

УДК 661.635.41; 546.41:54.05

М. А. Трубицын, Вьет Хунг Хоанг, Л. В. Фурда

**ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТ-ИОНОВ НА СТРУКТУРНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ
И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАНОРАЗМЕРНОГО БИОМИМЕТИЧЕСКОГО
ГИДРОКСИАПАТИТА, ДОПИРОВАННОГО СИЛИКАТ- И КАРБОНАТ-АНИОНАМИ**

Ключевые слова: гидроксиапатит, биомиметический, структурно-морфологический, цитрат-ион, карбонат, силикат, биоактивность.

В рамках данной работы проведен синтез наноразмерного биомиметического гидроксиапатита, структурно модифицированного силикат- и карбонат-анионами (далее БМГАП). Современными инструментальными методами анализа были исследованы морфологические и биологические свойства полученных образцов. Методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) установлено, что частицы БМГАП имеют размер от 13 до 65 нм и преимущественно сферическую форму. Показано, что с увеличением концентрации цитрат-ионов, вводимых в ходе синтеза БМГАП, наблюдается уменьшение среднего размера частиц. Согласно данным ИК-спектроскопического исследования выявлено, что в синтезированных образцах присутствуют только полосы валентных и деформационных колебаний структурных групп, характерные для БМГАП. Методом низкотемпературной адсорбции азота установлено, что все исследуемые материалы обладают достаточно развитой удельной поверхностью от 115,84 до 192,51 м²/г, а их объем и средний размер пор варьируется в диапазоне 0,25 - 0,58 см³/г и 5,07 - 13,26 нм соответственно. Изучена биологическая активность образцов БМГАП в модельном SBF растворе (от англ. Simulated Body Fluid) при 37 С в течение 14 суток. Обнаружено, что наибольшая скорость выхода ионов кальция наблюдается в первые сутки контакта с SBF-раствором и через 5 суток достигается максимальное равновесное значение концентрации ионов Ca²⁺. Показано, что образцы биомиметического гидроксиапатита, допированного силикат- и карбонат-анионами синтезированные в присутствии цитрат-ионов, обладают более высокой резорбируемостью по сравнению с БМГАПО, что подтверждает существенное влияние данных ионов на структурно-морфологические и биологические свойства полученных образцов.

М. А. Troubitsin, Viet Hung Hoang, L. V. Furda

**INFLUENCE OF CITRATE IONS ON STRUCTURAL, MORPHOLOGICAL,
AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF NANOSIZED BIOMIMETIC HYDROXYAPATITE DOPED
BY SILICATE AND CARBONATE ANIONS**

Keywords: hydroxyapatite, biomimetic, structural, morphological, citrate ion, carbonate, silicate, bioactivity.

In the framework of this work, we synthesized nanosized biomimetic hydroxyapatite structurally modified by silicate and carbonate anions (BMHAP). The morphological and biological properties of the obtained samples were investigated using modern instrumental methods of analysis. Using transmission electron microscopy, it was found that the BMHAP particles are preferably spherical in shape with a size of 13 to 65 nm. With an increase in the concentration of citrate ions introduced in the synthesis of BMHAP, a decrease in the average particle size was observed. According to the IR spectroscopy data, it was revealed that only the bands of stretching and bending vibrations of the BMHAP functional groups were present in the synthesized samples. Method of low-temperature nitrogen adsorption showed that all studied materials have a developed specific surface area from 115.84 to 192.51 m²/g, and their volume and average pore size vary in the range of 0,25 - 0,58 cm³/g and 5,06 - 13,26 nm, respectively. The biological activity of the BMHAP samples in a simulated SBF solution at 37°C for 14 days was studied. The highest release rate of calcium ions was observed on the first day of contact with the SBF solution and after 5 days the maximum equilibrium value of the Ca²⁺ concentration was reached. Biomimetic hydroxyapatite samples synthesized in the presence of citrate ions had higher resorbability in comparing with BMHAP, which confirms the significant effect of these ions on the structural, morphological, and biological properties of the samples.

