

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
(ФАНО РОССИИ)
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ МЕТАЛЛУРГИИ И
МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЯ ИМ. А.А. БАЙКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Тетерина Анастасия Юрьевна

**КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ
КАЛЬЦИЯ И БИОПОЛИМЕРОВ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ
КОСТНЫХ ТКАНЕЙ**

Специальность 05.17.11 – Технология силикатных и тугоплавких
неметаллических материалов

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
д.т.н., профессор РАН
Комлев Владимир Сергеевич

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ..... | 4 |
| ВВЕДЕНИЕ..... | 6 |
| ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 14 |
| 1.1. Материалы для замещения и регенерации костной ткани..... | 14 |
| 1.2. Материалы медицинского назначения на основе фосфатов кальция..... | 16 |
| 1.3. Кальций фосфатные цементы..... | 19 |
| 1.3.1. Основные принципы формирования КФЦ..... | 19 |
| 1.3.2. Апатитовые цементы..... | 22 |
| 1.3.3. Брушитовые цементы..... | 23 |
| 1.3.4. Свойства КФЦ..... | 24 |
| 1.3.4.1. Время схватывания..... | 24 |
| 1.3.4.2. Пористость КФЦ..... | 26 |
| 1.3.4.3. Резорбируемость..... | 26 |
| 1.3.4.4. Прочность..... | 27 |
| 1.3.4.5. Инъецируемость..... | 28 |
| 1.4. Композиционные кальцийфосфатные цементы..... | 31 |
| 1.4.1. Дисперсное упрочнение..... | 31 |
| 1.4.2. Армирование волокнами..... | 36 |
| 1.4.3. Полимер – кальцийфосфатные цементные материалы...37 | |
| 1.5. Применение кальций фосфатных цементов для замещения и регенерации костной ткани..... | 43 |
| 1.6. Выводы на основании литературного обзора..... | 49 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 52 |
| 2.1. Исходные материалы..... | 52 |
| 2.1.1. Синтез порошков АФК и ТТКФ..... | 52 |
| 2.1.2. Цементная жидкость..... | 53 |
| 2.1.3. Армирующие компоненты..... | 54 |

| | |
|--|-----|
| 2.1.4. Модифицирование порошка АФК катионами магния и цинка..... | 54 |
| 2.2. Методы исследования..... | 55 |
| 2.2.1. Рентгенофазовый анализ..... | 55 |
| 2.2.2. Инфракрасная спектроскопия..... | 56 |
| 2.2.3. Химический анализ (спектральный анализ)..... | 56 |
| 2.2.4. Сканирующая электронная микроскопия..... | 57 |
| 2.2.5. Просвечивающая электронная микроскопия..... | 58 |
| 2.2.6. Механические испытания..... | 58 |
| 2.2.7. Время схватывания КФЦ..... | 59 |
| 2.2.8. Исследование кинетики деградации..... | 59 |
| 2.2.9. Испытания <i>in vitro</i> образцов КФЦ на модели первичной клеточной линии для оценки острой цитотоксичности... | 60 |
| ГЛАВА 3. КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ И БИОПОЛИМЕРОВ..... | 63 |
| ГЛАВА 4. МОДИФИЦИРОВАНИЕ КОМПОЗИЦИОННЫХ КФЦ КЕРАМИЧЕСКИМИ И АЛЬГИНАТНЫМИ ГРАНУЛАМИ..... | 81 |
| 4.1. Упрочнение керамическими гранулами..... | 81 |
| 4.2. Армирование гранулами полисахарида..... | 87 |
| ГЛАВА 5. КОМПОЗИЦИОННЫЕ КФЦ, СОДЕРЖАЩИЕ КАТИОНЫ МАГНИЯ И ЦИНКА..... | 94 |
| ГЛАВА 6. КИНЕТИКА РАСТВОРИМОСТИ КФЦ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ..... | 100 |
| 6.1. Кинетические особенности деструкции КФЦ..... | 100 |
| 6.2. Биологические испытания <i>in vitro</i> КФЦ..... | 105 |
| ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ..... | 111 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ..... | 113 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ 1..... | 128 |

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АФК** – аморфный фосфат кальция;
- АНФ** - аморфно-нанокристаллическая фаза;
- ГА** – гидроксипатит;
- ДКФ** – дикальцийфосфат;
- ДКФД** – дикальцийфосфат двухводный;
- ИК-спектроскопия** – инфракрасная спектроскопия;
- КФЦ** – кальцийфосфатный цемент;
- МКФМ** – монокальциевый фосфат моногидрат;
- ОКФ** – октакальций фосфат;
- ПЖК** – пул жизнеспособных клеток
- ПРС** – полная ростовая среда;
- ПЭМ** – просвечивающая электронная микроскопия;
- РФА** – рентгенофазовый анализ;
- РЭМ** – растровая электронная микроскопия;
- СЭМ** – сканирующая электронная микроскопия;
- ТКФ** – трикальцийфосфат;
- ТТКФ** – тетракальцийфосфат;
- ФК** – фосфаты кальция;
- ФЧ** – фибробласты человека;
- ЦЖ** – цементная жидкость;
- AlgNa** – альгинат натрия;
- SBF** – simulation body fluid (жидкость, моделирующая внеклеточную жидкость организма);
- Биодеградация** – способность материала растворяться в контакте с тканями организма;

Остеокондуктивность – способность материала поддерживать жизнедеятельность остеобразующих клеток и образование новой костной ткани;

Остеоиндуктивность – способность материала вызывать эктопическое (вне кости) формирование костной ткани (*de novo*).

ВВЕДЕНИЕ

Восстановление костной ткани является актуальной медицинской проблемой, ее значимость обусловлена распространенностью патологических состояний костной ткани, возникающих, в частности, в результате травм, опухолевого (первичного и метастатического) поражения, возрастного остеопороза [1]. Традиционно при реконструктивно-пластических операциях для восполнения объема утраченной костной ткани применяют алло- и аутографты (фрагменты кости донора или собственной кости пациента, соответственно). Недостатки этих материалов хорошо известны: получение аутоматериала связано с дополнительными хирургическими вмешательствами для пациента и применимо лишь при небольших объемах дефекта; имплантация аллогенной костной ткани не исключает переноса инфекционных агентов от донора к реципиенту, аллергических реакций и имеет ряд проблем этического характера. Это ограничивает прогресс в хирургических подходах и, соответственно, расширение показаний к хирургическим вмешательствам [2-3].

Одним из рациональных путей решения проблемы могло бы стать использование синтетических биосовместимых материалов с оптимизированными в плане остеозамещения свойствами. Наиболее перспективны материалы на основе фосфатов кальция (ФК), близкие по составу к минеральной составляющей костной ткани. Кальцийфосфатные цементы (КФЦ) представляют собой реакционно - твердеющие системы, состоящие из порошка и жидкости, при смешении которых происходит химическое взаимодействие, сопровождающееся схватыванием и последующим твердением [4]. К несомненным достоинствам этих материалов можно отнести, во-первых, их способность заполнять дефекты самой сложной конфигурации и объема, во-вторых, малую инвазивность вмешательств, то есть возможность введения данных материалов в

инъекционной форме непосредственно в зону дефекта под контролем УЗИ или рентгена, т.е. без обширных оперативных вмешательств, и наконец, возможность трехмерной фиксации костной ткани пациента.

Основным недостатком таких материалов является их высокая хрупкость. Сравнительно новым подходом является создание композиционных материалов по цементной технологии на основе ФК и биополимеров, в которых полимерная составляющая образует каркас, придающий цементному материалу необходимую деформируемость, при сохранении биосовместимости и биоактивности за счет наличия кальцийфосфатной фазы. Формирование полимерного каркаса может происходить одновременно с процессом образования неорганических фаз. В результате в процессе схватывания будет образовываться эластичный полимерный каркас, армированный дисперсными частицами фосфатов, упрочняющих каркас и придающих материалу биоактивность [5-7].

В проблеме создания композиционных КФЦ существуют фундаментальные и прикладные задачи, которые необходимо решить. Это создание КФЦ с заданной формуемостью, способностью к полному заполнению дефекта *in situ*, регулируемой скоростью схватывания и твердения, контролируемой кинетикой биодеградации, заданными пористостью и механическими свойствами.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук. Представленные в работе результаты являются частью исследований, проведенных при поддержке гранта РФФИ № 12-03-00079 «Создание новых композиционных костных цементов биополимер - фосфаты кальция с улучшенными свойствами» и Соглашения № 0015042 для финансирования НИР по теме «Создание композиционных реакционно-твердеющих систем биополимер-фосфаты кальция для заполнения костных дефектов» победителя конкурса «Участник молодежного научно-инновационного

конкурса» («УМНИК»); Соглашения № 14.604.21.0132 (уникальный идентификатор ПНИ RFMEF 160414X0132) между Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук (ИМЕТ РАН) и Федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России) о предоставлении гранта в рамках реализации федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 28 ноября «2013» г. № 1096.

Целью работы является развитие физико – химических основ технологии получения композиционных материалов в системах биополимер – фосфаты кальция, обладающих повышенной деформируемостью.

Для достижения поставленной цели в ходе работы решались следующие задачи:

1. Установление условий формирования непрерывного полимерного каркаса, армированного частицами ФК, в процессе схватывания и твердения цемента в зависимости от параметров вяжущей системы и условий проведения процесса.
2. Изучение влияния полимерного компонента на кинетику фазообразования, фазовый состав и морфологические характеристики кальцийфосфатных фаз, в том числе на микроструктуру материала и его прочностные свойства.
3. Исследование возможности повышения прочностных характеристик материала армированием гранулами ФК и резорбируемого полисахарида. Выявление закономерностей влияния армирующих фаз на прочностные свойства и микроструктуру.

4. Изучение влияния на формирование микроструктуры и физико – химические свойства материалов физиологически важных катионов: магния и цинка.
5. Выявление кинетических особенностей деградации в модельных жидкостях организма человека разработанных материалов и исследование их биологических свойств *in vitro*.

Научная значимость

Разработаны композиционные КФЦ на основе АФК, ТТКФ и высокомолекулярного хитозана (600 кДа), в которых в процессе схватывания формируется непрерывный полимерный каркас, придающий затвердевшему цементу повышенную по сравнению с известными аналогами деформацию до разрушения. Изучены особенности формирования микроструктуры цементов и их механические свойства в зависимости от состава (соотношение компонентов твердая фаза/жидкая фаза) и условий схватывания и твердения (значение рН, выдержка на воздухе и в жидкостях, моделирующих внеклеточную жидкость организма).

Выявлены особенности упрочнения композиционных КФЦ, армированных керамическими гранулами ТКФ (100-200 и 300-500 мкм с содержанием до 30 масс. %) и альгината натрия (100-200 и 300-50 мкм с содержанием до 5 масс. %). Установлена немонотонность изменения значений прочности при сжатии от содержания гранул. Исследованы структурные изменения цементов, армированных гранулами альгината натрия в процессе формирования пористости *in situ* в условиях, моделирующих внеклеточную жидкость организма.

Установлено влияние физиологически важных катионов магния (Mg^{2+}) и цинка (Zn^{2+}) (1, 2 и 5 % замещения по кальцию) на формирование микроструктуры композиционных КФЦ и их механические свойства при различных условиях схватывания (выдержка на воздухе и в жидкостях, моделирующих внеклеточную жидкость организма).

Выявлены кинетические особенности растворения разработанных материалов. Для композиционных цементов КФЦ, установлено, что переход во времени закона растворения к экспоненциальному, соответствует кинетике скоростей реакций первого порядка. Армирование композиционных КФЦ гранулами ТКФ не оказывает влияния на растворимость цементов, а армирование гранулами альгината натрия приводит к обратной зависимости.

Практическая значимость

Созданы композиционные КФЦ, различные по фазовому составу, структуре, механическим и биологическим свойствам, которые могут найти широкое применение для замещения дефектов костных тканей.

Разработан технологический регламент изготовления композиционных систем биополимер - фосфаты кальция с заданной скоростью схватывания и твердения, контролируемой кинетикой биodeградации, заданными пористостью и механическими свойствами. Изготовлены лабораторные партии материалов. В сотрудничестве с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации проведены сравнительные биологические исследования *in vitro* для выбора оптимального состава.

Разработанные КФЦ были использованы для получения композиционных функционально – ориентированных трехмерных каркасов на основе полимера – фосфатов кальция методом прототипирования.

По результатам работы получен патент РФ № 2485978 (от 07.06.2012) «Пористый кальций - фосфатный цемент» и поданы заявки на патент № 2015144535 (от 16.10.2015) «Способ получения композиционного трёхмерного каркаса для замещения костно – хрящевых дефектов» и № 2016126010 (от 29.06.2016) «Гидрогель для получения композиционных материалов с антибактериальной активностью для замещения костно – хрящевых дефектов методом 3D печати».

На защиту выносятся:

1. Закономерности формирования композиционных КФЦ на основе фосфатов кальция и биополимеров на микроструктуру и механические свойства.
2. Закономерности упрочнения композиционных КФЦ армированных органическими и неорганическими наполнителями в зависимости от их состава, содержания и размера в условиях, моделирующих внеклеточную жидкость организма.
3. Закономерности формирования микроструктуры композиционных КФЦ и их механические свойства при введении в их состав физиологически важных катионов магния и цинка в различных условиях.
4. Особенности растворения разработанных материалов и результаты биологических испытаний *in vitro*.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: Всероссийские конференции аспирантов и молодых научных сотрудников «Физико-химия и технология неорганических материалов» Москва, 2013, 2014, 2015; Всероссийское совещание «Биоматериалы в медицине» Москва, 2013, 2015; конференция «Нанотехнологии в онкологии» Москва, 2013; Международная конференция «Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества» Суздаль, 2015; Training School COST Action NAMABIO MP1005 3rd Course, Загреб, Хорватия, 2014; конгресс TERMIS EU Chapter Meeting, Генуя, Италия, 2014; Training School COST Action NAMABIO MP1005 4rd Course, Никозия, Кипр, 2015; International Conference Unified scientific approaches towards regenerative orthopaedics and dentistry. Венеция, Италия, 2015; World conference on regenerative medicine. Лейпциг, Германия, 2015.

Публикации

По результатам проведенных исследований опубликовано 32 работы, в том числе 15 статей в журналах рекомендованных ВАК, 14 тезисов докладов трудов конференций, получен 1 патент РФ и поданы 2 заявки на патент РФ.

Достоверность полученных результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена применением современных приборов и методов, сопоставлением полученных результатов с данными других исследований в области создания материалов для замещения костной ткани и применением статистических методов обработки результатов.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 138 страницах машинописного текста, иллюстрирована 41 рисунком и 12 таблицами, а так же содержит 1 приложение. Список цитируемой литературы содержит 149 ссылок. Работа состоит из введения, списка используемых сокращений, 6 глав, включая литературный обзор, описание материалов и методов исследования, экспериментальную часть, а также выводов и списка литературы.

Автор диссертации выражает благодарность научному руководителю д.т.н., проф. РАН Комлеву Владимиру Сергеевичу за руководство работой и неоценимую помощь в планировании, обсуждении и оформлении результатов диссертационной работы. За помощь в планировании и интерпритации полученных данных зав. лаборатории № 20 ИМЕТ РАН чл.-корр. РАН, заслуженному деятелю науки РФ Баринову Сергею Мироновичу. За помощь в проведении экспериментов и исследований огромная благодарность всем сотрудникам лаборатории № 20 и особенно – к.т.н. Федотову А.Ю., к.т.н. Егорову А.А., а также аспирантам Смирнову И.В. и Зобкову Ю.В., и заведующей аспирантурой ИМЕТ РАН Тютьковой Ю.Б. за постоянную поддержку и помощь.

Отдельная благодарность за проведение рентгенофазовых исследований к.ф.-м.н. Л.И. Шворневой и к.т.н. Сиротинкину В.П.; за проведение ИК-спектроскопии и измерение удельной площади поверхности С.В. Куцеву. За постановку и проведение испытаний *in vitro* сотрудникам ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации проф., д.б.н. Н.С. Сергеевой, к.б.н. И.К. Свиридовой, к.б.н. В.А. Кирсановой, С.А. Ахмедовой.

1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Материалы для замещения и регенерации костной ткани

Важнейшими задачами настоящего времени являются увеличение продолжительности и улучшение качества жизни людей. В связи с этим предъявляются более высокие требования к качеству медицинского обслуживания и лечения пациентов, что требует разработки новых подходов к лечению больных, внедрения новых технологий и связанной с этим разработки новых материалов. Особую проблему представляет разработка новых материалов медицинского назначения (медицинские изделия), предназначенных для контакта со средой живого организма и необходимых для реконструктивной медицины [8-11]. Еще более востребованы специализированные биосовместимые материалы для сформировавшегося в последние годы нового направления – клеточной и тканевой инженерии, связанного с разработкой биоискусственных органов. Исследования в области материалов медицинского назначения выступают одним из актуальных направлений, соответствуют задачам и уровню развития науки, технологий и техники РФ и перечню критических технологий Российской Федерации, в котором приоритетным направлением является «Технологии создания биосовместимых материалов». Освоение новых биосовместимых материалов и создание специализированных биомедицинских изделий из них становится лидирующим направлением исследований и коммерциализации в настоящее время. Ежегодный бюджет медицинских центров в Европе, Японии и США, занимающихся проведением фундаментально-прикладных исследований в области тканевой и клеточной инженерии, составляет сотни миллионов долларов США [12-14]. В настоящее время в России не производится в коммерческих масштабах специализированных биомедицинских изделий, в то время как потребность в этих материалах

велика, поэтому медучреждения вынуждены закупать их за рубежом, что чрезвычайно невыгодно с экономической точки зрения. Налаживание производства этих материалов в России является важнейшей задачей. Серьезной проблемой современной восстановительной хирургии в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии является пластика дефектов костной ткани, образующихся при хирургическом лечении ряда заболеваний и повреждений кости. Результаты хирургического восстановления дефектов костной ткани в большей степени зависят от протекания процесса репаративного остеогенеза [15]. Отдаленные сроки клинических исследований указывают на то, что репаративный остеогенез в посттравматических дефектах костной ткани проходит медленно – месяцы и годы, а в ряде случаев костные дефекты не заполняются костной тканью.

В идеальном случае, по своей форме, составу, микроструктуре, архитектонике и биомеханическим свойствам материал для замещения костно-хрящевых дефектов должен быть максимально приближен к нативному межклеточному матриксу ткани [16]. Биосовместимый материал должен способствовать эффективному прикреплению (адгезии) к его поверхности клеток требуемых типов, не проявляя при этом токсичности и иммуногенности. Он должен обеспечивать механическую прочность и устойчивость формы, размеров и внутренней структуры конструкции, достаточные как для ее имплантации, так и последующего ремоделирования с ее помощью костно-хрящевой ткани. Необходимым условием является высокая пористость матрикса (около 70 - 90 %) с взаимосвязанными пора́ми размером 100 – 1000 мкм для обеспечения направленного роста клеток внутрь объема и поддержания их жизнедеятельности [17-19]. Скорость биодеградации такого материала должна коррелировать со скоростью формирования костно-хрящевой ткани в каждом конкретном случае, а сам процесс не должен провоцировать иммунных реакций. Материал должен

быть легко стерилизуем для исключения внесения и распространения инфекций.

1.2. Материалы медицинского назначения на основе фосфатов кальция

В настоящее время для замещения костной ткани применяют широкий спектр материалов на основе фосфатов кальция, например высокотемпературную керамику, стеклокерамику, реакционно-твердеющие системы, а так же различные композиционные материалы. Все эти материалы обладают своими преимуществами, как и недостатками, которые и определяют спектр их применения в медицине [20].

Кальцийфосфатная керамика – материал, получаемый традиционной керамической технологией - спеканием на высокие температуры предварительно спрессованного порошка. Высокотемпературная керамика на основе ГА и ТКФ наиболее распространенный материал для замещения костных дефектов, благодаря своей высокой биосовместимости. Однако она обладает низкой скоростью резорбции. Возможным способом решения данной проблемы считается создание открытой системы макропор в керамическом имплантате. Несмотря на то, что прочностные свойства керамики падают с увеличением ее пористости, в случае использования биокерамики наблюдается прорастание костной ткани через имплантат, что обеспечивает значительное улучшение механических свойств за счет биологической фиксации [21].

Спекание керамики проводят при высоких температурах 800-1200 °С, в результате чего на фазовый состав таких материалов налагаются определенные ограничения, поскольку не все фосфаты кальция могут существовать при таких температурах. В связи с этим основной фазовой составляющей высокотемпературной керамики могут быть: тетракальциевого фосфата $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$, гидроксиапатита $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$, трикальциевого

фосфата в виде α и β модификаций ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), пирофосфата кальция в виде β модификации ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) и полифосфата кальция в виде α и β модификаций ($\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$), а также ренанитов и ренанитоподобных соединений [22, 23].

Композиционная керамика

Для достижения необходимой скорости резорбции материала имплантата в среде организма проводятся множество исследовательских работ по созданию композиционных керамических материалов, состоящих из фаз с различным значением растворимости. Наиболее ярким примером может служить бифазная керамика на основе ГА-ТКФ, в которой трикальцийфосфатная фаза используется в качестве более растворимого компонента системы, а гидроксиапатит служит матриксом, отвечающим за прочностные характеристики и целостность системы [24]. Такие композиты могут быть получены путем смешения исходных компонентов с последующим проведением реакции при высокой температуре, либо при разложении кальцийдефицитного гидроксиапатита с заданным соотношением Ca/P [25]. Второй метод является более предпочтительным, так как обеспечивает большую равномерность распределения компонентов.

Кроме трикальцийфосфата так же часто используют в качестве резорбируемой фазы карбонат кальция, фосфатные стекла, а так же смешанные фосфаты.

Биоактивные стекла (в системе $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$) проявляют высокую биоактивность и биосовместимость [26]. При создании большинства стекол используется состав марки "45S5": 24.5% вес. Na_2O , 24.5 % вес. CaO , 45.0 % вес. SiO_2 , 6 % вес. P_2O_5 . Варьируя состав стекломатериалов, можно существенно изменять их биоактивность и резорбируемость.

В медицине в настоящее время используется несколько типов стеклокерамических композитов. Один из них – так называемая стеклокерамика, которую получают кристаллизацией ГА или/и волластонита

CaSiO_3 из стекломатрицы в процессе термической обработки [27]. Биоактивная стеклокерамика имеет прочность в среднем около 100 МПа.

Композиционные материалы ГА/стекло получают при помощи отжига при температурах 800-1000 °С, поскольку при таких температурах гидроксипатит не вступает в химическое взаимодействие со стеклом. Также часто используют подход легирования ГА-керамики добавками биостекла для улучшения прочностных характеристик и увеличения плотности материала. При этом определённые добавки стекла могут активировать деградацию ГА с образованием ТКФ.

Кальцийфосфатные покрытия

Фосфаты кальция находят широкое применение в качестве материала для покрытий металлических имплантатов (в основном титана и его сплавов) [28]. Основное применение металлических имплантатов – замещение дефектов костной ткани, несущих значительные механические нагрузки, но большинство металлов токсичны для организма и вызывают негативную реакцию тканей. В результате основной функцией покрытий на основе фосфатов кальция является быть промежуточным звеном между металлом и средой, минимизируя отрицательную реакцию организма и препятствуя выходу токсичных ионов металлов. Так же покрытия обеспечивают остеоинтеграцию имплантата с костной тканью и соответственно его фиксацию в дефекте.

Распространенный способ получения покрытий – плазменное напыление. Толщина покрытий, полученных таким методом, 40-200 мкм. Покрытие должно быть достаточно толстым (с учетом резорбции ГА со скоростью 15-30 мкм в год), поскольку с увеличением толщины соответственно уменьшается влияние металла на организм. Однако, данный тип материалов также обладает целым рядом недостатков, связанных с деградацией керамических покрытий, увеличением скорости резорбции костной ткани вокруг протеза из-за большой жесткости материала

имплантатов по сравнению с костной тканью, а также возможность отрицательной реакции организма на титан и его сплавы [29].

Кальцийфосфатные цементы (реакционно – твердеющие системы), в общем случае, представляют собой гетерогенную композицию, и включает одну или более твердую дисперсную фазу (наполнитель) и цементную жидкость (связующее). При взаимодействии этих компонентов происходят процессы схватывания и твердения.

1.3. Кальцийфосфатные цементы

1.3.1. Основные принципы формирования КФЦ

Кальцийфосфатные цементы представляют собой вяжущие системы, состоящие из порошка и жидкости, при смешении которых происходит химическое взаимодействие, сопровождающееся схватыванием и последующим твердением (рисунок 1.3.1.1.). К несомненным достоинствам этих материалов можно отнести, во-первых, их способность заполнять дефекты сложной конфигурации и объема, во-вторых, малую инвазивность вмешательства, то есть возможность введения данных материалов в инъекционной форме непосредственно в зону дефекта под контролем УЗИ или рентгена без обширных оперативных вмешательств, и, наконец, возможность фиксации костной ткани пациента.

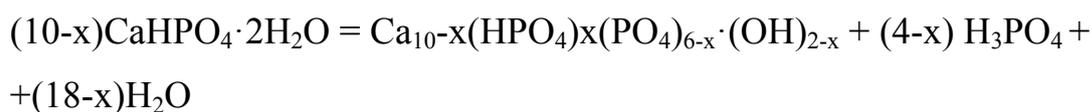
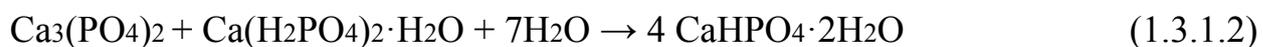
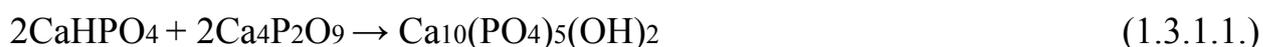


Рисунок 1.3.1.1. – Схема приготовления КФЦ

История разработок в области КФЦ, которые были выполнены в большинстве зарубежными исследователями, начинается лишь с 80-х годов прошлого столетия [30]. Данные исследования позволили выявить главным образом, частные аспекты синтеза КФЦ.

Технология получения КФЦ строится на следующих принципах. Важнейшими параметрами, определяющими эксплуатационные характеристики и области применения, являются время схватывания, пористость, прочность, скорость резорбции в организме человека и инъектируемость. Эти параметры зависят от фазового состава и микроструктуры затвердевшего цементного камня, которые определяются фазовым, химическим составом и соотношением исходных компонентов. Механизмы схватывания и твердения КФЦ основаны на двух типах взаимодействия: кислотно-основные реакции с формированием нейтрального соединения или реакция гидролиза метастабильного ортофосфата в водной среде [31]. Основными продуктами взаимодействия в цементных системах, в которых происходит взаимодействие относительно кислого компонента с относительно основным, являются: осажденный апатит $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, который имеет химический состав, близкий к составу

гидроксиапатита и дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД, структурный тип брушита) состава $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (см. схемы реакций 1.3.1.1 и 1.3.1.2). Последний является метастабильным в условиях организма человека, его гидролиз, происходящий через образование промежуточной фазы октакальциевого фосфата (ОКФ), приводит в итоге к процессу кристаллизации ГА. Процесс гидролиза брушита сопровождается выделением ортофосфорной кислоты (см. схему реакции 1.3.1.3):



(1.3.1.3)

Ортофосфорная кислота снижает рН системы, что может приводить к воспалительным реакциям при применении в клинической практике. При разработке брушитовых цементов, по-видимому, одним из важнейших параметров является снижение скорости гидролиза, так чтобы скорость резорбции цемента остеокластами превосходила скорость гидролиза, предотвращая формирование кислой среды в имплантационном ложе. Известны два способа снижения скорости гидролиза (степени): введение в систему ионов магния, тормозящих гидролиз брушита, либо введение избытка трикальцийфосфата в цементную систему, взаимодействующего с ортофосфорной кислотой с образованием брушита [32].

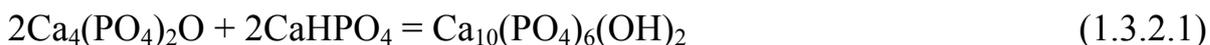
Классификацию кальций фосфатных смесей проводят в зависимости от продуктов, образующихся в цементном камне: апатитовые и брушитовые КФЦ. Таким образом, различают два основных типа КФЦ: апатитовые, характеризующиеся устойчивостью к воздействию жидкостей организма, и

брушитовые - резорбируемые и гидролизующиеся с образованием апатита в среде организма.

1.3.2. Апатитовые цементы

Апатитовый цемент состоит из слабо кристаллизованной апатитоподобной фазы [33], также не исключено наличие в цементном камне исходных непрореагировавших продуктов. Специфической особенностью твердеющего апатитового КФЦ является то, что силы, связывающие вновь образованные кристаллы очень слабы, поэтому кристаллы могут быть легко отделены от цементного камня, особенно после частичной деградации материала в организме.

