

На правах рукописи

Комлев Владимир Сергеевич

**ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОСТРУКТУРЫ И СВОЙСТВА
КАЛЬЦИЙФОСФАТНОЙ КЕРАМИКИ ДЛЯ ИНЖЕНЕРИИ
КОСТНОЙ ТКАНИ**

Специальность 05.17.11 – Технология силикатных и
тугоплавких неметаллических материалов

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора технических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН (ИМЕТ РАН)

Научный консультант:

Чл.-корр. РАН, профессор, д.т.н.
Баринов Сергей Миронович

Официальные оппоненты:

Чл.-корр. РАН, профессор, д.х.н.
Жабрив Валентин Александрович

Профессор, д.т.н.
Лукин Евгений Степанович

Профессор, д.т.н.
Суздалецев Евгений Иванович

Ведущая организация:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет»

Защита диссертации состоится «30» июня 2011 года в «14.00» на заседании диссертационного совета Д 002.060.04 при Учреждении Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН и на сайте института www.imet.ac.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.т.н.

В.И. Калита

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Возвращение к нормальной жизни и сокращение сроков реабилитации больных после хирургических операций на костных тканях является важной и актуальной социальной проблемой. В последние годы интенсивно разрабатывается концепция регенерации, а не механического замещения костной ткани (так называемая «инженерия костной ткани» (ИКТ)). Она базируется на результатах исследований процессов биоминерализации; основная цель разработок этого направления – достижение максимального соответствия свойств ткани, образующейся *de novo*, свойствам исходной восстанавливаемой ткани. Предполагается, что организм способен сам восстановить повреждение, если поместить в место дефекта биодеградируемый матрикс (суппорт или носитель) необходимой архитектуры, изготовленный из биологически совместимого с организмом материала, с культивированными в нем остеообразующими клетками, и если имеются стимулы для пролиферации этих клеток, неоваскуляризации и биологических потоков в матрикс. Создание матриксов является одной из ключевых проблем для реализации данной технологии. Значительные усилия исследователей направлены на разработку керамических матриксов. Перспективным для этой цели представляется использование пористой кальцийфосфатной керамики, поскольку минеральная составляющая костной ткани представлена, в основном, биологическим апатитом кальция $(Ca, Na, Mg)_{10}(PO_4, HPO_4, CO_3)_6(OH, F, Cl)_2$.

Синтетический гидроксиапатит $(GA, Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ – наименее растворимый при физиологических условиях ортофосфат кальция (ФК). Среди других фосфатов кальция, которые обладают относительно высокими остеокондуктивными потенциальными, регулируемой кинетикой биодеградации и могут быть использованы для матриксов, наибольшее внимание привлекает композиционная бифазная керамика (БФК) в системе гидроксиапатит – трехкальциевый фосфат $(GA-TKF)$, материалы на основе карбонатсодержащего ГА (КГА) и октакальциевого фосфата (ОКФ).

В проблеме создания материалов на основе ФК для матриксов существуют фундаментальные задачи, которые необходимо решить. Это разработка методов синтеза ФК с регулируемым в широком диапазоне химическим и фазовым составом, в том числе с анион- и катионными замещениями; совершенствование технологии гранул и керамики из синтезированных веществ с заданной пористостью и распределением пор по размерам; установление оптимального соотношения фазового состава и структуры для обеспечения необходимой кинетики биодеградации и биологического поведения. Некоторые ФК являются термически неустойчивыми соединениями, поэтому важной задачей является предотвращение их термического разложения, фазовых превращений и изменений химического состава при спекании. На решение этих задач применительно к керамическим матриксам на основе фосфатов кальция и направлена данная работа.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР Учреждения Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН; поддержана программами фундаментальных исследований Президиума РАН и Отделения химии и наук о материалах РАН, программой Фонда содействия

отечественной науке, грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№№ 03-03-32230-а, 05-03-99200-с, 06-03-03004-б, 06-03-08028-офи, 06-03-32192-а, 06-08-01112-а, 08-08-00224-а, 09-02-01259-а, 09-03-00187-а и 09-08-12097-офи_м), программой грантов Президента РФ для поддержки молодых российских ученых (№№ МК-1052.2005.3, МК-4047.2008.3, МК-2286.2009.3 и МК-235.2010.3), Федеральным агентством по науке и инновациям в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (государственные контракты №№ 02.513.11.3159 и 02.513.12.3008), программами прикладных научных исследований и проектов в интересах города Москвы (грант Правительства Москвы № ГА-19/00 и № 12-3д/05, Государственные контракты с Департаментом науки и промышленной политики г. Москвы №№ 8/3-316н-06, 8/3-471н-07 и 8/3-407н-08).

Цель и задачи работы

Целью работы является развитие физико-химических основ технологии кальцийфосфатных материалов на основе ГА–ТКФ, КГА и ОКФ с варьируемым в широких пределах химическим и фазовым составом и установление закономерностей формирования их микроструктуры и свойств.

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

- разработка методов синтеза ГА–ТКФ, КГА и ОКФ, в т.ч. анион- и катион-замещенных, заданного фазового состава, дисперсности и морфологии частиц;
- изучение термической стабильности КГА в зависимости от состава, установление закономерностей термического разложения КГА в широком диапазоне температур для выявления предельных температур термической обработки;
- разработка технологии гранул и пористых материалов для матриц с учетом процессов термического разложения и биологических требований;
- установление возможности повышения прочностных характеристик пористой керамики путем инфильтрации водных растворов полимеров в пористый каркас;
- изучение кинетики фазообразования в вязущих системах на основе ФК с ОКФ в качестве прекурсора кристаллизации ГА в процессах схватывания и твердения;
- выявление кинетических особенностей деградации разработанных материалов в жидкостях, моделирующих внеклеточные жидкости организма, в зависимости от структуры и фазового состава материалов;
- изготовление лабораторных партий образцов для установления взаимосвязи микроструктуры и физико-химических свойств разрабатываемых материалов с их биологическим поведением *in vitro* и *in vivo*, включая ограниченные клинические испытания; создание основ опытно-производственной технологии керамики.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования выбраны материалы на основе ГА–ТКФ, КГА и ОКФ. Такой выбор материалов обусловлен следующими причинами. Концепция бифазных композиционных материалов в системе ГА–ТКФ была разработана, исходя из предположения о возможности регулирования кинетики биodeградации изменением соотношения менее (ГА) и более (ТКФ) растворимых фаз в одном материале. Растворение ТКФ-составляющей в жидкости организма

способствует процессу минерализации, и биологическое поведение БФК зависит от соотношения ГА/ТКФ. Физиологически важным являются анион- и катионные замещения, в частности карбонат группами, магнием и натрием, т.к. минеральная основа костной ткани содержит 4-8 масс. % CO_3^{2-} и до 1 масс. % Mg^{2+} и Na^+ . Карбонатные группы создают решеточные искажения в структуре апатита, влияющие на свойства и биологическое поведение материала; ионы магния и натрия дестабилизируют структуру апатита. Известно, что карбонатные группы способствуют биодеградации ГА. Выбор ОКФ связан с тем, что образование стабильной в организме фазы – биологического апатита – происходит через стадию образования промежуточной метастабильной фазы – октакальциевого фосфата.

Для решения поставленных задач в работе использовали комплекс современных методов: просвечивающая электронная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия с энергодисперсионным анализом; атомно-силовая микроскопия; рентгеновская дифрактометрия; дифракция электронов; энергодисперсионная рентгеновская дифракция; рентгеновская микротомография, в том числе с использованием синхротронного излучения; Фурье ИК-спектроскопия; ЯМР-спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния; исследование механических свойств и растворимости по изменению концентрации ионов в растворе; измерения удельной поверхности по изотермам низкотемпературной адсорбции азота; дифференциально-термический и термогравиметрический анализ; количественный химический анализ (в т.ч. атомно-эмиссионная и абсорбционная спектрометрия).

В сотрудничестве с ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий» и ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Росмедтехнологий» проведены сравнительные доклинические биологические исследования экспериментальных образцов материалов *in vitro* и *in vivo* и ограниченные клинические медицинские испытания.

Достоверность и обоснованность результатов обеспечена проведением исследований, основанных на новейших мировых достижениях в данной области, и использованием современных взаимодополняющих методов диагностики и статистической обработки.

Научная новизна

1. Развита методика синтеза частиц ГА–ТКФ, КГА и ОКФ заданного состава, степени замещения, дисперсности и морфологии, в том числе разработаны методы: синтеза ГА–ТКФ термической обработкой кальций-дефицитного апатита (КДА); гетерофазного синтеза КГА с механохимической активацией и синтеза ОКФ гидролизом дикальцийфосфата дигидрата (ДКФД). Термическая обработка при заданной температуре (от 900 до 1300⁰С) кальций-дефицитного апатита с варьируемым соотношением Са/Р (от 1,54 до 1,64) обеспечивает возможность получения БФК с соотношением ГА/ТКФ в широких пределах от 12:88 до 89:11. Частичное замещение кальция магнием приводит к стабилизации фазового состава БФК в широком интервале температур от 900 до 1200⁰С. Технологически простой метод гетерофазного синтеза КГА с механохимической активацией позволяет

получать карбонатсодержащий ГА с различной степенью замещения CO_3^{2-} от 0,6 до 9,0 масс. % и Mg^{2+} и Na^+ до 1,0 масс. %. С увеличением содержания карбонат-групп в ГА происходит увеличение удельной поверхности порошков, сопровождающиеся изменением морфологии кристаллов от изометрической до игольчатой и стержневидной. Длительный гидролиз ДКФД в растворе ацетата натрия при 37°C обеспечивает синтез 100 % ОКФ, при этом образующиеся кристаллы наследуют исходные размеры частиц ДКФД. Показано, что в жидкостях, моделирующих внеклеточную жидкость организма человека (SBF), ОКФ переходит в карбонатсодержащий ГА, а ДКФД является ингибитором его трансформации.

2. Установлено влияние содержания CO_3^{2-} , Mg^{2+} и Na^+ на термическую стабильность КГА в широком интервале температур (до 1500°C). Выделение CO и CO_2 начинается при температурах выше 300°C , причем содержание CO в паровой фазе возрастает монотонно с температурой, а концентрация CO_2 проходит через максимум, положение которого зависит от состава материала. При введении натрия или магния положение максимума смещается от $700\text{--}800^\circ\text{C}$ (карбонатсодержащий ГА) до $500\text{--}600^\circ\text{C}$ (магний- и натрийзамещенные формы КГА).

3. Разработана суспензионная технология гранул из ГА, ГА–ТКФ и КГА, основанная на явлении несмешивающихся жидкостей. Технология позволяет получать керамические гранулы сферической формы размером от 50 до более чем 2000 мкм в зависимости от соотношения порошок/биополимер, температуры нейтральной среды, скорости перемешивания и условий термической обработки, с пористостью до 50 об. % и размером пор 0,1–5,0 мкм (на поверхности) и 100–500 мкм (внутригранульные поры). Выявлены кинетические особенности растворения разработанных материалов. Для гранул на основе ГА–ТКФ и КГА установлен переход во времени закона растворения к экспоненциальному, соответствующему кинетике скоростей реакций первого порядка. Процесс растворения БФК гранул определяется ТКФ-составляющей, а гранул на основе КГА – содержанием карбонат-групп. Скорость растворения гранул КГА выше более чем в 2 раза по сравнению с гранулами БФК.

4. Разработана технология керамики с бимодальным распределением пор по размерам, основанная на прессовании и последующем спекании гранул. Технология позволяет получать керамику с пористостью 60–70 об. % и размером пор от 0,1 до 250 мкм. Методом наполнения ячеистого полимерного каркаса суспензией ФК/биополимер получена керамика, имеющая взаимопроникающие крупные, средние и тонкие поры размером 150–250, 10–50 и 1,0–5,0 мкм. Установлены закономерности формирования микроструктуры и свойств керамики на основе ГА–ТКФ и КГА в широком интервале температур до 1350°C . Для КГА разработан состав керамической шихты с добавкой двойной соли карбоната калия - кальция, образующей жидкую фазу при спекании, что позволило понизить температуру спекания на 350°C и избежать термического разложения КГА.

5. Созданы высокопористые композиционные материалы методом вакуумной пропитки пористой ГА керамики водными растворами биополимеров (желатин и поливиниловый спирт (ПВС)). Установлены закономерности влияния пропитки на прочность композиционных материалов; показано, что прочность керамики в результате пропитки и залечивания дефектов возрастает в 2–6 раз.

6. Разработаны реакционно-твердеющие системы с ОКФ в качестве прекурсора кристаллизации ГА на основе α -ТКФ–ОКФ и раствора солей ортофосфорной кислоты, а также на основе аморфного фосфата кальция (АФК), дикальцийфосфата (ДКФ), ДКФД и ОКФ с полисиликатом натрия. Установлены закономерности фазообразования при схватывании и твердении реакционно-твердеющих смесей в таких системах, формирования химических и механических свойств при физиологических температурах. Выявлено новое, ранее не известное циклическое изменение свойств в системах на основе ДКФ, ДКФД и ОКФ в процессе твердения. Впервые получены объемные материалы, содержащие в конечном продукте 100 масс. % ОКФ. Исследованы структурные изменения в процессе растворения и взаимодействия цементов с низкомолекулярным хитозаном и SBF. Показано, что для реакционно-твердеющей смеси на основе АФК формирование конечного продукта – текстурированного ГА, происходит через промежуточную фазу – ОКФ.

Практическая значимость работы

Разработан и изучен широкий спектр кальцийфосфатных материалов, различающихся по химическому, фазовому составу, структуре, механическим, химическим и биологическим свойствам, назначению для применения. В сотрудничестве с ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий» проведены сравнительные доклинические биологические исследования экспериментальных образцов материалов *in vitro* и *in vivo* для выбора оптимального варианта и прогнозирования их поведения в организме; созданы биоинженерные конструкции на оптимальном варианте матрикса с иммобилизованными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК) и проведены сравнительные доклинические биологические исследования образцов *in vivo*.

Разработаны варианты технологических регламентов синтеза порошков и керамики; изготовлены лабораторные партии материалов; сформулированы технические требования для технического задания на разработку продукции (Технические условия ТУ 9398-001-02698772-2009 «Гранулы керамические на основе фосфата кальция для замещения костных дефектов»).

В рамках выполнения работы было получено 9 патентов РФ на изобретения (№№ 2280017, 2281121, 2297249, 2299869, 2303580, 2333010, 2356581, 2368354 и 2376019) и положительное решение на выдачу патента (Заявка № 2009134778).

Некоторые из разработанных материалов прошли государственную экспертизу в организациях, уполномоченных Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития: протоколы и заключения технических испытаний изделия медицинского назначения № 14/П-8-097-044 от 02.06.2008 г. ФГУ «ВНИИИМТ» и № 12.1325-2.2009 от 04.09.2009 г. Испытательного лабораторного центра НИИ ФХМ (№ РОСС RU.0001.21ИМ33); протоколы и заключения токсикологических испытаний № 58-07 от 07.03.2007 г., № 119-09 от 29.06.2009 г., № 128-09 от 17.08.2009 г. ФГУ «ВНИИИМТ» и № 7658.009 от 11.09.2009 г. Испытательного лабораторного центра НИИ ФХМ (№ РОСС RU.0001.21ИМ33).

Проведены ограниченные клинические испытания в ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий» (20 пациентов, протокол медицинских испытаний № 239 от 15.04.2010 г.), ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Росмедтехнологий» (25 пациентов, протокол медицинских испытаний № М-14/09-К от 15.12.2009 г.), «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства России» (15 пациентов, протокол медицинских испытаний от 25.05.2008 г.) и «Клинический центр стоматологии Федерального медико-биологического агентства России» (21 пациент, протокол медицинских испытаний № 31 от 10.06.2010 г.).

Получено положительное экспертное заключение № 569-10/ОИМН от 26.10.2010 г. от ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации с рекомендацией применения в медицинской практике на территории РФ изделия медицинского назначения и разрешение Росздравнадзора РФ (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09231 от 17.10.2010 г.) на производство, продажу и применение в медицинской практике на территории РФ изделия медицинского назначения «Гранулы керамические на основе фосфата кальция для замещения костных дефектов».

Настоящая работа связана с одной из критических технологий Российской Федерации – «Нанотехнологии и наноматериалы». Часть проведенных исследований выполнена по заказу Российского агентства по науке и инновациям в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» и легла в основу государственных контрактов № 02.513.11.3159 «Разработка физико-химических основ технологии формирования керамических и композиционных материалов на основе фосфатов кальция для медицины» и № 02.513.12.3008 «Биосовместимые резорбируемые гибридные композиты для клеточной регенерации поврежденных костных тканей».

Выполненные разработки прошли стадию проблемно-ориентированных поисковых исследований. Создано опытное производство изделий медицинского назначения при ИМЕТ РАН.