Введение

На сегодняшний день широко используемым в регенеративной медицине кальций-фосфатным биоматериалом является синтетический гидроксиапатит (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, ГАП), который по химическому составу аналогичен апатиту биогенного происхождения, т. н. биоапатиту [1-4]. Однако существенными недостатками препаратов на основе ГАП, применяемых в настоящее время в медицинской практике, являются их неоптимальная биорезорбция (способность растворения при контакте с межтканевыми жидкостями в организме) и слабая остеиндукция (способ-

ность стимулирования образования новой костной ткани) [5,6].

Известно, что биоактивность и соответственно скорость биорезорбции гидроксиапатита можно регулировать величиной удельной поверхности за счет размера частиц и химическим модифицированием структуры биосовместимыми ионами. В работе [7] показано, что биогенный апатит - неорганический компонент костной ткани, эмали и дентина человека, по своему химическому составу соответствует формуле (Ca[Na, Mg])₁₀(PO₄[HPO₄, CO₃, SiO₄])₆(OH[F, Cl])₂ - то есть является кальцийдефицитным гидрокси-

апатитом с катионными и анионными замещениями. По своей морфологии частицы, формирующие природный ГАП, являются наноразмерными и преимущественно сферической формы.

В последнее время большой интерес представляют исследования, направленные на синтез биомиметического гидроксиапатита (БМГАП), который по своему химическому составу, структуре и морфологии максимально приближен к биогенному апатиту [8-12].

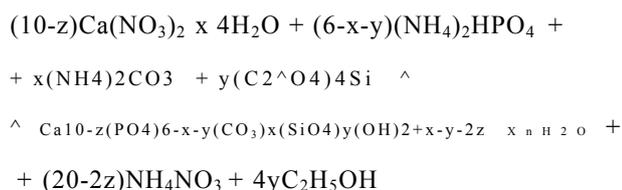
Установлено [13-16], что внедрение силикат-анионов в структуру ГАП способствует ускорению процесса остеоинтеграции, повышает скорость остеогенеза *in vivo* при имплантации кремнийсодержащей керамики. Также сообщалось в ряде работ [17-19], что замещение фосфат-ионов карбонатными группами в структуре ГАП приводит к уменьшению размеров кристаллов, степени кристалличности, а также увеличивает скорость биорезорбции. Сообщается, что синтетический карбонатсодержащий ГАП более растворим *in vivo*, чем немодифицированный ГАП, и обладает повышенной локальной концентрацией ионов кальция и фосфата, необходимых для формирования новой костной ткани.

Анализ литературы [20-22] показывает, что важную роль в формировании структурно-морфологических характеристик наночастиц ГАП играют цитрат-ионы, которые препятствуют росту частиц гидроксиапатита. Предполагается, что регулирование размеров кристаллитов достигается за счет адсорбции цитрат-ионов на межфазовой поверхности в процессе синтеза.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния цитрат-ионов на структурно-морфологические характеристики и биоактивность биомиметического гидроксиапатита, допированного силикат- и карбонат-анионами.

Экспериментальная часть

Образцы наноразмерного биомиметического гидроксиапатита, допированного силикат- и карбонат-анионами, которые отвечают формуле $\text{Ca}_{10-z}(\text{PO}_4)_6-x-y(\text{CO}_3)_x(\text{SiO}_4)_y(\text{OH})_{2+x-y-2z} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ были получены методом осаждения из водных растворов в присутствии цитрат-ионов различной концентрации. Процесс синтеза БМГАП можно описать следующим уравнением:



где

z - степень дефицитности ионов кальция;

x - степень замещения фосфат-ионов карбонат-анионами;

y - степень замещения фосфат-ионов силикат-анионами.

Для проведения исследований в данной работе было принято мольное соотношение $\text{C}_{\text{Ca}}^{2+}/(\text{C}_{\text{PO}_4}^{3-} + \text{C}_{\text{CO}_3}^{2-} + \text{C}_{\text{SiO}_4}^{4-}) = 1,50$; а степени замещения фосфат-ионов карбонат- и силикат-анионами во всех случаях составляли $x = y = 1$.

Для получения образцов БМГАП в качестве прекурсоров использовали $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (х.ч.); тетраэтоксисилан $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_4$ (ТЭОС) (ос. ч.); $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (х. ч. а.); $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (ч.). Растворителем во всех случаях была дистиллированная вода.