Классической моделью апатитового цемента является КФЦ, разработанный Брауном с соавторами [34]. В его состав входят тетракальциевый фосфат (основный компонент $\text{Ca/P} = 2,0$) и дикальцийфосфат безводный (кислый компонент, $\text{Ca/P} = 1,0$). При их взаимодействии с водой происходит следующая гипотетическая реакция:



Если вместо ДКФ использовать ДКФД, то происходит реакция:



Уменьшая молярное отношение ТТКФ к ДКФ и ДКФД можно получать кальций-дефицитный ГА в качестве конечной кристаллической фазы. Все реакции, протекающие в этой системе (1.3.2.1 и 1.3.2.2) экзотермические, энтальпия образования ГА равна – 134 кДж/моль.

Время схватывания цемента в подобной системе на основе брушита и ТТКФ составляет от 15 до 22 минут [35]. Для уменьшения времени

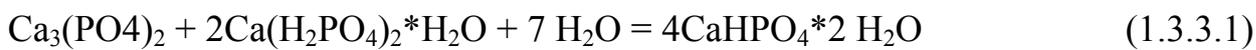
схватывания следует увеличить соотношение твердая фаза/жидкая фаза, либо ввести в систему добавки, изменяющие время схватывания.

Размер частиц, температура жидкости затворения, а также наличие кристаллов ГА влияют на время схватывания цементов [36], но как показали исследования *in vitro* влияние данных параметров незначительно [37].

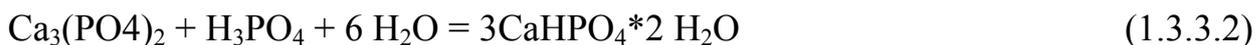
Апатитовые цементы слабо растворимы в нейтральных средах, их растворимость резко повышается с понижением pH [38].

1.3.3. Брушитовые цементы

Брушитовые КФЦ основаны на взаимодействии трикальцийфосфата (β или α - ТКФ, с соотношением кальция к фосфору 1,5; близок к нейтральному) с монокальцийфосфатом моногидратом ($\text{Ca/P} = 0,5$; кислый):



или с ортофосфорной кислотой:



В настоящее время для получения брушитовых цементов чаще всего используют следующие составы: β - ТКФ + МКФМ [39], β - ТКФ + H_3PO_4 [40], и ТТКФ + МКФМ + CaO [41].

В ряде случаев, замена МКФМ на фосфорную кислоту приводит к значительному изменению параметров цементных систем (особенно систем, основанных на β - ТКФ). Но при этом, из-за низких значений pH ортофосфорная кислота может оказать негативное влияние на цитотоксичность и, как следствие, биосовместимость КФЦ [42].

Одним из важных недостатков брушитовых цементов является относительно небольшое время схватывания. Так, для систем на основе

МКФМ с ГА время схватывания составляет несколько минут, а для систем на основе МКФМ с α - и β - ТКФ до 60 секунд. Это можно объяснить зависимостью времени схватывания КФЦ от растворимости основной фазы. Для решения этой проблемы часто используют добавки - замедлители, для увеличения времени схватывания.

Брушитовые цементы обладают более высокими значениями скорости резорбции в организме, по сравнению с апатитовыми, они метастабильны в физиологических условиях [43]. Тем не менее, несмотря на все положительные свойства, область применения таких КФЦ сильно ограничена из-за низких прочностных характеристик и быстрого схватывания. В основном их применяют в медицине для заполнения дефектов, не несущих значительные нагрузки, например в челюстно-лицевой хирургии [44].

1.3.4. Свойства КФЦ

1.3.4.1. Время схватывания

Время схватывания КФЦ определяет время манипулирования в процессе хирургической операции и поэтому является важнейшей характеристикой цемента. Обычно, для пластики дефекта необходимо время схватывания от 5 до 20 минут. Время схватывания оценивают по изменению механических характеристик, фазового состава и по протеканию тепловых эффектов [45]. В большинстве случаев, под формулировкой «время схватывания» понимают интервал времени от момента замешивания цемента до достижения им определенного уровня механических свойств. Чаще всего это определяется по сопротивлению проникновению иглы в КФЦ диаметром 1 мм прибора Вика под воздействием нагрузки 400 г или иглы прибора Гилмора. В испытаниях по методу Гилмора используют иглу диаметром 2,13 мм под нагрузкой 1115,12 г для измерения времени начального схватывания

и иглу диаметром 1,02 под нагрузкой 453,60 для определения времени окончательного схватывания [46], при этом время схватывания определяется моментом, когда игла перестаёт оставлять заметный отпечаток на поверхности цемента. В период схватывания обычно структурообразующие процессы не завершены и продолжают протекать в процессе твердения.

Формирование брушита по реакциям (1.3.1.1 и 1.3.2.2) происходит быстро, в связи с чем необходимо использовать приёмы, позволяющие повысить время схватывания. Для апатитовых цементов ситуация обратная. В простейшем случае процесс схватывания такого цемента состоит из нескольких стадий: растворение твердых компонентов в затворяющей жидкости до её насыщения ионами кальция и фосфат-ионами; образование зародышей кристаллизации; рост новой фазы. Поэтому, регулировать время схватывания можно, влияя на кинетику протекания указанных стадий. К основным параметрам, влияющим на кинетику процесса схватывания можно отнести дисперсность порошка, соотношение твердой и жидкой фаз, значение рН цементной жидкости, введение частиц, являющихся центрами кристаллизации, например ГА, введение ионов кальция или фосфат –ионов в исходную затворяющую жидкость, проведение анионных и катионных замещений исходных порошков твердой фазы, регулирование растворимости исходного порошка, например, используя механохимическую или температурную обработку. Известно, что снижение размера частиц исходного порошка, повышение отношения твердая фаза/жидкая фаза, снижение значения рН приводит к понижению времени схватывания [47].

Также, можно регулировать время схватывания введением в систему различных добавок – замедлителей и ускорителей, например кислых агентов, таких как лимонная кислота, сульфат магния, молочная, винная или уксусная кислоты. Замедлителями могут быть биополимеры (желатин, хитозан и др.)

1.3.4.2. Пористость КФЦ

Для инженерии костной ткани необходимы пористые материалы, которые помимо того, что благоприятны для прорастания костной ткани, могут быть использованы для доставки лекарственных препаратов: противоопухолевых и противовоспалительных, пептидов и антибиотиков в организм человека [48-51].

Пористость КФЦ снижается с увеличением соотношения твердая фаза/жидкая фаза в цементной системе. Для увеличения пористости материала, в системы часто вводят порообразующие добавки, которые легко удаляются после твердения цемента, например частицы сахара, кристаллы растворимых солей и водорастворимые полимеры. С помощью введения таких добавок может быть достигнута макропористость до 50 об. %. Еще одним способом увеличения пористости считается введение в систему гидрофобной жидкости, например масла, которая формирует капли в цементной пасте [52]. Наиболее часто используемыми добавками для создания пористости, по литературным данным, являются соли хлорида натрия, частицы желатина в виде микросфер и частицы сахара. Используются для таких целей вспенивающие агенты, например карбонат аммония или карбонат кальция, которые, взаимодействуя с цементной жидкостью на основе ортофосфорной кислоты, образуют углекислый газ.

1.3.4.3. Резорбируемость

Резорбируемость (биодegradация) КФЦ в организм зависит, в основном, от фазового состава и микроструктуры продуктов реакции схватывания. Различают два основных механизма резорбции: активную резорбцию в результате клеточной активности (остеокласты, макрофаги) и пассивную резорбцию химическим растворением материала [53]. В процессе деградации КФЦ в организме действуют оба механизма. Брушитовые КФЦ

значительно более резорбируемы, чем апатитовые. Двухфазные цементные системы подвергаются пассивной резорбции, и в дальнейшем разложением их структур на составляющие. На процессы резорбции большое влияние оказывает пористость материала. Более пористые КФЦ обеспечивают пространство для циркуляции жидкостей организма и жизнедеятельности клеток, в связи с чем более резорбируемы [54].

1.3.4.4. Прочность

Прочность КФЦ важная характеристика, определяющая область применения материалов. Прочность цементов снижается по экспоненциальному закону с повышением пористости, поэтому для создания высокопрочных материалов требуется свести пористость к минимуму. Зависимость прочности от пористости может быть описана различными эмпирическими зависимостями, в частности, уравнением Бальшина:

$$\sigma_{\Pi} = \sigma_0 \cdot (\rho_{\text{каж}}/\rho_0)^m \quad (1.3.4.4.1.)$$

и уравнением Рышкевича:

$$\sigma_{\Pi} = \sigma_0 \cdot \exp(-q \cdot \Pi) \quad (1.3.4.4.2.)$$

где: σ_{Π} – предел прочности материала при кажущейся плотности $\rho_{\text{каж}}$;

σ_0 – предел прочности материала с теоретической плотностью материала ρ_0 ;

m и q – эмпирические коэффициенты;

Π – общая пористость в долях от единицы [55].

Также прочностные характеристики увеличиваются с уменьшением кристаллов, выделяющихся в процессе схватывания фаз. Существенное влияние оказывает морфология кристаллов, поскольку процесс твердения обычно связан с механическим зацеплением выделяющихся кристаллов: иглообразные кристаллы придают материалу большую прочность, чем

равноосные. Не менее важным фактором можно назвать состояние границ зерен: формирование связующих фаз, например кристаллогидратов магния, по границам приводит к повышению прочности. Армирование реакционно-твердеющих материалов хрупкими или пластичными фазами позволяет повысить их прочностные характеристики [56-58]. Типичные значения прочности при сжатии апатитовых цементов не превышают уровня 30-40 МПа, в то время как прочность брушитовых существенно ниже - до 10 МПа [59].

Одним из эффективных способов повышения прочности реакционно-твердеющих является использование добавок, содержащих фосфаты магния. Введение подобных добавок способствует формированию прочных магнийфосфатных фаз, приводящих к повышению прочности до 50-60 МПа на 1-е сутки. Рост прочности происходит за счет цементации образующимися прочными магнийфосфатными фазами зерен материала в процессе схватывания и твердения [60].

1.3.4.5. Инъецируемость

Для широкого применения в костной хирургии, например, при пластике позвоночника, цементы должны обладать высокой инъецируемостью [61]. Пластичную массу в таком случае доставляют к месту имплантации инъекцией через шприц. В одном из определений, инъецируемостью называют способность пасты проходить через иглу шприца определенного диаметра и длины (чаще всего 2 мм и 10 см соответственно) при заданной нагрузке (100 Н) [62]. Количественной мерой является относительное количество пасты, прошедшей через иглу.

Прохождению пасты препятствует её расслоение на твердую и жидкую фазы и образование «пробки» из частиц твердой фазы. При этом, во многих работах определение инъецируемости по массе пасты, прошедшей через иглу, считают не совсем верным. Поскольку в случае модифицирования

пасты, изменяющем её вязкость, может потребоваться увеличение нагрузки для прохождения пасты через иглу, иначе цемент может быть оценен как не инъектируемый. Согласно другому, более корректному определению, под инъектируемостью стоит понимать способность цементной пасты проходить через иглу шприца, сохраняя гомогенность, независимо от прилагаемой нагрузки. Важным условием для использования цементной пасты при малоинвазивных хирургических вмешательствах является то, что она, сохраняя свойства инъектируемости, должна быть достаточно вязкой для удержания цемента в имплантационном ложе.

На инъектируемость влияет много факторов. Экспериментально установлено, что она повышается при использовании частиц наполнителя округлой формы, при увеличении соотношения жидкой и твердой фаз и добавлении к КФЦ вязких полимерных растворов [63]. Влияние на инъектируемость оказывают добавки глицерофосфата, молочной кислоты, глицерина, хитозана, желатина, поливинилового спирта. При этом паста приобретает повышенную когезионную способность и устойчивость к вымыванию из места инъекции.

Повышение устойчивости системы к расслоению на твердую и жидкую фазы можно достичь использованием таких добавок как молочная кислота, глицерин, лимонная кислота [64]. Цитратные ионы не токсичны и обнаруживаются в твердых тканях человека. Известно, что цитратные ионы тормозят процесс выделения осажденного ГА в цементах. Введение цитрат-ионов снижает вязкость пасты из-за сил отталкивания, создаваемых этими ионами.

Попытка обобщенного аналитического описания влияния различных факторов на инъектируемость КФЦ была предпринята в работе на основании моделирования ньютоновской жидкости через отверстие [65]. Основными параметрами такой модели были: предел пластичности, отношение жидкая фаза/твердая фаза, скорость течения пасты, длина и диаметр отверстия иглы. Предел пластичности цементной пасты – это минимальное отношение

объёма жидкой фазы к массе твердой фазы, при котором паста приобретает пластичность. Он зависит от морфологических характеристик порошкового компонента. Анализ, проведенный на основании данной модели с привлечением экспериментальных данных, привел к следующим выводам. Для повышения инъектируемости необходимо снижать размер частиц наполнителя, повышать соотношение жидкая фаза/твердая фаза, использовать порошок с не агломерированными частицами сферической формы и с широким распределением частиц по размерам, вводить в систему определенные ионы или полимеры, в качестве поверхностно-активных веществ, снижающих межчастичные взаимодействия в порошке, и повышать вязкость жидкой фазы. Наиболее эффективным оказалось влияние последнего фактора. Предполагается использовать гидрогели в качестве затворяющих жидкостей КФЦ [66]. Не менее важным является геометрия устройства и условия проведения инъектирования. Целесообразно уменьшение длины и увеличение диаметра иглы шприца, а также снижение скорости подачи цементной массы через шприц.

Данная модель была основана на упрощенных исходных предположениях, в частности, о ньютоновском характере течения цементной пасты, что не соответствует действительности из-за зависимости вязкости от времени в результате протекания процессов структурообразования. Тем не менее, применение модели позволяет получить общие качественные оценки, которые могут быть использованы в качестве ориентиров для разработки цементных паст.

Важной технологической характеристикой цементов является их способность сохранять свои свойства в течение длительного периода времени. В работе [67] изучали старение смесей наполнителя брушитовой цементной системы на основе МКФМ и β -ТКФ при комнатной температуре. Механическая смесь компонентов при 22 °С и относительной влажности 60 % взаимодействовала с образованием ДКФД в течение нескольких дней по механизмам растворения/осаждения, происходящим в результате

конденсации влаги на поверхности частиц. Замедлить взаимодействие компонентов данной системы удалось использованием осушенной атмосферы и введением твердых добавок трехнатриевого цитрата. Введение лимонной кислоты также эффективно тормозит взаимодействие, но одновременно снижает скорость схватывания цемента.

За исключением инъекционного способа, клиническое применение связано с необходимостью смешения компонентов цементной системы непосредственно в процессе проведения хирургической операции для получения цементного теста и пластического закрытия костного дефекта. Это увеличивает продолжительность операции. Кроме того, недостаточность однородной массы из-за неполного перемешивания может вызывать послеоперационные осложнения [68-70]. В результате отдельными факторами следует выделить стерилизацию и хирургическое перемешивание КФЦ. Индивидуальные компоненты такой системы подлежат отдельной стерилизации, а смешивание непременно должно проводиться в стерильных условиях.

1.4. Композиционные кальцийфосфатные цементы

1.4.1. Дисперсное упрочнение

Для широкого практического применения в костной хирургии для непосредственного заполнения дефектов кости, например при пластике позвоночника, КФЦ должны обладать повышенной прочностью и трещиностойкостью. Прочность апатитовых КФЦ при сжатии не превышает 50-60 МПа, что существенно ниже значений прочности биологической кортикальной кости (около 200 МПа) [71]. Прочность брушитовых цементных материалов еще ниже, при сжатии она составляет 1-10 МПа [72]. В литературе практически отсутствуют данные по трещиностойкости – сопротивлению хрупкому разрушению КФЦ. Известно, что величина

коэффициента интенсивности напряжений (мера трещиностойкости) не превышает $0,5 \text{ МПа} \cdot \text{м}^{1/2}$ [73].

Механические свойства кальцийфосфатных цементов могут быть улучшены посредством армирования. Известны работы посвященные дисперсному упрочнению апатитовых и брушитовых КФЦ частицами неорганических соединений, таких как кремнезем или рутил. В частности, прочность системы α – ТКФ – ТТКФ была существенно увеличена введением в состав диоксида циркония, по принципу трансформационного упрочнения. Армирование цемента на основе ТТКФ с магнийсодержащей затворяющей жидкостью с частицами оксида алюминия в количестве 25 масс. % позволило повысить уровень прочность при сжатии до 100 МПа [74].

Цементную матрицу упрочняют частицами плотной керамики. Общеизвестные данные, что керамические материалы, схожие по своему фазовому составу более прочные, чем аналогичные цементные материалы, поскольку не содержат непрочные кристаллогидратные и аморфные фазы. Например, в работе [75] апатитовый цемент системы ТТКФ – ДКФ упрочняли введением частиц ГА и исследовали влияние морфологии этих частиц на прочность (рисунок 1.4.1.1. и 1.4.1.2). Наибольшее влияние на прочность, по сравнению с неармированным цементом достигнуто при армировании цемента пластинчатыми частицами субмикронного размера.

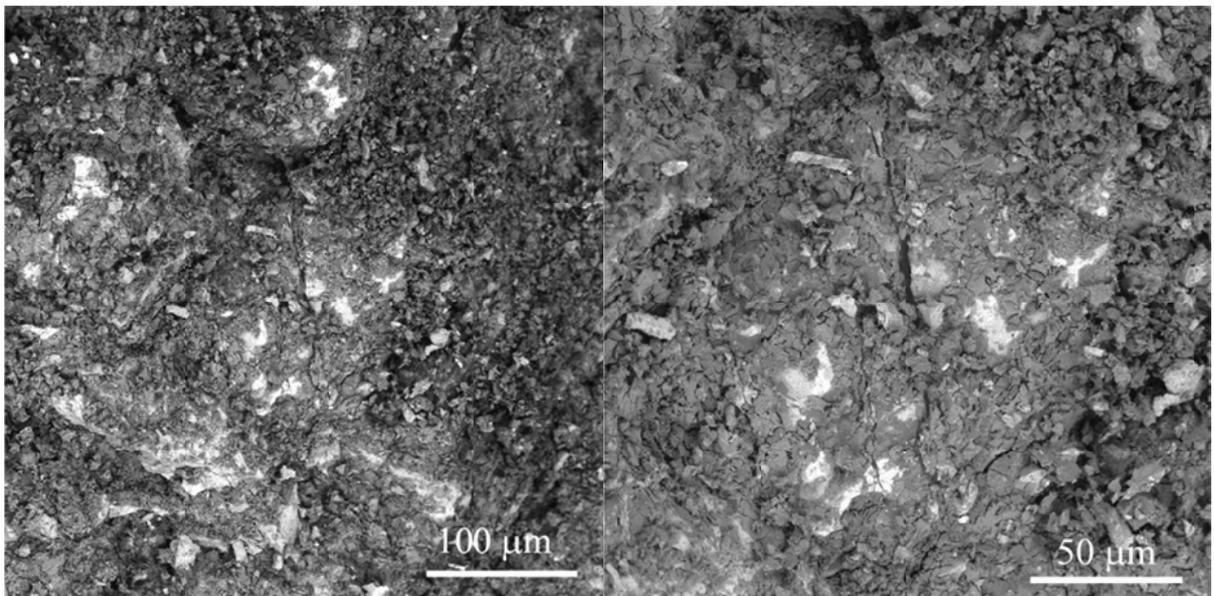


Рисунок 1.4.1.1 – Микроструктура поверхности разрушения КФЦ, армированного частицами ГА

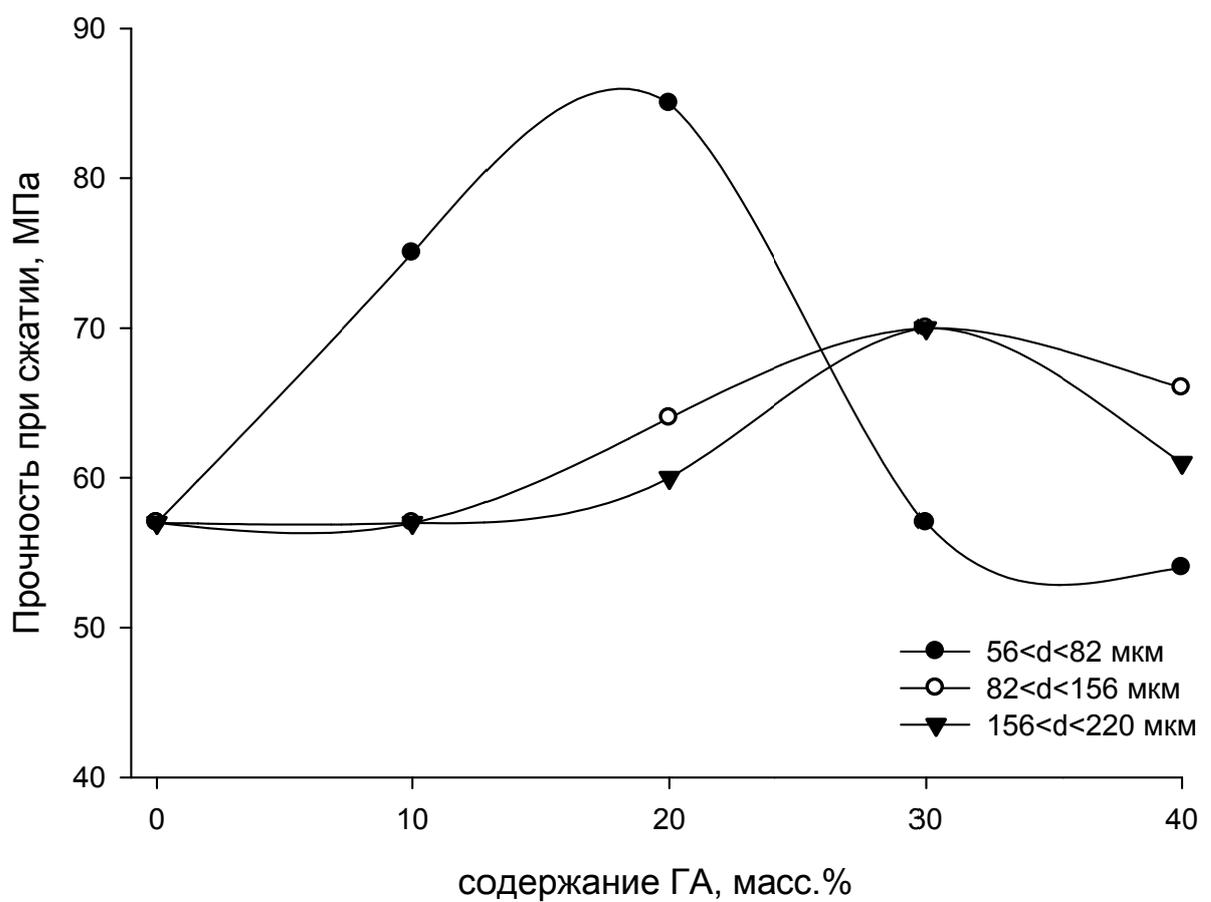


Рисунок 1.4.1.2 - Зависимость прочности при сжатии от содержания и размера частиц ГА

Для повышения механических свойств используют армирование металлическими частицами. В работах [76,77] исследовали апатитовые цементы на основе ТКФ, дисперсно-упрочненные частицами титана (рисунок 1.4.1.3 и 1.4.1.4). Их прочность при сжатии достигала 100 МПа.

Возможные механизмы влияния дисперсных частиц металла на механические свойства хрупкой матрицы рассмотрены в работе [78]. Основными механизмами повышения трещиностойкости являются блокировка распространяющейся трещины при её встрече с частицей; увеличение поверхности разрушения за счет огибания частиц фронтом распространяющейся трещины; влияние полей сжимающих напряжений в матрице, препятствующих раскрытию трещины; пластическая деформация частиц. Механизмы, связанные с остаточными напряжениями и пластической деформацией частиц титана, вряд ли реализуемы, поскольку микроструктура материала формируется при физиологической температуре, когда взаимодействие цемента с титаном незначительно.

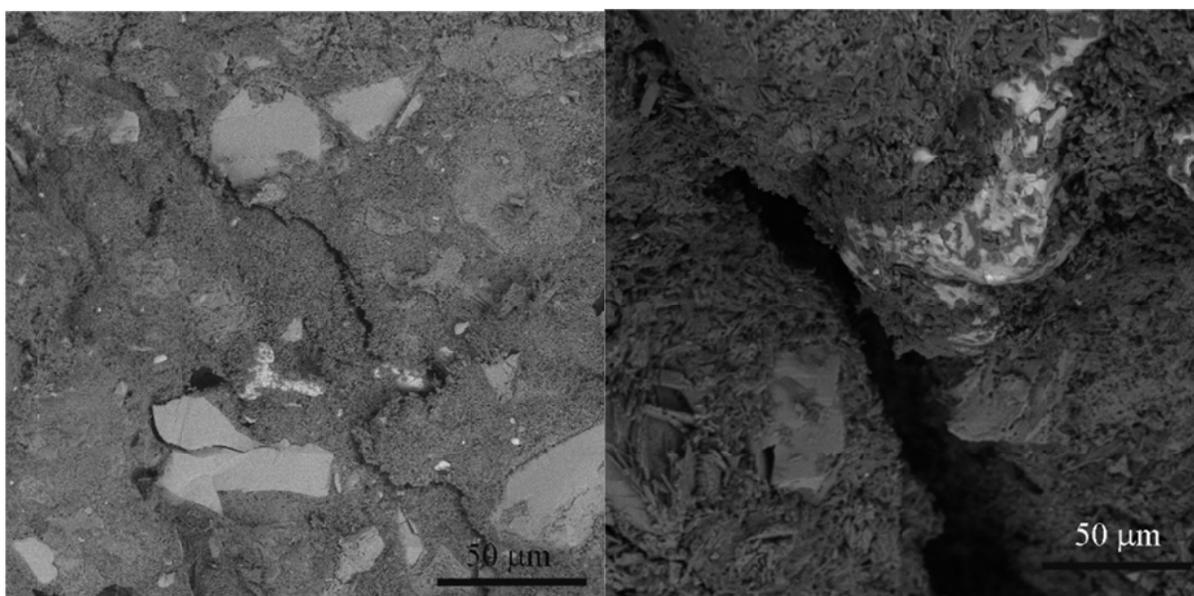


Рисунок 1.4.1.3 – Микроструктура поверхности разрушения апатитового КФЦ, содержащего 40 масс. % частиц титана

Выбор фракции частиц титана для армирования КФЦ зависит от необходимого соотношения между их содержанием и требуемым уровнем механических свойств.

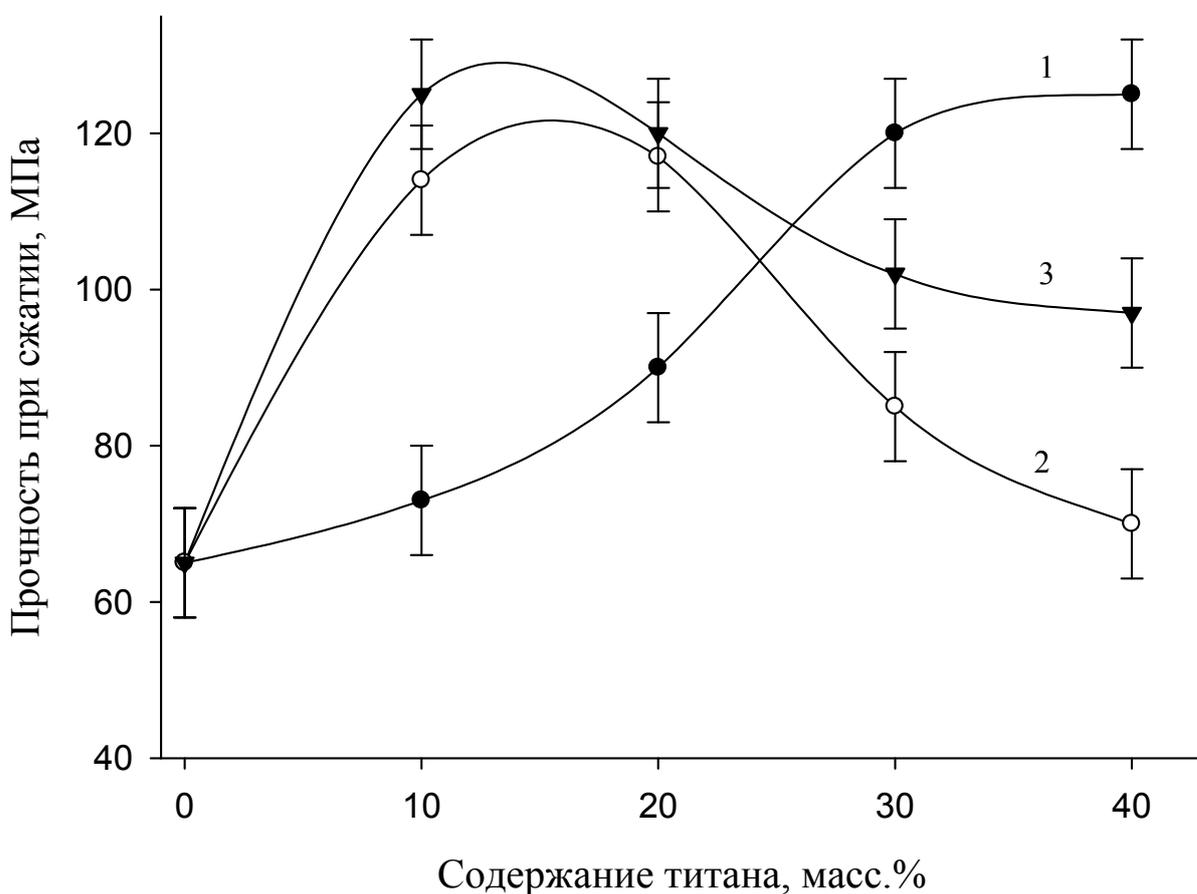


Рисунок 1.4.1.4 - Зависимость прочности при сжатии КФЦ от содержания и размера частиц титана: 1- 1-5 мкм, 2- 90-120 мкм, 3- 300-400 мкм

С увеличением содержания частиц титана значения прочности КФЦ монотонно возрастают. Максимумы зависимости можно объяснить влиянием двух противоположных процессов, происходящих в материале: увеличение сопротивления хрупкому разрушению и разупрочнение КФЦ в связи с образованием трещиноподобных дефектов. Влияние размера частиц на прочностные характеристики ярко выражено уже при низких концентрациях, по - видимому это связано с образованием крупных дефектов в зоне контакта матриц/армирующий компонент.