Личный вклад автора

В диссертации представлены результаты исследований, выполненных лично автором в период с 1999 по 2008 гг. в лаборатории «Керамических композиционных материалов» Института физико-химических проблем керамических материалов РАН и с 2008 по 2011 гг. в лаборатории «Керамических композиционных материалов» Учреждения Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН. Личный вклад автора в настоящую работу состоит в постановке задач, разработке экспериментальных методик, проведении экспериментов, обработке, анализе и обобщении полученных результатов.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на следующих конгрессах, конференциях, научных школах, симпозиумах и семинарах: Meeting and Seminar on:

Ceramics, Cells and Tissues (Faenza, Italy 2001, 2003, 2006, 2007, 2009); International School on Advanced Materials and Technologies (Jesi, Italy 2001, 2003, 2005-2008, 2010); Международная конференция «Физика и промышленность – 2001» (Голицыно 2001); International Conference «Deformation and Fracture in Structural Materials» (Stará Lesná, Slovakia 2002, 2005, 2008); World Congress on Regenerative Medicine (Leipzig, Germany 2003, 2005; Stuttgart, Germany 2008); 17th International Conference on X-ray Optics and Microanalysis (Chamonix, France 2003); TERMIS-EU (Lausanne, Switzerland 2004; Rotterdam, Holland 2006; London, UK 2007; Galway, Ireland 2010); Medical Applications of Synchrotron Radiation (Trieste, Italy 2004); Международная специализированная выставка нано- технологий и материалов «NTMEX» (Москва 2004-2006); Всероссийская конференция по наноматериалам «Нано 2004» (Москва 2004); International Conference Strategies in Tissue Engineering (Wuzburg, Germany 2004); Международная конференция Европейского Керамического Общества (Санкт-Петербург 2004); 4th Conference on Synchrotron Radiation in Materials Science (Grenoble, France 2004); Matter, Materials and Devices (Genova, Italy 2005); Congresso Nazionale Biomateriali (Milan, Italy 2005); 4th Annual Meeting of European Tissue Engineering Society (Munich, Germany 2005); Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisica (Catania, Italy 2005); XX Congress of the International Union of Crystallography (Florence, Italy 2005); Conference Bioceramics 18 (Kyoto, Japan 2005); VIII Китайско-российский симпозиум (Китай, Гуан-Чжоу 2005); 20th European Conference on Biomaterials (Nantes, France 2006); KMM Second Integration Summer School (Udine, Italy 2006); 17th International Bone Densitometry Workshop (Kyoto, Japan 2006); Всероссийская конференция «Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах» (Воронеж 2006, 2010); I Всероссийское совещание «Биокерамика в медицине» (Москва 2006); XXVII SISC Meeting Italian Society for the Study of Connective Tissues (Bologna, Italy 2007); 4th International Workshop on Nanosciences & Nanotechnologies (Thessaloniki, Greece 2007); 2nd Skill Path Intensive Session: Advanced characterisation techniques based on large scale facilities (Ancona, Italy 2007); EUROMAT 2007 (Nurnberg, Germany 2007); Asian Symposium Advanced Materials (Vladivostok 2007); Британско-российское совещание по стволовым клеткам (Москва 2007); III Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Москва 2007); IX Ежегодный научный форум «Стоматология 2007» (Москва 2007); Ежегодная Всероссийская и международная конференция «Стволовые клетки и перспектива их использования в здравоохранении» (Москва 2007); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Клеточные и нанотехнологии в биологии и медицине» (Курган 2007); 18-й Международный Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Москва 2007); XVIII Международная научно-техническая конференция «Конструкции и технологии получения изделий из неметаллических материалов» (Обнинск 2007); Всероссийская школа-конференция «Нелинейные процессы и проблемы самоорганизации в современном материаловедении (индустрия наносистем и материалы)» (Воронеж 2007, 2009); Конференция «Стоматология славянских государств» (Белгород 2008); Научно-практическая конференция «Современные технологии в стоматологии» (Москва 2008); International Bone-Tissue-Engineering Congress (Hannover, Germany

2008); Международный форум по нанотехнологиям Rusnanotech (Москва 2009, 2010); конференция «Нанотехнологии в онкологии» (Москва 2009, 2010); Всероссийское совещание «Биоматериалы в медицине» (Москва 2009); Международная конференция «Функциональные наноматериалы и высококачественные вещества» (Суздаль 2008, 2010); Научно-практическая конференция с международным участием «Совершенствование медицинской помощи при онкологических заболеваниях, включая актуальные проблемы детской гематологии и онкологии» (Москва 2009); Научная конференция «Химическая биология – Фундаментальные проблемы бионанотехнологии» (Новосибирск 2009); VI Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов (Москва 2009); 9th International ISMR Meeting (Sestri Levante, Italy 2010); Четвертая Всероссийская конференция по наноматериалам «НАНО 2011» (Москва 2011).

За отдельные части работ, составляющих основу данной диссертации, автор был удостоен медали Европейской Академии для молодых ученых России по направлению «Химия» (2006 г.), медали Российской академии наук для молодых ученых (2006 г.) по направлению «Физикохимия и технология неорганических материалов» и медали «50 лет Московской городской организации ВОИР» (2009 г.).

Части данной работы, представленные совместно с ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий» на 9-м Международном форуме «Высокие технологии XXI века» (2008 г.) были удостоены медали оргкомитета и на 11-м Международном форуме «Высокие технологии XXI века» (2010 г.) отмечены наивысшей наградой форума за достижения в области применения инновационных решений – золотым знаком «Святой Георгий».

Публикации

По результатам проведенных исследований опубликовано более 150 работ, в том числе 2 монографии и 87 статей в российских и международных журналах, находящихся в Перечне ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 340 страницах машинописного текста, иллюстрирована 94 рисунками и 19 таблицами. Список цитируемой литературы содержит 357 ссылок. Работа состоит из введения, шести глав (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение), выводов и списка цитируемой литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность работы, сформулированы цели, показана научная новизна и ее практическая значимость, обозначены основные этапы исследования.

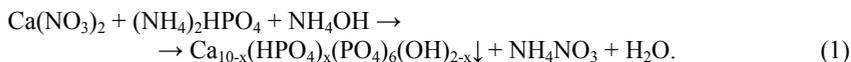
В **первой главе** представлен аналитический обзор литературы по материалам на основе фосфатов кальция. Рассмотрена проблема биоматериалов, предназначенных для замещения и регенерации костной ткани, описаны структура и свойства костной ткани и принципы биоминерализации. Существенное место в

обзоре уделено вопросам синтеза порошков ГА–ТКФ, КГА, ОКФ и технологии керамики. Рассмотрены достижения в области создания пористых керамических матриксов из биodeградируемых osteoconдуктивных ФК. Приведены сведения о разработках в области композиционных материалов на основе ФК и биосовместимых полимеров. Описано их биологическое поведение в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. На основании данных аналитического обзора сформулированы цели и задачи исследований. Обоснован выбор разрабатываемых материалов.

Вторая глава посвящена методам синтеза частиц ГА–ТКФ, КГА и ОКФ, в т.ч. анион- и катион- замещенных форм, заданного фазового состава, дисперсности и морфологии частиц.

Бифазные материалы в системе ГА–ТКФ были получены термическим разложением кальций-дефицитного апатита (КДА, Ca/P = 1,50-1,67) при температуре более 700⁰С. Метод обеспечивает высокую равномерность распределения компонентов.

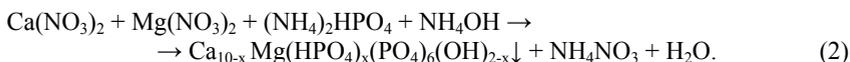
Исследовано влияние состава КДА и температуры термической обработки на фазовые соотношения в бифазных композиционных материалах (БФК). В качестве исходных реагентов использовали растворы Ca(NO₃)₂ и (NH₄)₂HPO₄. Взаимодействие происходит по схеме:



Синтез проводили, поддерживая значение pH раствора в интервале от 7,0 до 8,5. Старение и сушку осадка проводили с использованием СВЧ-излучения. Рентгеновский фазовый анализ (РФА) показал, что фазовый состав продукта разложения зависит как от соотношения Ca/P в продукте синтеза, так и от температуры термической обработки. Например, для образца с заложенным отношением Ca/P=1,57 после термообработки при 900⁰С состав включает 62 % β-ТКФ и 38 % ГА. При увеличении температуры до 1000⁰С происходит увеличение содержания ГА до 47 % и уменьшение содержания β-ТКФ до 53 %. При температуре 1100⁰С основной фазой является ГА (61 %). После термообработки при температурах выше 1200⁰С появляется α-ТКФ фаза.

Таким образом, метод осаждения КДА из растворов с варьируемым соотношением компонентов (Ca/P от 1,50 до 1,67) с последующей термической обработкой продукта синтеза при температурах в интервале от 900 до 1300⁰С обеспечивает возможность получения двухфазных фосфатов с соотношением ГА/β-ТКФ в широких пределах от 12/88 до 89/11, а также трехфазных фосфатов с соотношением ГА/β-ТКФ/α-ТКФ от 55/24/21 до 93/3/7.

Физиологически важным для костной ткани является наличие магния (Mg²⁺). Проведены эксперименты по синтезу магнийсодержащих БФК осаждением из растворов Ca(NO₃), Mg(NO₃)₂ и (NH₄)₂HPO₄. Магний вводили в количестве от 1 до 6 ат. % от отношения Mg²⁺ к общему содержанию Ca²⁺ и Mg²⁺. Взаимодействие происходило по схеме:



Разложение кальций-дефицитного магнийсодержащего апатита при термической обработке происходит по схеме:



с образованием ГА и β -ТКФ.

Согласно данным РФА, содержание β -ТКФ увеличивается с повышением содержания магния в кальций-дефицитном апатите. При замещении 1 % ионов кальция на магний происходит образование 16 % β -ТКФ, а для 3 %-ного замещения соотношение фаз ГА/ β -ТКФ составило 56/44. Введение больше 6 % магния приводит к образованию однофазного β -ТКФ. Фазовый состав получаемых порошков мало изменяется при увеличении температуры термической обработки от 900 до 1100⁰С. Положение дифракционных максимумов, соответствующих β -ТКФ, смещается в длинноволновую область при введении магния. Для определения параметров элементарной ячейки использовали положения максимумов отражений (300), (021), (220) для β -ТКФ и (410), (213), (112), (211) для ГА. Установлено, что введение Mg^{2+} в БФК не влияет на параметры элементарной ячейки ГА ($a = 9,432 \pm 0,002 \text{ \AA}$ и $c = 6,883 \pm 0,002 \text{ \AA}$). Однако присутствие ионов Mg^{2+} в БФК приводит к уменьшению параметров элементарной ячейки β -ТКФ с увеличением содержания Mg^{2+} (рис. 1), что обусловлено различием ионных радиусов Ca^{2+} (1,14 \AA) и Mg^{2+} (0,86 \AA). Таким образом, можно предположить, что магнии образует твердый раствор замещения в β -ТКФ и не входит в структуру ГА.

Особый интерес представляет для ИКТ карбонатсодержащая ГА керамика, т.к. биологическая костная ткань является композиционным материалом, состоящий из волокон коллагена и нанокристаллов карбонат-замещенного ГА с переменным соотношением Са/Р и с содержанием карбонат-групп до 8 масс. %, в зависимости от вида ткани и возраста индивидуума.

Для синтеза КГА с различной степенью замещения карбонат групп от 0,6 до 9,0 масс. % был использован метод гетерофазного синтеза с механохимической активацией. Преимуществом данного метода синтеза является технологическая простота. В качестве источника Ca^{2+} использовали прокаленный при 950⁰С

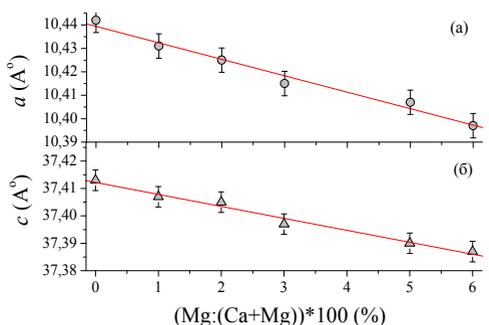
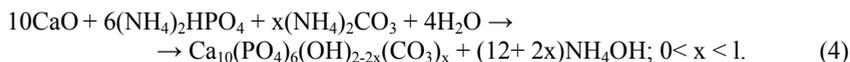


Рис. 1. Изменение параметров a (а) и c (б) элементарной ячейки ТКФ в зависимости от атомного отношения $\text{Mg}:(\text{Mg}+\text{Ca})$.

в течение одного часа порошок CaO. В качестве источника PO_4^{3-} использовали $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, а в качестве источника CO_3^{2-} - $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Взаимодействие компонентов шло по гипотетической реакции (в предположении А-типа замещения):



Исходные реагенты в виде сухих соединений CaO, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ и $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, подвергали механохимической активации в планетарной мельнице в течение 30 минут. Затем в смесь добавляли 300 мл воды и продолжали процесс в планетарной мельнице еще в течение 30 минут. Далее взвесь помешали в бытовую СВЧ печь, где сушили до полного высыхания при мощности 300-450 Вт (40-50 минут). Продукт реакции, белый порошок, был подвергнут термической обработке в воздушной атмосфере печи при 700°C для кристаллизации КГА.

Изучено влияние степени замещения $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$, OH от 0,6 до 9,0 масс. %, на дисперсность и морфологию продуктов карбонатсодержащего ГА. С увеличением содержания карбонат-групп в ГА происходит увеличение удельной площади поверхности порошков. Наибольшую дисперсность $70 \text{ м}^2/\text{г}$ имели порошки, содержащие 9 масс. % карбонат-групп. Морфология кристаллов КГА различна: порошок со степенью замещения карбонат групп 0,6 масс. % представлен кристаллами изометрической формы (рис. 2а), в то время как КГА с содержанием 6 и 9 масс. % карбонат-групп – агломерированными кристаллами игольчатой и стержневидной формы (рис. 2б).

Карбонатсодержащий ГА термически нестабилен, поэтому проблематично изготовить керамику на его основе. Изучена термическая устойчивость порошков КГА разных составов методами химического анализа, РФА, ИК-спектроскопии твердой фазы и Фурье ИК-спектроскопии конденсата паровой фазы, образующейся при нагреве в ячейке Кнудсена. Установлено, что разложение КГА начинается уже при температурах $300\text{-}400^\circ\text{C}$ с выделением CO и CO_2 . На рис. 3 в качестве примера приведены данные по зависимости площади пиков ИК-спектров CO при 2149 и 2138 см^{-1} , и CO_2 (2345 и 2339 см^{-1}) конденсата паровой фазы от температуры испарения образцов КГА с 3 и 6 масс. % CO_3 , соответственно. При

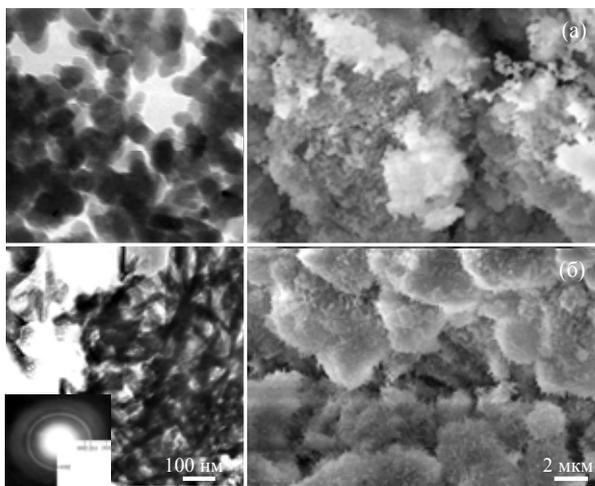


Рис. 2. Морфология кристаллов порошка КГА со степенью замещения карбонат групп 0,6 (а) и 6,0 (б) масс. %.

температурах 1200-1300⁰С КГА полностью теряет карбонат-группы. По данным химического анализа, КГА теряет более 50 % карбонат-групп после термообработки при 1100⁰С. Исчезает также полоса поглощения ОН-групп в ИК-спектре, а полосы карбонат-групп при 1650-1300 см⁻¹ претерпевают существенные изменения. Анализ формы спектров ЯМР ¹Н показал, что термическая обработка КГА при 1100⁰С приводит к трехкратному снижению содержания протонов; при этом происходит структурная перестройка ГА в оксиапатит.

Исследована возможность стабилизации КГА посредством компенсации зарядового дисбаланса, возникающего при вхождении CO₃²⁻ в структуру ГА. Для компенсации часть Ca²⁺ может быть пропорционально замещена на Na⁺ (из-за близости ионных радиусов кальция и натрия). Синтез натрийсодержащих КГА с расчетным атомным соотношением Na/C 1:1 и 1:2 проводили методом механохимической активации. В качестве исходных реагентов использовали прокаленный оксид кальция, двухзамещенный фосфат аммония и гидрокарбонат натрия. Молярное соотношение реагентов CaO:(NH₄)₂HPO₄:NaHCO₃ составляло 1,67:1:0,17 и 1,67:1:0,085. Методами Фурье ИК-спектроскопии и термогравиметрии в широком диапазоне температур выявило снижение термической устойчивости образцов КГА с повышением содержания в них Na⁺ от 0,4 до 0,8 масс. %. Следовательно, компенсация зарядового дисбаланса, возникающего в результате замещения PO₄³⁻ на CO₃²⁻, введением Na⁺ вместо Ca²⁺ не является эффективным для стабилизации КГА. Согласно данным ИК-спектроскопии, возможная причина этого заключается в увеличении доли менее термодинамически стабильного КГА Б-типа в замещенном по АБ-типу карбонатсодержащем ГА.