Суспензии наноразмерного БМГАП готовили в стеклянном реакторе с использованием верхнеприводной мешалки по авторской методике [23-24]. В данной работе в качестве прекурсора цитрат-ионов использовали 0,5М раствор лимонной кислоты, которую вводили в количествах 1, 5 и 10 мл. $\text{pH}=10 (\pm 0,2)$ поддерживали добавлением 25% раствора NH_4OH . Согласно [25], при $\text{pH}>8$ преобладающей формой (>99%) является Cit^{3-} . Общий реакционный объем составлял 250 мл. Также для сравнения был получен БМГАП в отсутствие цитрат-ионов. Полученным образцам с различной концентрацией цитрат-ионов были присвоены индексы: БМГАП0, БМГАП1, БМГАП5 и БМГАП10 соответственно. Осажденную фазу БМГАП высушивали при температуре 120 С, измельчали в агатовой ступке и получали в виде порошков белого цвета.

Морфологию и размеры частиц гидродисперсий охарактеризовали с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на приборе JEM-2100 (JEOL Ltd., Япония). Параметры работы: ускоряющее напряжение электронной пушки $U=200$ кВ, разрешение $5= 0,19$ нм, увеличение до $\times 800000$. В качестве подложки применяли углеродную пленку и медную сетку с круглыми отверстиями диаметром 0,1мм. Образцы в виде суспензий предварительно подвергли обработке в ультразвуковой ванне в течение 10-15 мин.

ИК-спектры поглощения полученных порошков регистрировали на Фурье-спектрометре «IRPrestige-21» (Shimadzu, Япония) в интервале волновых чисел от 400 до 4000 cm^{-1} . Образцы готовили таблетированием с KBr.

Измерение удельной поверхности (S^{\wedge}), объема и среднего размера пор исследуемых порошков осуществляли методом Брунера-Эммета-Теллера (БЭТ) на автоматизированной сорбционной установке TriStar II 3020 (фирма «Micromeritics», США). Образцы выдерживали в инертной атмосфере азота с одновременным обеспечением нагрева при температуре 350 С. Величина удельной поверхности определена по изотерме низкотемпературной адсорбции паров азота по однотоочному методу БЭТ в точке $P/P_0= 0,299869104$, а объем пор при $P/P_0 = 0.983956169$.

Биорезорбируемость исследуемых материалов изучали по международной стандартной методике в модельном SBF растворе (Simulated Body Fluid) [26]. Модельный SBF-раствор — это раствор, который аналогичен по своему химическому составу и концентрации ионов человеческой межтканевой

жидкости (плазме крови человека). Его химический состав представлен в табл. 1. Образцы БМГАП помещали и выдерживали в SBF растворе при 37 С в термостате в течение 14 суток. Через заданные промежутки времени определяли концентрацию ионов кальция, переходящих в раствор, методом комплексонометрического титрования [27]. Биорезорбируемость, согласно методике, оценивали по количественному выходу Ca^{2+} .

Таблица 1 - Концентрация ионов (ммоль/л) в модельном SBF растворе

Ионы	Концентрация ионов, ммоль/л
Na ⁺	142,0
K ⁺	5,0
Ca ²⁺	2,5
Mg ²⁺	1,5
Cl ⁻	148,8
HPO ₂	1,0
HCO ₃ ⁻	4,2
SO ₄ ²⁻	0,5

Обсуждение результатов

В предварительных опытах методом рентгенофазового анализа (РФА) было доказано, что синтезированные порошки являются однофазными нанокристаллическими и могут быть идентифицированы как модификация ГАП.

В рамках настоящей работы было проведено исследование структурно - морфологических характеристик образцов БМГАП в форме гидродисперсий методом просвечивающей электронной микроскопии (Рис. 1).

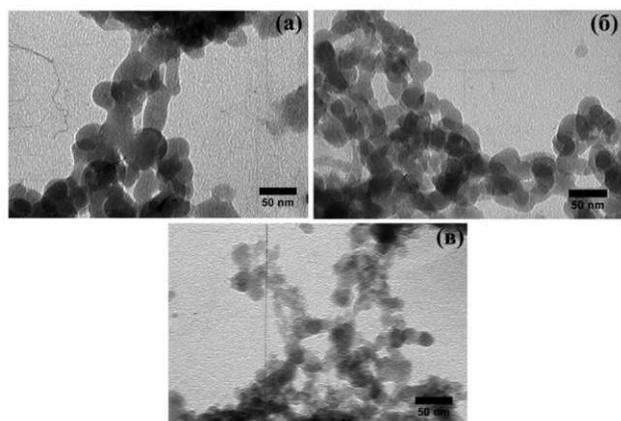


Рис. 1 - ПЭМ - микрофотографии изображений образцов: а - БМГАП0; б - БМГАП1; в - БМГАП10