1.4.2. Армирование волокнами

Армирование кальций фосфатных цементов различными волокнами может способствовать созданию канальных пор, если армирующие волокна растворимы. [79-84]. Для армирования цементных систем используют непрерывные или короткие волокна. В зависимости от ориентации волокон в модифицированном цементе полученный материал может быть однонаправленным – в случае, когда волокна ориентированы в одном направлении, и двуосно армированным. Помимо определенной направленности, короткие волокна могут быть случайно ориентированы.

Выбор армирующих волокон зависит от их прочностных характеристик, эластичности волокна, от которой зависит технологичность армирующих процессов [85-86].

Не менее важной характеристикой волокон является критическая длина волокна (l_c). Критическая длина волокна – это минимальная длина, при которой возможно его разрушение при достижении предела прочности:

$$l_c = \sigma D / 2\tau , \quad (1.4.2.1)$$

где σ – предел прочности волокна;

D – диаметр волокна;

τ – сдвиговая прочность матрицы.

В работе [87] в «классическую» цементную систему ТТКФ – ДКФ, затворенную водой, вводили волокна ВикрилTM (полиглактин 910) диаметром 322 мкм и длиной 8 мм в количестве 25 об. %. После схватывания и твердения при 37 °С и относительной влажности 100 % проводили исследования полученного материала. Введение армирующих волокон привело к повышению значений прочности при изгибе с 5 МПа для

неармированного цемента до 14 МПа. После выдержки таких материалов в изотоническом растворе прочность резко снижается, что можно объяснить резорбцией волокон в жидкостях. После растворения в цементной матрице были сформированы канальные поры размером более 250 мкм.

Применение армирующих волокон представляется весьма эффективным для создания матриц по цементной технологии. Существенное повышение прочности (до 4 раз) и сопротивления разрушению (до 100 раз) цементных материалов может быть достигнуто с использованием углеродных, стеклянных и полимерных волокон в качестве армирующего компонента [88].

1.4.3. Полимер – кальцийфосфатные цементные материалы

Естественная костно-хрящевая ткань является композиционным материалом, состоящим из биологического апатита, коллагена и других белков, поэтому значительные перспективы имеет принцип формирования композиционных структур [89-92]. Создание композиционного кальцийфосфатного цемента с полимерной составляющей может позволить получить цементный материал с оптимальными физико-химическими и биологическими характеристиками. Важной задачей является выбор полимерной компоненты, поскольку она окажет существенное влияние на все характеристики системы.

Коллаген – это белок, составляющий основу соединительной ткани организма (сухожилие, кость, хрящ.) и обеспечивающий её прочность и эластичность. Коллаген присутствует у всех многоклеточных животных, но отсутствует у растений, бактерий, вирусов, простейших и грибов [93]. Молекулу коллагена можно представить как правозакрученную спираль из трёх α - цепей. Один виток спирали α - цепи содержит три остатка аминокислоты. В среднем, молекулярная масса коллагена составляет 300

кДа, длина цепи 300 нм, толщина 1,5 нм. Для коллагена характерно высокое содержание глицина, низкое содержание серосодержащих аминокислот и отсутствие триптофана. Отличительной особенностью коллагена является содержание в его составе остатков нестандартных аминокислот: около 21 % таких остатков это 3-гидроксипролин, 4-гидроксипролин и 5-гидроксилизин [94]. Каждая из α - цепей состоит из триад аминокислот. В триадах третья аминокислота всегда глицин, вторая — пролин или лизин, первая — любая другая аминокислота, кроме трёх перечисленных (рис. 1.4.3.1.).

Коллаген – основной компонент соединительной ткани и самый распространённый белок у млекопитающих, составляющий от 25 % до 35 % белков во всём теле. Он широко используется для транспортировки клеток в виде гидрогеля. Однако традиционно используемый коллаген является чужеродным белком (чаще всего его получают из кожи свиней), поэтому он способен вызывать аллергические реакции, хроническое воспаление и являться переносчиком ряда инфекционных агентов, то есть его биосовместимость как ксеногенного белка весьма сомнительна. В силу этих обстоятельств в Европе рынок медицинских изделий на основе коллагена сокращается.

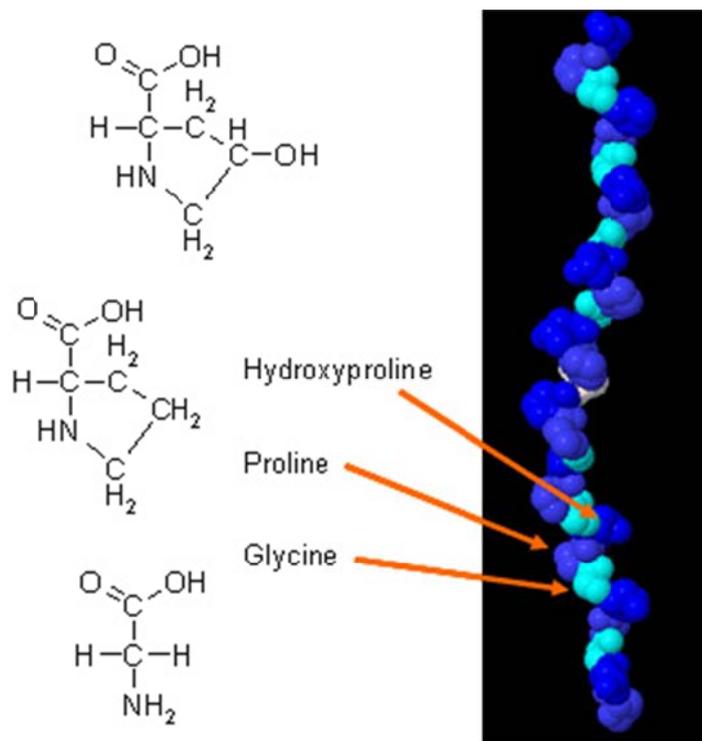


Рисунок 1.4.3.1 Структура коллагена

Агароза — полисахарид, полученный из морских водорослей. Он не вызывает побочных реакций при имплантации в естественных условиях и может поддерживать прорастание тканей как *in vitro*, так и *in vivo*. Схватывание и твердение агарозы индуцируется термически, за счет образования водородных связей при охлаждении. Это служит серьезным препятствием для использования данного биополимера в получении материалов по цементной технологии (рис. 1.4.3.2) [95].

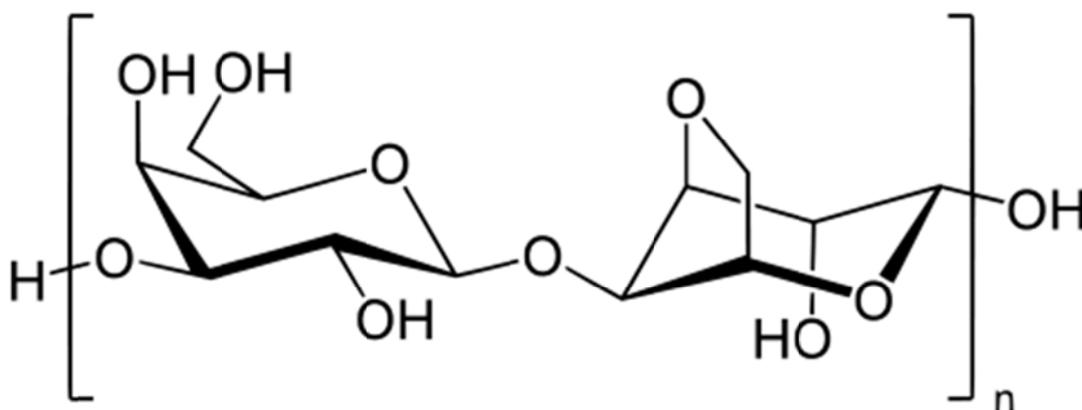


Рисунок 1.4.3.2 Структура агарозы

Метилцеллюлоза (МЦ) – природный полисахарид, выделяемый из растительных источников. Это внеклеточный клей, который не вызывает иммунного отклика. Она проявляет способность к схватыванию и гелеобразованию при температурах выше физиологических. Гелеобразование полностью может протекать от нескольких минут до нескольких часов. При 37 °С МЦ в воде образует слабый гель, который формируется, недостаточно быстро, чтобы его применять для доставки лекарственных средств или белков. Таким образом, МЦ может образовывать гель при более низких температурах (даже при температуре ниже комнатной). Однако биоактивность таких гидрогелей является не достаточной для их широкого клинического применения (рис. 1.4.3.3) [96].

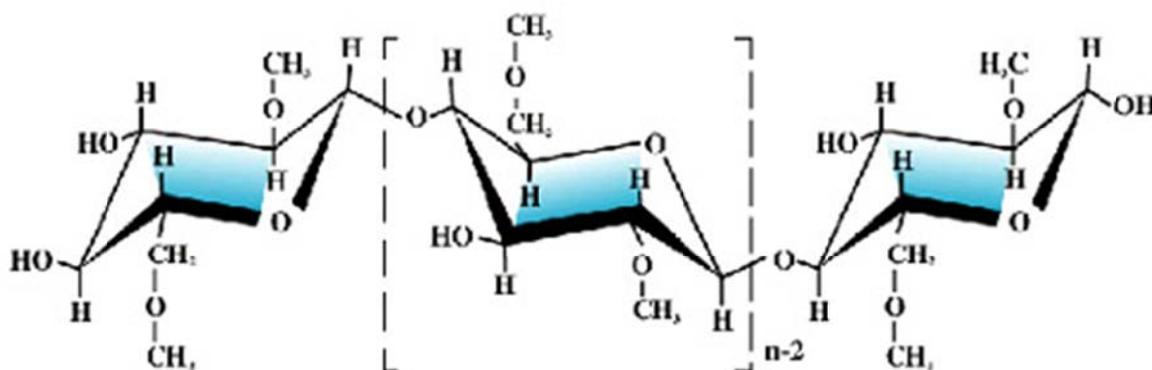


Рисунок 1.4.3.3 - Структура метилцеллюлозы

Альгинат натрия – это линейный сополимер (полисахарид), состоящий из двух различных пространственно повторяющихся единиц, (1,4)- β -D-маннуроновой кислоты (M) и α -L-гиалуроновой кислоты (G) в различных пропорциях. Альгинат широко применяют в тканевой инженерии в качестве матриц для костной хирургии (рис. 1.4.3.4) .

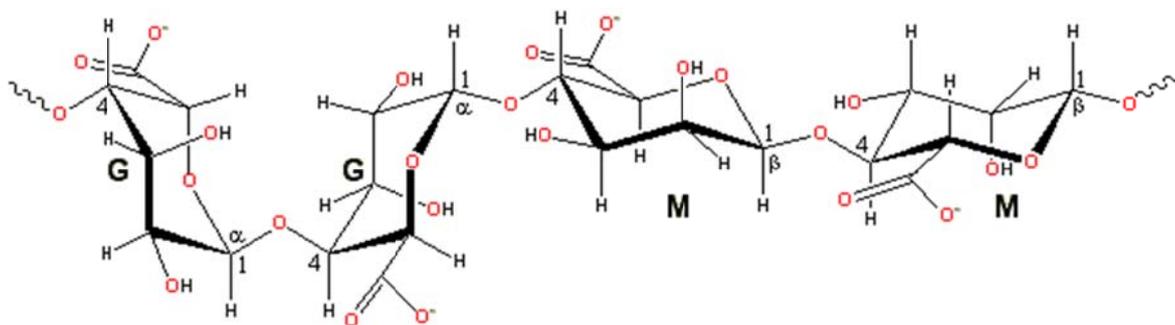


Рисунок 1.4.3.4. - Структура альгината

Раствор альгината натрия образует гель в присутствии двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} и Zn^{2+} за счет образования ионных связей между блоками гиалуроновой кислоты в альгинатных цепях [97]. Процесс гелеобразования может достигать 30 мин. Данный биополимер является биосовместимым. Существует возможность влиять на конечные свойства гидрогеля посредством регулирования катионного состава, концентрации и молекулярного веса. Альгинат обладает невысокой скоростью резорбции и его растворение происходит за счет диффузии катионов из полимерной матрицы [98]. Данный материал находит применение в медицинских изделиях и фармацевтических целях, при обработке ран различной этиологии, при регенерации мягких тканей, как гемостатический агент с антитромбогенными свойствами. [99]. Тем не менее, использование альгината натрия в качестве компонента цементной системы затруднено в связи с чрезвычайно быстрым процессом его полимеризации катионами кальция и, как следствие, сильному сокращению времени схватывания.

Хитозан – естественный линейный катионный полисахарид, получаемый из ракообразных, моллюсков и насекомых (рисунок 1.4.3.5). Хитозан дает возможность клеткам организма хорошо распластываться и пролиферировать на своей поверхности, а также может соединяться с другими биологическими активными полимерами или пептидами [100].

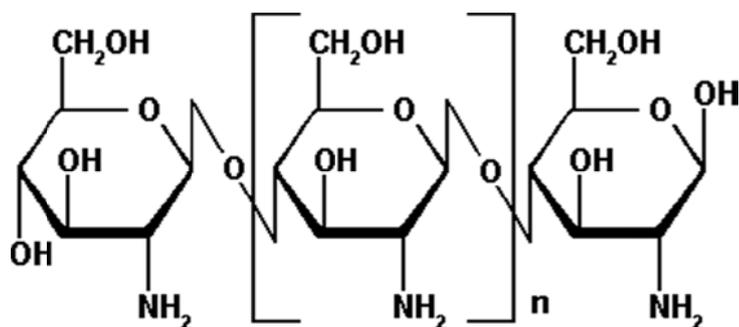


Рисунок 1.4.3.5. - Структура хитозана

Гелеобразование хитозана, как правило, зависит от значения pH. Поэтому данный полисахарид перспективен в качестве полимерной матрицы композиционных кальцийфосфатных систем. Возможность использования фосфатов кальция с разным соотношением кальция к фосфору позволит влиять на скорость изменения pH в материале и, соответственно, на скорость полимеризации хитозана.

В работах [101] разработаны композиционные материалы на основе таких биологических полимеров, как хитин, хитозан, желатин и целлюлоза как отдельно, так и в смесях, армированных частицами ГА размером менее 100 нм. Содержание наполнителя варьировали от 0 до 70 масс.%. В данных работах для твердения материалов применяли технологию сублимационной сушки. Пористость матриц достигала 95%. Эти материалы обладают взаимосвязанной пористостью с размером пор до 500 мкм. Материалы имеют благоприятные биологические свойства матриц, наблюдается хорошая адгезия и пролиферация на поверхности материала стволовых клеток.

Известны работы [102], направленные на изучение композитов ГА – коллаген, которые по составу схожи с естественной костью. Композиты могут быть изготовлены посредством смешения порошка ГА с раствором коллагена и последующим затвердеванием смеси под УФ излучением. При этом получается пористый материал с энергией разрушения 510 Дж/м². Прочностные свойства большинства композитов ГА-коллаген неудовлетворительны. В тоже время, эти материалы показывают более

высокую биологическую активность, нежели ГА и коллаген отдельно. Используя коллаген, можно создавать материалы с контролируемой резорбируемостью. Коллаген и желатин часто используют как материал – носитель лекарственных средств пролонгированного действия[103].

Тем не менее, многие вопросы технологии композиционных кальцийфосфатных цементов остаются пока еще открытыми. Не ясны закономерности влияния состава и структуры таких композиционных материалов на их химические, механические и биологические свойства, а также на инъектируемость цемента.

1.5. Применение кальцийфосфатных цементов для замещения и регенерации костной ткани

На сегодняшний день на рынке присутствуют цементные материалы как на основе гипса так и на основе кальцийфосфатных материалов. Большинство коммерческих кальций фосфатных цементов получают на основе трикальциевого фосфата в качестве основного твердого компонента, а так же различных добавок, которые включают как в порошковую, так и в жидкую компоненту. В табл. 1.5.1 приведены торговые марки некоторых промышленных костных цементов, исходные компоненты и образующиеся соединения [104].

Таблица 1.5.1. – Характеристики некоторых коммерческих КФЦ

| Производитель | Название продукта | Состав | Продукт |
|--|--|---|---------|
| AG Digital Technology Corp | A-GRIX | <u>Порошок</u> : порошок полуводного сульфата кальция ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) и гранулы сульфата кальция; <u>Раствор</u> : водный раствор | Гипс |
| Berkeley Advanced Biomaterials (США) | Sem-Ostetic™ | <u>Порошок</u> : фосфаты кальция (детали неизвестны); <u>Раствор</u> : стерильная вода | Апатит |
| Berkeley Advanced Biomaterials (США) | SemOstetic™ | Порошок: фосфаты кальция (детали неизвестны); Раствор: Стерильная вода | Апатит |
| Berkeley Advanced Biomaterials (США) | TriOstetic™ Порошок: фосфаты кальция (детали неизвестны); Раствор: Стерильная вода | Порошок: фосфаты кальция (детали неизвестны); Раствор: Стерильная вода | Апатит |
| Biomatlante (Франция) | МСРС | Порошок: главным образом α -ТКФ, АФК, Раствор:буферный фосфатный раствор | Апатит |
| Biomet (США) Interpore (США) Walter Lorenz Surgical (Германия) | Calcibon® | Порошок: α -ТКФ (61%), ДКФ (монетит) (26%), CaCO_3 (10%), осажденный ГА (3%); Раствор: H_2O , Na_2HPO_4 | Апатит |
| Biomet (США) Interpore (США) Walter Lorenz Surgical (Германия) | Mimix™ | Порошок: ТТКФ, α -ТКФ, цитрат натрия ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); Раствор: H_2O , лимонная кислота ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) ₂ | Апатит |
| Biomet (США) Interpore (США) Walter Lorenz Surgical (Германия) | Quick Set Mimix™ | Порошок: фосфат кальция, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Раствор: лимонная кислота | Апатит |

| | | | |
|--|-----------------------------|---|--------|
| | | | |
| Biomet (США) Interpore (США) Walter Lorenz Surgical (Германия) | Bone Plast® QS | Порошок: гипс полуводный (CaSO ₄ ·½H ₂ O); Раствор: стерильный водный | Гипс |
| BoneSupport AB (Швеция) | Cerament™ | Порошок: CaSO ₄ ·½H ₂ O (60%), ГА (40%); Раствор: водный раствор иодосодержащего рентгеноконтрастного агента | Гипс |
| Calcitec (США) | Osteofix | Порошок: Порошки фосфата кальция и оксид кальция; Раствор: фосфатный буфер | Апатит |
| Calcitec (США) | Osteofix | Порошок: Порошки фосфата кальция и оксид кальция; Раствор: фосфатный буфер | Апатит |
| ETEX (США) | α-BSM; Embarc; Biobon | Порошок: АФК (50%), ДКФД (50%); Раствор: Небуферный водный солевой Раствор | Апатит |
| ETEX (США) | β-BSM | Состав: не найден (очевидно, имеет более высокую прочность на сжатие и лучшую способность к инъектированию, чем α-BSM) | Апатит |
| ETEX (США) | OssiPro | Состав: не найден; Заявлено, что цемент после твердения – макропористый | Апатит |
| ETEX (США) | CarriGen | Состав: синтетический фосфат кальция, карбометилцеллюлозы натриевая соль, бикарбонат натрия, и карбонат натрия | Гипс |
| Graftys (Франция) | Graftys® HBS | Порошок: главным образом - ТКФ, АФК, Раствор: фосфатный буферный раствор | Апатит |
| Graftys (Франция) | Graftys® Quickset | Состав: соли фосфата кальция, гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), и водный раствор на основе фосфатов | Апатит |
| Kasios (Франция) | Jectos Eurobone® | Порошок: β-ТКФ (98%), Na ₄ P ₂ O ₇ (2%); Раствор: H ₂ O, H ₃ PO ₄ (3.0M), H ₂ SO ₄ (0.1M) | Брушит |
| Kyphon (США) | KyphOs™ | Порошок: β-ТКФ (77%), Mg ₃ (PO ₄) ₂ (14%), MgHPO ₄ | Апатит |

| | | | |
|--|-----------------------|--|--------|
| | | (4.8%), SrCO ₃ (3.6%) ; Раствор: H ₂ O, (NH ₄) ₂ HPO ₄ (3.5M) | |
| Lifecore (США) | CalMatrix | Порошок: 90% CaSO ₄ ·½H ₂ O и 10% карбометилцеллюлоза | Гипс |
| Mitsubishi Materials (Япония) | Biopex® | Порошок: α-ТКФ (75%), ТТКФ (20-18%), ДКФД (5%), ГА (0-2%) Раствор: H ₂ O, Sodium succinate (12-13%), хондроитин сульфат натрия (5-5.4%) | Апатит |
| Mitsubishi Materials (Япония) | Biopex®-R | Порошок: α-ТКФ, ТТКФ, ДКФД, НА, Mg ₃ (PO ₄) ₂ , NaHSO ₃ Раствор: H ₂ O, сукцинат натрия, натрия хондроитинсульфат | Апатит |
| Orthogen Corporation | DentoGen | Порошок полуводного гипса и водный раствор | Гипс |
| Produits Dentaires SA (Швейцария) CalciphOs (Швейцария) | VitalOs4 | Раствор 1: β-ТКФ (1.34г), Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇ (0.025г), H ₂ O, соли (0.05M pH 7.4 PBS буферный раствор); Раствор 2: МКФМ (0.78г), CaSO ₄ ·2H ₂ O (0.39г), H ₂ O, H ₃ PO ₄ (0.05M) | Брушит |
| Shanghai Rebone Biomaterials Co (Китай) | Rebone | Порошок: ТТКФ ДКФ; Раствор: H ₂ O | Апатит |
| Skeletal Kinetics (США) | Callos™ | Состав: α-ТКФ, CaCO ₃ , МКФМ; Раствор: силикат натрия | Апатит |
| Skeletal Kinetics (США) | Callos Inject™ | Состав: α-ТКФ и неизвестные соединения (вероятно, близок по составу к Callos™) | Апатит |
| Skeletal Kinetics (США) | OsteoVation EX Inject | Вероятно близок к “Callos Inject™” (производится S.K. но продается OsteoMed) | Апатит |
| Stryker (США) Leibinger (Германия) | BoneSource | Порошок: ТТКФ (73%), ДКФД (27%); Раствор: H ₂ O, смесь Na ₂ HPO ₄ и NaH ₂ PO ₄ | Апатит |
| Stryker (США) Leibinger (Германия) | HydroSet™ | Порошок: ТТКФ, ДКФД, цитрат натрия трехзамещенный; Раствор: H ₂ O, поливинилпирролидон, фосфат натрия | Апатит |

| | | | |
|-------------------------|--|--|--------|
| Synthes (США) | Norian® SRS Norian® CRS | Порошок: α-ТКФ (85%), CaCO ₃ (12%) МКФМ (3%); Раствор: H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ | Апатит |
| Synthes (США) | Norian® SRS Fast Set Паста Norian® CRS Fast Set Паста | Состав: не найден (вероятно близок к Norian SRS/CRS) | Апатит |
| Synthes (США) | Norian Drillable | Состав: порошок фосфата кальция, биорезорбируемые волокна и раствор гиалуроната натрия | Апатит |
| Synthes (США) | chronOS™ Inject | Порошок: β-ТКФ (73%), МКФМ (21%), MgHPO ₄ ·3H ₂ O (5%), MgSO ₄ | Брушит |
| Teknimed (Франция) | Cementek® | Порошок: α-ТКФ ТТКФ, глицерофосфат натрия; Раствор: H ₂ O, Ca(OH) ₂ , H ₃ PO ₄ | Апатит |
| Teknimed (Франция) | Cementek® LV | Порошок: α-ТКФ, ТТКФ, глицерофосфат натрия, диметилсилоксан; Раствор: H ₂ O, Ca(OH) ₂ , H ₃ PO ₄ | Апатит |
| Wright Medical (США) | MIIG™ 115 | Порошок: полуводный гипс; Раствор: физиологический | Гипс |
| Wright Medical (США) | MIIG® X3 | Состав: полуводный гипс; Раствор: Стерильная вода(содержит следы ускорителей твердения) | Гипс |
| Wright Medical (США) | MIIG® X3 High-Visc | Состав: полуводный гипс; Раствор: Стерильная вода(менее чем в MIIG® X3; содержит также следы ускорителей твердения) | Гипс |
| Wright Medical (США) | Pro-Dense® | Состав: 75% полуводный гипс, 25% ДКФД (брушит) и гранулированный β-ТКФ | Гипс |

Исследования поведения *in vitro* и *in vivo*, по приведенным выше коммерческим КФЦ, показали высокую биологическую совместимость [105,106]. Можно привести некоторые данные. Применение цементных

материалов на основе системы ТКФ - МКФМ – сульфат калия в дефекте эпифиза берцовой кости кролика показало, что спустя 16 суток после операции КФЦ замещается новой костной тканью с механическими свойствами, не уступающими таковым у исходной костной ткани [107]. Также, КФЦ на основе ТКФ – ДКФ - карбоната кальция использовали для замещения дефекта трабекулярной кости козла. Биодegradация КФЦ происходила с образованием новой костной ткани на поверхности материала без потери целостности связи кость-цемент [108].

Применение цементных материалов уже переведено в клиническую стадию. Например, в работе [109-122] описаны результаты клинических испытаний цемента Вiorex (Япония) системы ТКФ – ДКФД – ТТКФ для залечивания повреждений дистального отдела лучевой кости пациентов, больных остеопорозом. Залечивание перелома происходило в течение (в среднем) 3,5 недель, введение цемента в перелом существенно ускорило процесс остеогенеза. Существуют определённые перспективы для применения кальцийфосфатных цементов не только в костной ортопедии, но так же и в стоматологии, например для защиты пульпы или выстилки полостей [123-125] и в системе доставки лекарственных препаратов. В работах [126-134] описано использование КФЦ в качестве защитного покрытия пульпы зуба в сравнении с гидроксидом кальция. Было показано, что оба материала способны через 24 недели образовывать вторичный дентин. В результате, высока вероятность использования цементных материалов для временной фиксации металлических корневых имплантатов. В работе [135] предпринята попытка изучения процесса формирования новой костной ткани с использованием коммерческого цемента VitalOs (Швейцария) для заполнения костных дефектов вокруг дентальных имплантатов. Установлено, что костная ткань, сформированная в течение восьми недель в эксперименте, хорошо организована, и демонстрирует зрелую структуру. Однако их применение в качестве несущих нагрузку материалов ограничивается хрупкостью, низкими по сравнению с

акрилатными материалами прочностью и сопротивлением усталостному разрушению.

Использование КФЦ в черепно-лицевой хирургии представляется также перспективным, поскольку в дефектах таких типов материал не подвергается большим механическим нагрузкам [136-139]. В работе [140] представлены результаты операций по устранению черепных дефектов более чем 100 пациентов. Полная реабилитация пациентов с использованием КФЦ составила 97 % в течение 6 лет. Известны работы по применению КФЦ в критических дефектах костных тканей челюстей [141-149]. В целом, технологии, основанные на применении КФЦ для замещения и регенерации костной ткани, являются новыми и мало изученными. Перспективными направлениями исследований в области КФЦ являются создание технологии макропористых материалов для направленной регенерации костной ткани при сохранении требуемой прочности, регулирование биодеградации макропористых материалов для клеточных технологий реконструкции костных дефектов и создание по цементной технологии новых систем.

1.6. Выводы на основании литературного обзора

Разработка технологии получения композиционных кальцийфосфатных цементов для реконструкции/инженерии костно - хрящевой ткани является актуальной, научно - и практически обоснованной задачей. Применение таких материалов позволит расширить показания к хирургическим операциям при замещении критических дефектов костной ткани сложной геометрии и проводить малоинвазивные хирургические вмешательства.