Проведено сравнительное исследование термической стабильности образцов КГА и магнийсодержащего КГА. Последний синтезировали аналогичным образом, как и КГА, по гипотетической реакции (4), замещая 5 и 10 ат. % кальция магнием посредством введения, соответственно 0,05 и 0,1 моля оксида магния вместо оксида кальция в шихту. Замещение магнием дестабилизирует КГА, способствует его разложению с кристаллизацией трехкальциевого фосфата, за счет большого различия ионных радиусов кальция (1,14 Å) и магния (0,86 Å).

Одним из возможных остеоиндуктивных материалов является октакальциевый фосфат (ОКФ). Структура ОКФ подобна структуре ГА, сходство состоит в том, что ОКФ имеет слои со структурой апатита (слои А), разделенные гидратированными слоями (слои В), содержащими молекулы воды. Изучено влияние условий синтеза ОКФ методом осаждения из растворов на характеристики

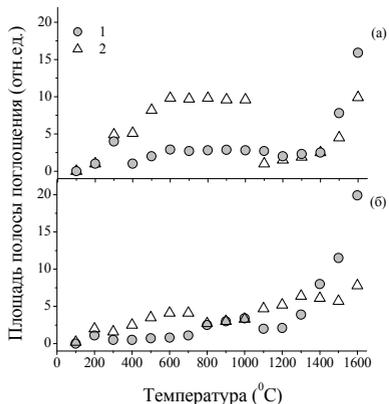


Рис. 3. Температурная зависимость площадей поглощения CO (1) и CO₂ (2) в ИК-спектрах конденсатов паровой фазы, образующейся при нагреве КГА (образец с содержанием 3 (а) и 6 масс. % (б) CO₃²⁻).

продуктов. Синтез ОКФ проводили осаждением из растворов ацетата кальция и двухзамещенного фосфата натрия. Значение pH и температуру растворов варьировали в интервале 5,0–6,5 и 37–90⁰С соответственно. Продуктом синтеза являлась смесь ОКФ и ДКФД с соотношением компонентов, зависящим от условий проведения процесса. С ростом температуры раствора при постоянном значении pH 5,5 содержание ОКФ в продукте возрастает (от 0 масс. % при 37⁰С до 90 масс. % при 90⁰С). С увеличением pH до 6,0 при постоянной температуре раствора 55⁰С содержание ОКФ в продукте синтеза также растет. На основании анализа данных РФА можно предположить, что в начальный период реакции после смешивания компонентов образуется ДКФД, из которого в результате гидролиза образуется ОКФ:



Тот факт, что при всех исследованных вариантах синтеза не удалось получить однофазный ОКФ, свидетельствует о незавершенности процесса гидролиза. Для проверки этого предположения образец состава ДКФД 100 масс. % подвергали гидролизу в растворе ацетата натрия концентрации 0,5 моль/л в течение до 5 суток при 37⁰С. После 3 суток образец был двухфазным ДКФД/ОКФ, а после 5 суток содержал 100 % ОКФ.

Порошок, полученный осаждением при температуре 90⁰С и pH 6,0, по фазовому составу соответствует 100 % ГА, фаз ДКФД и ОКФ в продукте не обнаружено. Можно полагать, что при одновременно относительно высоких температуре и pH процесс гидролиза существенно ускоряется. Гидролиз сопровождается присоединением к молекуле ОКФ ионов кальция из раствора и переходом части фосфат-ионов в раствор.

Методом ИК-спектроскопии установлено, что для образцов составов (в масс. %) ОКФ/ДКФД = 90/10 и 50/50 отсутствуют наиболее интенсивные полосы поглощения фосфат-групп, характерные для ГА, при 961 (ν₁), 629 (ν₄) и 567 (ν₄) см⁻¹, то есть процесс превращения ДКФД в ГА был остановлен на промежуточной стадии образования ОКФ.

Морфология кристаллов ОКФ и ДКФД различна: ДКФД представлен пластинчатыми кристаллами, в то время как ОКФ – кристаллами игольчатой и

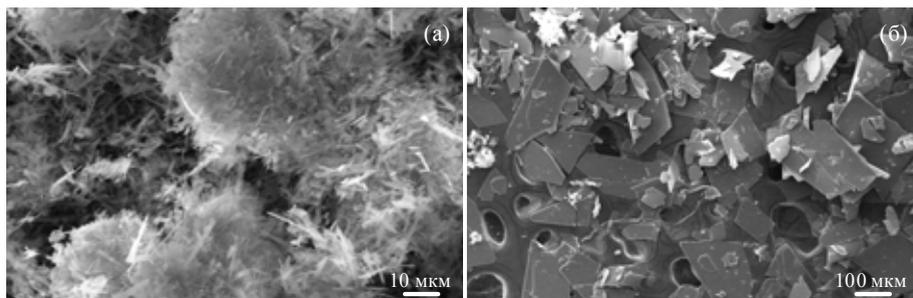


Рис. 4. Морфология частиц порошка ОКФ (а) и ДКФД (б).

стержневидной формы (рис. 4). Для обеих фаз характерен высокий разброс значений геометрических размеров кристаллов. Ширина пластинок ДКФД изменяется в диапазоне от 2 до 500 мкм, их толщина составляет от долей до нескольких микрометров. Стержни и иглы ОКФ имеют толщину 100-300 нм, их длина достигает 20 мкм при высокой температуре синтеза (рис. 4а). В композиционных составах ОКФ/ДКФД присутствуют как пластинки, характерные для ДКФД, так и иглы ОКФ. Кристаллы ОКФ в образце, полученном гидролизом ДКФД в течение 5 суток, объединены в агрегаты, форма и размеры которых соответствуют таковым у исходных пластинок ДКФД. Размер областей когерентного рассеяния для ОКФ меньше, чем у ДКФД. С повышением температуры синтеза размер областей когерентного рассеяния несколько возрастает, по-видимому, вследствие интенсификации процессов массопереноса при кристаллизации. Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии пластинчатые (ДКФД) и стержневидные (ОКФ) образования являются поликристаллами, состоящими из наноразмерных зерен соответствующих фаз.

Таким образом, синтез осаждением из растворов ацетата кальция и двузамещенного фосфата натрия является весьма простым и технологичным методом получения ОКФ и композиционных материалов в системе ОКФ/ДКФД.

Методом энергодисперсионного рентгеновского дифракционного анализа изучены превращения, происходящие в ОКФ в процессе его выдержки в изотоническом 0,1 М растворе NaCl при 25⁰С в течение периодов времени до 80 ч (рис. 5). Установлено протекание двух процессов: 1) рост размеров кристаллитов от 22 до 35 ± 1,0 нм и 2) кристаллизация из ОКФ гидроксиапатита с размером кристаллов около 5 ± 1,0 нм. Оба указанных процесса имеют примерно одинаковое характеристическое время около 2,9 ч.

Методами ИК-спектроскопии, СЭМ и энергодисперсионного рентгеновского дифракционного анализа исследована кинетика кристаллизации и превращений для образцов составов ОКФ, ОКФ/ДКФД = 70/30 (в масс. %) и ДКФД в растворе SBF (рис. 6). Установлено, что ОКФ переходит в КГА. Превращения сопровождаются морфологическими изменениями кристаллов (рис. 6в,е). При этом динамика процессов различна и характеризуется временами кристаллизации 3,3 и 7,2 ч для ОКФ и ОКФ/ДКФД соответственно, что свидетельствует об ингибирующем эффекте ДКФД. В случае однофазного продукта (ДКФД) структурных превращений не установлено.

Таким образом, разработаны методы синтеза частиц ГА–ТКФ, КГА и ОКФ заданного состава, степени замещения, дисперсности и морфологии. Термическая обработка

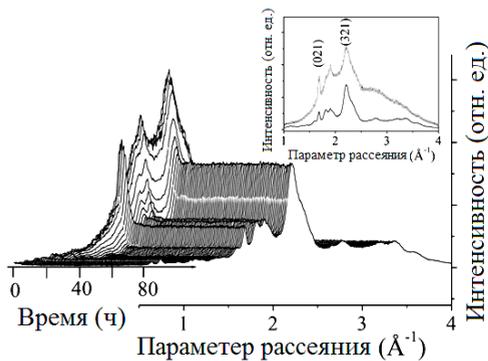


Рис. 5. Кинетика превращения ОКФ в процессе его выдержки в изотоническом растворе NaCl в течение 80 ч.

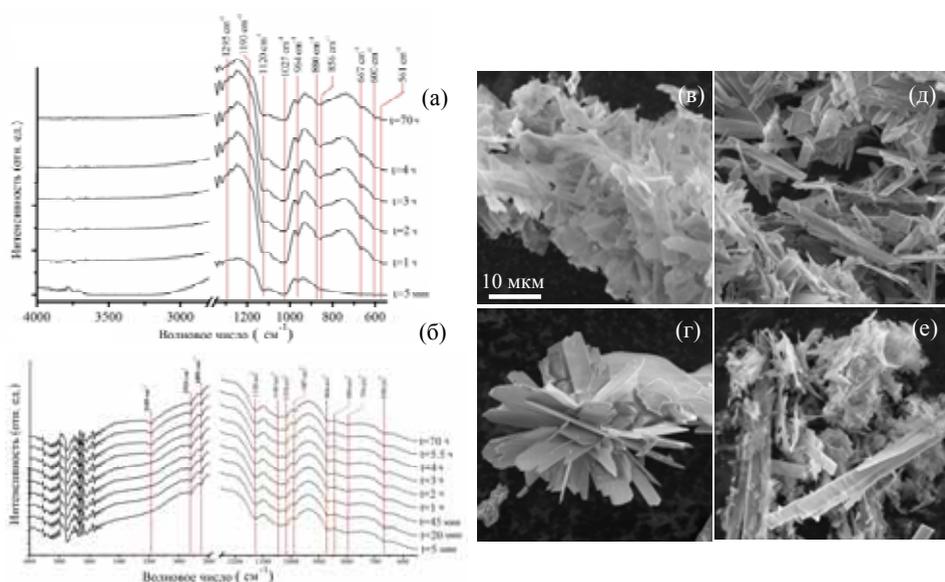


Рис. 6. ИК-спектроскопия образцов составов ОКФ (а) и ОКФ/ДКФД = 70/30 (б) (в масс. %). Морфология кристаллов образцов до (в-г) и после выдержки в растворе SBF (д-е), соответственно.

при заданной температуре (от 900 до 1300⁰С) кальций-дефицитного апатита с варьируемым соотношением Са/Р (от 1,54 до 1,64) обеспечивает возможность получения БФК с соотношением ГА/ТКФ в широких пределах от 12:88 до 89:11. Технологически простой метод гетерофазного синтеза КГА с механохимической активацией позволяет получать карбонатсодержащий ГА с различной степенью замещения CO_3^{2-} от 0,6 до 9,0 масс. % и Mg^{2+} и Na^+ до 1,0 масс. %. Длительный гидролиз ДКДФ в растворе ацетата натрия при 37⁰С обеспечивает синтез 100 % ОКФ.

В **третьей главе** описаны результаты исследования технологии керамических гранул сферической формы на основе ГА, ГА–ТКФ и КГА и использовании их в создании биосовместимых покрытий на титановых имплантатах и гибридных композиционных материалов.

За основу был выбран порошок ГА, который был получен методом гетерофазного синтеза с механохимической активацией по реакции (4). Технология изготовления керамических гранул ГА заключается в диспергировании жидкой фазы на капли с последующей термической обработкой. В качестве связующего агента использовали биополимер (желатин), который способствует сцеплению частиц порошка. Порошок ГА смешивали с 10 %-ным раствором желатина в дистиллированной воде. Концентрация суспензии варьировалась от 1,8 до 3,0 мл раствора желатина на 1 г порошка. После этого суспензию вводили в растительное масло при температуре от 15 до 30⁰С и перемешивали лопастной мешалкой при скорости от 200 до 1500 об/мин. Перемешивание формирует капли, которые далее превращаются в твердые частицы и выпадают в осадок. После отстаивания, осадок в виде сферических гранул отфильтровывали на воронке Бюхнера, отмывали от масла

этиловым спиртом, сушили и подвергали термической обработке при температурах от 1000 до 1200⁰С с выдержкой при этих температурах от 30 до 120 минут.

Установлено, что процесс гранулообразования завершается в течение первых 1-2 минут перемешивания, независимо от других параметров процесса. Размер гранул изменяется в пределах от 50 до более чем 2000 мкм и зависит от соотношения порошок/биополимер, температуры масла и скорости перемешивания. Данные статистического анализа показали, что изменение размера гранул в зависимости от технологических параметров подчиняется нормальному закону распределения. Например, среднее значение размера гранул при скорости перемешивания 200 об/мин, вязкости масла 0,585 Па.с и его плотности 0,917 г/см³ равно 1735 мкм. При скорости перемешивания 1000 об/мин размер уменьшается до 670 мкм.

Термическая обработка гранул приводит к выжиганию биополимера, усадке гранул от 10 до 25 % и формированию системы открытых взаимосвязанных пор. Высокая пористость достигается при малых соотношениях ГА/биополимер и при низких температурах термообработки. Доминирующая популяция относится к порам размером 0,1-5,0 мкм (на поверхности) и от 100 до 500 мкм (внутригранульные поры) (рис. 7а). По данным 3-х мерной рентгеновской микротомографии (РМТ) внутригранульные поры взаимосвязаны и имеют близкую к сферической форму (рис. 7б). Относительное их содержание в общем количестве открытых пор составляет до 50 %. Сферичность геометрии иллюстрирует рис. 7в.

Проведено сравнительное исследование влияния фазового состава исходных веществ на микроструктуру гранул БФК. По данным сканирующей электронной микроскопии БФК гранулы имеют однородную структуру с кристаллами изометрической формы. С увеличением содержания ТКФ в БФК отмечается значительный их рост до ~ 25 мкм.

Изготовлены КГА керамические гранулы по технологии, разработанной для ГА. Изучено влияние степени замещений $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow (\text{PO}_4^{3-}, \text{OH}^-)$ от 0,6 до 9,0 масс. %, на микроструктуру керамических КГА гранул. По данным сканирующей электронной микроскопии микроструктура КГА гранул со степенью замещения карбонат групп 0,6 масс. % представлена изометрическими образованиями. С увеличением содержания карбонат-групп до 3 и 6,

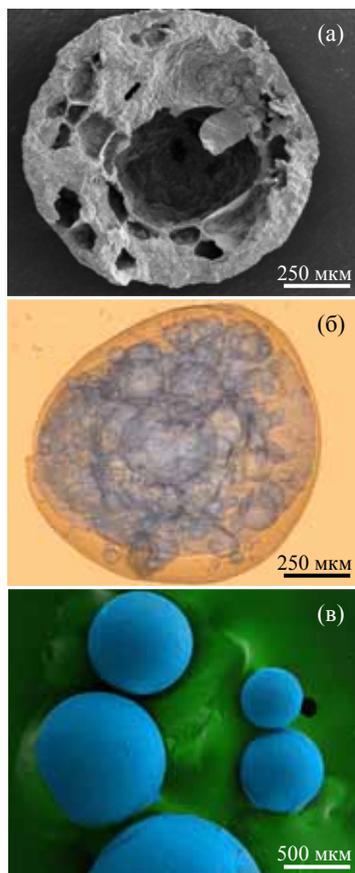


Рис. 7. Микрофотографии гранул ГА: а, б - внутренняя микроструктура по данным СЭМ и РМТ; в - общий вид гранул.

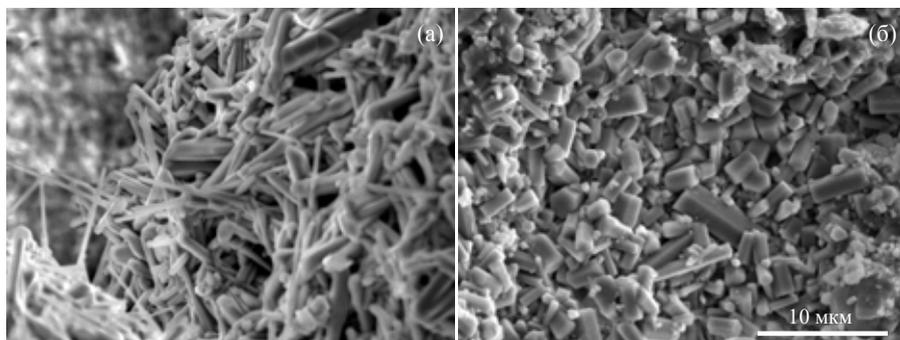


Рис. 8. Морфология кристаллов гранул КГА со степенью замещения карбонат групп 3 (а) и 9 (б) масс. %.

9 масс. % кристаллы имеют однородную игольчатую и призматичную форму, соответственно (рис. 8).

Проведено исследование кинетических особенностей деструкции (растворения) керамических гранул ГА, ГА–ТКФ и КГА. Растворимость измеряли с использованием фракции гранул диаметром 300-500 мкм в изотоническом 0,1 М растворе NaCl до 28 суток при постоянном объеме жидкой фазы (замкнутая система) и pH = 7,4. Концентрацию кальция в жидкой фазе измеряли с использованием иономера с ионоселективным электродом.

