150–1250°C) лежит выше исследуемой с помощью дилатометра области. Таким образом, можно сделать предположение, что во всех случаях процесс спекания завершился, о чем свидетельствует наличие развитой микроструктуры перешейков при более низкой температуре – 1100°C (рис. 5), а падение прочности связано с избыточной температурой обжига, приводящей к

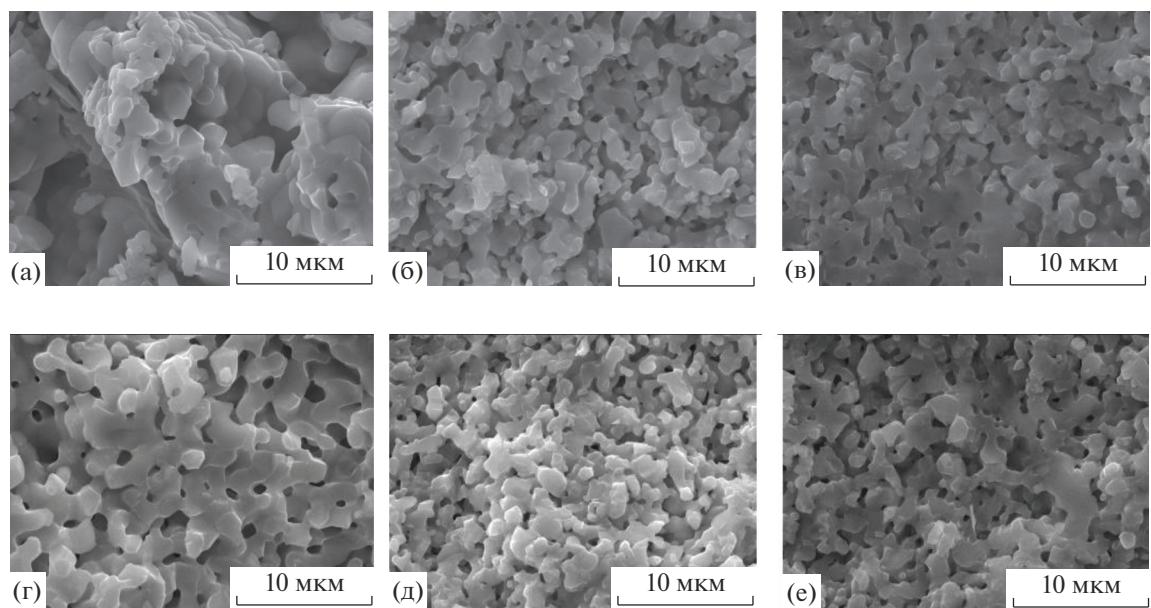


Рис. 5. Микроструктура образцов керамики с содержанием бария 0 (а, г), 0.44 (б, д), 4.42 мас. % Ba (в, е), полученных осаждением из водных растворов (г–е), механоактивацией (а–в) (температура обжига 1100°C).