По сравнению с КФЦ, армированной дисперсными частицами, композиционные цементные материалы с полимерной матрицей обладают более высокой эластичностью. Полимерные КФЦ могут соответствовать по структуре и свойствам костной ткани в намного большей степени, чем, например, спеченная керамика. Минеральная фаза ФК придает

композиционному материалу повышенную жесткость, которая не присуща полимеру. Наиболее широко используют природные полимеры: коллаген и желатин – продукт частичной деструкции коллагена; не протеиновые биополимеры – полисахариды (хитин, хитозан, крахмал, гиалуроновая кислота). Из-за опасности инфицирования имеются ограничения в клиническом использовании коллагена - продукта животного происхождения. Поэтому значительное внимание уделяется созданию композиционных материалов на основе полисахаридов. Особый интерес представляют КФЦ на основе альгината натрия и хитозана - внеклеточных полисахаридов, характеризующихся биосовместимостью и обладающих широким спектром полезных свойств. Данные полимеры находят применение в медицинских изделиях и фармацевтических целях, в том числе в разных имплантационных системах, при обработке ран различной этимологии, при регенерации мягких и твердых тканей и как гемостатический агент с антитромбогенными свойствами.

Несмотря на значительное число научных публикаций, и патентов по данной теме (более сотни только за последние несколько лет) проблема выбора материалов, методов и параметров изготовления цементных материалов на основе фосфатов кальция и биополимеров в полной мере остается не решенной. В фундаментальной проблеме создания материалов для медицины существуют задачи, которые требуют решения, что позволило сформулировать цели и задачи диссертационной работы.

Целью работы является разработка технологии получения и исследование физико-химических свойств композиционных материалов в системах биополимер – фосфаты кальция, обладающих повышенной деформируемостью.

Для достижения поставленной цели в ходе работы решались следующие задачи:

- Установление условий формирования непрерывного полимерного каркаса, армированного частицами ФК, в процессе схватывания и

твердения цемента в зависимости от параметров вяжущей системы и условий проведения процесса.

- Изучение влияния полимерного компонента на кинетику фазообразования, фазовый состав и морфологические характеристики кальцийфосфатных фаз, в том числе на микроструктуру материала и его прочностные свойства.
- Исследование возможности повышения прочностных характеристик материала армированием гранулами ФК и резорбируемого полисахарида. Выявление закономерностей влияния армирующих фаз на прочностные свойства и микроструктуру.
- Изучение влияния на формирование микроструктуры и физико-химические свойства материалов физиологически важных катионов: магния и цинка.
- Выявление кинетических особенностей деградации в модельных жидкостях организма человека разработанных материалов и исследование их биологических свойств *in vitro*.

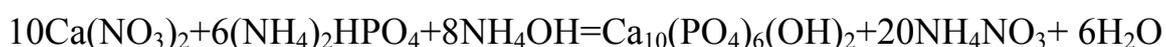
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Исходные материалы

В работе были использованы следующие реагенты: нитрат кальция марки «хч», гидрофосфат аммония марки «хч», водный раствор аммиака 25 % марки «чда», оксид кальция марки «хч», этиловый спирт 98 % марки «пищевой», ортофосфорную кислоту марки «хч», глутаминовую кислоту марки «хч», молочную кислоту марки «хч», высокомолекулярный хитозан (600 кДа) марки «хч», альгинат натрия марки «хч», нитрат магния марки «хч» и нитрат цинка марки «хч».

2.1.1. Синтез порошков АФК и ТТКФ

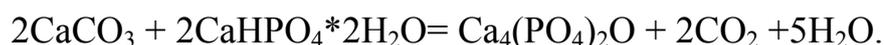
Аморфный фосфат кальция (АФК) с соотношением Ca/P = 1,67 получали осаждением из растворов по реакции:



Использовали исходные 0,1 М раствор $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и 0,6 М раствор $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. В процессе синтеза величину pH поддерживали в интервале 11-12 добавлением 25 % раствора аммиака. Синтез проводили при температурах 0, 13, 35, 60 и 80 °С в реакторе с гидродинамической рубашкой, перемешивание продолжали в течение 1,5 ч. Продукт реакции подвергали старению в течение 24 ч. при комнатной температуре. Осадок аморфного фосфата кальция отфильтровывали на воронке Бюхнера и промывали дистиллированной водой в объемном соотношении к раствору с осадком 5:1. Для стабилизации АФК и предотвращения гидролиза порошки были подвергнуты сублимационному обезвоживанию в течение 24 часов, после чего были обработаны термически в муфельной печи при $T = 200$ °С в течение

3 часов. Полученные порошки АФК помещали в эксикатор и хранили при $T \leq 10^{\circ}\text{C}$.

Тетракальцевый фосфат (ТТКФ) получали методом твердофазного синтеза с последующим обжигом при 1450°C в течение 2 часов смеси карбоната кальция и дикальцийфосфата дигидрата (ДКФД) по реакции:



Для этого 34,4 г ДКФД смешивали с 20 г карбоната кальция в планетарной мельнице корундовыми шарами (соотношение М:Ш = 1:6) в среде этанола в течение 30 мин. Смесь порошков ДКФД и карбоната кальция сушили в сушильном шкафу при температуре 90°C . Полученный порошок помещали в тигель и проводили термическую обработку в печи с хромитлантановыми нагревателями при 1450°C в течение 2 часов.

После охлаждения спеченный материал подвергали измельчению, а затем помолу в планетарной мельнице в среде абсолютированного этанола корундовыми шарами (соотношение М:Ш = 1:12), осадок отделяли фильтрованием и сушили при 120°C , дезагрегировали пропусканием через сито с размером ячейки 96 мкм. Полученные порошки ТТКФ помещали в эксикатор и хранили при $T \leq 10^{\circ}\text{C}$.

2.1.2. Цементная жидкость

Цементную жидкость готовили растворением хитозана (до 3 масс. %) в водных растворах (до 3 %) ортофосфорной, глутаминовой и молочной кислот.

2.1.3. Армирующие компоненты

Керамические гранулы получали на основе порошка ТКФ диспергированием жидкой фазы на капли и последующей температурной обработкой. Порошок ТКФ синтезировали осаждением из растворов согласно реакции:



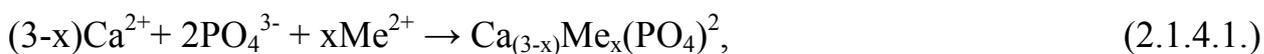
В качестве жидкой, сцепляющей частицы порошка, фазы использовали 10 %-ный раствор желатина в дистиллированной воде. Порошок ТКФ смешивали с раствором полимера в соотношении 2 мл раствора на 1 г порошка. Затем в эту суспензию вводили растительное масло при температуре 25 °С при непрерывном перемешивании лопастной мешалкой (скорость 1000 – 1500 об/мин). После осадок в виде керамических гранул отфильтровывали, отмывали и отжигали при температуре 1200 °С 60 мин. Отжиг проводили для удаления полимерной компоненты и формирования системы открытых взаимосвязанных пор. После сферические керамические гранулы просеивали, разделяя на фракции по размеру 100 - 200 и 300 – 500 мкм.

Частицы альгината натрия получали методом дробления. После керамические гранулы просеивали, разделяя на фракции по размеру 100 - 200 и 300 – 500 мкм.

2.1.4. Модифицирование порошка АФК катионами магния и цинка

Исходный порошок АФК модифицировали введением в него при синтезе катионов магния (Mg^{2+}) или цинка (Zn^{2+}). Синтез АФК проводили методом осаждения из водных растворов нитрата кальция, гидрофосфата

аммония и нитрата магния/цинка ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 / \text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) согласно реакции (2.1.4.1.):



где $\text{Me}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$ или Zn^{2+} в количестве 1, 2 и 5 масс. % по отношению к содержанию кальция, соответственно.

Раствор 1М нитрата кальция смешивали с 1М раствором нитрата магния или 1М нитратом цинка, далее по капельно добавляли раствор гидрофосфата аммония в раствор нитрата кальция, содержащего катионы магния (цинка), значение pH раствора поддерживали равным 7,0 добавлением NH_4OH . Полученный осадок отфильтровывали на воронке Бюхнера и сушили при температуре 80 °С в течение 2 суток. Высушенные порошки прокаливали при температуре 235 °С в течение 24 часов. Помол порошка вели циркониевыми шарами в тефлоновых барабанах в течение 30 минут в присутствии ацетона. Далее материал отфильтровывали на воронке Бюхнера и сушили при температуре 80 °С до полного высыхания.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Рентгенофазовый анализ

Рентгенофазовый анализ (РФА) – один из наиболее важных методов исследования структуры вещества, который позволяет проводить всестороннее изучение дифракции рентгеновских лучей телами различного строения и состава.

В работе рентгенографические исследования проводились на дифрактометре Rigaku D\Max – 2500 (Япония) и SHIMADZU – 6000 (Япония) с вращающимся анодом. Съёмку проводили в режиме отражения

(геометрия Брегга – Брентано) с использованием CuK_α излучения (длина волны = 1.54183 Å). Параметры работы генератора: ускоряющее напряжение 40 кВ, ток трубки 200 мА. Съёмку проводили в кварцевых кюветах без усредняющего вращения. Для закрепления порошковых образцов не использовали растворители. Параметры съёмки: интервал углов $2\theta = 10 - 60^\circ$, шаг по 2θ $0,02^\circ$, скорость регистрации спектров $5^\circ/\text{мин}$. Для коррекции спектра в качестве внутреннего стандарта использовали порошок кремния (ASTM). Анализ полученных рентгенограмм проводился с помощью программы WinXPow при использовании базы данных JCPDS.

2.2.2. Инфракрасная спектроскопия

Колебательные ИК – спектры поглощения широко используются для идентификации веществ по их молекулярному составу.

Для экспериментального исследования готовили образцы путем прессования в форме таблеток диаметром 13 мм с бромистым калием (усилие прессования 6 метрических тонн) из расчета 1 мг порошка на 150 мг бромистого калия (сверхчистого).

ИК – спектры образцов были получены на спектрометре Avatar Nicolet (США) в диапазоне $400 - 4000 \text{ см}^{-1}$ с шагом сканирования 4 см^{-1} . Анализ спектров проводили на основании литературных и существующих справочных данных.

2.2.3. Химический анализ (спектральный анализ)

Химический анализ проводили методом атомно – эмиссионной спектроскопии с индуктивно – связанной плазмой (АЭС с ИСП) на приборе ULTIMA 2 (Франция). Навески исследуемых материалов растворяли в 10 % - ной соляной кислоте (марки ОСЧ). Содержание металлов цинка, меди,

никеля, железа и марганца определяли также и методом атомно – абсорбционной спектроскопии (ААС) на приборе ICE 3500 (США). Относительная ошибка (погрешность) определения элементов приведена в таблице 2.2.3.1.

Таблица 2.2.3.1. – Относительная погрешность определения элементов

| Интервал содержаний элементов (масс. %) | Относительное стандартное отклонение АЭС с ИСП | Относительное стандартное отклонение ААС |
|---|--|--|
| 1,0 – 10,0 | 0,01 – 0,005 | 0,01 – 0,005 |
| 0,1 – 1,0 | 0,05 – 0,01 | 0,05 – 0,01 |
| 0,01 – 0,1 | 0,10 – 0,05 | 0,10 – 0,05 |
| 0,001 – 0,01 | 0,30 – 0,10 | 0,20 – 0,10 |

2.2.4. Сканирующая электронная микроскопия

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) дает возможность достигать значительных увеличений при визуальном анализе объектов (позволяет наблюдать объекты размера существенно меньше 1 мкм - ограничение оптической микроскопии).

Электронномикроскопические исследования образцов проводились при помощи сканирующих электронных микроскопов - Tescan VEGA II (Чехия). Для исследования в растровом режиме морфологии частиц образцы наклеивались на медную подложку при помощи проводящего углеродного клея и напыляли на них слой углерода или золота (напылительные установки Univex300 – Leybold, Германия; Fine Coat – JEOL, Япония). Поскольку образцы фосфатов кальция являются хорошими диэлектриками, то при облучении пучком электронов их поверхность не только нагревается, но и накапливает электрический заряд, что существенно затрудняет, а иногда и исключает возможность получения высококачественного изображения

морфологии поверхности при исследовании методом растровой электронной микроскопии (РЭМ). Поэтому перед изучением КФЦ в РЭМ на поверхность образцов методом ионно-плазменного распыления наносили тонкую сплошную пленку Au (толщина 10 – 20 нм), которая, с одной стороны, имеет хорошую электрическую проводимость и обеспечивает стекание наводимого электростатического заряда, с другой – высокий коэффициент вторичной эмиссии существенно повышает яркость и контраст РЭМ- изображения.

2.2.5. Просвечивающая электронная микроскопия

Для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) образцы готовили следующим образом. Полученный порошок помещали в рабочий бюкс с дистиллированной водой и полученную смесь подвергали диспергированию в установке УЗДН-2Т с частотой 44 КГц в течение 20 секунд до образования суспензии.

В качестве поддерживающих пленок, прозрачных для электронного пучка, использовали углеродные пленки (толщиной до 20 нм), которые получали методом электродугового испарения и конденсации в вакууме на поверхность скола кристалла КС) площадью $0,5 \text{ см}^2$ при давлении не выше $5 \cdot 10^{-3} \text{ Па}$ по стандартной методике в установке ВУП – 5. Углеродные пленки отделяли от кристаллов растворением последних в дистиллированной воде и вылавливали на предметную сетку для электронно-микроскопических исследований размером $1,0 \times 1,0 \text{ см}^2$. Высушенную пленку-подложку погружали в суспензию на 1-2 секунды, а затем извлекали и просушивали на воздухе. Аналогично готовили и цемент в виде порошка.

2.2.6. Механические испытания

Механические испытания образцов проводили на универсальной испытательной машине для одноосных опытов в диапазоне нагрузок до 5

тонн с электрическим приводом и следящей системой Instron 5581 (Великобритания). Для этого поверхности торцов цилиндрических образцов (диаметром $d = 8$ мм) предварительно зачищали в специальном шаблоне из текстолита до их параллельности. Шлифовку осуществляли с помощью алмазного абразивного инструмента.

Цилиндрические образцы подвергали одноосному (вдоль оси цилиндра) сжатию со скоростью нагружения 100 Н/с. Высота образцов определялась в каждом конкретном случае следящей системой по появлению нагрузки в момент «касания» столбика рабочей поверхностью установки. Влияние скорости проведения эксперимента на механические характеристики выявляли в опытах, когда скорость нагружения составляла 5 Н/с и 20 Н/с. Для оценки воспроизводимости значений прочности испытывали от 3 до 6 образцов. Пересчитанные в координаты «напряжение – деформация» кривые нагружения образцов регистрировались в оцифрованном виде на ЭВМ.

2.2.7. Время схватывания КФЦ

Время схватывания КФЦ определяли сопротивлением проникновению в КФЦ иглы диаметром 1 мм прибора Вика под воздействием нагрузки 400 г (стандарт ISO 1566).

2.2.8. Исследование деградации материалов

Исследование кинетики деградации проводили в жидкостях, моделирующих внеклеточную жидкость организма (изотонический раствор, NaCl), по изменению концентрации ионов в растворе, измеряемой ионоселективными электродом, и по изменению массы образцов (точность взвешивания 0,001 г.). Программа и методика исследовательских испытаний деградации КФЦ в

биологических жидкостях разработана согласно ГОСТ Р ИСО 10993 – 14 – 2001.

2.2.9. Испытания in vitro образцов КФЦ на модели первичной клеточной линии для оценки острой цитотоксичности

Скрининг образцов лабораторных партий образцов КФЦ осуществляли в 96-ти луночных платах (Costar, США). Каждый опытный образец в платах был представлен в триплетах. Эксперименты *in vitro* по оценке острой цитотоксичности данных материалов и динамики нарастания на них клеток выполняли на модели клеточной линии иммортализованных нормальных фибробластов человека (ФЧ) (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва).

Линию ФЧ поддерживали в полной ростовой среде (ПРС) следующего состава: среда ДМЕМ (ПанЭко, Москва), 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, Австрия), глютамин (600 мг/л), гентамицин (50 мкг/мл). В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста (предконфлюэнтный монослой). Для получения суспензии одиночных клеток монослой ФЧ обрабатывали 0,25% раствором трипсина (Sigma, США), затем полученную взвесь клеток тщательно дважды отмывали центрифугированием в большом объеме ПРС, производили их подсчет и оценку жизнеспособности, окрашивая клеточную суспензию 0,4 % раствором трипанового синего.

Стерильные образцы КФЦ (стерилизация: γ -облучение – 15 КГр до начала эксперимента раскладывали по 96-луночным платам (по четыре лунки на каждый срок/образец: триплет – опыт и 1 лунка – бланк) и заливали ПРС. Время экспозиции в ПРС и частота смены среды на свежую порцию зависели от начальных значений рН ростовой среды с образцами и динамики ее восстановления.

После установления нейтральных значений pH (1 – 3 суток экспозиции образцов в ПРС) в платы с исследуемыми образцами КФЦ (опыт) и без них (контроль) вносили суспензию ФЧ (40 тыс. клеток на лунку) в объеме 200 мкл ПРС и инкубировали: для определения острой цитотоксичности – в течение 24 часов, для оценки матричных свойств поверхности образцов КФЦ – 3, 6 суток с регулярной (дважды в неделю) полной заменой ПРС. Все операции осуществляют в стерильных условиях, в атмосфере влажного воздуха, содержащего 5 % CO₂ при 37 °С.

Жизнеспособность ФЧ в динамике эксперимента оценивали с помощью МТТ-метода, который основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый (МТТ, Sigma, США) в голубые кристаллы формазана, нерастворимые в воде. Как было показано ранее, количество образовавшегося формазана может характеризовать пролиферативную активность (жизнеспособность/количество) различных клеток человека и животных. Для проведения МТТ-теста в опытах *in vitro* по окончании культивирования из каждой лунки декантировали по 100 мкл среды и вносили по 25 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл. Через 3 часа инкубации (5 % CO₂, 37 °С) из каждой лунки полностью удаляли среду и производили растворение образовавшегося формазана с помощью изопропилового спирта (200 мкл на лунку). От осадка, образующегося в результате преципитации белков в изопропанол, освобождались центрифугированием плат в течение 10 мин. При 3000 об/мин. Далее из каждой лунки переносили по 100 мкл супернатанта в 96-луночный плоскодонный планшет (Costar, США) и оценивали оптическую плотность раствора формазана на спектрофотометре МСС-340 (Швеция) при длине волны 540 нм. В качестве спектрофотометрических контролей (бланки) использовали пробы с чистой ПРС и пробы, содержащие тестируемые образцы КФЦ в ПРС (без клеток).

На этапах эксперимента в каждый конкретный срок рассчитывали величину пула жизнеспособных клеток (ПЖК) (по отношению к контролю) по формуле:

$$\text{Пул жизнеспособных клеток} = \frac{\text{(ПЖК) } \text{ОД}^*_{\text{опыт.}}}{\text{ОД}_{\text{контр.}}} \times 100\% \quad (2.2.9.1)$$

ОД* - оптическая плотность раствора формазана.

При оценке матриксных свойств образцов КФЦ определяли изменение пула ФЧ

(Δ) в конкретный срок по формуле:

$$\Delta = \frac{\text{ОД}_{\text{наст.}} - \text{ОД}_{\text{пред.}}}{\text{ОД}_{\text{пред.}}} \times 100\% \quad (2.2.9.2)$$

ОД_{наст.} - величина оптической плотности раствора формазана в конкретный срок,

ОД_{пред.} - величина оптической плотности раствора формазана в предыдущий срок.

Положительная величина пула свидетельствовала о приросте популяции ФЧ, отрицательная – о гибели части популяции.

Статистическую обработку результатов проводят по методу Стьюдента. Достоверным считали разницу при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ И БИОПОЛИМЕРОВ

Согласно данным РФА, исходный цементный порошок АФК является продуктом синтеза при температурах 0, 13 и 35 °С (рис. 3.1.). При повышении температуры до 60 – 80 °С АФК кристаллизуется в гидроксиапатит.

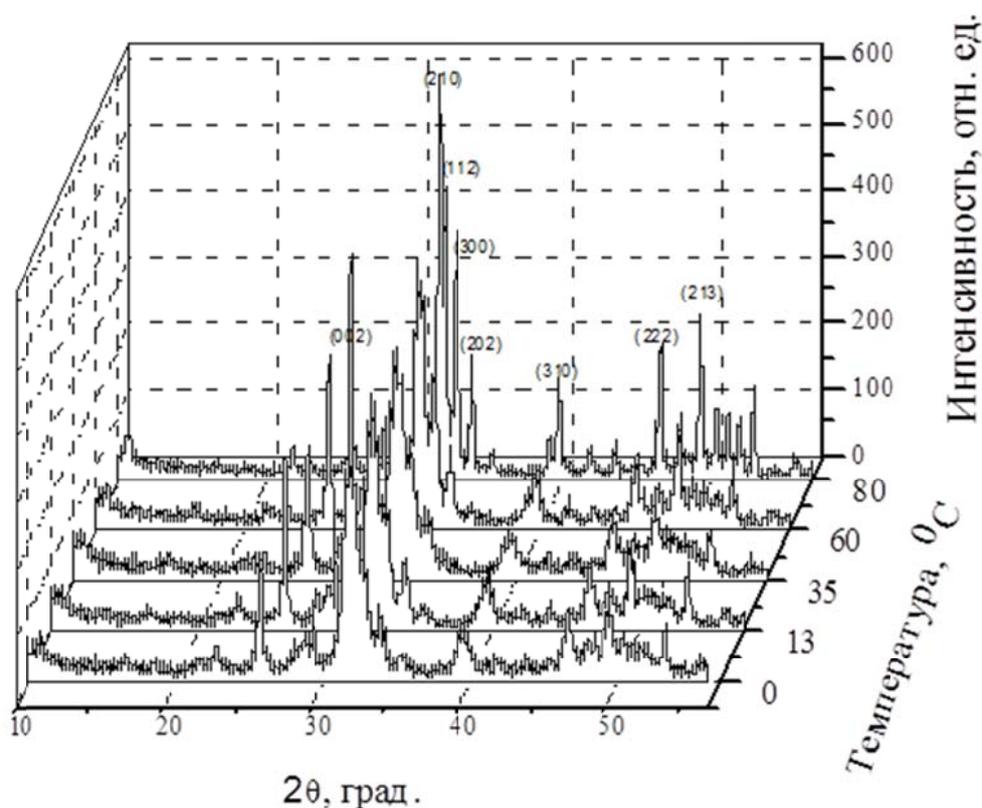


Рисунок 3.1. - Дифрактограммы порошков АФК, полученных при разных температурах синтеза

ИК – спектры порошков АФК представлены на рисунке 3.2. Полосы с волновыми числами в интервалах 960 – 962 и 520 – 660 см^{-1} соответствуют ν_1 и ν_4 модам колебаний фосфатных групп, причем наличие пиков при 553 – 563 и 600 – 602 см^{-1} характерно именно для карбонат содержащего апатита. Полосы в интервале 1300 – 1650 см^{-1} и около 873 см^{-1} соответствуют ν_3 и ν_2

модам колебаний карбонат – групп. С возрастанием температуры синтеза пики сужаются, становятся более разрешенными. Интенсивность полос ОН – групп и фосфатных групп может рассматриваться как индикатор кристалличности апатита. Увеличение интенсивности этих полос с повышением температуры синтеза указывает на возрастание кристалличности продукта синтеза. Снижение интенсивности широкой полосы поглощения адсорбционной воды в интервале $2500 - 3700 \text{ см}^{-1}$ также подтверждает этот вывод, поскольку закристаллизованный ГА менее гидрофилен по сравнению с аморфным фосфатом кальция.

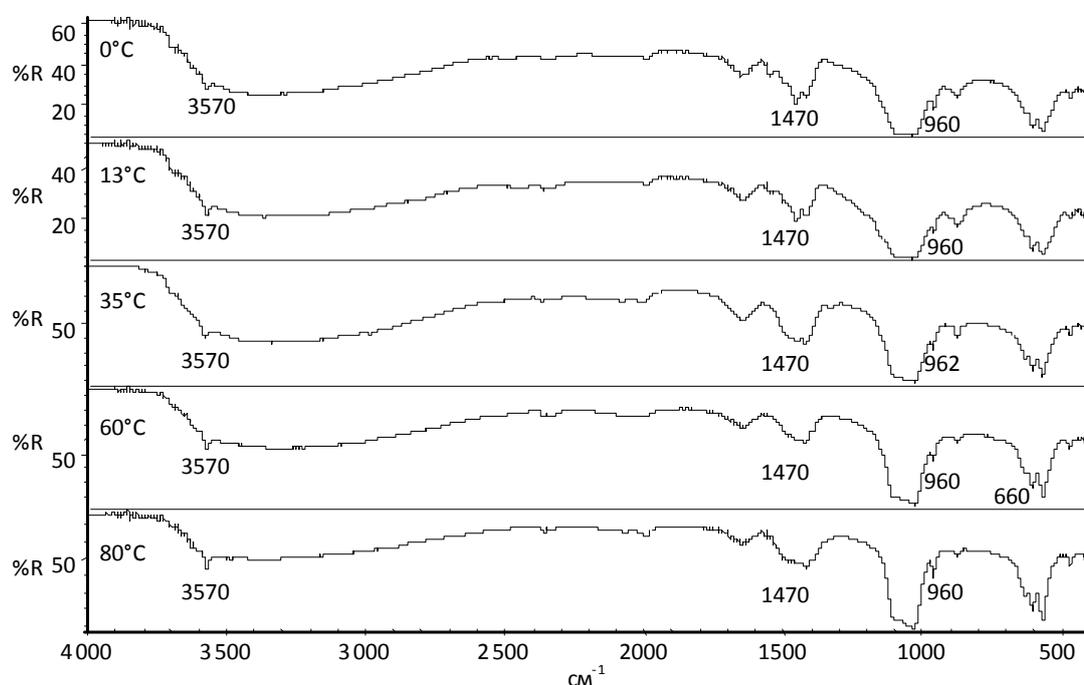


Рисунок 3.1.2 - ИК спектры порошков АФК, полученных при разных температурах синтеза

Для контроля фазового состава реакционно - связанных материалов были проведены исследования кинетики гидролиза синтезированного порошка АФК в ГА при различных температурах (от 0 до $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$) в растворе приближенном по химическому составу к плазме крови человека (SBF). Анализ кинетики превращения показал, что максимум степени превращения (60 %) достигается после гидролиза в течение 24 часов при $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$. При более

длительной выдержке в SBF превращение происходит с очень малой скоростью. При увеличении времени выдержки в SBF рост кристаллов ГА уменьшается, так как на поверхности образуется апатитовый слой, замедляющий диффузию.

Средний размер кристаллитов рассчитывали по формуле Шеррера. Результаты проведенной оценки, а также данные измерений удельной поверхности и размера частиц порошка приведены в таблице 3.1. Размер кристаллитов изменяется с увеличением температуры синтеза от 11,5 нм до 37 нм при температуре 0 °C и 80 °C соответственно.

Таблица 3.1. - Средний размер кристаллитов и удельная поверхность порошков АФК

| Температура синтеза, °C | 0 | 13 | 35 | 60 | 80 |
|---|------|------|------|------|------|
| Размер кристаллитов по Шерреру, нм | 11,5 | 14,8 | 12,0 | 20,0 | 37,1 |
| Удельная поверхность, м ² /г | 98 | 90 | 139 | 69 | 54 |
| Размер частиц по удельной поверхности | 20 | 22 | 14 | 28 | 36 |

Форма кристаллитов изменяется от близкой к сферической при низких температурах до игольчатых с изменением температуры от 0 °C до 80 °C.

На рисунке 3.3 представлены электронограмма (а), светлопольное (б) и темнопольное (в) ПЭМ-изображения, характеризующие фазовый состав, субструктуру и морфологию частиц исходного порошка аморфного фосфата кальция, полученного синтезом при температуре 35 °C. Из электронграммы следует, исходный порошок нанокристалличен. Вследствие близости параметров решеток кристаллических структур фосфатов кальция, малыми

размерами, и текстурой однозначная идентификация кристаллической фазы затруднена.