Результаты исследования кинетики растворения ГА и БФК гранул представлены на рис. 9а. Регрессионный анализ кинетических кривых показал, что процесс растворения гранул – многостадийный, подобный растворению гранул стекла Bioglass®. На начальной стадии (до 1 суток) зависимость концентрации кальция в растворе от времени можно аппроксимировать логарифмической или степенной функцией. С течением времени процесс растворения замедляется и кинетический закон переходит в экспоненциальный:

$$c(t) = c_0 + c_m[1 - \exp(-bt)], \quad (6)$$

где c_0 – условная начальная концентрация, c_m – концентрация насыщения, b – коэффициент, t – время.

Экспоненциальная зависимость соответствует кинетике 1-го порядка, когда скорость изменения количества “активных центров растворения” в

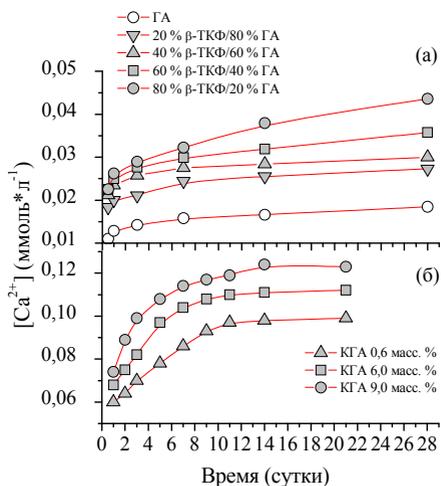


Рис. 9. Изменение концентрации ионов Ca^{2+} в изотоническом растворе при растворении гранул ГА и БФК (а) и КГА (б).

растворяемом материале пропорциональна их количеству в данный момент: $dc(t)/dt = -kC(t)$, где k не зависит от времени.

Представляет интерес количественная оценка скорости изменения концентрации кальция в растворе в зависимости от соотношения ГА/β-ТКФ в гранулах. На экспоненциальной стадии скорость изменения концентрации уменьшается во времени: $dc(t)/dt = c_m b \cdot \exp(-bt)$, поэтому в качестве количественной меры может рассматриваться начальная скорость растворения, $dc/dt (t = 0) = c_m b$. Результаты количественных оценок кинетических параметров процесса представлены в табл. 1. Величина начальной скорости растворения возрастает с увеличением содержания β-ТКФ в гранулах. Принято значения параметров кинетического уравнения растворения нормировать на величину удельной поверхности, что дает возможность сравнивать растворимость разных материалов. Начальная скорость выделения кальция, нормированная на изменение удельной поверхности, возрастает с увеличением содержания β-ТКФ в гранулах с 0,263 до 0,791 мМоль/(л·сутки·(м²/г)). Следовательно, скорость растворения зависит не только от площади удельной поверхности, но и от фазового состава. Существенное увеличение площади удельной поверхности гранул после выдержки в изотоническом растворе свидетельствует о селективном растворении отдельных структурных элементов. Согласно данным РФА, содержание β-ТКФ в образцах после испытаний уменьшается.

Результаты исследования кинетики растворения гранул КГА представлены на рис. 9б. Установлено, что количество карбонат-ионов, входящих в структуру КГА, оказывает существенное влияние на растворимость керамики: увеличение содержания карбонатных групп от 0,6 до 9,0 % масс. приводит к увеличению количества выделяющихся в модельный раствор ионов Ca²⁺ с 0,98 до 1,22 мМоль/л для 0,6 и 9,0 % КГА, соответственно. Кинетика растворения описывается степенной или логарифмической функцией на начальном этапе, переходящей затем в экспоненциальную функцию, как и для БФК гранул. Скорость растворения гранул КГА превышает скорость растворения гранул БФК более, чем в 2 раза.

Для анализа поведения ГА, БФК и КГА гранул в открытой системе, (непрерывная циркуляция жидкости) проводили эксперименты в растворе SBF состава (в мМоль): Na⁺ 142,0, K⁺ 5,0, Mg²⁺ 1,5, Ca²⁺ 2,5, Cl⁻ 147,8, HCO³⁻ 4,2, HPO⁴³⁻ 1,0, SO⁴²⁻ 0,5. В растворе ионы Ca²⁺, PO⁴³⁻, CO³²⁻ и OH⁻ могут взаимодействовать

Таблица 1. Параметры экспоненциальной стадии растворения, площадь удельной поверхности S_0 до и S_k после испытаний гранул на растворимость в зависимости от фазового состава гранул.

Содержание β-ТКФ, масс. %	c_0 , мМоль/л	c_m , мМоль/л	b , сутки ⁻¹	$c_m b$, мМоль/(л· сутки)	S_0 , м ² /г	S_k , м ² /г
0	0,123	0,019	6,28	0,119	0,639	2,248
16	0,184	0,039	5,33	0,208	1,391	2,181
36	0,225	0,030	5,50	0,165	—	—
53	0,236	0,043	5,34	0,230	0,402	1,113
77	0,250	0,074	5,30	0,392	0,325	1,367
100	0,280	0,104	4,97	0,517	0,027	0,680
α-ТКФ (100 %)	0,407	0,199	4,79	0,953	—	0,898

между собой. В нейтральной и кислой средах взаимодействие фосфат-ионов с протонами приводит к образованию HPO_4^{2-} . Эти ионы могут взаимодействовать с частью ионов кальция, продукт взаимодействия осаждается в форме менее растворимого CaHPO_4 . Кроме того, группы CO_3^{2-} и OH^- могут взаимодействовать с оставшейся частью ионов кальция с образованием кальцита и гидроксида. Продукты реакций осаждаются на поверхности материалов из раствора SBF. Группы HPO_4^{2-} на поверхности керамики обуславливают прогрессивно снижающееся значение отношения Ca/P. Таким образом, с увеличением времени выдержки состояние поверхности смещается от нейтрального в сторону кислотного (с дефицитом по кальцию). Определенное методом рентгеновского энергодисперсионного анализа соотношение Ca/P в образце бифазной керамики композиционного состава 60 % ТКФ – 40 % ГА было 1,58 и 1,49 до и после выдержки в растворе, соответственно. По данным сканирующей электронной микроскопии на поверхности гранул формируется слой апатитоподобной фазы из раствора SBF. Для КГА гранул время формирования слоя составляет 9 суток, по сравнению с 28 и 24 суток для ГА и БФК гранул (рис. 10). Такое поведение по типу растворение-осаждение может, по-видимому, иметь место в условиях *in vivo* при имплантации керамики.

Биосовместимые покрытия на основе ФК эффективны для обеспечения остеоинтеграции металлических имплантатов с костными тканями. С использованием наноструктурированных керамических гранул ГА диаметром 40-70 мкм сформированы ГА-покрытия на титановых имплантатах методом плазменного напыления. Показано, что при напылении гранул ГА не происходит изменения их фазового состава. Получены ГА-покрытия толщиной 50 мкм и адгезионной прочностью $37 \pm 2,2$ МПа, что превышает в 2 раза значение, регламентированное требованиями стандарта ISO 13779-2.

Разработанные гранулированные материалы использованы как наполнители гибридных композиционных материалов хитозан/желатин – гранулы ГА, ТКФ и КГА, предназначенных для применения в качестве пористых матриц в медицине для регенерации поврежденных костных тканей. Материалы эластичны, имеют пористость до 80 %, размер пор до 300 мкм, обладают регулируемой кинетикой растворения, содержат до 85 масс. % гранул размером от 100 до 300 мкм (рис. 11), характеризуются отсутствием цитотоксичности, их введение в место костного дефекта существенно ускоряет процесс восстановления костной ткани.

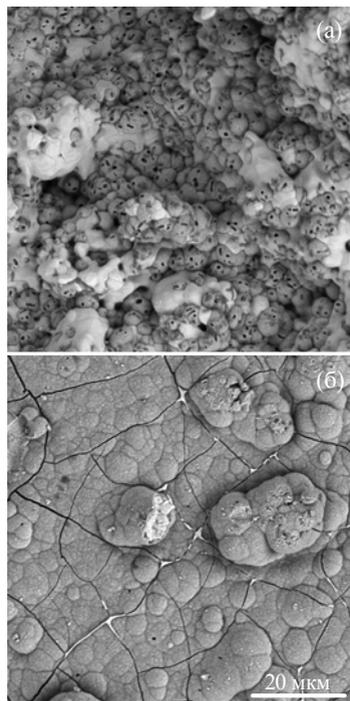


Рис. 10. Поверхности гранул БФК состава 80 % ТКФ – 20 % ГА (а) и КГА (б) после выдержки в растворе SBF 24 и 9 суток, соответственно.

Таким образом, разработана суспензионная технология гранул из ГА, ГА–ТКФ и КГА. Технология позволяет получать керамические гранулы сферической формы размером от 50 до более чем 2000 мкм в зависимости от соотношения порошок/биополимер, температуры нейтральной среды, скорости перемешивания и условий термической обработки, с пористостью до 50 об. % и размером пор 0,1-5,0 мкм (на поверхности) и 100-500 мкм (внутригранульные поры). Выявлены кинетические особенности растворения разработанных материалов. Сравнительный анализ показал, что КГА гранулы являются более растворимыми, чем ГА и БФК гранулы. Разработанные материалы использованы для формирования ГА-покрытий на титановых имплантатах и в качестве наполнителей гибридных композиционных материалов хитозан/желатин – гранулы ГА, ТКФ и КГА.

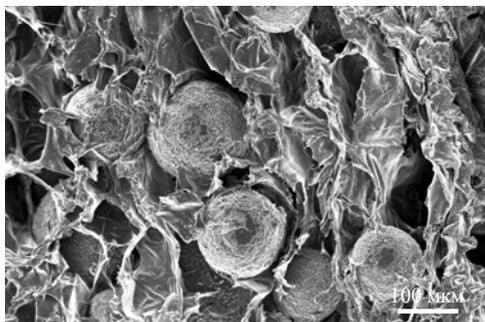


Рис. 11. Микрофотография гибридного композиционного материала хитозан/желатин – гранулы КГА.

Четвертая глава посвящена разработке принципов формирования микроструктуры пористых керамических материалов, обеспечивающих высокую биологическую эффективность при имплантации, и методу повышения прочности пористой керамики посредством инфильтрации биосовместимых полимеров в керамический каркас.

Применение свободных укладок гранул в качестве матриц связано с опасностью их переноса потоками жидкостей организма из места костного дефекта. Перспективным представляется использование объемных керамических материалов. Взаимопроникающие поры такой керамики должны иметь размер не менее 100-135 мкм, чтобы обеспечивать доступ крови к контактным поверхностям, неоваскуляризацию, прорастание и фиксацию костной ткани. Поры меньшего размера также необходимы, поскольку они способствуют адсорбции протеинов. Таким образом, желательно, чтобы пористая керамика имела бимодальное распределение пор по размерам (крупные и тонкие поры).

Разработан способ получения пористой керамики на основе ГА, ГА–ТКФ и КГА, содержащей тонкие и крупные взаимопроникающие поры в количестве до 70 об. %, основанный на компактировании и спекании пористых гранул. Выжигание биополимера из гранул приводит к образованию тонких пор в гранулах (интрапоры), а укладка гранул обуславливает формирование межгранульных взаимосвязанных пор (интерпоры).

Монодисперсные гранулы могут быть упакованы в свободной засыпке в сырую заготовку, содержащую 30-40 об. % межгранульных пор. Такая укладка гранул соответствует координационному числу примерно 7:

$$N = 11,6 (1 - P), \quad (7)$$

где Π – объемная доля открытых пор.

Это значение близко к координационному числу упаковки атомов в объемно-центрированной кубической решетке. Минимальное сечение порового пространства в укладке монодисперсных сферических гранул может быть оценено как соответствующее плоскости (100) объемно-центрированной кубической решетки.

Как показали электронно-микроскопические и 3-х мерные рентгеновские микротомографические исследования, укладка монодисперсных гранул размером 500 мкм при давлении прессования меньше 50 МПа обуславливает минимальное сечение порового пространства примерно 100×200 мкм, что соответствует требованию минимального размера пор 100-135 мкм, необходимого для остеоинтеграции, а мезо- и нанопоры для адсорбции протеинов обеспечиваются пористостью гранул (рис. 12). Ситуация становится более сложной при использовании полифракций гранул. Показано, что содержание открытых пор в укладке зависит от соотношения содержания и размеров гранул во фракциях. При свободной укладке сферических гранул с соотношением диаметров больше 5:1 интервал значений открытой пористости составляет от 12,5 до 35,0 об. % в зависимости от соотношения размеров, количества в образце гранул каждой фракции и их объемного относительного содержания. Межгранульная пористость для бифракционного материала может быть рассчитана, как

$$\Pi_{\text{мин}} = kV_2/[(1-k)V_1 + V_2], \quad (8)$$

где k – коэффициент, равный 0,3-0,4; V_1 – объем крупных гранул; V_2 – объем мелких гранул сферической формы.

Приложенное давление при формировании монодисперсных упаковок гранул заметно влияет на пористость. С увеличением давления прессования от 10 до 100 МПа наблюдается снижение пористости с 67 до 18 %, что обусловлено как деформацией сырых гранул, так и уплотнением их упаковки (уменьшение размера интерпор). Это подтверждено данными электронной микроскопии.

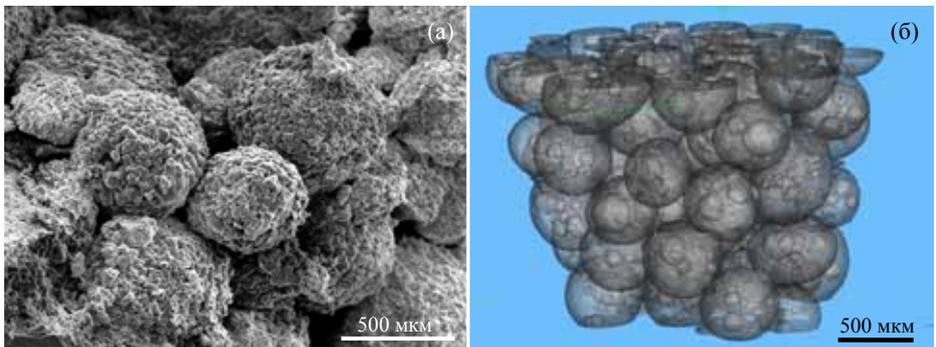


Рис. 12. Микроструктура ГА керамики с бимодальной (внутри- и межзеренной) пористостью полученной спеканием гранул: а – СЭМ и б – РМТ.

На рис. 13 приведена зависимость предела прочности при сжатии σ спеченных образцов ГА керамики от содержания открытых пор. Прочность резко снижается с увеличением пористости. Обычно для описания зависимости σ от пористости используют соотношение Рышкевича:

$$\sigma = \sigma_0 \exp(-q\Pi), \quad (9)$$

где σ_0 – предел прочности материала без пор, или соотношение М.Ю. Бальшина:

$$\sigma = \sigma_0(1-\Pi)^m, \quad (10)$$

где $m=3-10$ для керамических материалов.

Оценки по этим соотношениям показывают, что при содержании пор примерно 30 об. % прочность снижается в 8-12 раз по сравнению с прочностью материала без пор, что соответствует полученным экспериментальным данным.

Максимальная пористость около 60-70 об. % достигается при низких давлениях прессования 10-20 МПа. Однако образцы такой керамики имеют весьма низкую прочность при сжатии (около 1 МПа), поэтому предпочтительно получать керамику при несколько более высоких давлениях прессования в интервале 30-50 МПа.

Проведены эксперименты по получению высокопористой керамики методом наполнения ячеистого полимерного каркаса суспензией ФК/биополимер (инверсионный метод реплик) с последующей сушкой и термической обработкой. Данная технология позволяет получать материал с пористостью около 80 об. % с крупными взаимопроникающие порами размера 150-250 мкм; средними, образовавшиеся при выгорании неорганической части полимерного каркаса, порами 10-50 мкм; тонкими межкристаллическими порами – 0,1-5,0 мкм (рис. 14). В качестве полимерного каркаса использовали пористый полиуретан (ПУ) с плотностью с плотностью 19 кг/см³, поскольку он обладает необходимой структурой и при термической обработке полностью удаляется. Суспензию ФК/биополимер (желатин) готовили на основе водного раствора с соотношением 1/1 по массе.

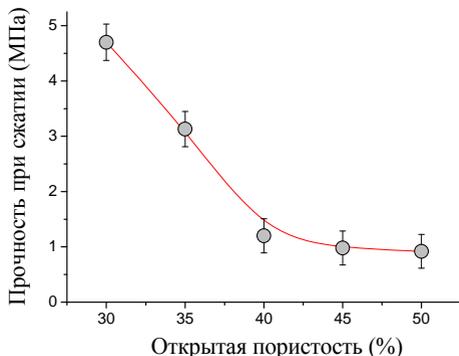


Рис. 13. Зависимость предела прочности при сжатии спеченных образцов ГА керамики при температуре 1200⁰С от содержания открытых пор.