Как видно из ПЭМ - изображений, частицы полученных образцов БМГАП имеют сферическую форму, а их размеры зависят от присутствия и концентрации цитрат-ионов. Так для образца БМГАП0 размер ча-

стиц варьируется в интервале от 32 до 65нм, для БМГАП1 - от 20 до 54,5нм, а для образца БМГАП10 - от 13 до 32нм.

На рисунке 2 представлены результаты определения удельной поверхности, объема и среднего размера пор полученных образцов.

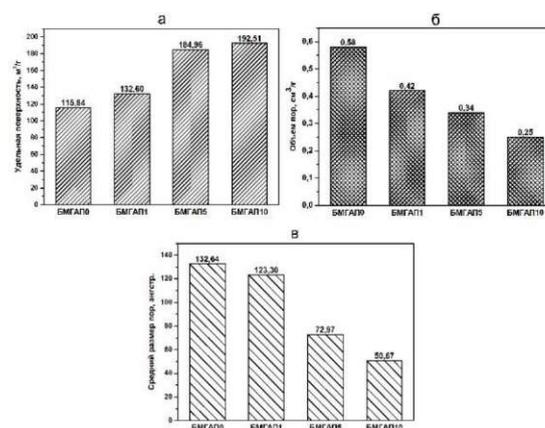


Рис. 2 - Гистограммы текстурных характеристик образцов БМГАП: а - удельная поверхность; б - объем пор; в - средний диаметр пор

Все исследуемые материалы обладают достаточно развитой удельной поверхностью. Максимальное значение зафиксировано у БМГАП10. Следует отметить, что для исследуемого ряда образцов по мере увеличения концентрации цитрат-ионов наблюдается уменьшение объема и среднего размера пор. Так, для БМГАП10 объем и средний размер пор в 2,3 и 2,6 раз ниже соответствующих значений для образца БМГАП0.

В данной работе качественный анализ структурно-функциональных групп в различных позициях кристаллической структуры БМГАП был проведен методом ИК-спектроскопии. Результаты исследования продуктов синтеза представлены на рисунке 3.

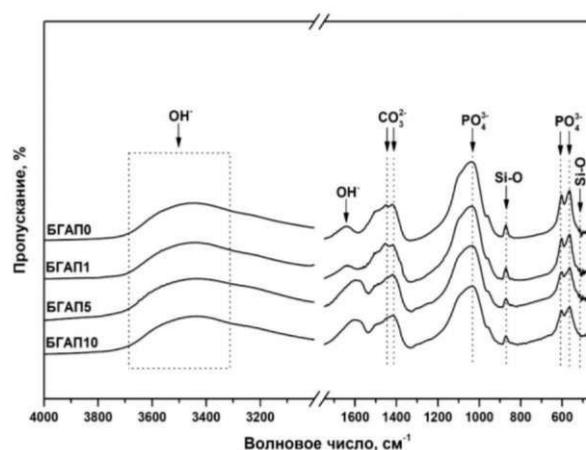


Рис. 3 - ИК-спектры полученных образцов БМГАП

Как следует из рисунка 3, в синтезированных продуктах присутствуют только полосы валентных и деформационных колебаний структурных групп, характерные для БМГАП.

Полосы поглощения 1640 и 3570 см^{-1} соответствуют валентным колебаниям ОН-групп; а полосы в интервале от 2500 до 3700 см^{-1} указывают на наличие адсорбционной H_2O ; 564 - 607 и 958 - 1038 см^{-1} отвечают деформационным и валентным колебаниям фосфатных групп, а в интервале 1417 - 1460 см^{-1} соответствуют колебаниям карбонат-групп. В спектрах также зафиксированы полосы поглощения при 510 и 866 см^{-1} , которые указывают на присутствие силикат-ионов.