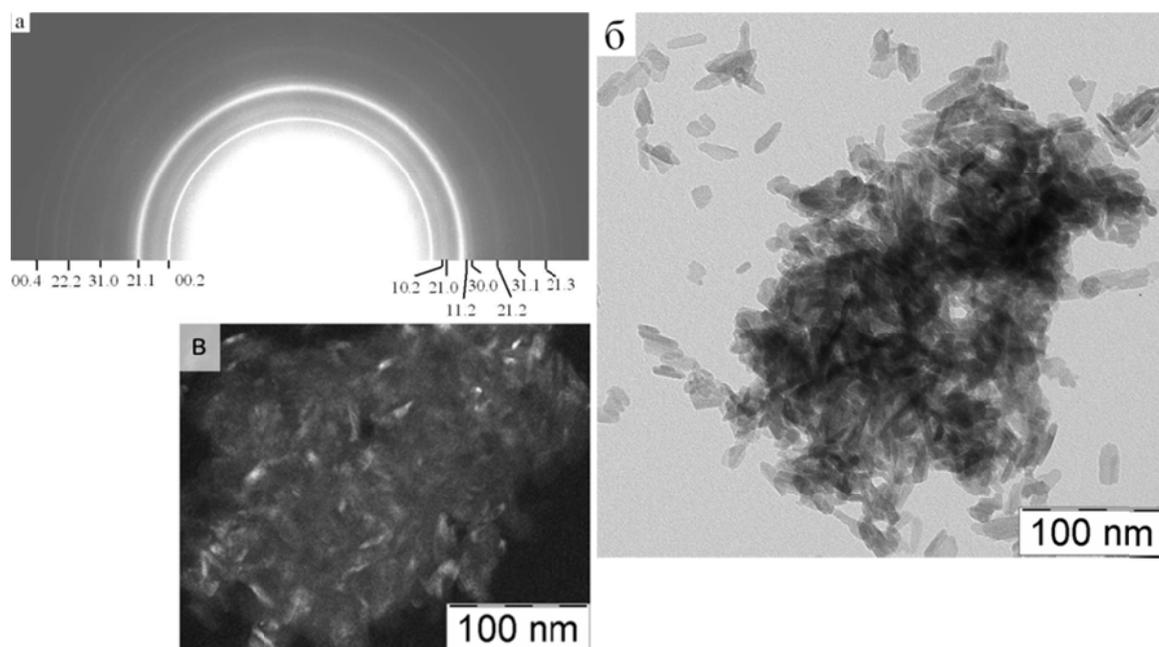


Рисунок 3.3. - Электронограмма (а), светлопольное (б) и темнопольное (в) ПЭМ-изображения исходного порошка АФК

Исходный порошок тетракальциевого фосфата (ТТКФ) получали методом твердофазного синтеза с последующим обжигом при 1450 °С. По данным РФА показано, что единственной кристаллической фазой полученного порошка является ТТКФ (рисунок 3.4.).

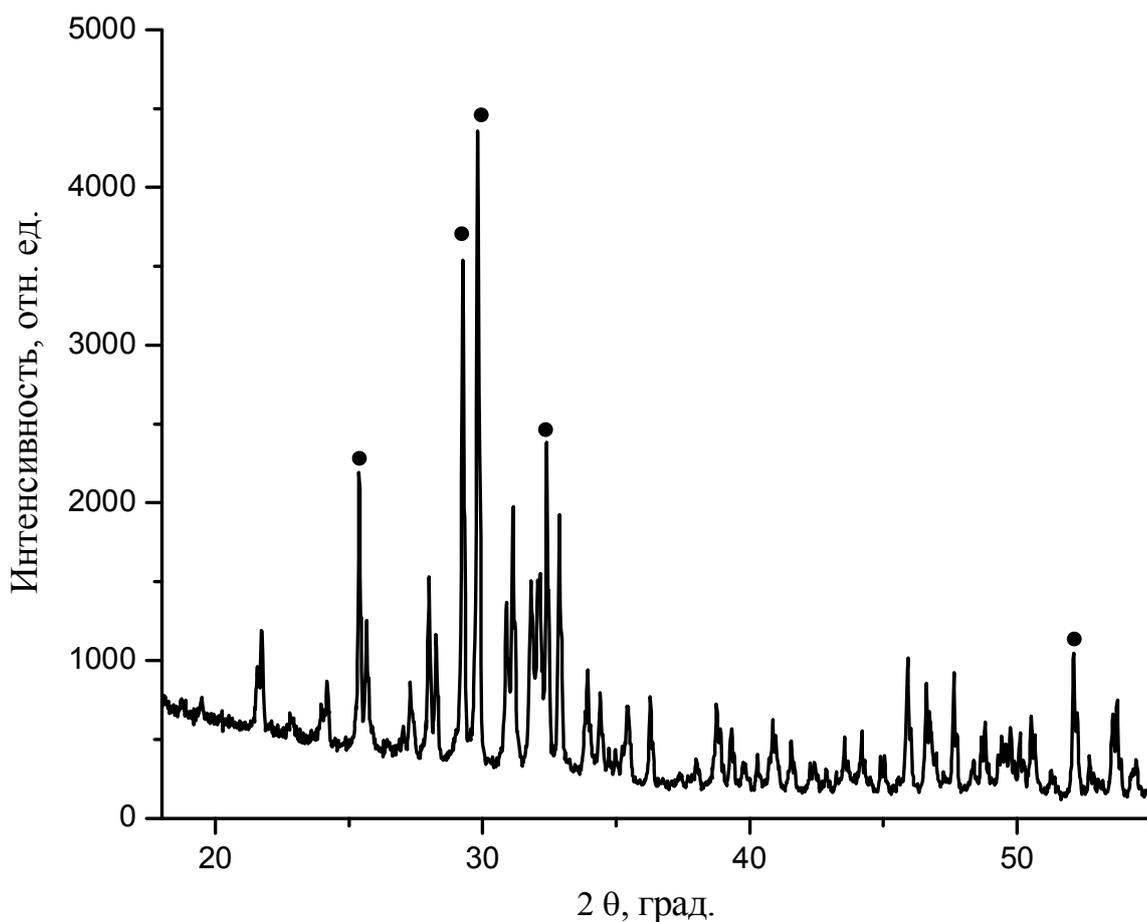


Рисунок 3.4. – Дифрактограмма тетракальциевого фосфата

По данным ПЭМ порошок ТТКФ состоит из отдельных частиц длиннопризматической (большинство) и пластинчатой морфологии. Размеры длиннопризматических частиц по большой оси составляют от 10 до 30 нм, по малой – от 3 до 9 нм. Размер пластинчатых частиц составляет около 25 нм. Размер областей когерентного рассеяния на темнопольном изображении не превышает 10 нм, что свидетельствует о дефектной и мозаичной кристаллической структуре частиц. На рисунке 3.5 представлены микроэлектронограмма (а) и светлопольное (б) ПЭМ-изображения, характеризующие субструктуру и морфологию частиц диспергированного образца ТТКФ. Картины микродифракции свидетельствуют о микрокристалличности основной фракции порошка, относящейся, к ТТКФ.

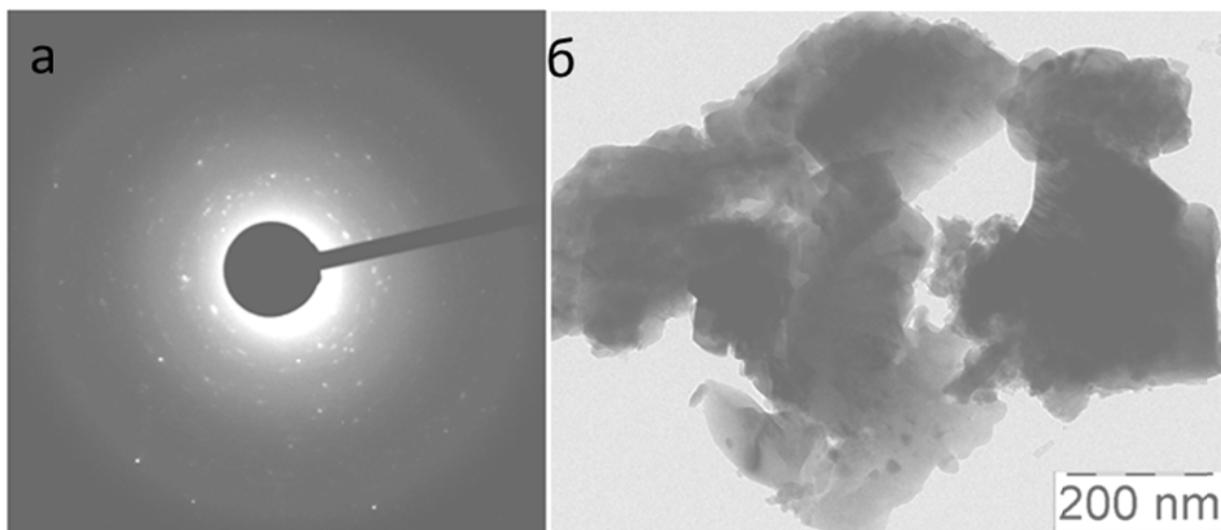


Рисунок 3.5. - Микроэлектронграмма (а), светлопольное (б) ПЭМ - изображения исходного порошка ТТКФ

По данным ПЭМ можно сделать вывод, что частицы исходного порошка ТТКФ являются либо отдельными кристаллитами, либо агрегатами нескольких зерен. Фракционный состав порошка характеризуется широким спектром размеров частиц от 0,2 до 3 мкм. Зерна в агрегатах имеют размеры от 0,05 до 1 мкм.

Неорганическая составляющая композиционного КФЦ состояла из аморфного фосфата кальция (АФК) и тетракальциевого фосфата (ТТКФ) в соотношении от 1 до 1,3. В качестве цементной жидкости (ЦЖ) использовали хитозан в водных растворах ортофосфорной кислоты концентрации 1-3 масс. %, водных суспензиях глутаминовой или молочной кислоты концентрации 1-3 масс. %. Проводили сравнительные исследования с жидкой фазой без хитозана и с хитозаном в количестве 1-3 масс. %.

Установлена последовательность введения компонентов в систему для того, чтобы получить хитозановый каркас: сначала готовят смесь ЦЖ с АФК ($\text{pH} \approx 4$), а затем в эту смесь добавляют ТТКФ, который изменяет значение pH в сторону нейтральной реакции, что приводит к полимеризации хитозана и образованию каркаса. Технологическая схема получения КФЦ приведена на рисунке 3.6.

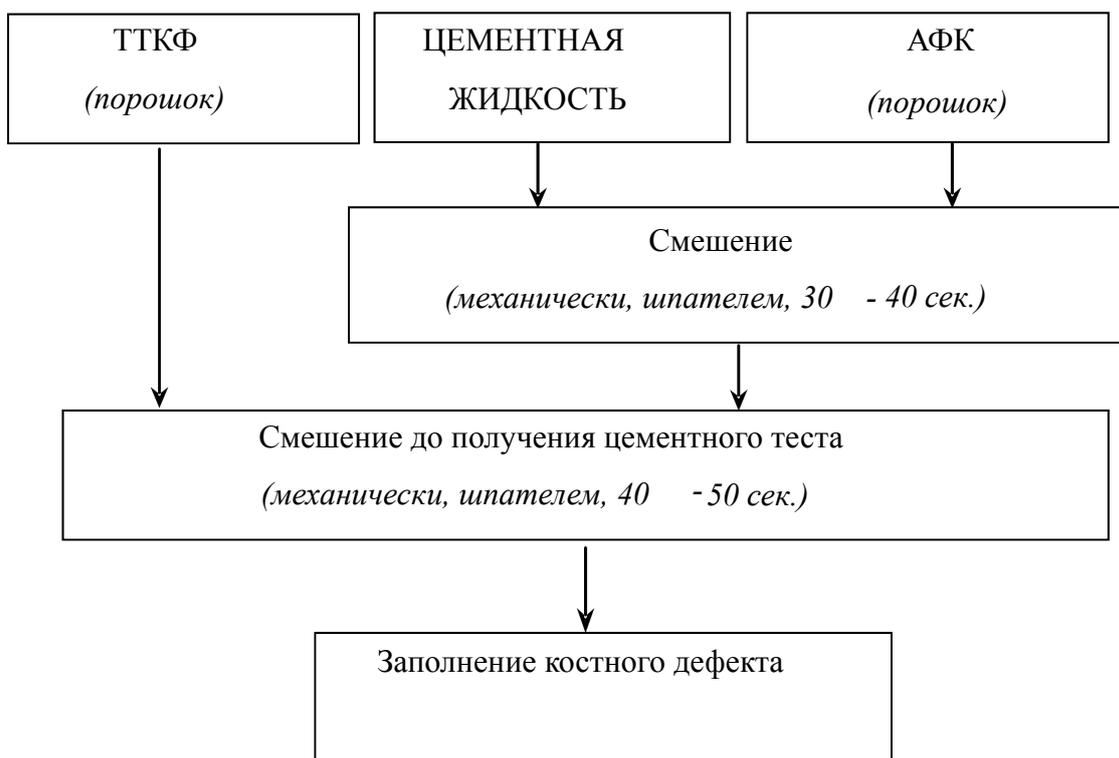


Рисунок 3.6. – Схема получения композиционного КФЦ

Неорганическая составляющая композиционного КФЦ состояла из АФК и ТТКФ в соотношении от 0,5 до 1,3. В качестве (ЦЖ) использовали 1, 2 и 3 % хитозан в водных растворах ортофосфорной кислоты концентрации 1-3 масс. %, водных суспензиях глутаминовой или молочной кислоты концентрации 1-3 масс. %.

Изучены параметры цементной системы – время схватывания, значение рН материала после схватывания и твердения, вязкость системы - в зависимости от различных технологических параметров.

Показано, что оптимальное соотношение концентраций является 1/1. При иных соотношениях происходит существенное уменьшение времени схватывания (в случаях, когда концентрация хитозана меньше концентраций кислоты), либо цементный камень не формируется (концентрация хитозана выше концентрации кислоты). Результаты исследований изменения концентрации хитозана и концентраций кислот на примере ортофосфорной кислоты приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. – Изменение параметров КФЦ на основе фосфорной кислоты при различных ЦЖ

| | рН ЦЖ | Время схватывания, мин. | рН КФЦ после схватывания | рН КФЦ через 10 мин. | рН КФЦ через 1 час | рН КФЦ через 24 часа |
|------------------------------------|-------|-------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| ЦЖ 1 % хит. 1% фосф. к-та. | 4,46 | 30 мин. | 7,2 | 7,4 | 7,5 | 7,6 |
| ЦЖ 2 % хит. 1% фосф. к-та. | - | - | - | - | - | - |
| ЦЖ 3 % хит. 1% фосф. к-та. | - | - | - | - | - | - |
| ЦЖ 1 % хит. 2% фосф. к-та. | 3,84 | 1 мин. | 6,2 | 6,3 | 6,3 | 6,3 |
| ЦЖ 2 % хит. 2% фосф. к-та. | 4,23 | 20 мин. | 7,1 | 7,4 | 7,4 | 7,5 |
| * ЦЖ 3 % хит. 2% фосф. к-та. | - | - | - | - | - | - |
| ЦЖ 1 % хит. 3% фосф. к-та. | 3,76 | ≤1 мин. | 6,1 | 6,4 | 6,4 | 6,2 |
| ЦЖ 2 % хит. 3% фосф. к-та. | 3,92 | 2-3мин. | 6,6 | 6,5 | 6,5 | 6,3 |
| ЦЖ 3 % хит. 3% фосф. к-та. | 4,2 | 20 мин. | 6,9 | 7,3 | 7,5 | 7,5 |

При варьировании соотношения твердая фаза/жидкая фаза было получено оптимальное значение 1/1, поскольку уменьшение количества ЦЖ (до соотношения 0,5/1) не удастся получить гомогенную цементную пасту, происходит слишком быстрое схватывание цементного материала, время схватывания составляет 1 – 2 минуты. При изменении количества ЦЖ в

большую сторону (до 1/1,5) цементная паста имеет слишком жидкую консистенцию и время схватывания составляет более нескольких часов (таблица 3.3).

Таблица 3.3. – Время схватывания КФЦ при различном соотношении жидкая фаза/твёрдая фаза

| Соотношение жидкая фаза/твёрдая фаза (ЦЖ/ФК) | 0,5/1 | 1/1 | 1,5/1 |
|--|---------|---------|------------|
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % ортофосфорной кислоты | 12 мин. | 30 мин. | ≥60 мин. |
| ЦЖ на основе 2 % хитозана в растворе 2 % ортофосфорной кислоты | 7 мин. | 20 мин. | 45-50 мин. |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % ортофосфорной кислоты | -* | 20 мин. | 45 мин. |
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % молочной кислоты | 10 мин. | 23 мин. | ≥60 мин. |
| ЦЖ на основе 2 % хитозана в растворе 2 % молочной кислоты | 5 мин. | 12 мин. | 35 мин. |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % молочной кислоты | -* | 10 мин. | 20 мин. |
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % глутаминовой кислоты | 14 мин. | 36 мин. | ≥60 мин. |
| ЦЖ на основе 2 % хитозана в растворе 2 % глутаминовой кислоты | 9 мин. | 30 мин. | 55 мин. |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % глутаминовой кислоты | -* | 25 мин. | 53 мин. |

*– не был получен цементный материал.

Влияние изменения соотношения порошковой компоненты приведено в таблице 3.4. Показано, что уменьшение количества основного компонента ТТКФ приводит к увеличению времени схватывания. Оптимальным выбрано соотношение АФК/ТТКФ = 1,3/1. Для ЦЖ на основе

ортофосфорной, молочной и глутаминовой кислот при этом соотношении время схватывания составляет от 15 до 30 минут.

Таблица 3.4. – Время схватывания КФЦ при различном соотношении АФК/ТТКФ

| Соотношение порошковой компоненты АФК/ТТКФ | 1/1 | 1,3/1 | 1,5/1 |
|--|---------|---------|---------|
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % ортофосфорной кислоты | 10 мин. | 30 мин. | 40 мин. |
| ЦЖ на основе 2 % хитозана в растворе 2 % ортофосфорной кислоты | 8 мин. | 20 мин. | 43 мин. |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % ортофосфорной кислоты | 4 мин. | 20 мин. | 45 мин. |
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % молочной кислоты | 8 мин. | 18 мин. | 27 мин. |
| ЦЖ на основе 2 % хитозана в растворе 2 % молочной кислоты | 5 мин. | 15 мин. | 23 мин. |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % молочной кислоты | 3 мин. | 13 мин. | 20 мин. |
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % глутаминовой кислоты | 15 мин. | 34 мин. | 40 мин. |
| ЦЖ на основе 2 % хитозана в растворе 2 % глутаминовой кислоты | 19 мин. | 35 мин. | 38 мин. |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % глутаминовой кислоты | 7 мин. | 22 мин. | 34 мин. |

Таким образом, были установлены оптимальные условия и соотношения для получения композиционных кальцийфосфатных цементов с полимерной составляющей. При замешивании цемента необходимо соблюдать последовательность введения компонентов: ЦЖ смешивают с АФК и, после перемешивания, вводят ТТКФ, повышающий значение pH. Цементная жидкость представляет собой 1 -3 % раствор хитозана в 1 -3 %

растворах ортофосфорной, глутаминовой и молочной кислотах с соотношением концентраций полимер/кислота 1/1. Соотношения порошковой компоненты АФК/ТТКФ составляет 1,3/1 и соотношение твердая фаза/жидкая фаза 1/1. Выбранные условия и соотношения позволяют получать гомогенную цементную пасту с варьируемым временем схватывания от 15 до 30 минут. Начальное значение рН такой системы составляет 7,0 - 7,1, через 24 часа увеличивается до 7,5 – 7,6.

Согласно данным РФА основной фазой в продукте взаимодействия, вне зависимости от состава ЦЖ, на 14 суток твердения в SBF является апатитоподобная фаза частицы непрореагировавшего порошка ТТКФ. На рисунке 3.7 приведены данные РФА для КФЦ на основе 3 % хитозана в 3 % ортофосфорной кислоте сразу после схватывания материала и после твердения на воздухе в течение 3, 7 и 14 суток.

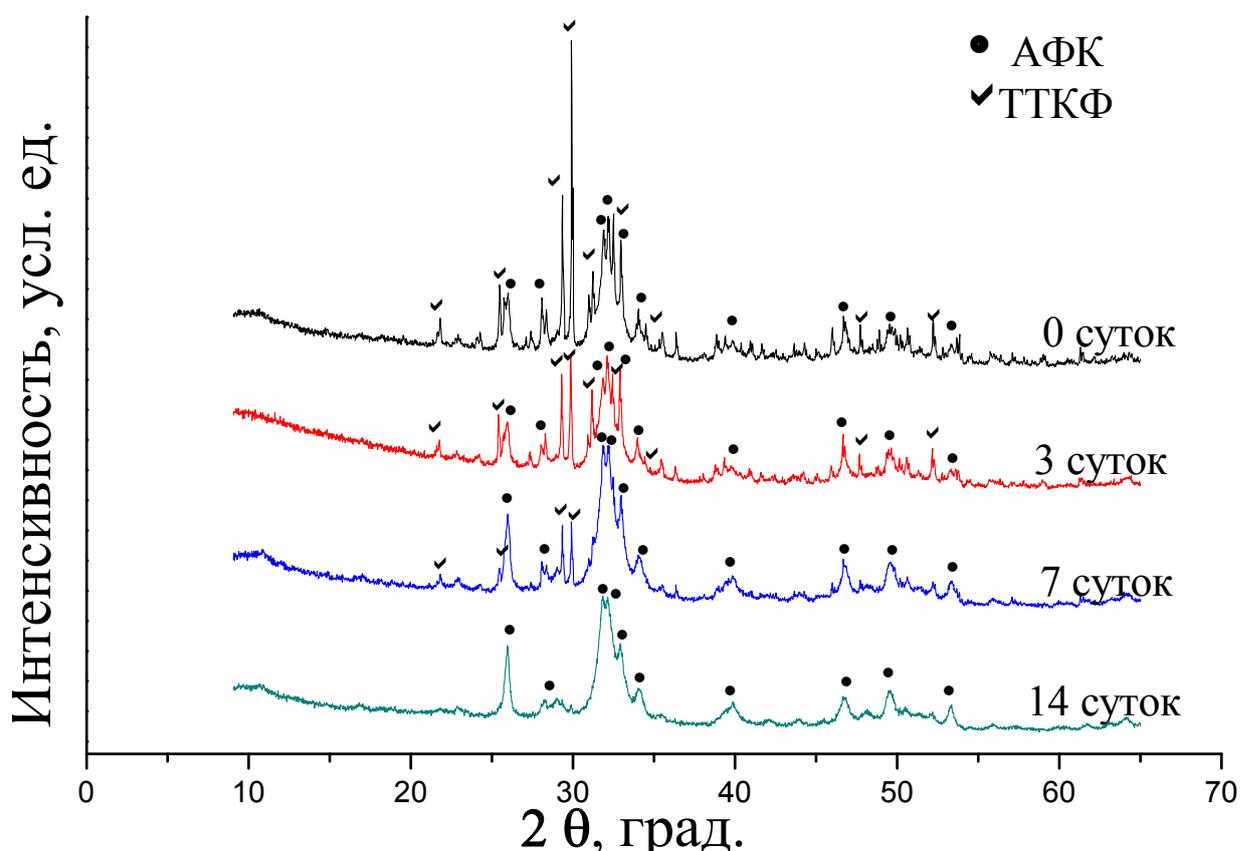


Рисунок 3.7. - Дифрактограмма композиционных КФЦ на основе 3 % хитозана в 3 % растворе ортофосфорной кислоты

Анализ КФЦ методом ПЭМ подтверждает результаты РФА, не исключая, кроме апатитоподобной фазы и непрореагировавшего ТТКФ, возможности присутствия аморфно-нанокристаллической фазы (АНФ). Частицы всех цементных порошков являются агрегатами микро- и нанокристаллов, связанными аморфно-нанокристаллической фазой по структуре близкой к ГА.

Микрокристаллы соответствуют частицам порошка ТТКФ, нанокристаллы – длиннопризматические частицы апатитоподобной фазы. АНФ связывает эти полидисперсные частицы, местами образуя глобулярные и игольчатые нанокристаллические выделения. Несмотря на одинаковый фазовый состав всех образцов и общие совокупные характеристики субструктуры и морфологии, на ПЭМ изображениях заметны индивидуальные особенности, обусловленные различием цементаобразования в системе хитозан/АФК+ТТКФ для различных цементных жидкостей. Для удобства сравнения субструктурные и морфологические параметры в зависимости от состава и содержания затворяющей жидкости сведены в таблицу 3.5.

Таблица 3.5. - Морфологические особенности композиционных КФЦ

| Состав ЦЖ | ТТКФ | Ca ₉ HPO ₄ (PO ₄)OH | АНФ | |
|--|-----------|---|---------|----------|
| | | Вытянутые призмы | глобулы | иглы |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % ортофосфорной кислоты | 0,1-2 мкм | 20/8 нм | 3 нм | 40/ 5 нм |
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % ортофосфорной кислоты | 0,1-2 мкм | 20/8 нм | 2 нм | нет |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % молочной кислоты | 0,1-2 мкм | 20/8 нм нанопоры 2 нм | 5 нм | 50/ 8 нм |
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % молочной кислоты | 0,1-2 мкм | 20/8 нм | 2 нм | 40/ 5 нм |
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % глутаминовой кислоты | 0,1-2 мкм | 20/8 нм | 4 нм | 40/ 4 нм |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % глутаминовой кислоты | 0,1-2 мкм | 20/8 нм | 4 нм | 40/ 4 нм |

Размеры нанокристаллических глобул и игл больше в КФЦ, полученных на основе цементной жидкости с более низкими значениями pH. В частицах цемента на основе 3 % хитозана в растворе 3 % молочной кислоты присутствуют нанопоры размером около 2 нм (рисунок 3.8).

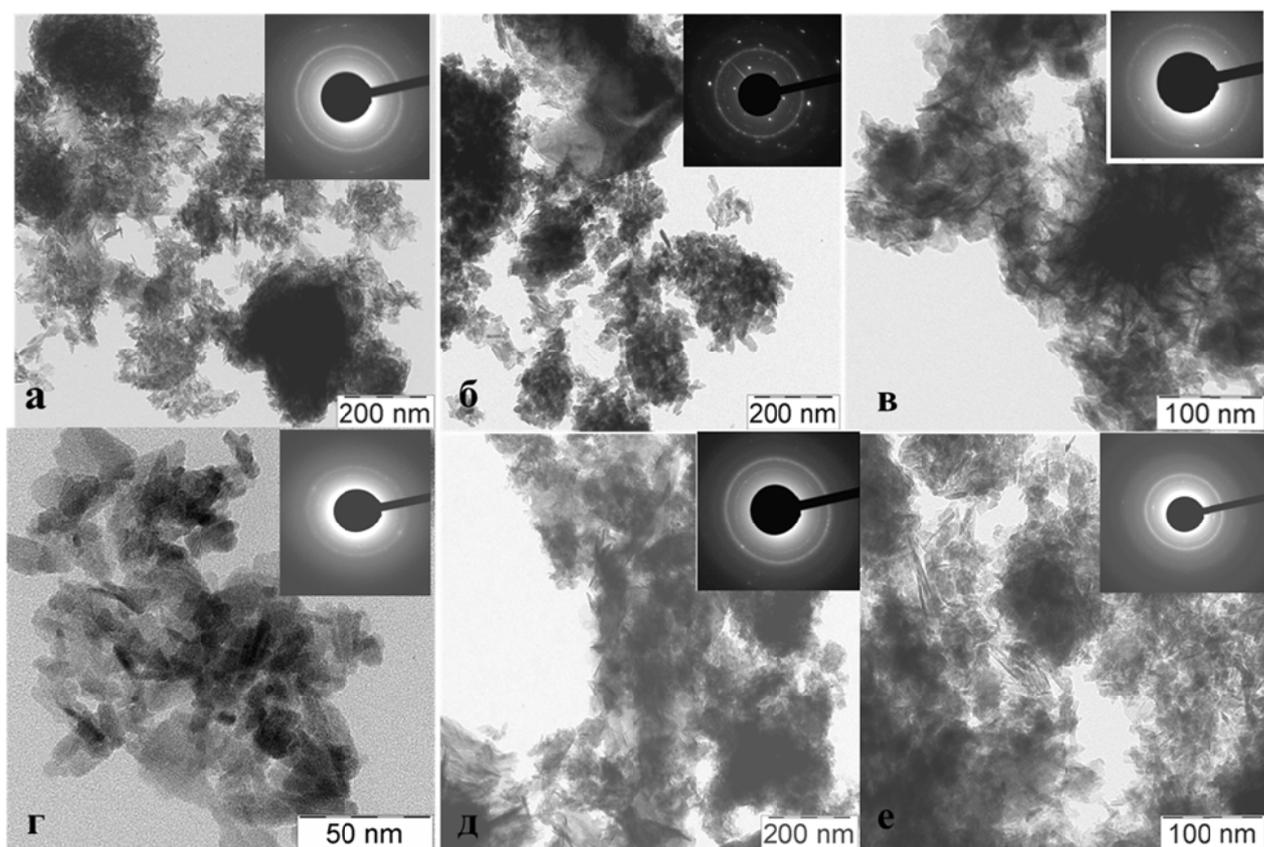


Рисунок 3.8. - Микроэлектроннограмма и светлопольные изображения КФЦ на основе: а – 3 % ортофосфорной кислоты; б – 3 % молочной кислоты; в – 3 % глутаминовой кислоты; г - 1 % ортофосфорной кислоты; д - 1 % молочной кислоты; е - 1 % глутаминовой кислоты

По данным СЭМ композиционные КФЦ представляют собой хитозановый каркас, в котором по всем объему распределены частицы АФК размером менее 1 мкм. Частицы непрореагировавшего ТТКФ имеют размер до 10 мкм. На рисунке 3.9 приведена микроструктура КФЦ на основе ЦЖ различного состава после 14 суток твердения на воздухе и выдержке в SBF.