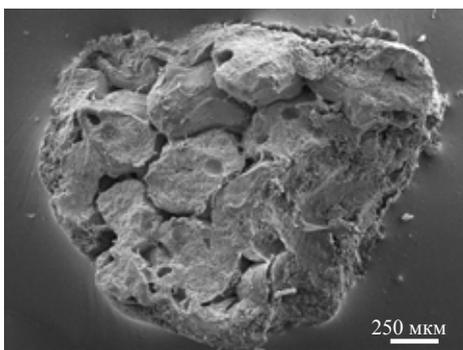


Рис. 14. Микроструктура КГА керамики полученная методом наполнения ячеистого полимерного каркаса суспензией КГА /биополимер (инверсионным методом реплик).

При меньших концентрациях ФК в суспензии образцы при спекании разрушаются, а при больших концентрациях вязкость раствора слишком велика, чтобы заполнить равномерно объем полимерного каркаса. Пропитку ПУ каркаса вели следующим образом: ПУ каркас заданной формы полностью погружали в керамический шликер, деформировали (сжатием) каркас на 50 %, после чего за счет восстановления объема ПУ каркаса шликер заполнял его свободное пространство. Образцы извлекали из суспензии и помещали в морозильную камеру с температурой -4°C на 2 часа для фиксации структуры. Последующая термическая обработка приводит к выжиганию ПУ каркаса и спеканию керамики. Прочность при сжатии такой керамики составляет около 3 МПа.

Изучены особенности спекания керамики на основе ГА–ТКФ и КГА в интервале температур $950\text{--}1350^{\circ}\text{C}$ и $650\text{--}1250^{\circ}\text{C}$, соответственно. Установлено влияние температуры на прочностные характеристики материалов и фазовый состав.

Интенсивное спекание ГА керамики начинается при 950°C . Наибольшая усадка при спекании 15 % и наименьшая открытая пористость 0,5 % достигается при 1200°C . Плотная керамика, полученная при данной температуре, обладает наибольшей прочностью при изгибе 84 МПа (рис. 15). При дальнейшем повышении температуры прочность снижается из-за роста зерна керамики.

Установлено, что для БФК керамики скорость усадки при изотермической выдержке максимальна при $1000\text{--}1150^{\circ}\text{C}$. На участке $1150\text{--}1350^{\circ}\text{C}$ скорость усадки резко снижается, открытая пористость стремится к нулю. До 1000°C усадка происходит незначительно. Можно полагать, что в этом интервале спекание происходит по механизму поверхностной диффузии, при котором наблюдаются сфероидизация частиц и образование контакта между ними, но не происходит сближение их центров. Далее с повышением температуры начинается ускоренная усадка, что свидетельствует о лимитирующей роли объёмной диффузии в процессах уплотнения. Увеличение доли содержания ТКФ в БФК отрицательно влияет на процессы спекания. На рис. 15 показана зависимость прочности при изгибе материалов от температуры нагрева в интервале $1000\text{--}1350^{\circ}\text{C}$. С повышением температуры от 1000 до 1200°C прочность возрастает, достигая максимальных значений (55–80 МПа) при 1200°C , а затем снижается, причем более высокая прочность керамики с меньшим содержанием β -ТКФ обусловлена меньшей ее пористостью. Термическая обработка при $1250\text{--}1350^{\circ}\text{C}$ приводит к снижению прочности образцов, что связано, по-видимому, с ростом зерна. Уменьшение прочности происходит также и вследствие образования α -ТКФ, вызывающего 7 %-

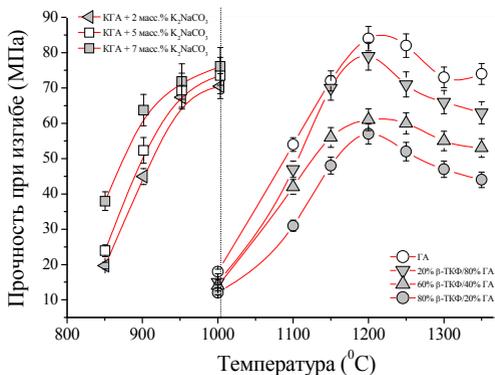


Рис. 15. Зависимость прочности при изгибе от состава и температуры термической обработки ГА, БФК и КГА керамики.

ное увеличение объема по сравнению с β -ТКФ, что может приводить к растрескиванию.

При термической обработке на воздухе образцов КГА усадка составляет не более 10 %. Начало процесса спекания соответствует 650-700⁰С, дальнейшее увеличение температуры до 800-1000⁰С не приводит к получению более плотных образцов. По данным РФА это связано с разложением КГА и образованием оксида кальция, который препятствует консолидации порошковых материалов при низких температурах. Разработан состав шихты для активированного спекания. Установлена зависимость усадки, пористости и размера зерна в зависимости от количества карбонатсодержащей добавки. Спекорящую добавку $K_2Ca(CO_3)_2$ ($T_{пл} = 755^0C$) вводили в порошок КГА через водные растворы солей калия и кальция в количестве 2, 5 и 7 масс. %. При использовании в качестве добавки двойной соли карбоната калия и кальция в количестве 2, 5 и 7 масс. % при температуре обжига соответственно 850-900, 860-880 и 850-860⁰С образцы имели пористость менее 5 %. Интенсификация процесса консолидации происходит, по-видимому, за счет образования расплавов на основе низкотемпературных эвтектик, что подтверждается наличием стеклофазы, которая покрывает зерна материала (рис. 16а). Данные дифференциального термического анализа (ДТА) подтверждают появление жидкой фазы при спекании КГА (рис. 16б). Прочность при изгибе образцов КГА керамики, спеченных с карбонатсодержащей добавкой, находится на уровне 70-75 МПа (рис. 15).

С целью улучшения прочностных характеристик пористой ФК-керамики производили инфильтрацию раствора полимера (желатина и поливинилового спирта (ПВС)) в пористую керамическую матрицу с последующей сушкой композиции. За основу была выбрана пористая ГА керамика, полученная по технологии компактирования и спекания пористых гранул.

Установлено, что количество полимера, инфильтрируемого в керамику, зависит от концентрации раствора, исходной пористости керамики и времени пропитки. Так,

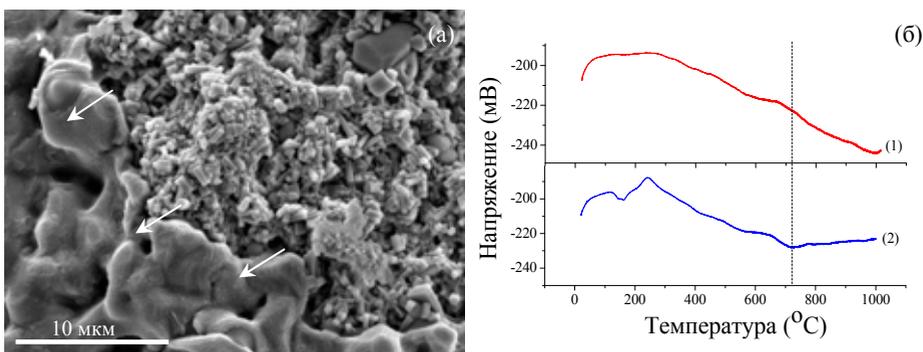


Рис. 16. Поверхность КГА керамики при температуре обжига 750⁰С (стрелками отмечена стеклофаза) (а) и кривые ДТА образцов КГА (1) и КГА + 50 масс. % $K_2Ca(CO_3)_2$ (2) (б).

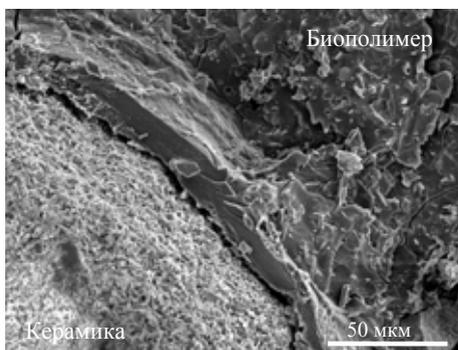


Рис. 17. Микрофотография пористой ГА керамики пропитанной 5 %-ным раствором желатина.

образцов происходит равномерно по всему объему (рис. 17).

Степень заполнения порового пространства находится в интервале от 1 до 9 % и от 1 до 12 % для образцов, пропитанных раствором ПВС и желатина соответственно. Максимальная степень заполнения достигается при высокой концентрации полимера в растворе, исходной пористости образцов 40-60 об. % и остаточном давлении 1,33 Па (10^{-2} мм.рт.ст.) с выдержкой 30 минут. Таким образом, 80 % порового пространства остается не заполненным, что обусловлено условиями пропитки и размером пор в образцах.

Материалы подвергали испытанию на диаметрально сжатие. На рис. 18 представлены данные по влиянию концентрации водного раствора желатина и условий вакуумирования на значение предела прочности при растяжении. Прочность растет с увеличением концентрации раствора и времени пропитки. Наиболее интенсивное увеличение прочности от 2 МПа в исходном состоянии до 9,1 МПа наблюдается у образцов, пропитанных 10 %-ным раствором желатина при остаточном давлении 1,33 Па (10^{-2} мм.рт.ст.) с выдержкой 30 минут. Значение прочности керамики, пропитанной растворами ПВС, изменяется в пределах от 1,5 до 4,9 МПа. Различие в значениях прочности керамики, пропитанной желатином и ПВС, объясняется количеством полимера в образце. Прирост прочности после пропитки керамики с исходной пористостью 25-35 % в 2 раза

масса образцов, пропитанных растворами желатина, увеличивается линейно с увеличением концентрации раствора, исходной пористости образцов и времени пропитки. Максимальное изменение массы образцов порядка 4-5 % достигается пропиткой 10 %-ным раствором желатина образцов пористостью 40-60 об. % при остаточном давлении 1,33 Па (10^{-2} мм.рт.ст.) с выдержкой 30 минут. Масса образцов, пропитанных растворами ПВС, также растет с увеличением исходной пористости и времени пропитки. По данным оптической и сканирующей электронной микроскопии пропитка

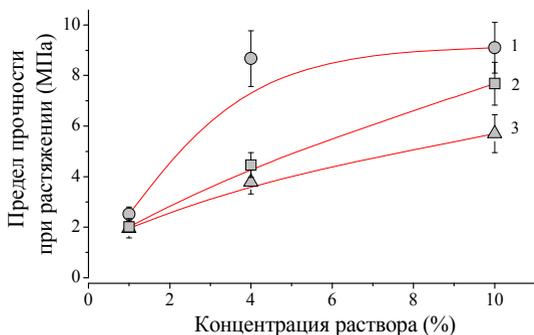


Рис. 18. Влияние концентрации водного раствора желатина и условий вакуумирования (1 – 10^{-2} мм.рт.ст., 30 мин.; 2 – 10^{-3} мм.рт.ст., 10 мин.; 3 – атмосферное давление, 30 мин.) на значение предела прочности при растяжении.

меньше, чем керамики с исходной пористостью 40-60 %.

Таким образом, разработана технология керамики с бимодальным распределением пор по размерам. Технология позволяет получать керамику с пористостью около 60-70 об. % и размером пор от 0,1 до 250 мкм. Методом наполнения ячеистого полимерного каркаса суспензией ФК/биополимер получена керамика, имеющая взаимопроникающие крупные, средние и тонкие поры размером 150-250, 10-50 и 1,0-5,0 мкм. Установлены закономерности формирования микроструктуры и свойств керамики на основе ГА–ТКФ и КГА в широком интервале температур до 1350⁰С. Для КГА разработан состав керамической шихты, что позволило понизить температуру спекания на 350⁰С и избежать термического разложения КГА. Продемонстрирована принципиальная возможность получения спектра композиционных материалов с заданными свойствами посредством инфильтрации водных растворов полимеров в керамический каркас.

В **пятой главе** представлены результаты разработки реакционно-твердеющих систем с ОКФ в качестве прекурсора кристаллизации ГА на основе α-ТКФ–ОКФ и раствора солей ортофосфорной кислоты и АФК, ДКФ, ДКФД и ОКФ с полисиликатом натрия.

Невозможно изготовить керамику спеканием порошков термически неустойчивых соединений, таких как ОКФ, избежав при спекании химических и фазовых изменений, влияющих на состав и свойства керамики. Кроме того, пористые спеченные керамические материалы имеют существенный недостаток: жесткость, не позволяющая полностью заполнить дефект кости, особенно если этот дефект имеет сложную трехмерную конфигурацию. Альтернативой может быть технология вяжущих систем (кальцийфосфатные цементы, КФЦ), схватывающихся и твердеющих при физиологической температуре.

Изучена базовая реакционно-твердеющая система, основанная на смеси α-ТКФ – ОКФ в качестве твердой фазы и растворах солей ортофосфорной кислоты. Установлены закономерности и кинетика фазообразования при схватывании и твердении в зависимости от соотношения исходных компонентов, формирования их химических и механических свойств при физиологических температурах.

α-ТКФ получали термообработкой ДКДФ и карбоната кальция при 1300⁰С в течение 5 ч. Порошок α-ТКФ измельчали в планетарной мельнице корундовыми мелющими телами в среде этанола с последующей сушкой при 80⁰С. ОКФ получали осаждением из растворов ацетата кальция и гидрофосфата аммония. В качестве жидкой фазы использовали раствор ортофосфорной кислоты в соотношении порошок/жидкость 2:1. Порошки смешивали в различных соотношениях (табл. 2).

Таблица 2. Основные характеристики полученных цементов.

Образец	Фазовый состав, масс. %		Время схватывания, мин	рН
	Продукты взаимодействия			
1	90/10	α-ТКФ/ДКФД/ГА 90/7/3	5	6,1
2	80/20	α-ТКФ/ДКФД/ГА/ОКФ 65/23/9/3	7	6,1
3	70/30	α-ТКФ/ДКФД/ГА/ОКФ 51/30/14/5	9	6,3
4	60/40	α-ТКФ/ДКФД/ГА/ОКФ 27/38/20/15	10	6,7
5	50/50	-	63	-

Методами РФА и энергодисперсионного рентгеновского дифракционного анализа изучена кинетика фазообразования в течение до 75 часов. Схватывание и твердение КФЦ сопровождается трансформацией α -ТКФ в ДКФД, с последующим гидролизом последнего в ГА. ОКФ частично переходит в ГА, т.к. присутствие ДКФД ингибирует процесс его трансформации.

Прочность КФЦ увеличивается с момента затворения в течение первых двух суток, достигая через 75 часов максимального значения 30 МПа. В процессе твердения КФЦ его структура претерпевает существенные изменения в течение первых 3 суток (рис. 20). Изменения микроструктуры хорошо коррелируют с прочностью. Через 10 минут после затворения (рис. 20а) микроструктура КФЦ неоднородна, заметны множественные включения исходных частиц α -ТКФ и ОКФ. Через 24 часа (рис. 20б) обнаруживаются пластинчатые кристаллы неправильной формы, которые, на основании данных РФА и формы кристаллов, можно отнести к ДКФД. Между частицами видны многочисленные поры, которые снижают прочность цемента. Через 75 часов поры исчезают (рис. 20в), образуются пластинчатые и игольчатые кристаллы, покрытые аморфной массой. С появлением аморфной составляющей, соединяющей структурные элементы КФЦ, связано существенное увеличение прочности.

Проведено исследование кинетических особенностей растворения КФЦ в изотоническом 0,1 М растворе NaCl в течение 21 суток при постоянном объеме

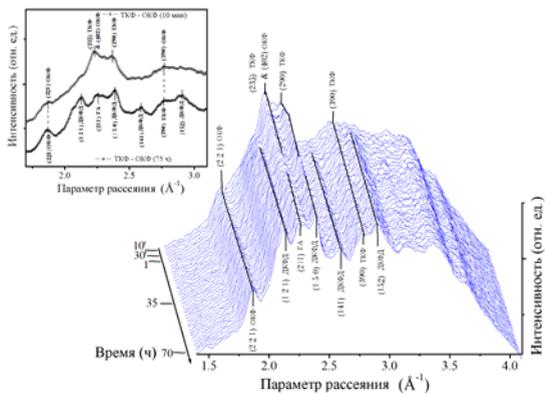


Рис. 19. Кинетика твердения КФЦ составом 60/40 α -ТКФ/ОКФ в течение 75 ч.

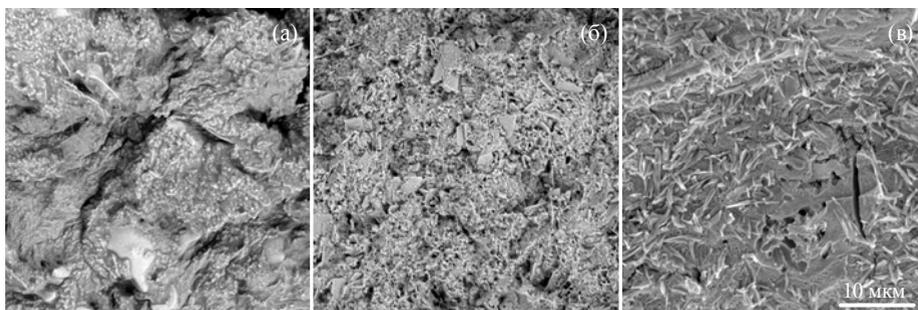


Рис. 20. Эволюция микроструктуры КФЦ состава 60/40 α -ТКФ/ОКФ после затворения через 15 минут (а), 24 (б) и 75 часов (в), соответственно.