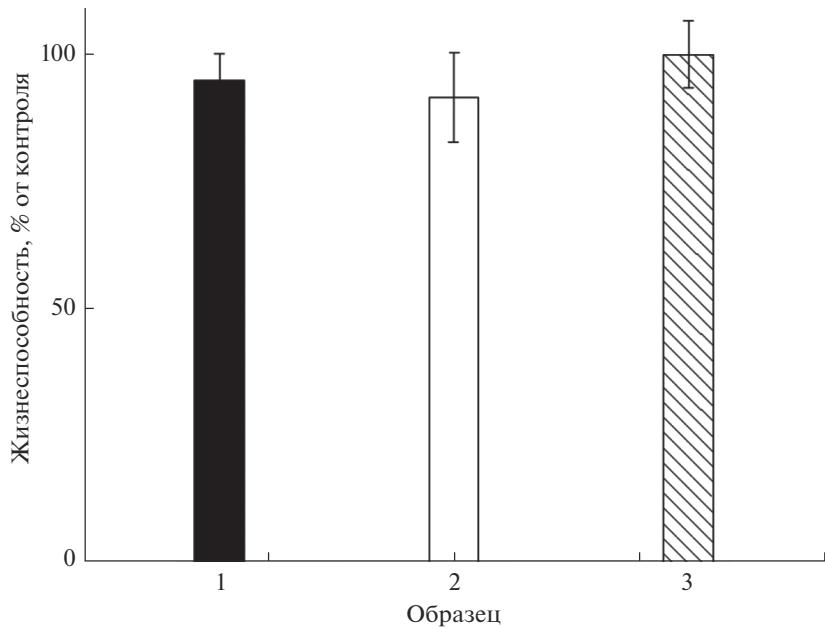


Рис. 6. Метаболическая активность клеток линии NCTC L929 по результатам МТТ-теста при инкубации 24 ч с вытяжками из материалов: 1 – 0.01BaTKФ, 2 – 0.1BaTKФ, 3 – ТКФ.

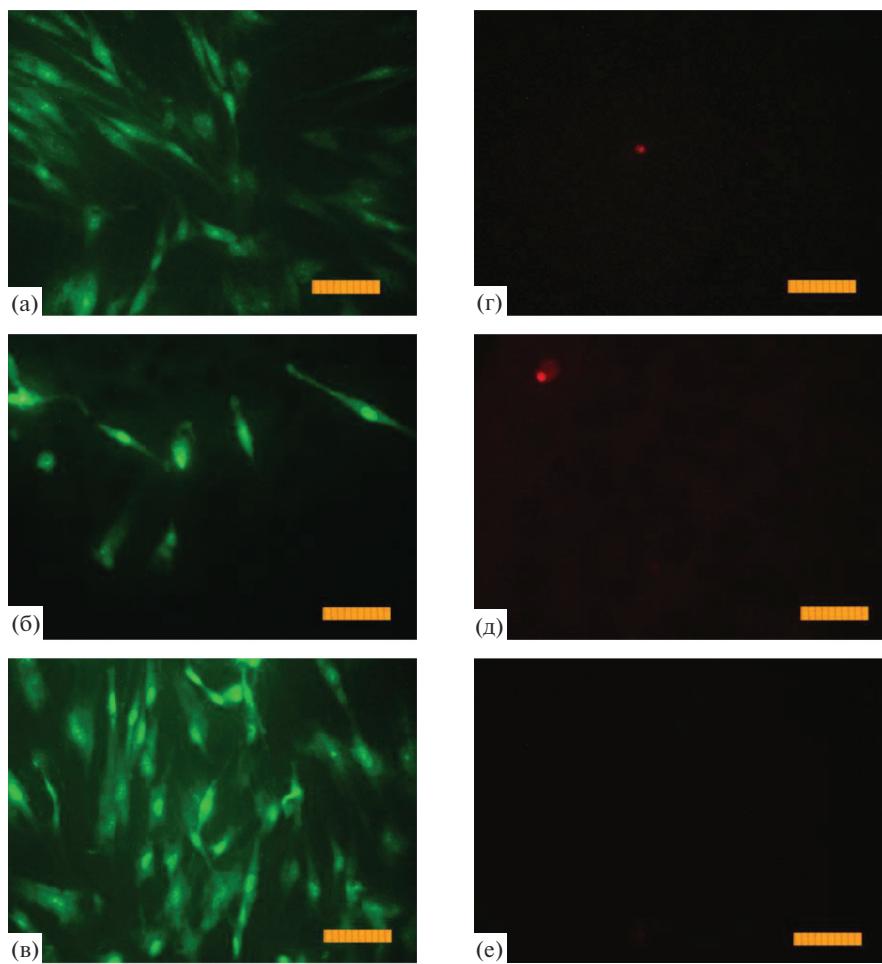


Рис. 7. Внешний вид клеток DPSC через 1 сут после посева на поверхности образцов: 0.01BaTKФ (а, г), 0.1BaTKФ (б, д), ТКФ (в, е): а–в – SYTO9, г–е – PI; линейка 100 мкм.