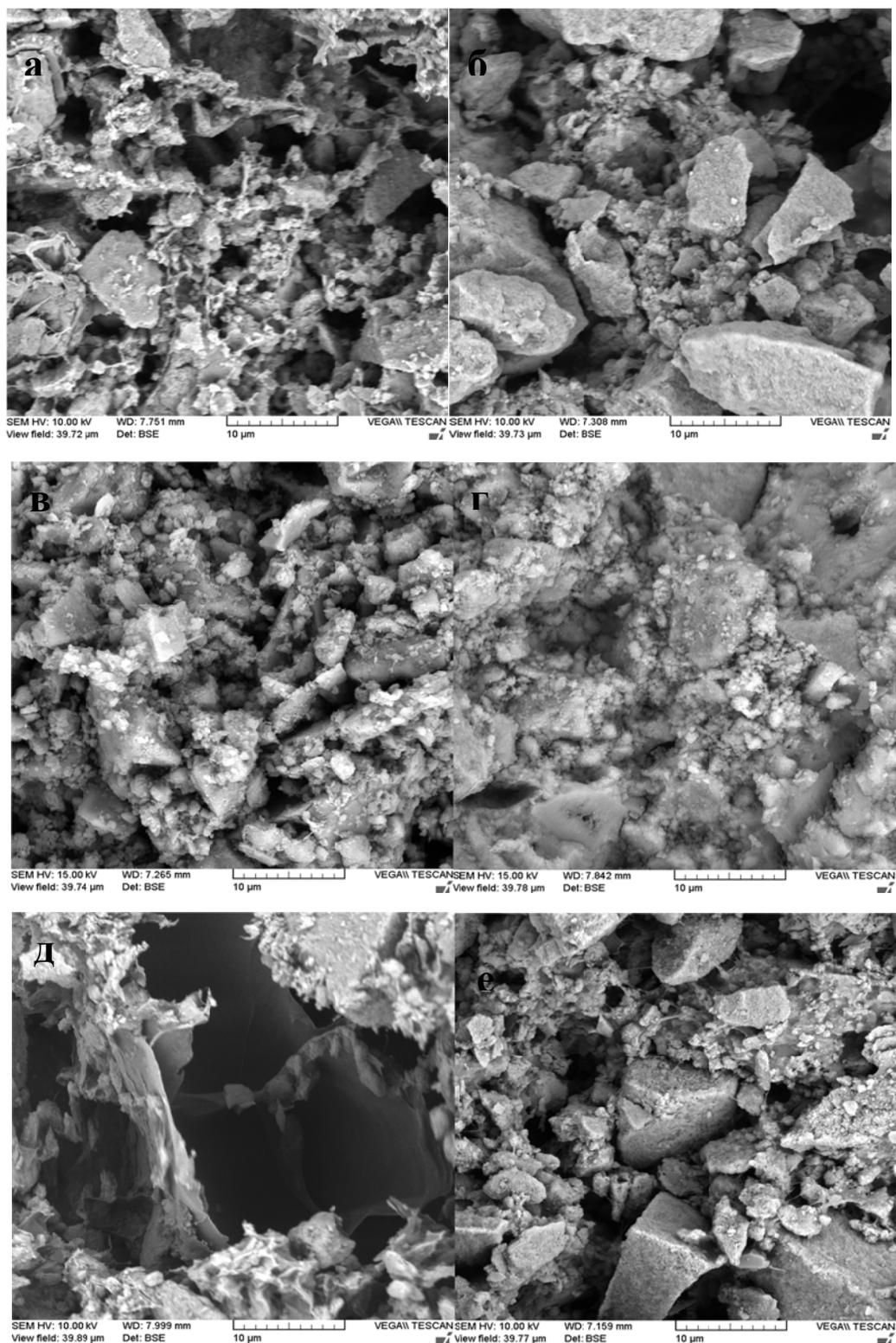


Рисунок 3.9. – Микроструктура КФЦ на основе: а, б – 3 % ортофосфорной кислоты; в, г – 3 % молочной кислоты; д, е – 3 % глутаминовой кислоты после твердения в течение 14 суток на воздухе и в SBF, соответственно

Прочность композиционных КФЦ, выдержанных на воздухе, была в 3 - 4 раза выше прочности цементов, твердевших в SBF. На рисунке 3.10

показана диаграмма зависимости прочности цемента после 7 суток твердения на воздухе и в SBF от содержания хитозана в ЦЖ. Прочность возрастает с увеличением содержания хитозана и при переходе от органических глутаминовой и молочной кислот к неорганической ортофосфорной кислоте. Последнее может быть обусловлено более высокой степенью завершенности взаимодействия компонентов системы: взаимодействие органических кислот с хитозаном происходит через amino - группы хитозана и карбокси - группы кислот, тогда как ортофосфорная кислота более эффективна из-за образования протонов.

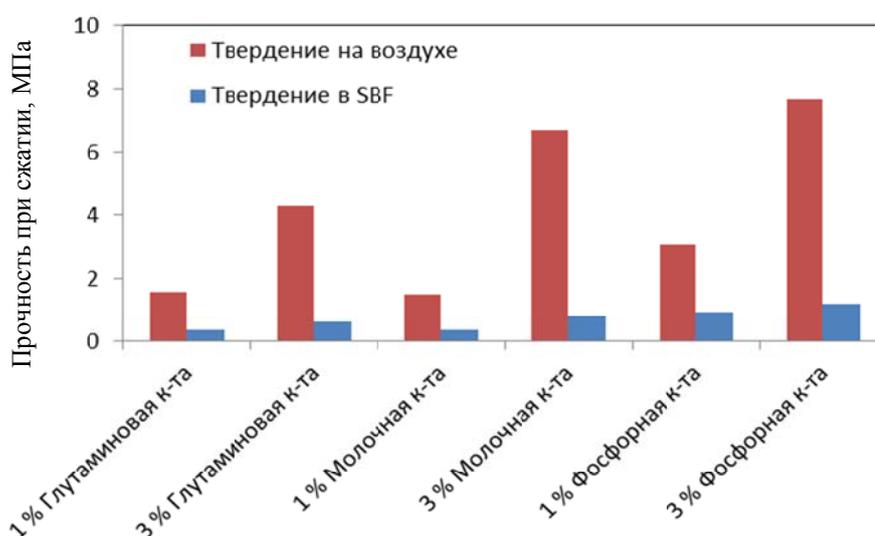


Рисунок 3.10. - Диаграмма зависимости прочности цемента от состава цементной жидкости при твердении на воздухе и в SBF на 7 сутки

Определение пористости материалов методом гидростатического взвешивания показало, что значения открытой пористости КФЦ 15 – 20 % (таблица 3.5). Через 28 суток при твердении и выдержке в SBF пористость возрастает в почти в 2 раза, достигая значений 25 - 27 % для КФЦ с содержанием хитозана 3 %. Это можно объяснить растворением полимерной компоненты в композиционном КФЦ, что приводит к образованию сквозных макропор в материале.

Таблица 3.5. - Открытая пористость КФЦ при выдержке в SBF

| Время выдержки в SBF | 1 сутки | 3 сутки | 7 сутки | 14 сутки | 28 сутки |
|--|---------|---------|---------|----------|----------|
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % ортофосфорной кислоты | 17,5 % | 17,5 % | 24,2 % | 22,4 % | 24,4 % |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % ортофосфорной кислоты | 18,3% | 18,8 % | 22,9 % | 25,5 % | 27,2 % |
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % молочной кислоты | 13,6 % | 13,6 % | 14,5 % | 14,8 % | 17,8 % |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % молочной кислоты | 17,6 % | 18,4 % | 19,1 % | 21,0 % | 22,3 % |
| ЦЖ на основе 1 % хитозана в растворе 1 % глутаминовой кислоты | 19,7 % | 19,7 % | 19,9 % | 21,4 % | 25,7 % |
| ЦЖ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % глутаминовой кислоты | 17,9 % | 18,3 % | 19,8 % | 22,4 % | 26,8 % |

На рисунке 3.11 приведены диаграммы деформирования композиционных цементов на основе с 3 % хитозана в растворе 3 % ортофосфорной кислоты при твердении на воздухе и в SBF в течение 3, 7 и 14 суток. Деформация КФЦ при твердении на воздухе оставляет 8 - 9 %. Твердение в SBF приводит к значительному повышению деформируемости цемента (рис. 3.11 б). Предельная деформация до разрушения таких цементов достигает 20-25 %.

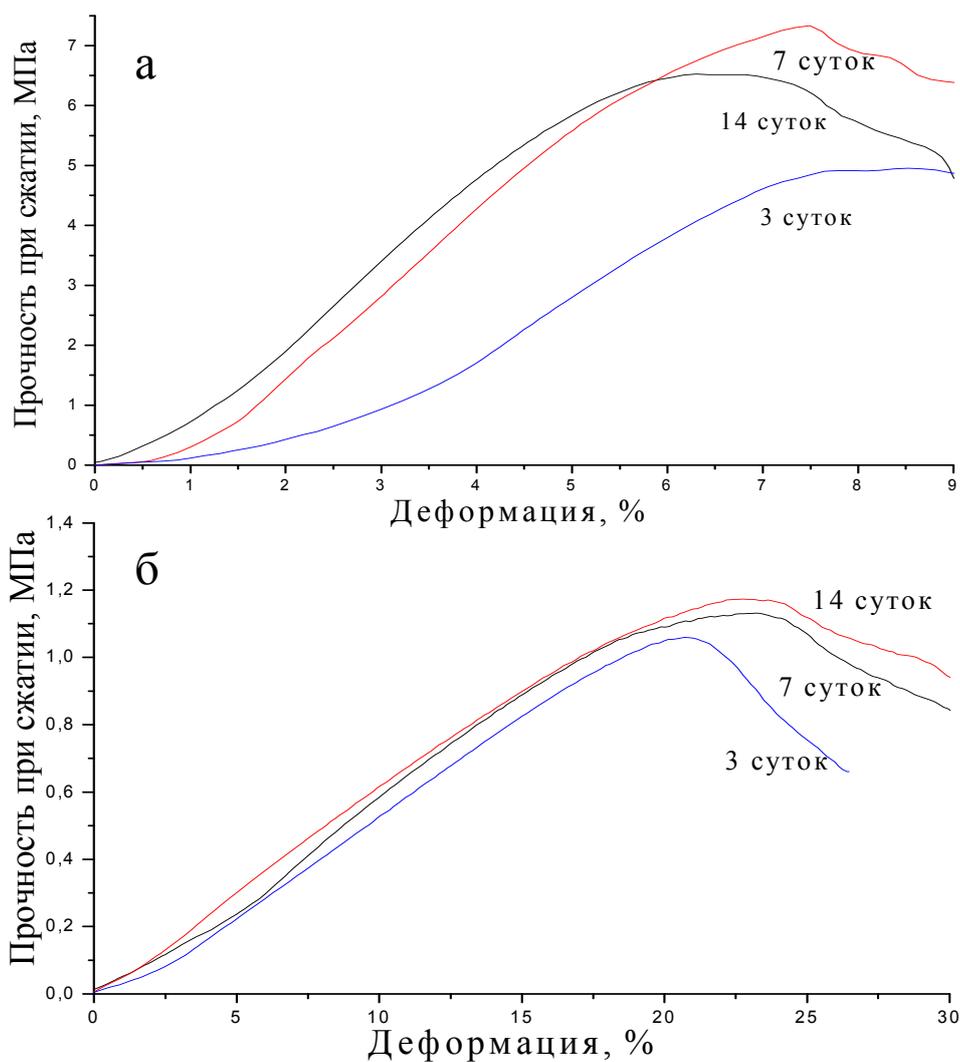


Рисунок 3.11. - Диаграммы деформирования при сжатии КФЦ на основе 3 % хитозана в 3 % растворе фосфорной к-ты после твердения: а – на воздухе; б – в растворе SBF

Таким образом, установлены условия формирования полимерного каркаса, армированного частицами ФК. Выявлены зависимости влияния полимерной составляющей на процессы фазообразования и морфологические особенности КФЦ, в том числе на микроструктуру и прочностные свойства материала.

ГЛАВА 4. МОДИФИЦИРОВАНИЕ КОМПОЗИЦИОННЫХ КФЦ КЕРАМИЧЕСКИМИ И АЛЬГИНАТНЫМИ ГРАНУЛАМИ

В четвертой главе представлены результаты исследования технологии армирования КФЦ гранулами фосфатов кальция - для упрочнения цемента и резорбируемого полисахарида - для формирования пористости в цементе имплантате. На основании проведенных ранее исследований для формирования матрицы композиционного материала выбрана цементная система на основе АФК/ТТКФ (соотношение 1,3/1) и цементная жидкость на основе 3 % хитозана в 3 % водном растворе ортофосфорной кислоты. Армирующими компонентами были керамические гранулы трикальцийфосфата (ТКФ) и полисахарида – альгината натрия, размером 100 – 200 и 300- 500 мкм.

4.1. Упрочнение композиционных КФЦ в системе фосфаты кальция – хитозан гранулами трикальцийфосфата

В порошок АФК вводили керамические гранулы ТКФ размером 100-200 или 300-500 мкм в количестве 10, 20 или 30 масс. %. СЭМ – изображения керамических гранул на основе ТКФ представлены на рисунке 4.1.1.

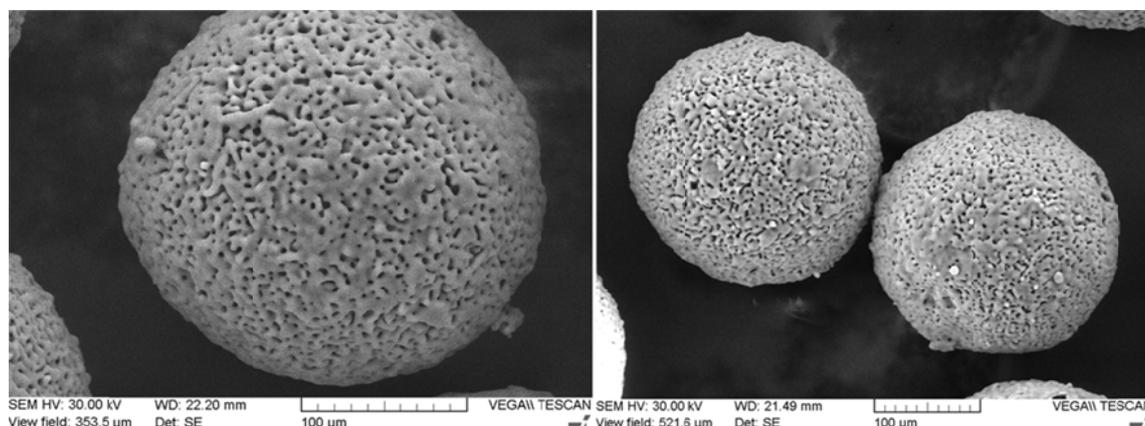


Рисунок 4.1.1. – Микрофотографии керамических гранул на основе ТКФ

В полученную смесь добавляли ЦЖ, а затем в эту смесь добавляли порошок ТТКФ, который изменял значение рН в сторону нейтральной реакции, что приводило к полимеризации хитозана и образованию каркаса.

Установлено, что время схватывания композиционного цемента снижается при увеличении количества гранул ТКФ (таблица 4.1.1).

Таблица 4.1.1. - Влияние армирования КФЦ гранулами ТКФ на время схватывания и значение рН образцов

| Свойства Состав КФЦ | Время схватывания, мин. | рН КФЦ после схватывания | рН КФЦ через 10 мин. | рН КФЦ через 1 час | рН КФЦ через 24 часа |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| КФЦ + 10 масс. % ТКФ 100-200 мкм | 30 | 7,3 | 7,5 | 7,7 | 7,9 |
| КФЦ + 10 масс. % ТКФ 300-500 мкм | 25 | 7,1 | 7,4 | 7,6 | 7,7 |
| КФЦ + 20 масс. % ТКФ 100-200 мкм | 23 | 7,3 | 7,5 | 7,7 | 7,9 |
| КФЦ + 20 масс. % ТКФ 300-500 мкм | 18 | 7,1 | 7,4 | 7,6 | 7,7 |
| КФЦ + 30 масс. % ТКФ 100-200 мкм | 15 | 7,3 | 7,5 | 7,7 | 7,9 |
| КФЦ + 30 масс. % ТКФ 300-500 мкм | 16 | 7,1 | 7,4 | 7,6 | 7,7 |

По данным РФА основными фазовыми составляющими композиционных материалов являются апатитоподобная фаза и ТКФ. Согласно данным ИК - спектроскопии, исследуемые образцы содержат CO_3^{2-} группу - полосы в диапазоне $1540\text{-}1300\text{ см}^{-1}$ характерны для моды ν_3 колебаний (рисунок 4.1.2). Это является следствием частичного поглощения цементным материалом углекислого газа из атмосферы. Также в спектре присутствует полоса деформационных колебаний OH^- групп при 3571 см^{-1} ,

полосы ν_4 - моды колебаний фосфат-групп, расположенные в интервале волновых чисел $660-520\text{ см}^{-1}$, и ν_3 – моды при $1080-1030\text{ см}^{-1}$. Смещение полосы при 1578 см^{-1} , характерной для амино-групп, до 1542 см^{-1} может свидетельствовать о депротонировании амино-групп. Наиболее вероятным механизмом взаимодействия хитозана с ФК является фосфорилирование хитозана фосфат - группами.

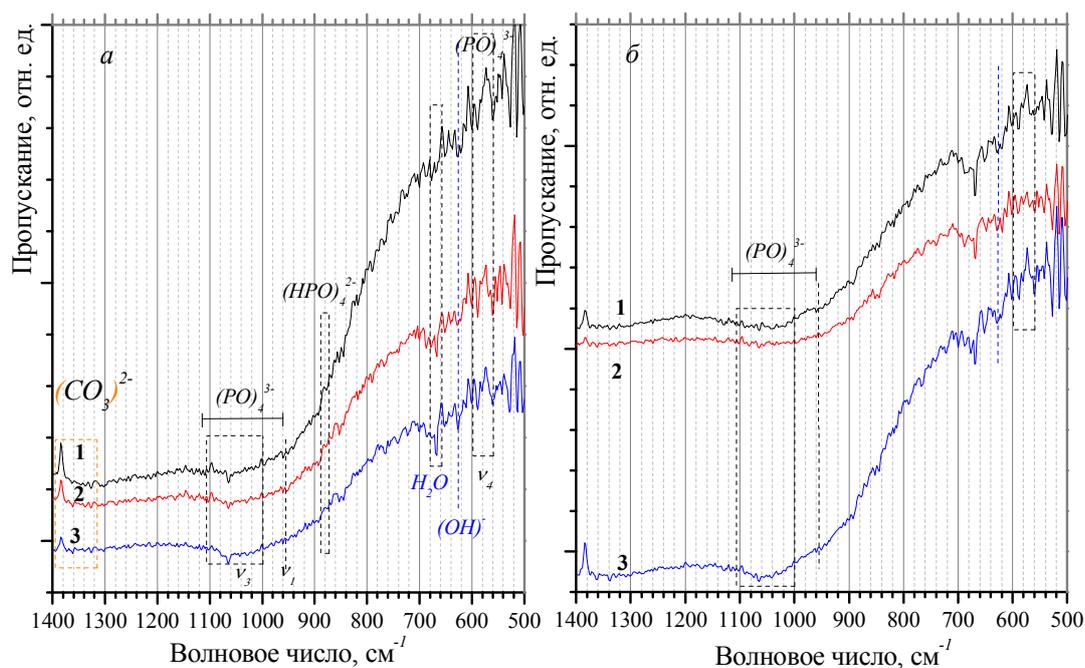


Рисунок 4.1.2. – ИК - спектры поглощения композиционных КФЦ, армированных 20 масс. % гранул ТКФ: а – 100 – 200 мкм; б – 300 -500 мкм, выдержанных в растворах SBF в течение 1 суток (1), 3 суток (2) и 7 суток

На 4.1.3 показана микроструктура поверхности разрушения КФЦ, армированного 20 масс. % гранул ТКФ размером 100 - 200 и 300 - 500 мкм. Видно, что цементная матрица пористая, с размером пор до 20 мкм. Наблюдается полимерный каркас в виде нитей, связывающих между собой частицы фосфатов.

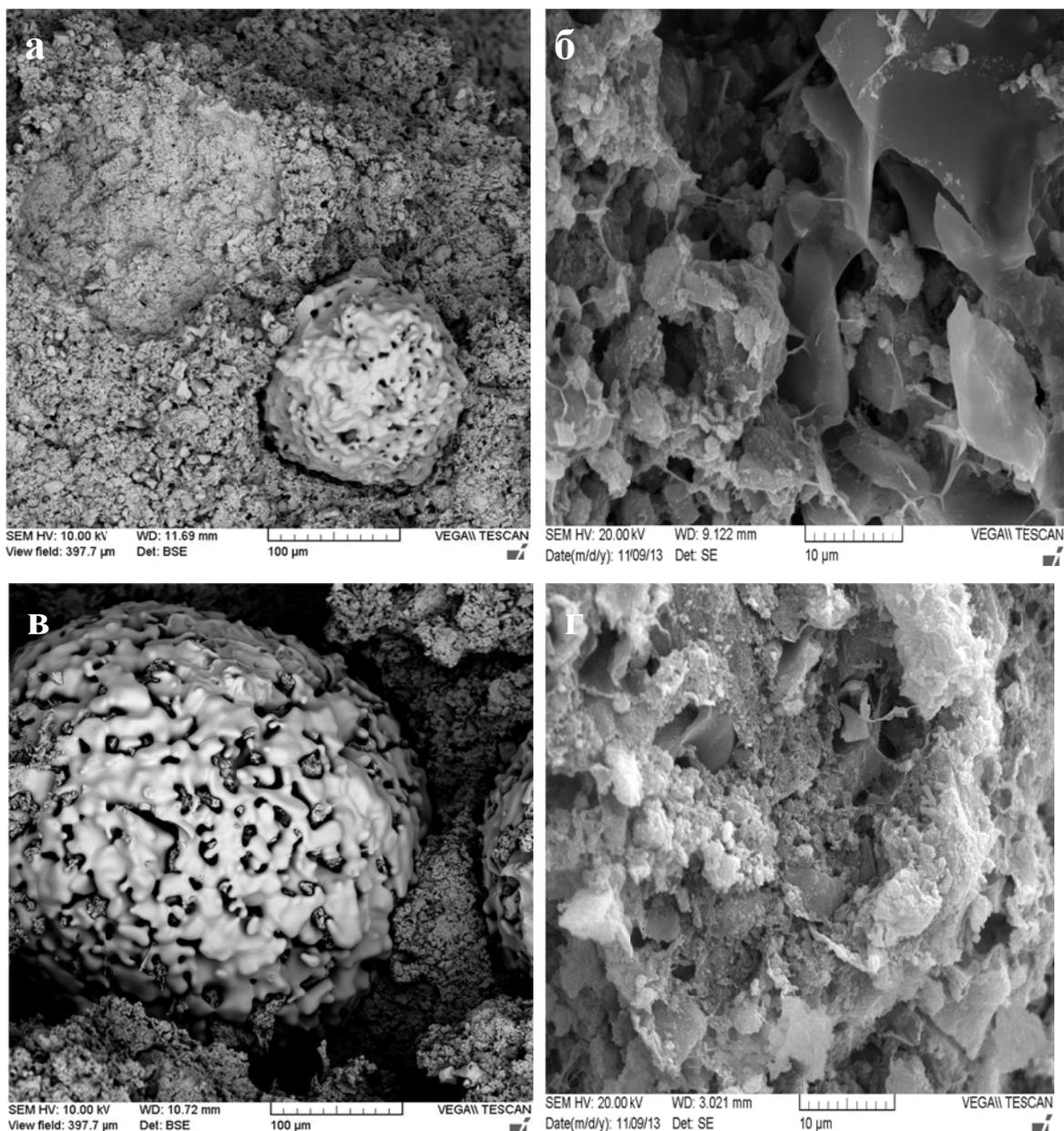


Рисунок 4.1.3. - Микроструктура композиционного КФЦ, армированного гранулами ТКФ а, б – 100 – 200 мкм; в, г – 300 -500 мкм

Композиционный КФЦ, не содержащий гранул ТКФ, имеет прочность при сжатии около 10 МПа. В случае использования керамических гранул ТКФ прочность цемента увеличивалась при введении фракций гранул 100-200 мкм. При этом наибольшие значения прочности до 15 МПа были получены на образцах, содержащих 20 масс. % частиц ТКФ. На рис. 4.1.4 приведены диаграммы деформирования при сжатии образцов КФЦ,

содержащих гранулы ТКФ размером 100-200 мкм, твердевших на воздухе (а) или в SBF (б) в течение времени до 14 суток. С введением гранул большего размера 300-500 мкм ТКФ достигается меньшее упрочнение до 11 - 12 МПа (30 масс. % частиц ТКФ).

Известно, что керамические материалы, близкие по фазовому и химическому составу исследуемым, являются более прочными, чем аналогичные цементы. Это связано с тем, что керамические материалы не содержат непрочные кристаллогидратные и аморфные фазы. Поэтому при введении керамических гранул в цементную матрицу можно ожидать повышения прочности согласно принципу аддитивности. Но в данных материалах изменение прочности носит более сложный характер. Это может быть связано в первую очередь с равномерностью распределения армирующего компонента и прочностью контакта на границе фаз (матрица-добавка). Так при увеличении размера вводимых гранул ТКФ максимум прочности смещается в сторону больших концентраций. Это связано с тем, что частицы большего размера распределяются по объему образца менее равномерно и эффект упрочнения проявляется только при содержаниях ТКФ более 30 %. Однако при дальнейшем повышении содержания ТКФ прочность незначительно снижается. Это можно объяснить нарушением целостности цементной матрицы, когда количество гранул ТКФ становится достаточным для разупрочнения цемента и возникновения прямых контактов между вводимыми керамическими частицами. Можно предположить, что основная причина повышения прочности композиционных цементов при сжатии состоит в увеличении работы разрушения за счет транскристаллитного разрушения вводимых керамических гранул ТКФ. Этот эффект можно последовательно проследить на фотографиях, полученных при микроскопических исследованиях. Наличие транскристаллитного разрушения связано с близостью химического состава фаз: апатитовой матрицы и упрочняющих гранул ТКФ, что позволяет формировать более прочный контакт в композиционном материале между фазами.

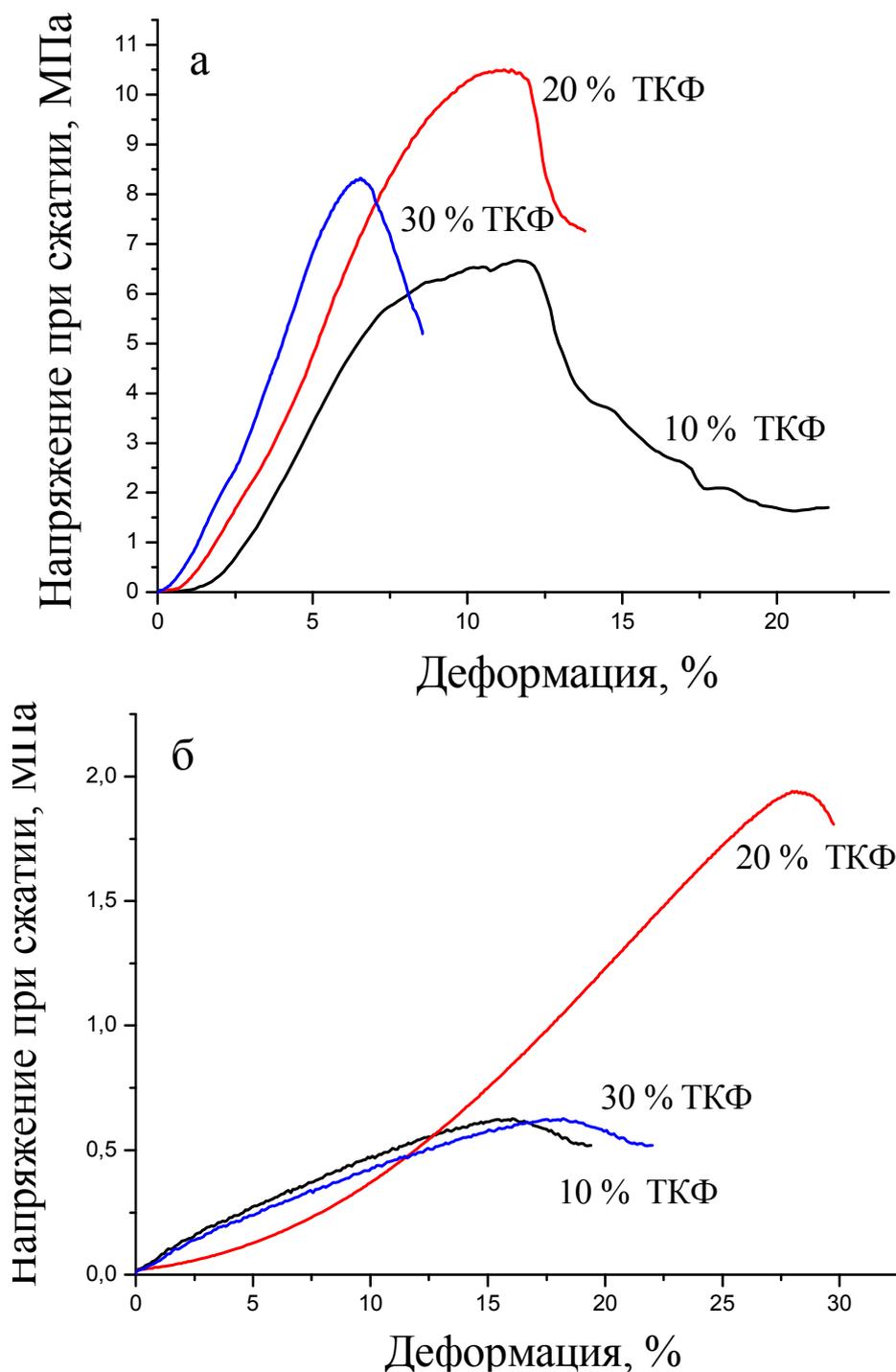


Рисунок 4.1.4. - Диаграммы деформирования КФЦ, армированного гранулами ТКФ размером 100-200 мкм на 14 сутки твердения: а – на воздухе; б – в SBF

Прочность образцов, выдержанных в растворе, моделирующем внеклеточную жидкость организма (simulated body fluid (SBF)), значительно ниже: 0,6 – 1,8 МПа, но сохраняется та же тенденция в зависимости прочности от размера и количества керамических гранул ТКФ, что и для

образцов, твердевших на воздухе. Выдержка в SBF значительно повышает деформируемость цементов, которая достигает 20-30% (деформация до разрушения при сжатии) по сравнению с 6-12% для цементов того же состава, но твердевших на воздухе. Такое различие можно объяснить повышенной эластичностью хитозана в SBF и его жесткостью на воздухе.