жидкой фазы и $pH = 7,4$. Измеряли концентрацию кальция в жидкой фазе. Концентрация Ca^{2+} при выдержке КФЦ резко возрастает в течение первых двенадцати суток, после чего она стабилизируется (рис. 21а). Установлено, что концентрация Ca^{2+} в растворе в 2 раза превышает значение для гранул КГА; растворение сопровождается переходом ОКФ, ТКФ и ДКФД в апатитоподобную ГА фазу (рис. 21б).

Изучены различные способы формирования пористости в КФЦ на основе α -ТКФ и ОКФ с использованием порообразующих добавок (карбонат калия, кальция, аммония и гидрокарбонат натрия и аммония). Установлена возможность формирования пор размером от 10 до 250 мкм при общем содержании открытых пор до 70 об. % за счет разложения добавки и выделения углекислого газа (рис. 22). Прочность при сжатии пористых КФЦ достигает 5 МПа.

Разработаны плотные и пористые КФЦ на основе α -ТКФ – ОКФ, которые характеризуются приемлемыми для медицинских применений временем схватывания от 5 до 25 минут, значением $pH \sim 6,7$, прочностью при сжатии до 30 МПа и заданным фазовым составом.

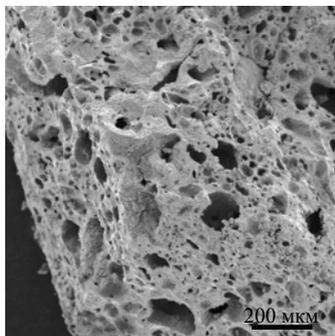


Рис. 22. Микрофотография пористого КФЦ на основе α -ТКФ – ОКФ.

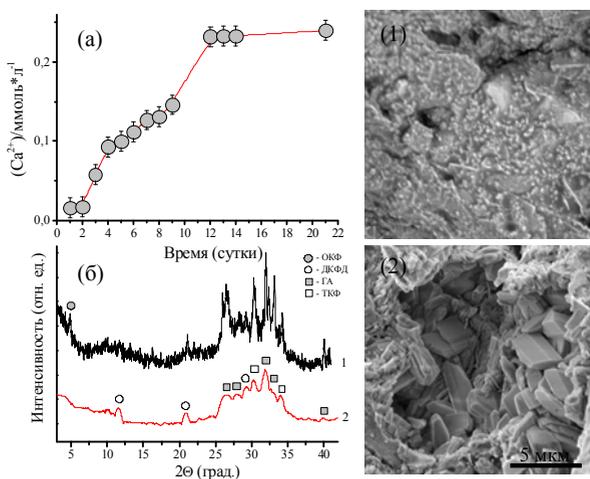


Рис. 21. Изменение концентрации Ca^{2+} в изотоническом растворе при растворении КФЦ составом 60/40 α -ТКФ/ОКФ (а). Дифрактограммы (б) и микроструктура образцов до (1) и после растворения на 21 сутки (2).

Разработаны реакционно-твердеющие смеси в системах АФК, ДКФ, ДКФД, ОКФ – раствор полисиликата натрия. Порошки АФК, ДКФД и ОКФ синтезированы осаждением из растворов ацетата кальция и гидрофосфата аммония. ДКФ получали из ДКФД прокаливанием при $150^{\circ}C$ в течение двух часов. Средний размер частиц порошков составлял ~ 1 мкм. В качестве затворяющей жидкости использовали полисиликат натрия состава 20 % Na_2O и 80 % SiO_2 .

Методом СЭМ выявлены особенности формирования микроструктуры полученных материалов. Через 10 минут после затворения микроструктура КФЦ неоднородна, заметны множественные включения исходных частиц АФК,

ДКФ, ДКФД и ОКФ. Между частицами имеются многочисленные поры, которые снижают прочность КФЦ. Пористость КФЦ увеличивается в течение первых трех суток после затворения до 25 %. Размер пор составляет 10-50 мкм.

По данным РФА в исследуемых системах образование новых фаз не происходит. Выявлено новое, ранее не известное циклическое изменение свойств в процессе твердения, что открывает возможности в создании нового класса медицинских материалов, в качестве естественных биореакторов для клеточной терапии. Обычно изменение прочности при сжатии КФЦ описывается сигмоидальной кривой роста с выходом на плато, что обусловлено процессом кристаллизации. Для исследуемых образцов прочность при сжатии в процессе твердения характеризуется последовательностью пиков и плато на кривой (рис. 23а). Как видно из приведенной зависимости размера зерна наиболее интенсивного пика (120) для КФЦ на основе ДКФ, структурные изменения в материале полностью согласуются по времени с изменениями на кривой зависимости прочности при сжатии от времени твердения (рис. 23).

Методами РФА и энергодисперсионного рентгеновского дифракционного анализа изучены структурные изменения, происходящие при взаимодействии КФЦ с раствором низкомолекулярного хитозана и SBF в течение до 60 часов. Показано, что для КФЦ на основе АФК формирование конечного продукта ГА с текстурой (321) происходит через промежуточную фазу – ОКФ (рис. 24). Такое поведение схоже с процессами самоорганизации коллаген - апатитовой матрицы костной ткани в условиях *in vivo* при биоминерализации. Динамика процесса образования ОКФ характеризуется временами кристаллизации и растворения $4,25 \pm 0,25$ ч и $14,00 \pm 0,25$ ч и ростом средних размеров кристаллитов с $14 \pm 1,0$ нм до $25 \pm 1,0$ нм, соответственно. Кинетика фазообразования КФЦ на основе ОКФ в присутствии

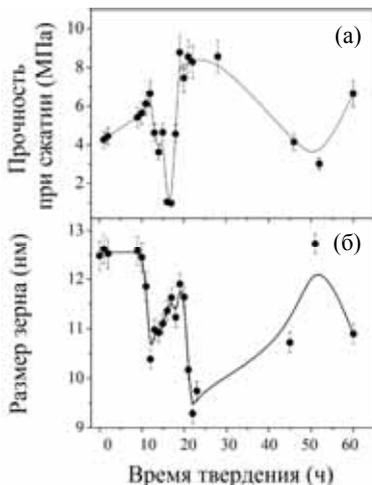


Рис. 23. Прочность при сжатии (а) и размер зерна (б) КФЦ на основе ДКФ в процессе твердения.

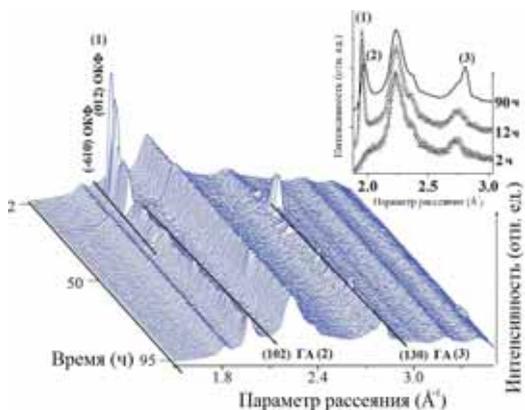


Рис. 24. Кинетика фазообразования КФЦ на основе АФК – раствор полисиликата натрия в присутствии низкомолекулярного хитозана и SBF в течение 95 ч.

хитозана и SBF обусловлена быстрым переходом его в апатитоподобную ГА фазу с характерным размером кристаллов $12-18 \pm 1,0$ нм. Установлено, что низкомолекулярный хитозан является модулятором циклических изменений свойств и ингибитором процессов кристаллизации исследуемых КФЦ (АФК, ДКФ, ДКФД и ОКФ – раствор полисиликата натрия).

Таким образом, разработаны КФЦ на основе АФК, ДКФ, ДКФД, ОКФ – раствор полисиликата натрия, характеризующиеся временем твердения 15-20 минут, рН после затвердевания ~ 8,5. Прочность при сжатии через 1 сутки после затворения достигает ~ 8-10 МПа. Пористость КФЦ увеличивается в течение первых трех суток после затворения до 25 %, размер пор – 10-50 мкм. Впервые получены объемные керамические материалы, содержащие в конечном продукте 100 % ОКФ.

В шестой главе отражена практическая значимость работы и представлены результаты сравнительных доклинических биологических исследований разработанных материалов *in vitro* и *in vivo*, и ограниченных клинических испытаний.

На основании проведенных исследований разработаны варианты технологических регламентов синтеза порошков и керамики; изготовлены лабораторные партии материалов; сформулированы технические условия на производство продукции.

Проведены испытания образцов ГА- и БФК-керамики на адсорбцию протеинов, которую оценивали методом ELISA по результатам измерения оптической плотности. Были исследованы две группы образцов: с низкой (≤ 1 %) и относительно высокой (~ 20 %) открытой пористостью. Установлено, что как фазовый состав, так и пористость существенно влияют на адсорбцию протеинов на БФК керамике: адсорбция повышается с увеличением содержания ТКФ и с повышением пористости керамики.

На модели иммортализованных фибробластов человека (ФЧ) проведены испытания *in vitro* образцов ГА, БФК и КГА керамики совместно с ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий»: изучена цитотоксичность материалов и оценены матриксные свойства их поверхностей, т.е. исследованы возможности поддерживать активный рост и пролиферацию клеток при длительном совместном культивировании. Показано, что керамика на основе ГА, БФК и КГА не обладает токсичностью в отношении ФЧ. Популяция ФЧ при длительном культивировании на ГА, БФК и КГА постоянно нарастала. К окончанию сроков культивирования популяция ФЧ на образцах керамики значительно превышала контрольные значения на полистироле.

В экспериментах *in vivo* показано, что при подкожной трансплантации экспериментальным животным керамические материалы на основе ГА, БФК и КГА не вызывают реакции воспаления окружающих тканей, т.е. являются биосовместимыми. Шероховатость поверхности этих образцов обеспечивает им выраженные матриксные качества – процесс миграции остеообразующих клеток с заселением отдельных гранул и формированием соединительной ткани отмечается уже через 2 недели после операции. Пористость создает условия для эффективной неоваскуляризации.

На модельных экспериментах *in vivo* краевой резекции большеберцовой кости

крысы, показано что ГА, БФК и КГА керамика без ММСК и в составе биоинженерной конструкции обладает остеокондуктивными потенциальными возможностями различной степени выраженности. В целом, очаги оксификации в зоне дефекта появляются уже через 3 недели после операции (рис. 25). К 6-ой неделе эти процессы нарастают, вокруг образцов начинается формироваться надкостница. Параллельно процессам формирования новой костной ткани идут процессы биодеградации. По скорости биодеградации исследованные материалы можно выстроить в следующий ряд: ГА < БФК < КГА. К 12 неделе эксперимента керамические матрицы на основе КГА почти полностью биодеградируют и замещаются зрелой костной тканью с формированием остеонов. Использование биоинженерной конструкции в зоне дефекта приводит к более раннему формированию очагов оксификации и, как минимум, на неделю раньше происходит восстановление костного дефекта.

Методом рентгеновской микродифракции и 3-х мерной микротомографии, с использованием синхротронного излучения установлено, что биодеградация *in vivo* материалов происходит в большей степени за счет активации остеобразующих клеток в области новообразования костной ткани (рис. 26).

Таким образом, по кинетике биодеградации, образованию новой костной ткани и остеокондуктивным потенциальным свойствам керамика на основе КГА более перспективна в качестве имплантата и материала матрикса, чем ГА и БФК керамика.

По результатам *in vitro* и *in vivo* проведены ограниченные клинические испытания в ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий», ФГУ «Центральный научно-

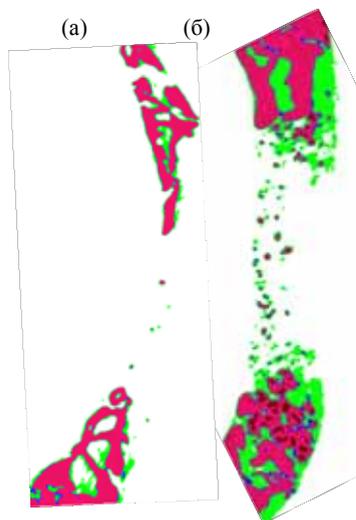


Рис. 25. 2-х мерный микротомографический снимок дефекта костной ткани без (а) и с гранулами КГА (б) на 3 неделю имплантации.

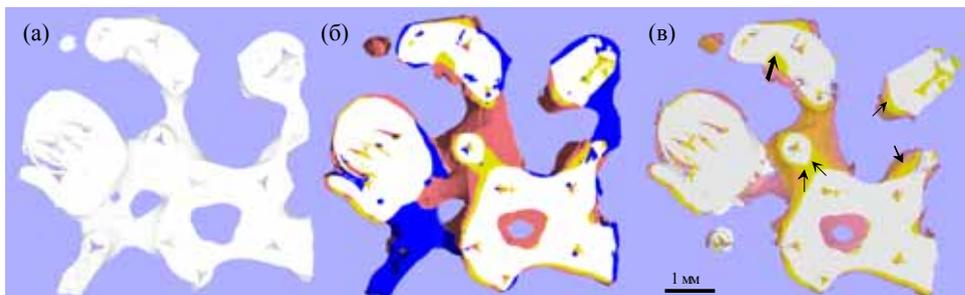
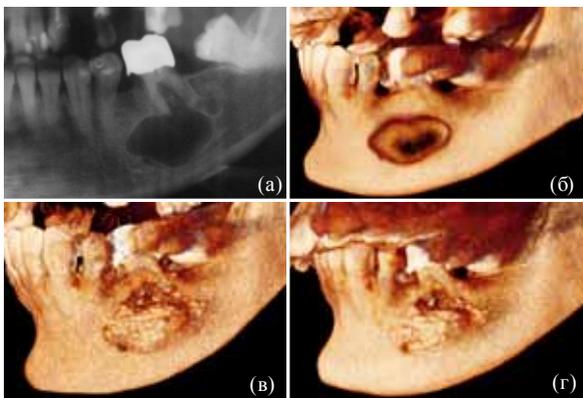


Рис. 26. 3-х мерный микротомографический снимок БФК керамики до (а) и после подкожной имплантации с ММСК на 16 недель (б, в), где область биодеградации отмечена, синим и желтым цветом, розовый цвет – новообразовавшаяся костная ткань.

исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Росмедтехнологий», «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства России» и «Клинический центр стоматологии Федерального медико-биологического агентства России». Показано, что керамика на основе КГА стимулирует



новообразование костной ткани и замещает костный дефект при операциях:

резекции слизистой полости рта с плоскостной резекцией тела нижней челюсти и восстановлением альвеолярного отростка нижней челюсти, краниофациальной резекции, удалении опухоли кожи скальпа с резекцией костей свода черепа, удалении опухоли головы и шеи с вовлечением костных структур, удаление периапикальных деструктивных изменений, резекции и ретроградном пломбировании корней зубов, вовлеченных в полость кисты, восстановлении гребня альвеолярного отростка и лоскутной операции, в частности кюретаж пародонтальных карманов, сглаживании поверхности корней, с методикой направленной регенерации костной ткани (рис. 27).

Рис. 27. Рентгенографический снимок (а) и 3-х мерная компьютерная томография костного дефекта ткани пациента (б), после имплантации гранул КГА - 1 сутки (в) и 3 месяц (г).

Создано опытное производство изделий медицинского назначения при ИМЕТ РАН и получено разрешение Росздравнадзора РФ (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09231 от 17.10.2010 г.) на производство, продажу и применение в медицинской практике на территории РФ изделия медицинского назначения.

Выводы

Выполнены исследования по технологии кальцийфосфатных материалов на основе ГА–ТКФ, КГА и ОКФ. Установлены закономерности формирования микроструктуры и физико-химических свойств материалов. На основании полученных экспериментальных данных сделаны следующие выводы:

1. Осаждением из растворов с расчетным соотношением Ca/P от 1,50 до 1,64 при варьировании значения pH от 7,0 до 8,5 получены продукты, соответствующие по составу кальций-дефицитному апатиту. Термической обработкой таких продуктов при заданной температуре от 900 до 1300⁰С получены БФК материалы в системе ГА–ТКФ с контролируемым соотношением фаз ГА/ТКФ от 12:88 до 89:11. Введение Mg²⁺ в БФК приводит к стабилизации фазового состава. По результатам расчетов изменения параметров элементарной ячейки установлено, что Mg²⁺ входит исключительно в кристаллическую структуру ТКФ.

2. Методом гетерофазного синтеза с механохимической активацией получен карбонатсодержащий ГА с различной степенью замещения CO_3^{2-} от 0,6 до 9,0 масс. % и Mg^{2+} и Na^+ до 1,0 масс. %. Установлено влияние степени замещений $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow (\text{PO}_4^{3-}, \text{OH}^-)$ до 9 масс. %, на морфологию и дисперсность продуктов синтеза КГА. С увеличением содержания карбонат-групп в ГА происходит увеличение удельной площади поверхности порошков, сопровождающееся изменением формы кристаллов с изометрической на игольчатую и стержневидную. Изучена термическая стабильность в интервале температур до 1500°C карбонатсодержащих ГА, магний- и натрий- замещенных КГА. Установлено, что разложение всех материалов начинается уже при 300°C с выделением оксидов углерода. Температура максимума выделения CO_2 зависит от замещений: при введении Mg^{2+} или Na^+ положение максимума смещается от $700\text{-}800^\circ\text{C}$ (чистый КГА) до $500\text{-}600^\circ\text{C}$ (замещенные КГА). Интенсивность выделения CO возрастает монотонно с повышением температуры. Согласно результатам исследований методами ^1H ЯМР-спектроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния, потеря протонов при температурах выше 700°C приводит к образованию оксиапатита. Структура КГА сохраняется до, примерно, 1100°C , но происходящее при этом частичное термическое разложение КГА сопровождается полной потерей OH -групп. Na^+ , компенсируя зарядовый дисбаланс, не приводит к стабилизации КГА. Частичное замещение Ca^{2+} на Mg^{2+} дестабилизирует КГА, способствует его разложению с кристаллизацией ТКФ за счет большого различия ионных радиусов кальция ($1,14 \text{ \AA}$) и магния ($0,86 \text{ \AA}$).