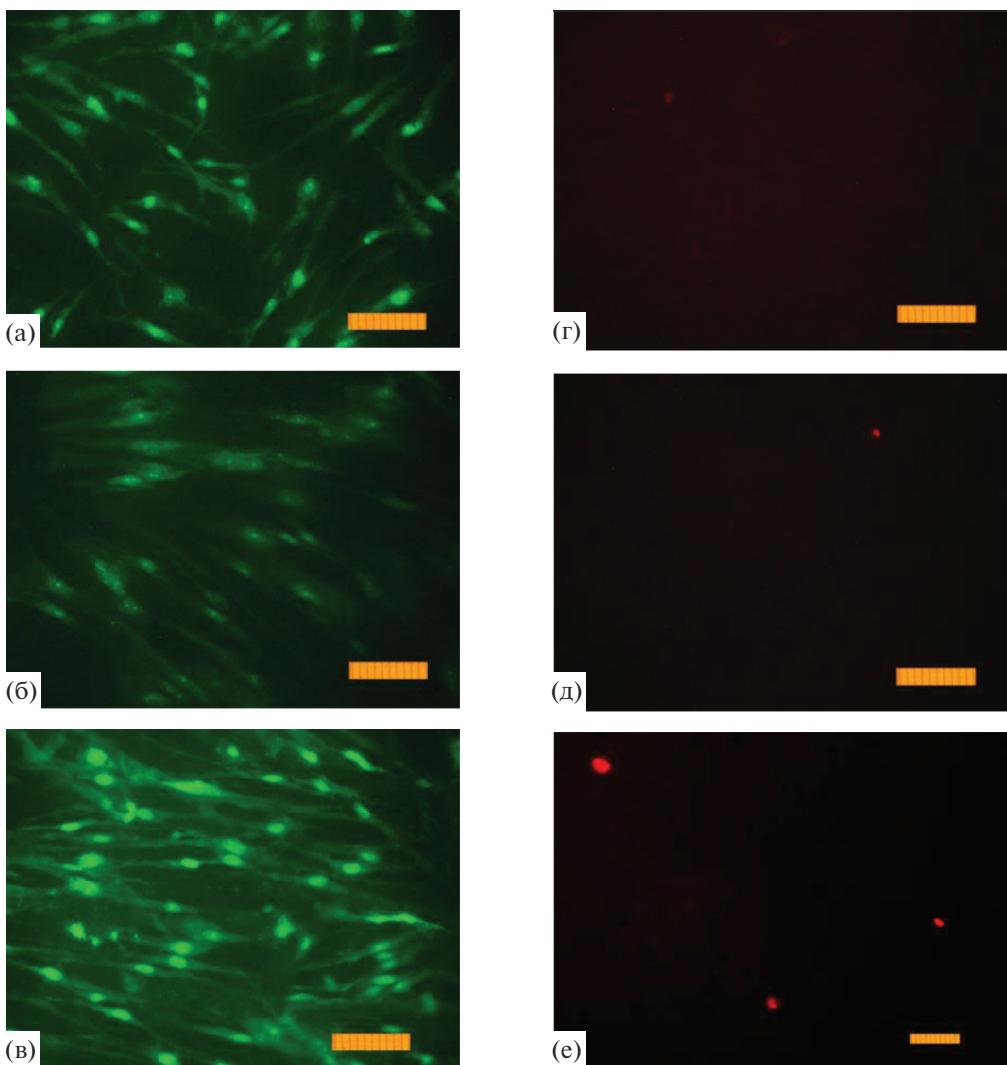


Рис. 8. Внешний вид клеток DPSC через 7 сут после посева на поверхности образцов: 0.01BaТКФ (а, г), 0.1BaТКФ (б, д), ТКФ (в, е): а–в – SYTO9, г–е – PI; линейка 100 мкм.

неконтролируемому росту керамических зерен (рис. 5) и, как следствие, падению прочности согласно закону Холла–Петча. В случае же незамещенного ТКФ температура спекания оказалась более подходящей, что привело к формированию относительно прочных керамических образцов (до 35 МПа при изгибе) (рис. 4).

В результате спекания в течение 2 ч при 1100°С получена керамика с пористостью до 40%. Введение в структуру ТКФ ионов бария приводит к интенсификации процесса спекания (рис. 3). Способ синтеза также влияет на спекаемость барийзамещенных ТКФ: порошки, полученные гетерофазным методом, при одинаковых условиях (температура спекания и выдержка) спекаются лучше, чем порошки, синтезированные методом осаждения из водных растворов.