4.2. Упрочнение композиционных КФЦ в системе фосфаты кальция – хитозан гранулами альгината натрия

Исследованы композиционные КФЦ, упрочненные гранулами альгината натрия (AlgNa) в количестве до 5 масс. % разного размера (100-200 и 300-500 мкм в диаметре). Экспериментально установлено, что введение более 5 масс. % гранул AlgNa в порошок АФК препятствует смешению исходных компонентов с ЦЖ. Гранулы альгината натрия вводили в цементную систему с порошком АФК, смешивая с ЦЖ, а затем добавляли порошок ТТКФ. Экспериментально установлено, что введение более 5 масс. % альгинатных гранул в цементную систему препятствует смешению исходных компонентов с ЦЖ, существенно сокращая время схватывания. Влияние гранул альгината натрия на время схватывания КФЦ приведено в таблице 4.2.1.

Таблица 4.2.1. - Влияние армирования КФЦ гранулами альгината натрия на время схватывания и значения рН образцов

| Свойства Состав КФЦ | Время схватывания, мин. | рН КФЦ после схватывания | рН КФЦ через 10 мин. | рН КФЦ через 1 час | рН КФЦ через 24 часа |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| КФЦ + 1 масс. % AlgNa 100-200 мкм | 20мин. | 7,3 | 7,4 | 7,5 | 7,7 |
| КФЦ + 1 масс. % AlgNa 300-500 мкм | 25 мин. | 7,4 | 7,4 | 7,6 | 7,6 |
| КФЦ + 3 масс. % AlgNa 100-200 мкм | 20мин. | 7,5 | 7,5 | 7,6 | 7,7 |
| КФЦ + 3 масс. % AlgNa 300-500 мкм | 25 мин. | 7,5 | 7,5 | 7,6 | 7,6 |
| КФЦ + 5 масс. % AlgNa 100-200 мкм | 20мин. | 7,4 | 7,5 | 7,5 | 7,5 |
| КФЦ + 5 масс. % AlgNa 300-500 мкм | 25 мин. | 7,5 | 7,5 | 7,6 | 7,6 |

По данным СЭМ в процессе схватывания и твердения аморфная фаза покрывает гранулы альгината натрия, цементируя их между собой. В результате формируется прочный и одновременно эластичный цементный камень с равномерным распределением частиц альгината натрия по объему (рисунок 4.2.1.)

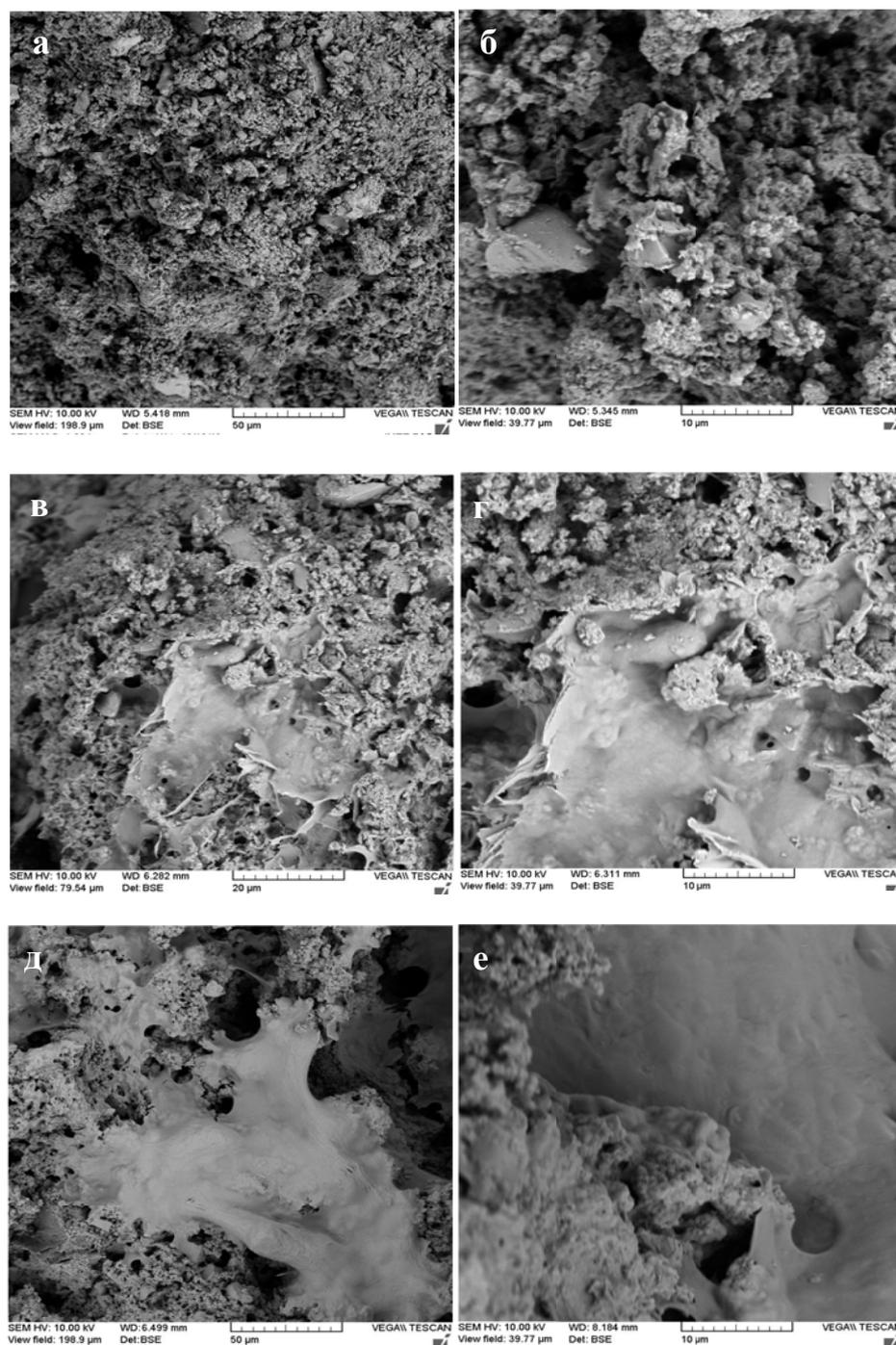


Рисунок 4.2.1. - Микроструктура композиционного КФЦ, армированного гранулами альгината натрия 100 – 200 мкм: а, б – 1 масс. %; в, г – 3 масс. %; д, е – 5 масс. %

Прочность композиционного КФЦ при введении частиц альгината натрия достигает максимума 18 МПа при их содержании 1 масс. % (рисунок 4.2.2.).

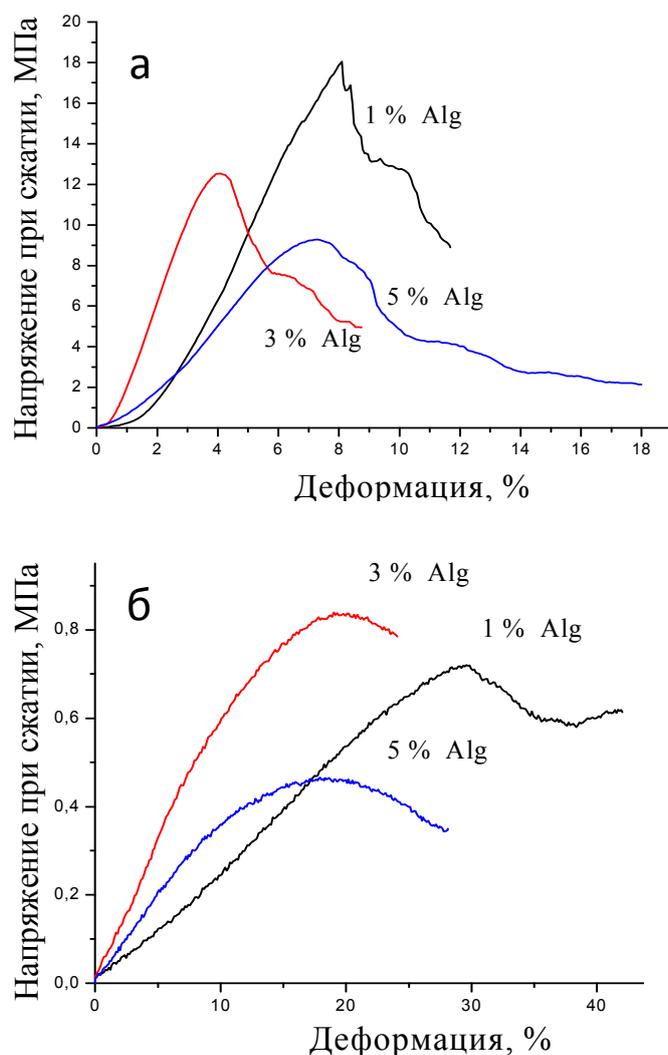


Рисунок 4.2.2. - Диаграммы деформирования КФЦ, армированного гранулами альгината натрия размером 100-200 мкм., на 14 сутки твердения:
а – на воздухе, б – в SBF

Эффект от армирования незначительно возрастает с увеличением размера вводимых частиц AlgNa при равном содержании. Основными механизмами повышения прочности материала являются блокировка распространяющейся трещины при ее встрече с частицей; увеличение поверхности разрушения за счет огибания частиц фронтом распространяющейся трещины; влияние полей сжимающих напряжений в матрице, препятствующих раскрытию трещины; неупругая (вязко - упругая) деформация полимерных частиц. Трещина распространяется по хрупкой матрице, огибая частицы альгината натрия. Эти частицы могут блокировать

трещину, поскольку интенсивность напряжений, необходимая для распространения трещины в плоскости, отличной от плоскости разрушения нормальным отрывом, всегда выше.

С увеличением содержания гранул AlgNa (размер частиц 100-200 мкм) до 3 и 5 масс. % прочность композиционного КФЦ, при твердении на воздухе, монотонно уменьшается до 12 МПа и 8,5 МПа. Это процесс обусловлен разупрочнением композиционного материала вследствие формирования в нем пористости и трещин. Трещиноподобные дефекты появляются в местах контактов между частицами альгината натрия. Частицы не взаимодействуют между собой, и контактная граница представляет собой трещину. Согласно известным положениям механики хрупкого разрушения, разрушающее напряжение обратно пропорционально корню квадратному из размера дефекта. Очевидно, что с увеличением размера частиц AlgNa, вводимых в цемент, размер контактной зоны между ними и, соответственно, трещины возрастает, приводя к более значительному снижению прочности, чем при армировании частицами меньшего размера (рисунок 4.2.4.).

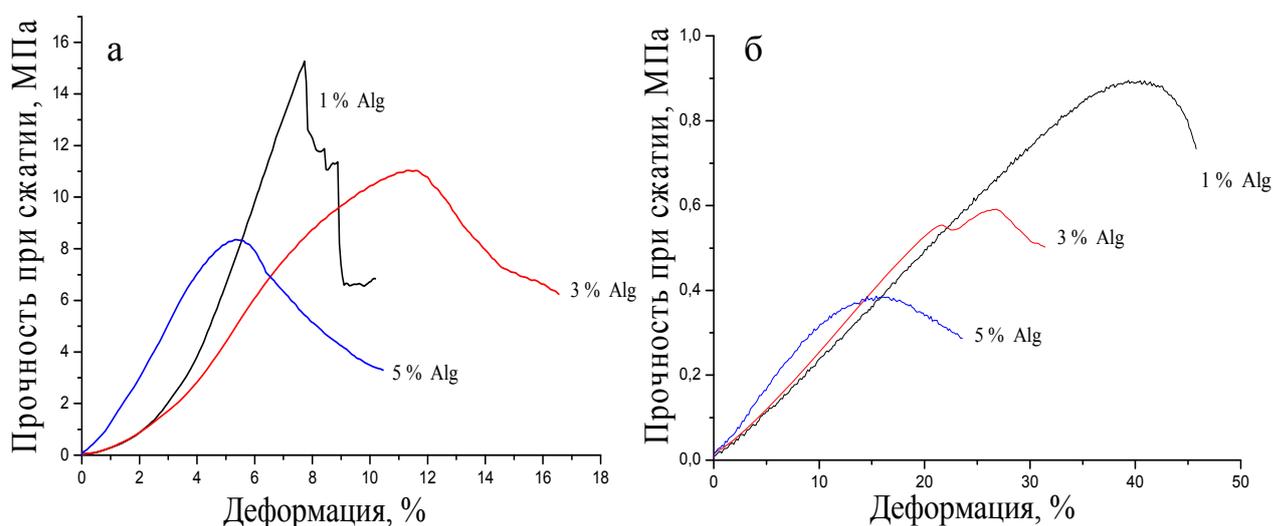


Рисунок 4.2.3. - Диаграммы деформирования КФЦ, армированного гранулами альгината натрия размером 300-500 мкм., на 14 сутки твердения: а – на воздухе, б – в SBF

В связи с этим, выбор фракции частиц AlgNa для армирования КФЦ зависит от требуемого соотношения между их содержанием и достигаемым уровнем механических свойств. Прочность при сжатии композиционного цемента с гранулами альгината натрия, выдержанного в SBF, монотонно уменьшается с увеличением выдержки с 0,9 – 1,1 МПа (3 сутки) до 0,5 – 0,6 МПа (14-е сутки), что обусловлено растворением хитозанового каркаса и гранул AlgNa (рисунок 4.2.4). Это так же подтверждает изменение значений открытой пористости композиционного КФЦ при твердении в SBF. Пористость цементных материалов, армированных гранулами альгината натрия почти в 2 раза превышает пористость немодифицированного КФЦ и КФЦ, армированного керамическими гранулами ТКФ (таблица 4.2.2.).

Таблица 4.2.2. – Влияние армирования композиционных КФЦ на значения открытой пористости при выдержке в SBF

| | КФЦ на основе 3 % фосф. к-ты и 3 % хитозана | КФЦ + 20 масс. % ТКФ 100-200 мкм | КФЦ + 20 масс. % ТКФ 300-500 мкм | КФЦ + 3 масс. % AlgNa 100-200 мкм | КФЦ + 3 масс. % AlgNa 300-500 мкм |
|----------|---|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1 сутки | 17 % | 12% | 22 % | 39% | 28% |
| 3 сутки | 17 % | 12 % | 20% | 39% | 32 % |
| 7 сутки | 24 % | 15 % | 14 % | 53% | 32 % |
| 14 сутки | 22% | 24 % | 24 % | 63% | 39 % |
| 28 сутки | 24 % | 25 % | 24 % | 52% | 42 % |

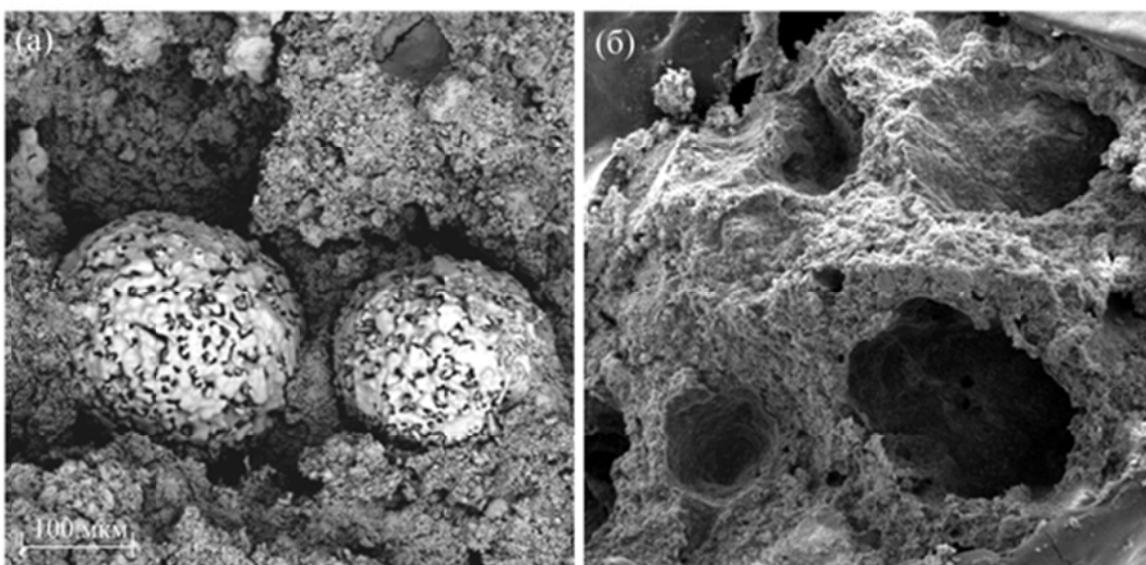


Рисунок 4.2.4. - СЭМ изображения поверхности композиционных КФЦ, армированных гранулами ТКФ (а) и гранулами альгината натрия (б) после выдержки в изотоническом растворе

Таким образом, выявлены возможности упрочнения КФЦ армированием неорганической и органической составляющей. Исследованы особенности влияния армирования на микроструктуру и прочностные характеристики.

Выявлено, что максимальный эффект упрочнения достигается армированием композиционных КФЦ керамическими гранулами размером 100 – 200 мкм в количестве 20 масс. %.

Модифицирование цементов гранулами полисахарида приводит к резкому возрастанию значений прочности при сжатии только при незначительных количествах армирующей составляющей (до 1 масс. %). Гранулы AlgNa позволяют создавать в материале макропористость *in situ*.

ГЛАВА 5. КОМПОЗИЦИОННЫЕ КФЦ, СОДЕРЖАЩИЕ КАТИОНЫ МАГНИЯ И ЦИНКА

В данной главе представлены результаты формирования микроструктуры и свойств композиционных КФЦ, содержащих физиологически важные катионы магния и цинка.

На основании проведенных ранее исследований в качестве объектов для создания модифицированных КФЦ была выбрана цементная система на основе АФК/ТТКФ (соотношение 1,3/1) и цементная жидкость на основе 3 % хитозана в 3 % водном растворе ортофосфорной кислоты.

Показана возможность введения магния и цинка в количествах до 1, 2 и 5 масс. % замещения кальция, соответственно, при синтезе АФК осаждением из растворов солей.

Исследования исходного порошка АФК, прокаленного на 1300⁰С, показали что основная фаза - трикальцийфосфат β – модификации (рисунок 5.1), наличие солей магния/цинка в образцах порошка АФК, даже при замещении 5 масс. % по кальцию не обнаружено.

Согласно данным РФА, основной фазой в затвердевших цементах является апатитоподобная фаза. Установлено, что введение магния и цинка не влияло на время схватывания, которое составляло от 15 до 30 минут. Для цементов всех разработанных составов характерно начальное значение рН от 7,1 до 7,3 и к 7-м суткам оно повышалось до 7,5 - 7,6.

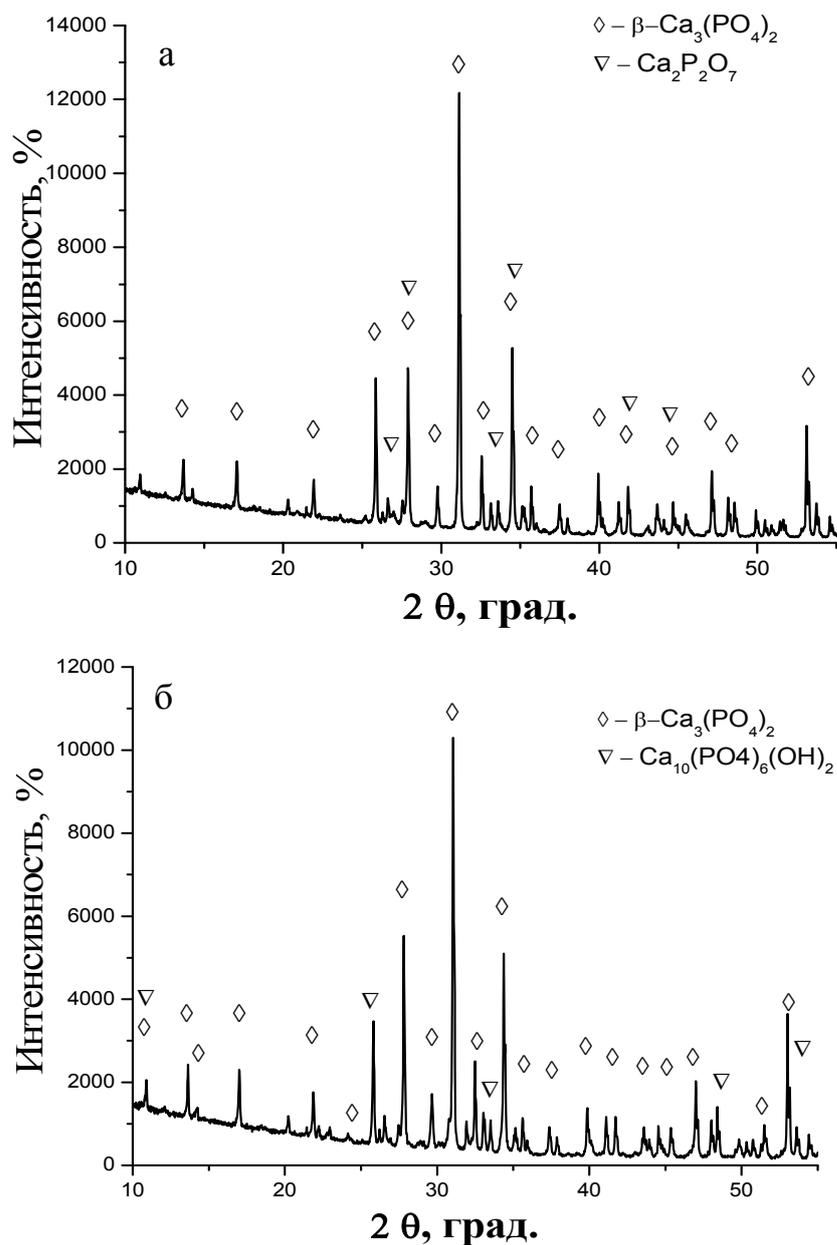


Рисунок 5.1. – Дифрактограмма порошка АФК, с введенными в него в процессе синтеза: а – катионами магния; б – катионами цинка

На рисунке 5.2 показана микроструктура поверхностей разрушения КФЦ, не содержащего катионы металлов (рис. 5.2.а и б), КФЦ с 5 %-ным замещением цинком и КФЦ с 5 %-ным замещением магнием при твердении на воздухе и в SBF на 14-е сутки. Структура исходного цемента, не содержащего катионов магния и цинка, однородна, представляет собой цементный камень на основе хитозана, с равномерно распределенными по всему объему частицами размером менее 1 мкм. В случае композиционных

КФЦ, содержащих катионы цинка наблюдается образование пластинчатых кристаллов, морфология которых соответствует кристаллам дикальцийфосфата дигидрата, что, видимо, происходит в результате гидролиза АФК.

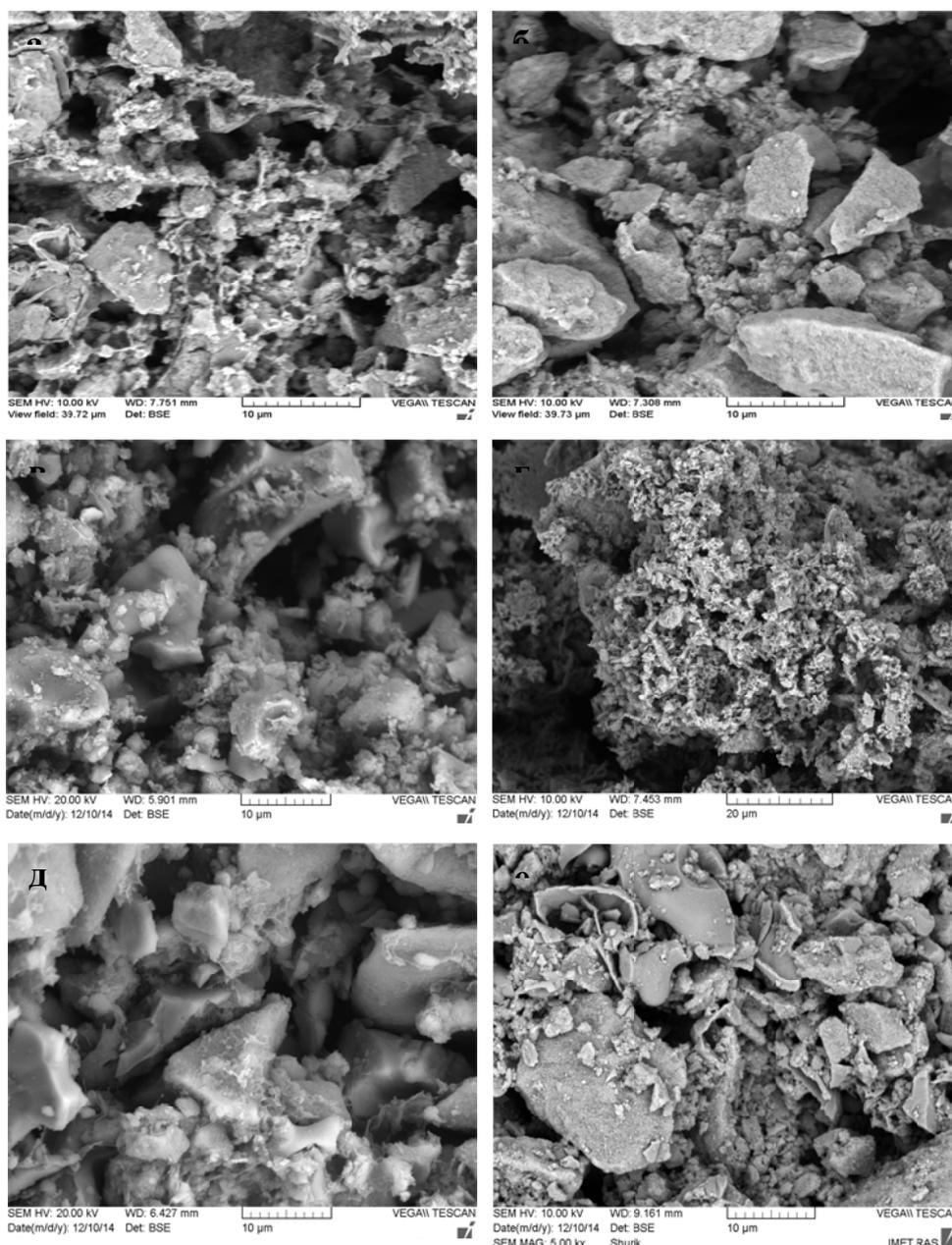


Рисунок 5.2. - СЭМ – изображения поверхностей разрушения КФЦ , выдержанных на воздухе и в SBF соответственно : а, б – не содержащих катионы магния/цинка; в, г - 5 % -ное замещение цинком; д, е – 5 % -ное замещение магнием

Разработанные цементы имеют высокую деформируемость при сжатии (до 30 %). На рисунке 5.3 приведены диаграммы деформирования при сжатии образцов КФЦ с 5 % - ным замещением цинком, выдержанных на воздухе и в SBF. Значения прочности при сжатии таких КФЦ, выдержанных на воздухе достигает 16 МПа и 1,2-1,4 МПа при выдержке в SBF, содержание катионов металлов не оказывает существенного влияния на прочностные характеристики. При этом пористость таких цементов при твердении в жидкости SBF изменялась с 17 % (1-е сутки твердения) до 26 % (28-е сутки твердения) в случае магний - содержащих образцов и с 16 % до 19 % для образцов, содержащих цинк.