3. Изучено влияние условий синтеза ОКФ методом осаждения из растворов на морфологию и фазовый состав получаемого продукта. Установлено, что с повышением температуры синтеза от 37 до 90°C при постоянном pH среды, равном $5,0$, фазовый состав продукта синтеза изменяется от ДКФД до композита, содержащего до 90 масс. % ОКФ в смеси с ДКФД. При pH $6,0$ и $\sim 90^\circ\text{C}$ происходит быстрый гидролиз продукта синтеза в термодинамически более устойчивый ГА. Длительный гидролиз ДКФД в растворе ацетата натрия при 37°C обеспечивает синтез 100 % ОКФ, при этом агрегаты образующихся кристаллов ОКФ наследуют исходные размеры частиц ДКФД. Изучены превращения, происходящие в ОКФ в процессе его выдержки в физиологическом растворе при 25°C в течение периодов времени до 80 ч. Установлено протекание одновременно двух процессов: рост размеров кристаллитов от 22 до 35 нм и кристаллизация из ОКФ гидроксиапатита с размером кристаллов около 5 нм. ОКФ в растворе SBF переходит в КГА, превращения сопровождаются морфологическими изменениями кристаллов. Динамика процессов различна и характеризуется временами кристаллизации $3,3$ и $7,2$ ч для ОКФ и ОКФ/ДКФД соответственно, что свидетельствует об ингибирующем эффекте ДКФД.

4. Разработана суспензионная технология изготовления сферических гранул из ГА, ГА-ТКФ и КГА размером от 50 до более чем 2000 мкм с пористостью $18\text{-}50$ об. % и размером пор $0,1\text{-}5,0$ мкм (на поверхности) и от 100 до 500 мкм (внутригранульные поры). Установлены особенности формирования микроструктуры пористых керамических гранул в зависимости от состава исследуемых материалов. Выявлены кинетические особенности растворения разработанных материалов в жидкостях, моделирующих внеклеточную жидкость

организма человека. Для материалов на основе ГА–ТКФ и КГА установлен переход во времени к экспоненциальному закону растворения, соответствующему кинетике скоростей реакций первого порядка. Процесс растворения БФК керамики определяется ТКФ составляющей, а КГА керамики – содержанием карбонат групп. Скорость растворения керамики КГА в 2 раза больше по сравнению с керамикой на основе БФК.

5. Разработана технология керамики с бимодальным распределением пор по размерам, основанная на прессовании и последующем спекании гранул с формированием интер- и интрагранулярной пористости. Показана возможность формирования пор размером от 0,1 до 1000 мкм при общем содержании открытых пор до 80 %. Методом наполнения ячеистого полимерного каркаса суспензией ФК/биополимер получена керамика, имеющая взаимопроникающие крупные, средние и тонкие поры размером 150-250, 10-50 и 1,0-5,0 мкм. Установлены особенности формирования микроструктуры при спекании пористой керамики на основе ГА–ТКФ и КГА в интервале температур 950-1350⁰С и 650-1250⁰С. Для КГА разработан состав шихты для спекания керамики с участием жидкой фазы, позволяющий снизить температуру спекания КГА керамики на 350⁰С и избежать термического разложения. Инфильтрация полимеров (желатин и ПВС) в поровое пространство керамики позволяет повысить прочность до 6 раз в результате залечивания дефектов и снижения концентрации напряжения у пор.

6. Разработаны реакционно-твердеющие системы с ОКФ в качестве прекурсора кристаллизации ГА, на основе α -ТКФ–ОКФ и раствора солей ортофосфорной кислоты и на основе АФК, ДКФ, ДКФД и ОКФ с полисиликатом натрия. Установлены закономерности фазообразования при схватывании и твердении реакционно-твердеющих смесей в таких системах, формирования химических и механических свойств при физиологических температурах. Выявлено новое, ранее не известное циклическое изменение свойств в цементных системах на основе ДКФ, ДКФД и ОКФ в процессе твердения. Получены материалы с содержанием ОКФ 100 масс. %. Исследованы структурные изменения, происходящие при взаимодействии цементов на основе прекурсоров в присутствии раствора низкомолекулярного хитозана и SBF. Показано, что для реакционно-твердеющей смеси на основе АФК формирование конечного продукта ГА происходит через промежуточную фазу – ОКФ. Кинетика фазообразования КФЦ на основе ОКФ в присутствии хитозана и SBF обусловлена быстрым переходом его в апатитоподобную фазу.

7. На основании проведенных исследований разработаны варианты технологических регламентов синтеза порошков и керамики; изготовлены лабораторные партии материалов; сформулированы технические требования для технического задания на разработку продукции. Проведенные сравнительные доклинические биологические исследования экспериментальных образцов материалов *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали высокую биологическую совместимость, отсутствие токсичности и воспалительных реакций, биодеградацию материалов, а также формирование новой костной ткани. Некоторые из разработанных материалов прошли государственную экспертизу и ограниченные клинические испытания на 81 пациенте. Создано опытное производство изделий медицинского назначения при ИМЕТ РАН и получено разрешение Росздравнадзора

РФ (Регистрационное удостоверение № ФСР 2010/09231 от 17.10.2010 г.) на производство, продажу и применение в медицинской практике на территории РФ изделия медицинского назначения.

Публикации по теме диссертации

Монографии

1. Баринов С.М., **Комлев В.С.** Биокерамика на основе фосфатов кальция. М.: Наука, 2005, с. 204.
2. Barinov S.M., **Komlev V.S.** Calcium phosphate based bioceramics for bone tissue engineering. Trans Tech Publications LTD, Key Eng. Mater. 2008. p. 170.

Обзоры

3. Орловский В.П., **Комлев В.С.**, Баринов С.М. Гидроксиапатит и керамика на его основе // Неорг. материалы. 2002. Т. 38, № 10. С. 973-984.
4. Mastrogiacomo M., Muraglia A., **Komlev V.**, Peyrin F., Rustichelli F., Crovace A., Cancedda R. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold // J. Orthod. Craniof. Res. 2005. V. 8, № 4. P. 277-283.
5. Lee J.H., Pabst W., De Aza P.N., **Komlev V.S.**, Barinov S.M., Ceniga L., Kamitakahara M., Birgoren B. Ceramics and composite materials: new research. Nova publishers, 2005. p. 238.
6. Cancedda R., Cedola A., Giuliani A., **Komlev V.**, Lagomarsino S., Mastrogiacomo M., Peyrin F., Rustichelli F. Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue engineered bones by X-ray microtomography and X-ray diffraction // Biomaterials. 2007. V. 28. P. 2505-2524.
7. Петрович Ю.А., Гурин А.Н., **Комлев В.С.**, Гурин Н.А., Фадеева И.В., Киченко С.М. Использование карбонатов в тканевой инженерии кости // Российский стоматологический журнал. 2008. № 5. С. 65–69.
8. Петрович Ю.А., Гурин А.Н., **Комлев В.С.**, Гурин Н.А., Фадеева И.В., Киченко С.М. Использование карбонатов в тканевой и генной инженерии кости (обзор литературы и собственные материалы) // Российский стоматологический журнал. 2009. № 1. С. 54-58.
9. Баринов С.М., **Комлев В.С.** Остеоиндуктивные керамические материалы для восстановления костных тканей: октакальциевый фосфат (Обзор) // Материаловедение. 2009. № 10. С. 34-41.
10. Belicchi M., Cancedda R., Cedola A., Fiori F., Gavina M., Giuliani A., **Komlev V.S.**, Lagomarsino S., Mastrogiacomo M., Renghini C., Rustichelli F., Sykova E., Torrente Y. Some applications of nanotechnologies in stem cells research // Mater. Sci. Eng. B. 2009. V. 165. P. 139-147.
11. Гурин А.Н., **Комлев В.С.**, Фадеева И.В., Баринов С.М. Октакальций фосфат – прекурсор биологической минерализации, перспективный остеопластический материал // Стоматология. 2010. Т. 89, № 4. С. 57-64.
12. Giuliani A., **Komlev V.**, Rustichelli F. Three-dimensional imaging by microtomography of x-ray synchrotron radiation and neutrons. In Materials structural properties by neutrons, synchrotron radiation and modelling / Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010. P. 123-177.

Статьи в рецензируемых журналах

13. **Комлев В.С.**, Баринов С.М., Фадеева И.В. Пористые керамические гранулы из гидроксиапатита для системы доставки лекарственных препаратов // Новые технологии-21 век. 2001. № 5. С. 18-19.
14. **Комлев В.С.**, Баринов С.М., Орловский В.П., Курдюмов С.Г. Пористые гидроксиапатитовые гранулы // Огнеупоры и техническая керамика. 2001. Т. 42, № 5-6. С. 195-197.
15. **Комлев В.С.**, Баринов С.М., Орловский В.П., Курдюмов С.Г. Пористые гидроксиапатитовая керамика с бимодальным распределением пор // Огнеупоры и техническая керамика. 2001. Т. 42, № 5-6. С. 242-244.
16. **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.
17. **Komlev V.S.**, Barinov S.M., Koplik E.V. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release // Biomaterials. 2002. V. 23. P. 3449-3454.
18. **Комлев В.С.**, Баринов С.М., Фадеева И.В. Повышение прочности пористой гидроксиапатитовой керамики посредством инфильтрации полимера // Перспективные материалы. 2002. № 4. С. 65-69.
19. Cedola A., Stanic V., Burghammer M., Lagomarsino S., Rustichelli F., Giardino R., Nicoli Aldini N., Fini M., **Komlev V.** and Di Fonzo S. X-ray micro-diffraction analysis of reconstructed bone at Zr prosthetic surface with sub-micrometer spatial resolution // J. Physics in Medicine and Biology. 2003. V. 48. P. 37-48.
20. **Komlev V.S.**, Barinov S.M., Girardin E., Oscarsson S., Rosengren A., Rustichelli F., Orlovskii V.P. Porous spherical hydroxyapatite and fluorhydroxyapatite granules: processing and characterization // Sci. Techn. Advanc. Mater. 2003. V. 4. P. 503-508.
21. **Komlev V.S.**, Barinov S.M., Rustichelli F. Strength enhancement of porous hydroxyapatite ceramics by polymer impregnation // J. Mater. Sci. Lett. 2003. V. 22. P. 1215-1217.
22. Rustichelli F., Cancedda R., Casari S., Hausard M., **Komlev V.**, Mastrogiacomo M., Peyr F. Non-destructive three-dimensional evaluation of a bone formation in porous hydroxyapatite ceramics loaded with bone marrow stromal cells by microtomography using synchrotron radiation // The Intern. J. of Artificial Organs. 2003. V. 26. P. 842.
23. Mastrogiacomo M., **Komlev V.S.**, Hausard M., Peyrin F., Turquier F., Casari S., Cedola A., Rustichelli F., Cancedda R. Synchrotron radiation microtomography of bone engineered from bone marrow stromal cells // Tissue Engineering. 2004. V. 10, 11-12. P. 1767-1774.
24. Hasegawa M., Sudo A., **Komlev V.S.**, Barinov S.M., Uchida A. High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution // J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater. 2004. V. 70B. P. 332-339.
25. Fadeeva I.V., Barinov S.M., **Komlev V.S.**, Fedotov D.A., Durisin J., Medvecky L. Apatite formation in the reaction-setting mixture of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - KH_2PO_4 system // J. Biomed. Mater. Res. 2004. V. 70A. P. 303-308.
26. Cedola A., Lagomarsino S., **Komlev V.**, Rustichelli F., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Milita S., Burghammer M. High spatial resolution X-ray microdiffraction applied to biomaterial studies and archeometry // Spectra Acta Part B. 2004. V. 59. p. 1557- 1564.

27. Barinov S.M., Bibikov V.Yu., Durisin J., Fadeeva I.V., Ferro D., **Komlev V.S.**, Medvecky L., Cesaro S. N., Rau J.V. Sintering of porous carbonated apatite bioceramics // Powder Met. Progr. 2004. V. 4, N 2. P. 95-103.
28. **Комлев В.С.**, Баринов С.М., Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Решетов И.В., Фадеева И.В., Кирсанова В.А. Пористые апатитовые биосовместимые матриксы для клеточных технологий реконструкции тканевых дефектов в хирургии // ДАН. 2005. Т. 401, № 1. С. 1-3.
29. Кубарев О.Л., Баринов С.М., Фадеева И.В., **Комлев В.С.** Пористые керамические гранулы на основе гидроксиапатита и трикальцийфосфата для клеточных технологий реконструкции тканевых дефектов в хирургии // Перспективные материалы. 2005. № 2. С. 34-42.
30. Sergeeva N.S., Reshetov I.V., Sviridova I.K., Kirsanova V.A., Achmedova S.A., Barinov S.M., **Komlev V.S.**, Samoylovich M.I., Belyanin A.F., Kleshceva S.M., Elinson V.M. The usage of three-dimensional nanostructured biomaterials in experimental and clinical oncology // J. Guangdong non-ferrous metals. 2005. V. 15. P. 355.
31. Sviridova I.K., Sergeeva N.S., Reshetov I.V., Kirsanova V.A., Achmedova S.A., Barinov S.M., **Komlev V.S.**, Fuljushin M.M. The usage of biotransplants (the autologous rat's mesenchymal stem cells on the ceramic granules) for reconstruction of bone defects // J. Guangdong non-ferrous metals. 2005. V. 15. P. 362.
32. Barinov S.M., Maitz M., Sergeeva N.S., Sviridova I.K., **Komlev V.S.**, Kubarev O., Kirsanova V., Reshetov I. In vitro and in vivo study of bi-phase calcium phosphate scaffolds of varying HA/TCP ratio // The Intern. J. of Artificial Organs. 2005. V. 28. P. 360.
33. Cedola A., Mastrogiacomo M., Giannini C., Guagliardi A., **Komlev V.**, Cancedda R., Rustichelli F., Lagomarsino S. Engineered bone from bone marrow stromal cells: a structural study by an advanced X-ray microdiffraction technique // Acta Cryst. 2005. A61. C64.
34. Hasegawa M., Sudo A., **Komlev V.S.**, Barinov S.M., Uchida A. Local delivery of antibiotics using hydroxyapatite with bi-modal pore size distribution // Key Eng. Mater. 2006. V. 309-311. P. 949-952.
35. Barinov S.M., Rau J.V., Fadeeva I.V., Nunziante Cesaro S., Ferro D., Trionfetti G., **Komlev V.S.**, Bibikov V.Yu. Carbonate loss from two magnesium-substituted carbonated apatites prepared by different synthesis techniques // Mater. Res. Bull. 2006. V. 41. P. 485-494.
36. Cedola A., Mastrogiacomo M., Burghammer M., **Komlev V.**, Giannoni P., Cancedda R., Rustichelli F., Favia A., Lagomarsino S. Structural study with advanced X-ray microdiffraction technique of bone regenerated by bone marrow stromal cells // J. Physics in Medicine and Biology. 2006. V. 51. P. N109-N116.
37. Фомин А.С., **Комлев В.С.**, Баринов С.М., Фадеева И.В., Ренгини К. Синтез нанопорошков гидроксиапатита для медицинских применений // Перспективные материалы. 2006. № 2. С. 51-55.
38. Чиссов В.И., Решетов И.В., Сергеева Н.С., Васильев А.В., Баринов С.М., Терских В.В., Свиридова И.К., **Комлев В.С.**, Кирсанова В.А., Батухина Е.В., Роговая В.С., Филюшин М.М. Клеточные технологии в замещении тканевых дефектов в онкологии // Вестник РАМН. 2006. № 6. С. 47-53.