На рисунке 3 также видно, что с увеличением концентрации цитрат-ионов происходит изменение структуры полос поглощения. Если на спектрах для БМГАП0 и БМГАП1 присутствуют полосы в интервале 1417 - 1459 см^{-1} , соответствующие карбонат-группам, то для БМГАП5 и БМГАП10 в этой области обнаруживается только одна полоса 1417 см^{-1} .

Биологическую активность синтезированных материалов оценивали по их резорбции в SBF-растворе. Результаты этого исследования представлены на рисунке 4.

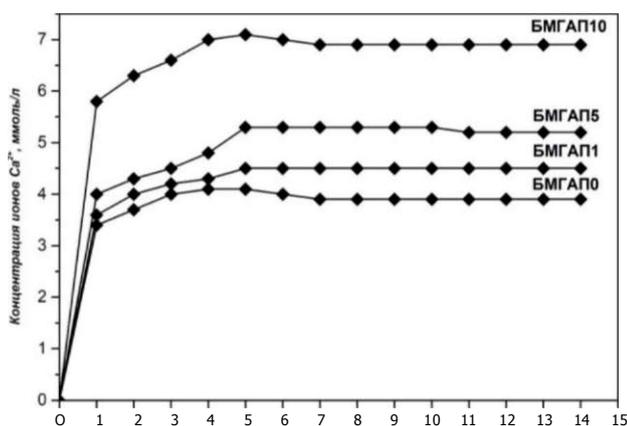


Рис. 4 - Выход ионов кальция в SBF-раствор в зависимости от времени экспозиции

Из рисунка 4 видно, что для всех исследуемых образцов графики процесса резорбции имеют схожий характер, когда наибольшая скорость выхода ионов кальция наблюдается в первые сутки контакта с SBF-раствором и через 5 суток достигается максимальное равновесное значение $C(\text{Ca}^{2+})$. Также проведенные исследования показали, что образцы БМГАП1, БМГАП5 и БМГАП10 обладают более высокой резорбируемостью по сравнению с БМГАП0, что подтверждается большим количеством ионов Ca^{2+} , переходящих в раствор SBF через 14 суток экспозиции: 4,50; 5,30; 7,10 ммоль/л и 4,10 ммоль/л, соответственно.

Заключение

Методом осаждения синтезированы однофазные образцы биомиметического гидроксиапатита, допированного силикат- и карбонат-анионами в присутствии цитрат-ионов различной концентрации из водных растворов. Частицы БМГАП являются наноразмерными (от 13 до 65 нм) и имеют сферическую форму. Все исследуемые материалы обладают развитой удельной поверхностью от 115,84 до 192,51 $\text{м}^2/\text{г}$.

Установлено, что введение цитрат-ионов в ходе синтеза БМГАП оказывает существенное влияние на структурно - морфологические характеристики и биологическую активность исследуемых образцов. Увеличение концентрации цитрат-ионов приводит к уменьшению размер частиц, объема и среднего размера пор БМГАП, и, как следствие, способствует повышению удельной поверхности.

Присутствие цитрат-ионов оказывает значительное влияние на биологическую активность БМГАП и позволяет успешно регулировать биорезорбируемость синтезированных материалов.

Работа выполнена с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования "Технологии и Материалы НИУ "БелГУ".