На рис. 6 отображен результат применения MTT-теста для определения клеточной активности NCTC L929. Вытяжки из модифицированного барием ТКФ не оказывали угнетающего воздействия на клетки, как и из немодифицированного ТКФ, поэтому данные материалы могут быть признаны биосовместимыми.

Оценка жизнеспособности и пролиферативной активности клеток на поверхности керамики (рис. 7) была проведена методом дифференцированного флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток с применением красителей SYTO 9 (окрашивает в зеленый цвет ДНК и РНК живых и мертвых клеток) и иодида пропидия (интеркалирующий реагент окрашивает в красный цвет ядра погибших клеток).

На первые сутки культивирования клеток (стадия адгезии и распластывания) на поверхности ке-

рамики число клеток уменьшалось с увеличением содержания Ba. Возможно, это связано с тем, что ионы Ba²⁺, имея одинаковый радиус с ионами K⁺, конкурируют с ними и снижают проницаемость калиевых каналов, вызывая деполяризацию клеточных мембран и понижая мембранный потенциал [11]. Однако незначительное количество мертвых клеток свидетельствует о том, что материалы не оказывают цитотоксического действия.

На седьмые сутки культивирования на поверхности всех образцов количество клеток возросло по сравнению с первыми сутками (рис. 8), при этом наблюдалась высокая жизнеспособность клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы. Введение ионов бария в структуру ТКФ интенсифицирует процесс спекания. Способ синтеза также влияет на спекаемость порошков барийзамещенных ТКФ: порошки, полученные с использованием механохимической активации, спекаются лучше по сравнению с порошками, синтезированными осаждением из водных растворов.

При проведении *in vitro* исследований установлено, что барийзамещенные ТКФ не оказывают цитотоксического действия на активность клеток NCTC L929.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена в рамках Госзадания № 075-00328-21-00.

Исследования материалов *in vitro* проведены в рамках Госзадания № 075-00381-21-00.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баринов С.М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины // Успехи химии. 2010. Т. 79. № 1. С. 15–32.
2. Лемешева С.А., Голованова О.А., Туренков С.В. Исследование особенностей состава костных тканей человека // Химия в интересах устойчивого развития. 2009. Т. 17. № 3. С. 327–332.
3. Раджабова Г.Т., Русаков М.К. Керамические порошки из барий- и стронцийзамещенных трикальцийфосфатов для медицины // Молодые ученые России. 2020. С. 21–26.
4. Герк С.А., Голованова О.А. Элементный состав костной ткани человека в норме и при патологии // Вестн. Омского ун-та. 2015. Т. 78. № 4. С. 39–44.
5. Фадеева И.В., Бакунова Н.В., Комлев В.С., Медвецкий Л., Фомин А.С., Гурин А.Н., Баринов С.М. Цинк- и серебросодержащие гидроксиапатиты: синтез и свойства // Доклады академии наук. 2012. Т. 442. № 6. С. 780–780.
6. Чайкина М.В., Булина Н.В., Винокурова О.Б., Прсанов И.Ю. Синтез стехиометрического и замещенного β-трикальцийфосфата с привлечением механохимии // Химия в интересах устойчивого развития. 2020. Т. 28. № 1. С. 73–78.
7. Кингери У.Д. Введение в керамику. М.: Стройиздат, 1967. 500 с.
8. Каназава Т. Неорганические фосфатные материалы. Киев: Наук. думка, 1998. С. 17–109.
9. Belik A.A., Izumi F., Stefanovich S.Y., Lazoryak B.I., Oikawa K. Chemical and Structural Properties of a Whitlockite-Like Phosphate, Ca₉FeD(PO₄)₇ // Chem. Mater. 2002. V. 14. № 9. P. 3937–3945. <https://doi.org/10.1021/cm020411+>
10. Бакунов В.С., Беляков А.В., Лукин Е.С., Шаяхметов У.Ш. Оксидная керамика: спекание и ползучесть. М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. 584 с.
11. Baraiba A.M., de Pascual R., Camacho M., Domíngue N., Machad J.D., Gandí L., Borges R. Distinct Patterns of Exocytosis Elicited by Ca²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺ in Bovine Chromaffin Cells // Pflügers Arch. 2018. V. 470. № 10. P. 1459–1471.