39. Кубарев О.Л., **Комлев В.С.**, Баринов С.М., Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Солнцев К.А. Биокерамические гранулы с контролируемой кинетикой резорбции, предназначенные для терапии костных тканей // ДАН. 2006. Т. 409, № 1. С. 73-76.
40. Фомин А.С., Баринов С.М., Иевлев В.М., Фадеева И.В., **Комлев В.С.**, Белоногов Е.К., Тураева Т.Л. Наноразмерный гидроксипатит, синтезированный осаждением в растворе желатина // ДАН. 2006. Т. 411, № 3. С. 348-351.
41. **Komlev V.S.**, Peyrin F., Mastrogiacomo M., Cedola A., Papadimitropoulos A., Rustichelli F., Cancedda R. Kinetics of in vivo bone deposition by bone marrow stromal cells into porous calcium phosphate scaffolds: a X-ray computed microtomography study // Tissue Engineering. 2006. V. 12. P. 3442-3451.
42. Cedola A., Mastrogiacomo M., Burghammer M., Cancedda R., Rustichelli F., **Komlev V.**, Lagomarsino S. X-ray microdiffraction for engineered bone study: scaffold resorption analysis // Acta Cryst. 2006. A62, P. 40.
43. Сергеева Н.С., Решетов И.В., Баринов С.М., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., **Комлев В.С.**, Фадеева И.В., Ахмедова С.А., Филюшин М.М., Сергеева В.С. Использование пористой наноструктурированной биокерамики в качестве матриц для клеточных культур с целью замещения костных дефектов при опухолевых заболеваниях головы и шеи // Сибирский онкологический журнал. 2006. № S1. С. 118-119.
44. Сергеева Н.С., Решетов И.В., Баринов С.М., Штанский Д.В., Самойлович М.И., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., **Комлев В.С.**, Фадеева И.В., Клещева С.М., Филюшин М.М. Разработка и испытания in vitro неорганических нанобиоматериалов в качестве матриц для клеточных культур // Сибирский онкологический журнал. 2006. № S1. С. 119-120.
45. Кубарев О.Л., **Комлев В.С.**, Майтц М., Баринов С.М. Биоактивная композиционная керамика в системе гидроксипатит – трикальцийфосфат // ДАН. 2007. Т. 413, № 3. С. 360-362.
46. Бузник В.М., Козлова С.Г., Габуда С.П., Баринов С.М., Бибииков В.Ю., Фадеева И.В., **Комлев В.С.** Структурные изменения в карбонатзамещенном гидроксипатите при высоких температурах: исследования методами ЯМР ¹H- и КР-спектроскопии // ДАН. 2007. Т. 413, № 2. С. 198-201.
47. Papadimitropoulos A., Mastrogiacomo M., Peyrin F., Molinari E., **Komlev V.S.**, Rustichelli F., Cancedda R. Kinetics of in vivo bone deposition by bone marrow stromal cells within a resorbable porous calcium phosphate scaffold: a X-ray computed microtomography study // Biotechnology and Bioengineering. 2007. V. 98(1). P. 271-281.
48. Cedola A., Mastrogiacomo M., Lagomarsino S., Cancedda R., Giannini C., Guagliardi A., Ladisa M., Burghammer M., Rustichelli F., **Komlev V.** Orientation of mineral crystals by collagen fibers during in vivo bone engineering: an X-ray diffraction imaging study // Spectra Acta Part B. 2007. V. 62. P. 642-647.
49. Giuliani A., **Komlev V.**, Moroncini F., Pennesi G., Rustichelli F., Tasso R., Torrente Y. Comparative micro-CT analysis of two different scaffolds seeded with mouse or human mesenchymal stem cells undergone myoblastic differentiation // Tissue Engineering. 2007. V. 13(7). P. 1660-1661.

50. Sviridova I.K., Sergeeva N.S., Reshetov I.V., Barinov S.M., Frank G.A., Tepljakov V.V., Kirsanova V.A., Akmedova S.A., Agzamov D.S., Filjushin M.M., **Komlev V.S.**, Fadeeva I.V., Kozlov V.V., Bukharov A.V., Khesuani Yu. D. Synthetic and natural 3D scaffolds for MMSC in a bone defects repair experiments // *Tissue Engineering*. 2007. V. 13(7). P. 1760.
51. Mastrogiacomo M., Papadimitropoulos A., **Komlev V.S.**, Cedola A., Peyrin F., Giannoni P., Pearce S., Alini M., Rustichelli F., Cancedda R. Bone tissue engineering: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption // *An Intern. J. Connective Tissue Research*. 2007. V. 48(6). P. 343-344.
52. Кубарев О.Л., Баринов С.М., **Комлев В.С.** Распределение магния при синтезе бифазных фосфатов кальция // *ДАН*. 2008. Т. 418, № 2. С. 44-46.
53. Баринов С.М., Фадеева И.В., Ферро Д., Рау Дж.В., Нунцианте Чезаро С., **Комлев В.С.**, Фомин А.С. О стабилизации карбонат-содержащего гидроксиапатита изоморфным замещением кальция натрием // *ЖНХ*. 2008. Т. 53, № 2. С. 164-168.
54. Чиссов В.И., Свиридова И.К., Сергеева Н.С., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Филюшин М.М., Баринов С.М., Фадеева И.В., **Комлев В.С.**, Смирнов В.В. Исследование in vitro матриксных качеств поверхности отечественных пористых гранулированных кальций-фосфатных керамических материалов // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2008. № 2. С. 68-72.
55. Чиссов В.И., Свиридова И.К., Сергеева Н.С., Франк Г.А., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Решетов И.В., Филюшин М.М., Баринов С.М., Фадеева И.В., **Комлев В.С.** Исследование in vivo биосовместимости и динамики замещения дефекта голени крыс пористыми гранулированными биокерамическими материалами // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2008. № 3. С. 151-156.
56. Смирнов В.В., Федотов А.Ю., **Комлев В.С.**, Баринов С.М. Цементные и керамические пористые материалы на основе гидроксиапатита // *Перспективные материалы*. 2008. № 5. С. 49-53.
57. Cancedda R., Mastrogiacomo M., Giannoni P., Alini M., Pearce S., Cedola A., Papadimitropoulos A., Peyrin F., **Komlev V.**, Rustichelli F. Cell therapy of bone // *European Cells and Materials*. 2008 V. 16(Suppl. 2). P. 18.
58. Renghini C., Girardin E., Fomin A.S., Manescu A., Sabbioni A., Barinov S.M., **Komlev V.S.**, Albertini G., Fiori F. Plasma sprayed hydroxyapatite coatings from nanostructured granules // *Mater. Sci. Eng. B*. 2008. V. 152. P. 86-90.
59. Barinov S.M., **Komlev V.S.**, Smirnov V.V., Fadeeva I.V., Fomin A.S. Advanced nanoceramics for bone tissue engineering // *Powder Met. Progr*. 2008. V. 8. P. 331-335.
60. Bakunova N.V., **Komlev V.S.**, Fedotov A.Y., Fadeeva I.V., Smirnov V.V., Shvorneva L.I., Gurin A.N., Barinov S.M. A method of fabrication of porous carbonated hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering // *Powder Met. Progr*. 2008. V. 8. P. 336-342.
61. Баринов С.М., Фомин А.С., Иевлев В.М., Бакунова Н.В., **Комлев В.С.**, Ферро Д., Фадеева И.В., Михайлов Б.П., Белоногов Е.К., Смирнов В.В., Федотов А.Ю. Нанопорошки и нанокристаллическая гидроксиапатитовая биокерамика // *Перспективные материалы*. 2008. № 5. С. 1-7.
62. Гурин А.Н., **Комлев В.С.**, Федотов А.Ю., Фадеева И.В., Смирнов В.В., Баринов С.М. Влияние хитозанового матрикса, содержащего гранулы

карбонатгидроксиапатита, на заживление костных дефектов в эксперименте // Перспективные материалы. 2008. № 5. С. 9-15.

63. Gurin A.N., **Komlev V.S.**, Fedotov A.Yu., Sergeeva N.S., Sviridova I.K., Kirsanova V.A., Fadeeva I.V., Smirnov V.V., Barinov S.M. Characterization and in vitro evaluation of chitosan-carbonate apatite-citric acid nanocomposite scaffolds // Tissue Engineering. Part A. 2009. V. 15. P. O-11.

64. Gurin A.N., **Komlev V.S.**, Fadeeva I.V., Smirnov V.V., Barinov S.M. In vivo evaluation of carbonated hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering // Tissue Engineering. Part A. 2009. V. 15. P. O-11-12.

65. Cancedda R., Mastrogiacomo M., Papadimitropoulos A., **Komlev V.**, Rustichelli F. Bulk and interface investigations of a Si-TCP/HA porous ceramic scaffold and tissue engineered bone by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction // Tissue Engineering. Part A. 2009. V. 15. P. 681.

66. Fedotov A.Y., **Komlev V.S.**, Smirnov V.V., Fomin A.S., Fadeeva I.V., Sergeeva N.S., Sviridova I.K., Kirsanova V.A., Barinov S.M. Porous composite materials chitosan – bioactive calcium compound particulate for bone tissue engineering // Tissue Engineering. Part A. 2009. V. 15. P. 727.

67. **Комлев В.С.**, Фадеева И.В., Гурин А.Н., Ковалева Е.С., Смирнов В.В., Гурин Н.А., Баринов С.М. Влияние содержания карбонат-групп в карбонатгидроксиапатитовой керамике на ее поведение in vivo // Неорг. материалы. 2009. Т.45, № 3. С. 373–378.

68. **Komlev V.S.**, Mastrogiacomo M., Peyrin F., Cancedda R., Rustichelli F. X-ray synchrotron radiation pseudo-holotomography as a new imaging technique to investigate angio- and microvasculogenesis with no usage of contrast agents // Tissue Engineering. Part C. 2009. V. 15. P. 425-430.

69. Scheiner S., Sinibaldi R., Pichler B., **Komlev V.**, Renghini C., Vitale-Brovarone C., Rustichelli F., Hellmich C. Micromechanics of bone tissue-engineering scaffolds, based on resolution error-cleared computer tomography // Biomaterials. 2009. V. 30. P. 2411–2419.

70. Renghini C., **Komlev V.**, Fabrizio F., Verne E., Baiono F., Vitale-Brovarone C. Micro-CT studies on 3-D bioactive glass-ceramics scaffolds for bone regeneration // Acta Biomaterialia. 2009. V. 5. P. 1328-1337.

71. Rau J.V., Generosi A., Laureti S, **Komlev V.S.**, Ferro D., Nunziante Cesaro S., Paci B., Rossi Albertini V., Agostinelli E., Barinov S.M. Physicochemical investigation of pulsed laser deposited carbonated hydroxyapatite films on titanium // Applied Materials & Interface. 2009. V. 1. P. 1813-1820.

72. Tasso R., Tortelli F., Mastrogiacomo M., **Komlev V.S.**, Rustichelli F., Peyrin F., Cancedda R. In vivo recruitment of two “waves” of host’s stem/progenitor cells by exogenous mesenchymal stem cells seeded onto porous ceramic scaffolds and role of endothelial progenitors in the new bone formation // European Cells and Materials. 2009. V 18. Suppl. 1. P 18.

73. Generosi A., Rau J.V., **Komlev V.S.** Albertini V.R., Fedotov A.Yu., Barinov S.M. Anomalous hardening behavior of a calcium phosphate bone cement // J. Phys. Chem. B. 2010. V. 114. P. 973-979.

74. **Komlev V.S.**, Mastrogiacomo M., Pereira R.C., Peyrin F., Rustichelli F., Cancedda R. Biodegradation of porous calcium phosphate scaffolds in an ectopic bone formation model

studied by x-ray computed microtomography // *European Cells and Materials*. 2010. V 19. P. 136-146.

75. Rau J.V., **Komlev V.S.**, Generosi A., Fosca M., Albertini V.R., Barinov S.M. In situ time-resolved X-ray diffraction study of octacalcium phosphate transformations under physiological conditions // *J. Crystal Growth*. 2010. V. 312. P. 2113-2116.

76. Баринов С.М., Иевлев В.М., **Комлев В.С.**, Кушев С.Б., Пономарев Ю.А., Синельников А.А., Солдатенко С.А. Морфологические изменения при термическом отжиге нанопорошков гидроксиапатита // *Конденс. среды и межфазн. границы*. 2010. № 1. С. 54-58.

77. Кубарев О.В., **Комлев В.С.**, Баринов С.М. Биоактивные керамические композиционные материалы в системе гидроксиапатит – трикальцийфосфат // *Материаловедение*. 2010. № 2. С. 28-33.

78. **Комлев В.С.**, Фадеева И.В., Фомин А.С., Шворнева Л.И., Ферро Д., Баринов С.М. Синтез октакальцийфосфата осаждением из раствора // *ДАН*. 2010. Т. 432, № 2. С. 178-182.

79. Бакунова Н.В., **Комлев В.С.**, Шворнева Л.И., Федотов А.Ю., Фомин А.С., Баринов С.М., Иевлев В.М., Пономарёв Ю.А., Солдатенко С.А. Влияние термообработки на характеристики нанопорошков гидроксиапатита // *Материаловедение*. 2010. № 4. С. 38-43.

80. Федотов А.Ю., **Комлев В.С.**, Смирнов В.В., Фадеева И.В., Баринов С.М., Иевлев В.М., Солдатенко С.А., Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А. Гибридные композиционные материалы на основе хитозана и желатины, армированные гидроксиапатитом, для тканевой инженерии // *Материаловедение*. 2010. № 7, С. 41-46.

81. Бакунова Н.В., Баринов С.М., Иевлев В.М., **Комлев В.С.**, Титов Д.Д. Влияние термообработки на спекание и прочность керамики из нанопорошков гидроксиапатита // *Материаловедение*. 2010. № 12, С. 11-15.

82. Гурин А.Н., Григорьянц Л.А., Григорьян А.С., **Комлев В.С.**, Фадеева И.В. Экспериментально-клиническое обоснование применения материалов на основе фосфатов кальция для заполнения костных дефектов челюстных костей // *Медицинский алфавит. Стоматология I*. 2010. № 1, С. 32-34.

83. Rau J.V., Fosca M., **Komlev V.S.**, Fadeeva I.V., Albertini V.R., Barinov S.M. In situ time-resolved studies of octacalcium phosphate and dicalcium phosphate dihydrate in simulated body fluid: co-operative interactions and nanoapatite crystal growth // *Crystal Growth & Design*. 2010. V. 10. P 3824-3834.

84. Rau J.V., Generosi A., **Komlev V.S.**, Fosca M., Barinov S.M., Albertini V.R. Real-time monitoring of the mechanism of poorly crystalline apatite cement conversion in the presence of chitosan, simulated body fluid and human blood // *Dalton Transactions*. 2010. V. 39. P. 11412–11423.

85. **Komlev V.S.**, Fadeeva I.V., Barinov S.M., Rau J.V., Fosca M., Gurin A.N., Gurin N.A. Phase development during setting and hardening of a bone cement based on α -tricalcium- and octacalcium phosphates // *J. Biomater. Appl.* 2011. doi: 10.1177/0885328210390403.

86. Федотов А.Ю., **Комлев В.С.**, Гольдберг М.А., Смирнов В.В., Свиридова И.К., Сергеева Н.С., Кирсанова В.А., Иевлев В.М., Баринов С.М. Высокопористые

композиционные материалы в системе биополимер–кальцит для тканевой инженерии // ДАН. 2011. Т. 437, № 1. С. 65-67.

87. **Комлев В.С.**, Фадеева И.В., Гурин А.Н., Шворнева Л.И., Бакунова Н.В., Баринов С.М. Новые кальцийфосфатные цементы на основе трикальцийфосфата // ДАН. 2011. Т. 437, № 3. С. 366-369.

Патенты

88. Баринов С.М., Смирнов В.В., Фадеева И.В., **Комлев В.С.**, Бибииков В.Ю. Шихта для карбонат гидроксиапатитовой керамики. Патент РФ № 2280017. 2006.

89. Баринов С.М., Смирнов В.В., Фадеева И.В., **Комлев В.С.**, Кубарев О.Л. Материал для замещения дефектов костной ткани. Патент РФ № 2281121. 2006.

90. **Комлев В.С.**, Баринов С.М. Композиционный материала для заполнения костных дефектов. Патент РФ № 2297249. 2007.

91. **Комлев В.С.**, Баринов С.М., Кубарев О.Л. Способ изготовления пористых керамических гранул фосфатов кальция. Патент РФ № 2299869. 2007.

92. **Комлев В.С.**, Баринов С.М. Способ изготовления гидроксиапатитовой керамики с бимодальным распределением пор. Патент РФ № 2303580. 2007.

93. Чиссов В.И., Баринов С.М., Сергеева Н.С., Решетов И.В., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Фадеева И.В., **Комлев В.С.**, Ахмедова С.А., Филюшин М.М. Материал для закрытия костных дефектов при реконструктивно-пластических операциях. Патент РФ № 2333010. 2008.

94. Смирнов В.В., Федотов А.Ю., Баринов С.М., **Комлев В.С.**, Фадеева И.В., Тютюкова Ю.Б. Способ получения пористых губок на основе хитозана для заполнения костных дефектов. Патент РФ № 2356581. 2009.

95. Баринов С.М., Смирнов В.В., **Комлев В.С.**, Чиссов В.И., Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А. Пористый синтетический коралл для реконструкции костных дефектов и способ его получения. Патент РФ № 2368354. 2009.

96. Баринов С.М., Смирнов В.В., Федотов А.Ю., **Комлев В.С.**, Фадеева И.В., Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А. Пористые композиционные материалы на основе хитозана для заполнения костных дефектов. Патент РФ № 2376019. 2009.

97. Положительное решение на выдачу патента Заявка № 2009134778 Пористый композиционный материал на основе хитозана и желатина, содержащий октакальцийфосфат для заполнения костных дефектов. Авторы: Баринов С.М., Федотов А.Ю., **Комлев В.С.**, Фадеева И.В., Смирнов В.В.