Литература

1. G. A. Helm, H. Dayoub, J. A. Jane, *Neurosurg. Focus.*, **4**, 10, pp. 1-5 (2001).
2. H. Ohgushi, V. M. Goldberg, A. I. Caplan, *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.*, **7**, 4, pp. 568-578 (1989).
3. E. B. Kenney, V. Lekovic, T. Han, FA Jr. Carranza, B. Dimitrijevic, *J. Periodontol.*, **56**, 2, pp. 82-88 (1985).
4. J. M. Spivak, A. Hasharoni, *Eur. Spine J. Off. Publ. Eur. Spine Soc. Eur. Spinal Deform. Soc. Eur. Sect. Cerv. Spine Res. Soc.*, **10**, Suppl2 (2), pp. 197-204 (2001).
5. J. Sun, X. Zheng, H. Li, D. Fan, Z. Song, H. Ma, X. Hua, J. Hui, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **73**, 4, pp. 596-602 (2017).
6. S. S. Singh, A. Roy, B. Lee, S. Parekh, P. N. Kumta, *Mater. Sci. Eng. C.*, **63**, 6, pp. 429-438 (2016).
7. Р.П. Самусев, Ю. М. Селин, *Анатомия человека. Медицина. Москва*, 1990. 479 с.
8. S. M. Varinov, *Russ. Chem. Rev.*, **79**, 1, pp. 13-29 (2010).
9. С. Н. Данильченко, *Вісник Сумського державного університету. Серія Фізика, математика, мехатка.*, **2**, С. 33-59 (2007).
10. А. В. Соин, П. В. Евдокимов, А. Г. Вересов, В. И. Пуляев, *Международный научный журнал "Альтернативная энергетика и экология."*, **1**, С. 130-132 (2007).
11. М. А. Трубицын, Н. Г. Габрук, И. И. Олейникова, В. Т. Ле, В. Д. Доан, *Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки.*, **122**, 3, с. 180-193 (2012).
12. А. М. Николаев. Дисс. канд. геол.-мин. наук, Ин-тут наук о Земле СПбГУ, Санкт-Петербург, 2017. 141с.
13. Y. Zheng, G. Dong, C. Deng, *Ceram. Int.*, **40**, 9, pp. 14661-14667 (2014).
14. M. A. Troubitsin, N. G. Gabruk, I. I. Oleynikova, V. T. Le, D. V. Doan, *Res J Pharm Biol Chem Sci*, **5**, 5, pp. 1703-1706 (2014).
15. V. Putlayev, A. Veresov, M. Pulkin, A. Soин, V. Kuznetsov, *Mater. Werkst.*, **37**, 6, pp. 416-421 (2006).
16. М. В. Бердинская, А. В. Зайц, О. А. Голованова, *Журнал "Бутлеровские сообщения"*, **37**, 1, С. 48-54 (2014).
17. В. С. Комлев, И. В. Фадеев, А. Н. Гурин, *Журнал "Неорганические материалы"*, **45**, 3, С. 373-378 (2009).
18. O. Frank-Kamenetskaya, A. Kol'tsov, M. Kuz'mina, M. Zorina, L. Poritskaya, *J. Mol. Struct.*, **992**, 1-3, pp. 9-18 (2011).
19. M. A. Trubitsyn, V. D. Doan, V. T. Le, N. G. Gabruk, I. I. Oleynikova, T. A. Shuteeva, *Advanced Materials Research*, **1040**, pp. 97-102 (2014).
20. N. H. de Leeuw, J. A. L. Rabone, *Cryst. Eng. Comm.*, **9**, 12, pp. 1178-1186 (2007).

21. М. Ю. Королева, Е. Ю. Фадеева, В. М. Шкинев, О. Н. Катасонова, Е. В. Юртов, *Журнал неорганической химии*, **61**, 6, С. 710-716 (2016).
22. Н. Yang, Y. Wang, *Mater. Sci. Eng.*, **62**, 5, pp. 160-165 (2016).
23. Пат. РФ 2500840 (2013).
24. Пат. РФ 2 588 525 С1 (2016).
25. J. Schubert, *Ion Exchange - theory and application*, ed. F. C. Nachod. Academic Press Inc., New York, 1949, pp. 167-222.
26. Т. Kokubo, *Biomaterials*, **12**, 2, pp. 155-163 (1991).
27. Г. Шарло, *Методы аналитической химии. Количественный анализ неорганических соединений*. Химия, Москва, Ленинград, 1965. 975 с.

© **М. А. Трубицын** - к.т.н., профессор кафедры общей химии Белгородского государственного национального исследовательского университета; **Хоанг Вьет Хунг** - аспирант кафедры общей химии Белгородского государственного национального исследовательского университета, hung.hoangviet191290@gmail.com; **Л. В. Фурда** - к.х.н., доцент кафедры общей химии Белгородского государственного национального исследовательского университета

© **M. A. Troubitsin** - candidate of technical sciences, professor of Department General chemistry at Belgorod State National Research University, Belgorod, e-mail: troubitsin@bsu.edu.ru; **Hoang Viet Hung** - postgraduate student of the department of general chemistry of the Belgorod State National Research University, Belgorod. Email: hung.hoangviet191290@gmail.com; **L. V. Furda** - candidate of chemical sciences, associate Professor of Department General chemistry at Belgorod State National Research University, Belgorod, e-mail: furda@bsu.edu.ru.