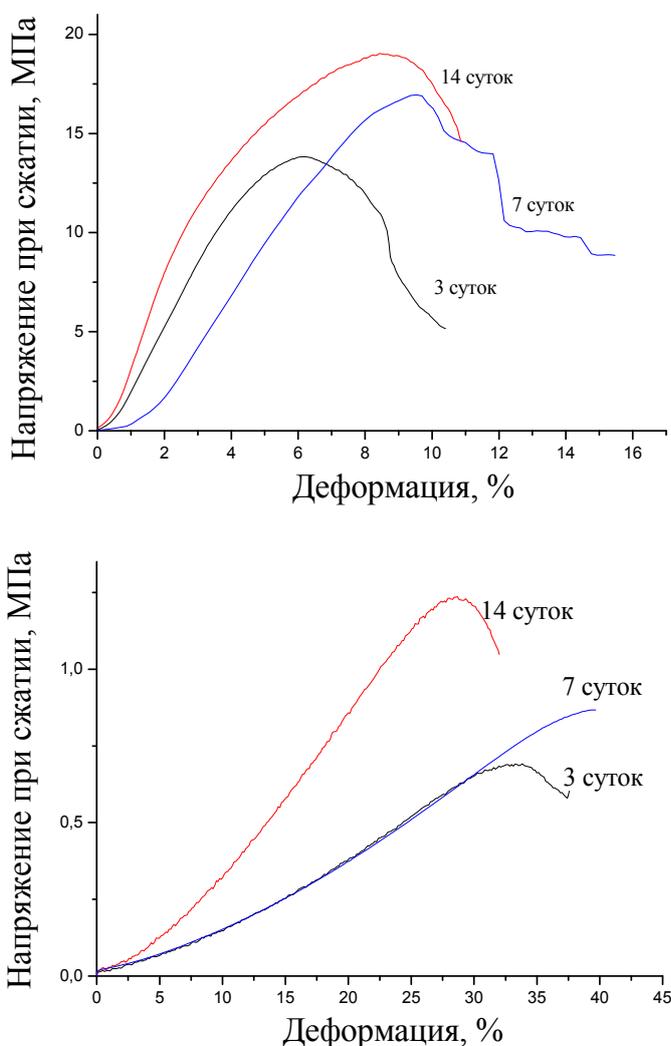


Рисунок 5.3. - Диаграммы деформирования при сжатии цинк – замещенных КФЦ; а – твердение на воздухе, б – твердение в жидкости SBF

Были проведены исследования по определению выхода катионов магния и цинка в изотоническом растворе при длительной выдержке КФЦ (рисунок 5.4.). Показано, что в случае замещения как магнием, так и цинком кинетика выхода ионов может быть описана экспоненциальной функцией, что соответствует кинетике реакций первого порядка (скорость изменения концентрации пропорциональна текущему ее значению).

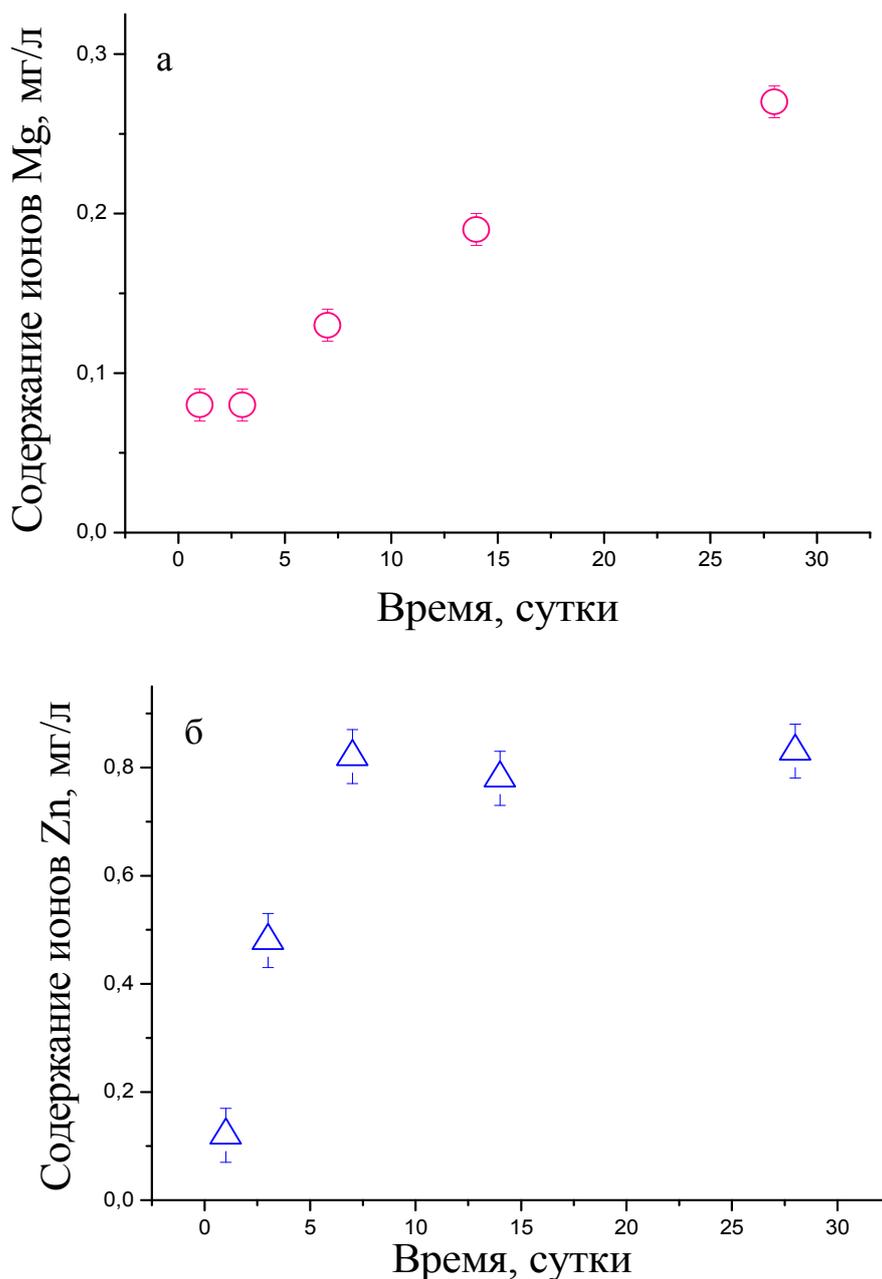


Рисунок 5.4. - Кривая изменения концентрации ионов магния (а) и цинка (б) при выдержке КФЦ в изотоническом растворе

Таким образом, установлено введение физиологически важных катионов магния и цинка не оказывает существенного влияния на время схватывания и твердения, как и на значение рН цементной системы. Установлено влияние физиологически важных катионов магния и цинка на формирование микроструктуры композиционных КФЦ, их механические свойства при твердении на воздухе и в жидкостях, моделирующих внеклеточные жидкости организма. Выявлены закономерности выхода катионов магния и цинка в изотонический раствор при длительной выдержке КФЦ.

ГЛАВА 6. КИНЕТИКА РАСТВОРИМОСТИ КФЦ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

В шестой главе представлены данные по кинетике растворимости разработанных композиционных КФЦ и результаты сравнительных биологических исследований *in vitro*.

6.1. Кинетические особенности деструкции КФЦ

Было проведено сравнительное исследование кинетических особенностей деструкции (растворения) композиционного материала без армирующей составляющей, с 20 масс. % гранул ТКФ размерами 100-200 мкм и 300-500 мкм и с 3 масс. % гранул альгината натрия размером 100-200 мкм и 300-500 мкм, соответственно. Растворимость проводили в изотоническом 0,1 М растворе NaCl до 28 суток при постоянном объеме жидкой фазы (замкнутая система), значение pH = 7,4 и температуре 37 °С.

Кинетика растворения КФЦ без армирующей составляющей, с гранулами ТКФ и с гранулами альгината натрия различна. Концентрация ионов кальция в изотоническом растворе КФЦ без армирующего компонента достигает максимума к 7 – м суткам (111,9 мг/л) и далее существенных изменений не происходит (92,8 мг/л на 28 сутки) (рисунок 6.1.1).

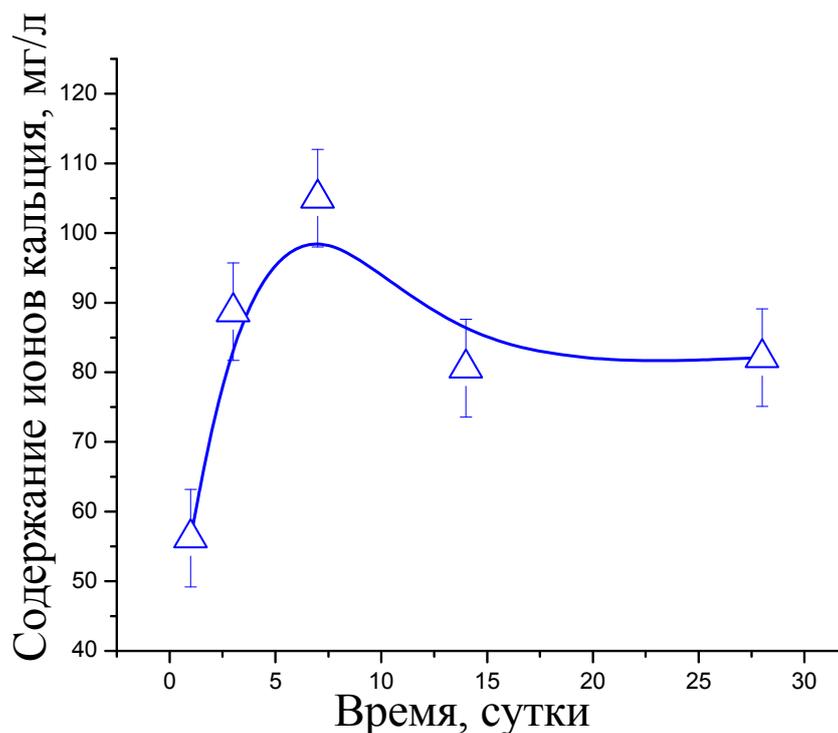


Рисунок 6.1.1. - Кинетическая кривая изменения концентрации ионов кальция в изотоническом растворе КФЦ без армирующей составляющей

Содержание кальция в композиционном КФЦ армированным гранулами ТКФ на 1 сутки резко возрастает (89,5 мг/л для КФЦ с ТКФ 100-200 мкм и 40,7 мг/л ТКФ 300-500 мкм) и далее практически не изменяется до 28 суток (101,5 мг/л для КФЦ с ТКФ 100-200 мкм и 105,6 мг/л ТКФ 300-500 мкм) (рисунок 6.1.2). Кинетика растворения на начальном этапе описывается степенной функцией. Содержание кальция в материалах, армированных гранулами альгината разного размера, достигает к 1-м суткам максимального значения (93 мг/л для КФЦ с гранулами альгината размером 100-200 мкм и 111,1 мг/л с гранулами альгината размером 300-500 мкм), но затем содержание кальция в физиологическом растворе резко падает и к 28 суткам составляет 67 мг/л для композитов с гранулами альгината размером 100-200 мкм и 23 мг/л для композитов с гранулами альгината натрия размером 300-500 мкм. Это может быть обусловлено способностью альгината взаимодействовать с ионами кальция, что также подтверждается ИК -

спектроскопическими исследованиями. По данным СЭМ гранулы альгината натрия со временем частично растворяются, что приводит к формированию пористости, необходимой для биологических потоков в цементном имплантате (рисунок 6.1.3). При этом кинетика растворения описывается экспоненциальной функцией.

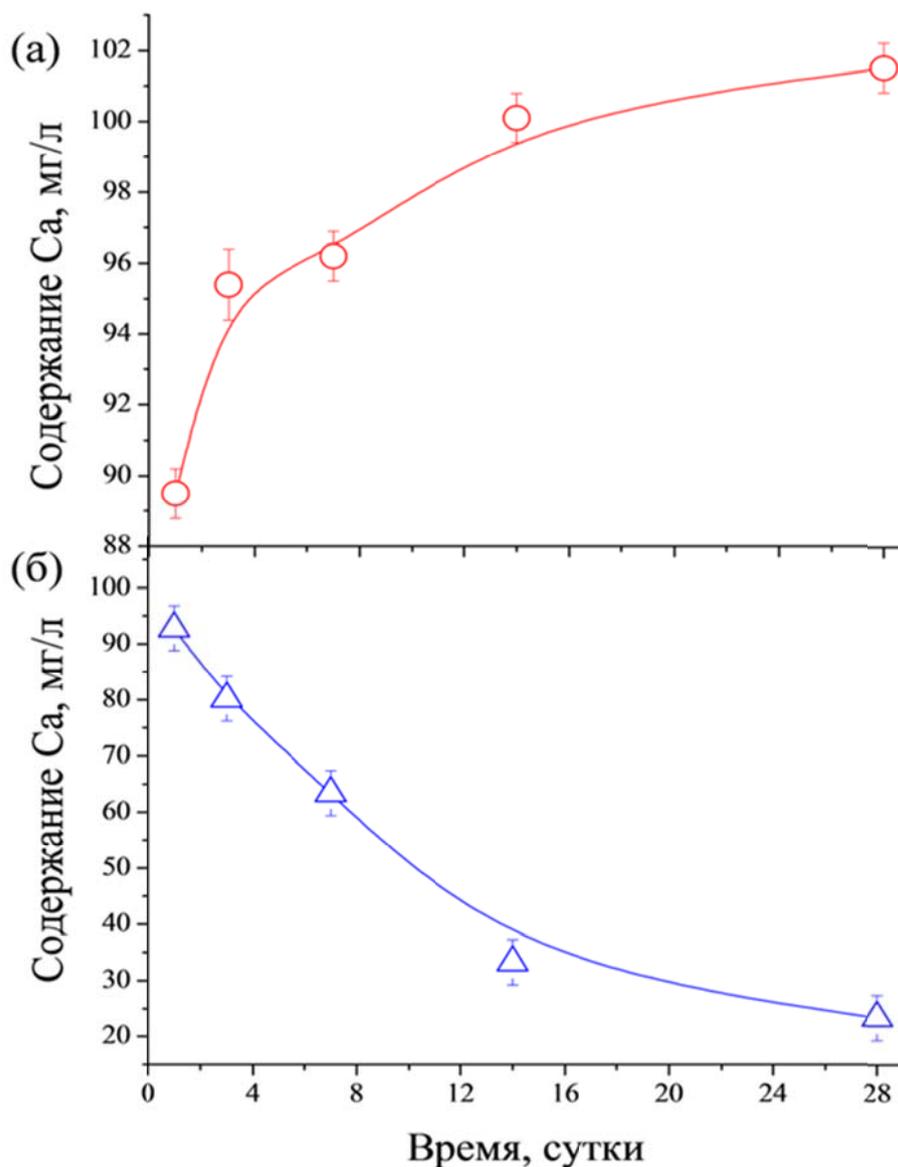


Рисунок 6.1.2. - Кинетические кривые изменения концентрации ионов кальция в изотоническом растворе: а– армирование гранулами ТКФ (20 масс. %), б – армирование гранулами альгината натрия (3 масс. %)

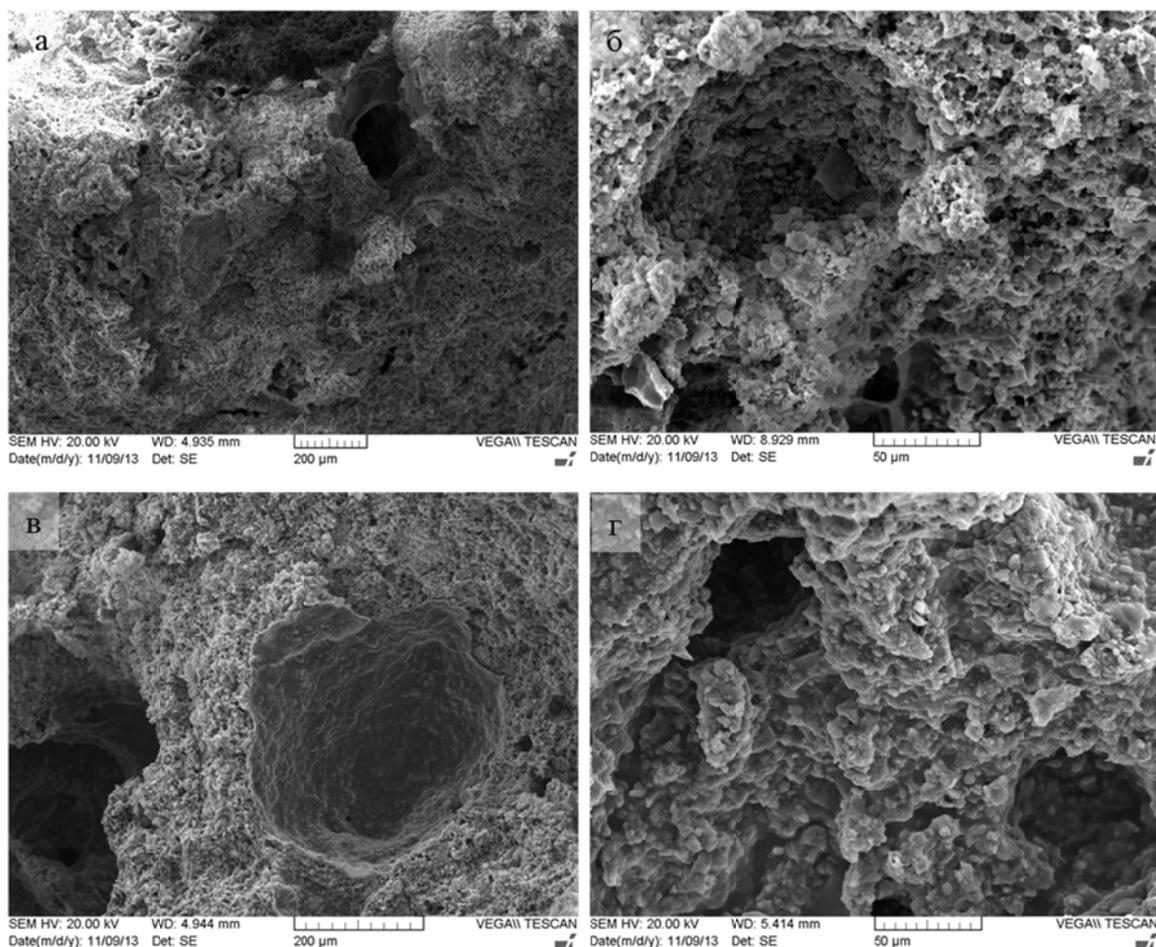


Рисунок 6.1.3. - СЭМ изображения поверхности разрушения композиционных материалов, армированных гранулами ТКФ (а) и гранулами альгината натрия (б) после выдержки в изотоническом растворе

Были проведены исследования растворимости композиционных КФЦ, модифицированных катионами магния и цинка (5 масс. %) по потере массы образца при выдержке в буферном растворе согласно ГОСТ Р ИСО 10993 – 14 -2001.

В первую очередь проводили исследования методом экстремального раствора. Исследование проводили в буферном растворе лимонной кислоты с низким значением $pH = 3,0$. Согласно этому методу сделан вывод, что все составы КФЦ обладают высокой растворимостью (5,00 г материала полностью растворились в 100 мл буферного раствора).

Затем проводили количественное исследование методом моделирующего раствора. По данному методу изучали потерю массы

образцов композиционных КФЦ всех разработанных составов в физиологическом растворе с $\text{pH} = 7,4$.

Значения потери массы КФЦ, модифицированного ионами магния значительно возрастают (до 10 %) к 7 –м суткам выдержки образца в растворе. Затем это значение продолжает увеличиваться достигая к 28 суткам значений 16 % потери массы образца (рисунок 6.1.4.). Потеря массы КФЦ, модифицированных ионами цинка резко возрастает 3 – м суткам растворения (до 8 %), но далее скорость растворения замедляется (9,75 % на 7 – е сутки и 10,77 % на 14 сутки) и к 28 сутками составляет 11,54 %.

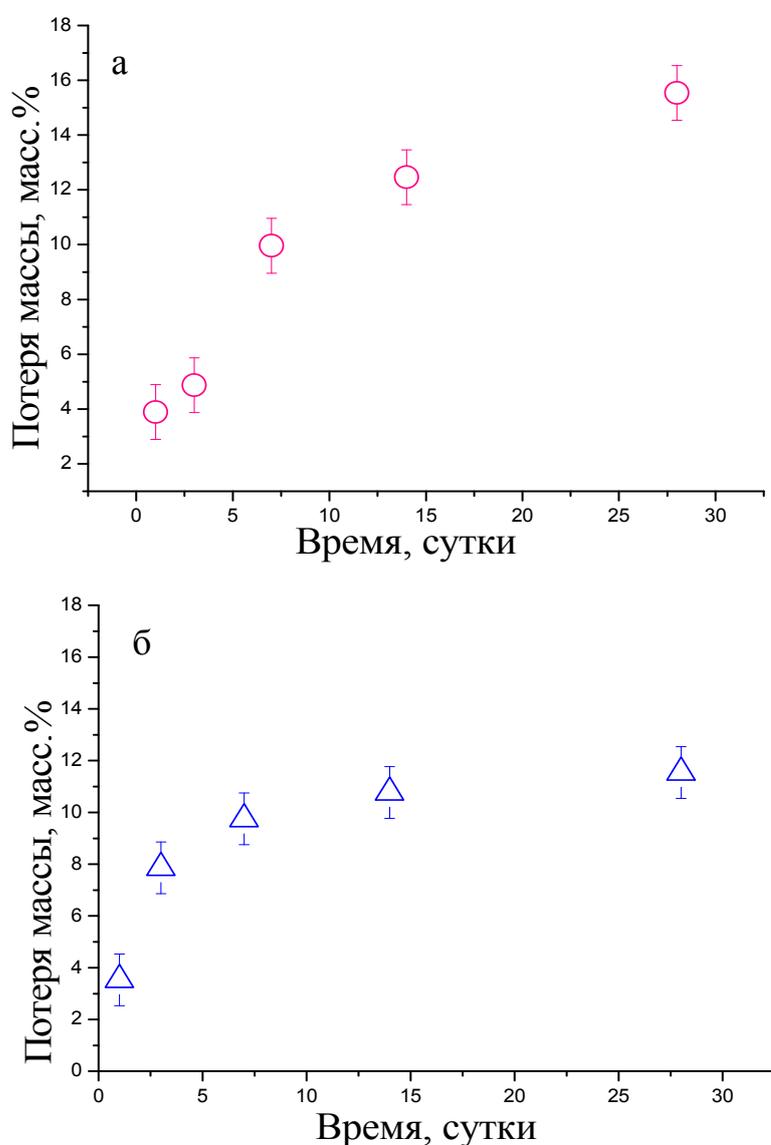


Рисунок 6.1.4. – Изменение массы образца КФЦ при выдержке в изотоническом растворе : а – модифицирование 5 масс. % магния; б – модифицирование 5 масс. % цинка

6.2. Биологические испытания *in vitro* КФЦ

Перед проведением испытаний *in vitro* разработанные композиционные КФЦ подвергали стерилизации γ - облучением. Известно, что γ - облучение кальцийфосфатных материалов (до 30 кГр) не приводят к каким –либо физико – химическим изменениям, то были проведены исследования на изучение влияния γ - облучения на хитозановую матрицу. Для этого на основе ЦЖ (раствор 3 % хитозана в 3 % фосфорной кислоте) готовили цилиндрические образцы (диаметром 12 мм и высотой 40 мм), замораживали их и подвергали сублимационной сушке. Полученные в результате хитозановые матрицы подвергали γ -облучению (источник ^{60}Co , доза облучения от 5 до 30 кГр).

В таблице 6.2.1. показано, как менялись значения рН хитозановых матриц с увеличением дозы радиации.

Таблица 6.2.1. - Значение рН при различных дозах облучения

| | Доза облучения, кГр. | | | | | | |
|-------------|----------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 |
| Значения рН | 7,23 | 7,19 | 7,07 | 6,95 | 6,88 | 6,70 | 6,44 |

По данным ИК – спектроскопии для образцов до облучения присутствуют основные характерные полосы поглощения хитозана (рисунок 6.2.1): широкая полоса 3700-3100 см^{-1} , отвечающая колебаниям связей OH^- и NH^- ; полоса 2900 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям CH^- и CH^{2-} групп; полосы при 1650 и 1560 см^{-1} можно объяснить колебаниями NH^{3+} - групп; максимумы при 1433 см^{-1} – деформационного колебания CH^{2-} или CH^{3-} групп и 1373 см^{-1} – деформационное колебание гидроксид - связей. В диапазоне 900-1200 см^{-1} можно отметить три характерных пика с частотами: 1155, 1080 и 1040 см^{-1} , принадлежащих С-О, С-N и С-С – связям основы молекул. С увеличением дозы облучения отчетливо видно уменьшение

интенсивности всех основных полос поглощения. При дозе γ -облучения 15 кГр уменьшается интенсивность полос поглощения групп ОН, что, вероятно, связано с разрушением мономерных звеньев по первичным радикалам отрыва Н и ОН. Затем, увеличение γ -облучения до 20 кГр приводит к разрушению аминогрупп и остова молекул в основном по связи С-Н. Все эти изменения сопровождаются уменьшением значений рН, можно предположить что происходит образование кислот.

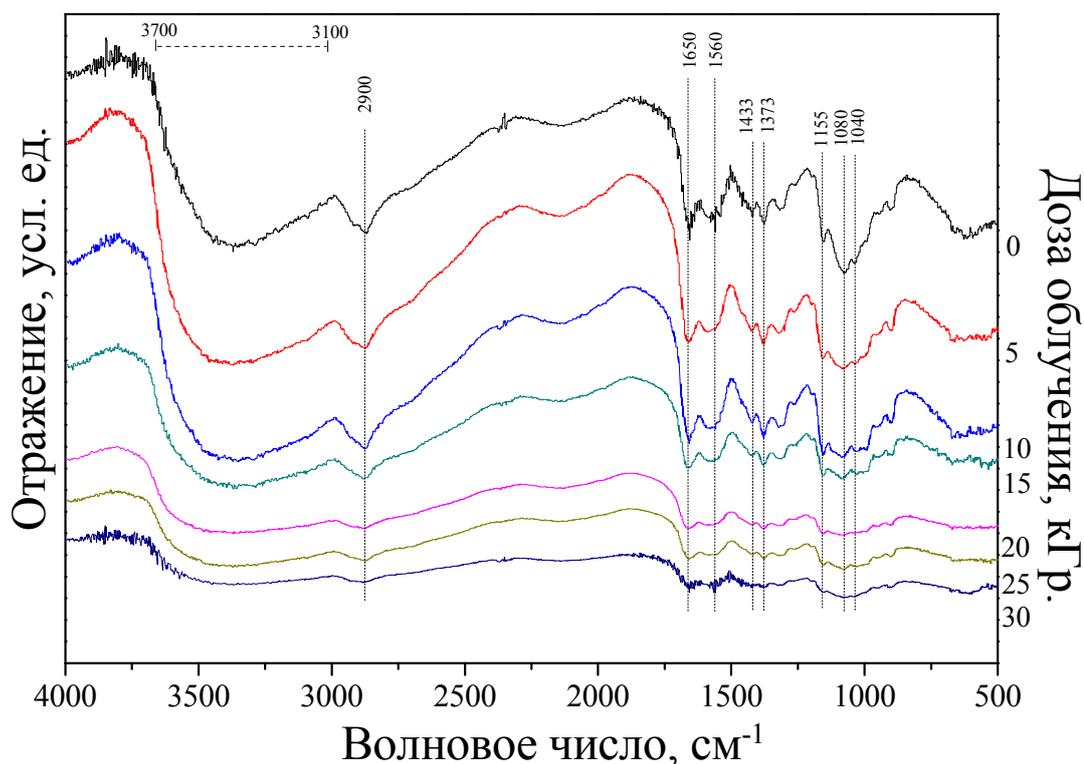


Рис. 6.2.1. - ИК-спектры хитозановых образцов подвергнутых γ -облучению дозой 0, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 кГр

На рисунке 6.2.2 показана микроструктура хитозановых образцов до и после облучения. Размер пор хитозанового матрикса превышает 100 мкм. Поровое пространство полимерных матриксов однородно до и после облучения. Но при этом видно, что дозы γ -облучения более 20 кГр приводят к деформации полимерных стенок образцов.

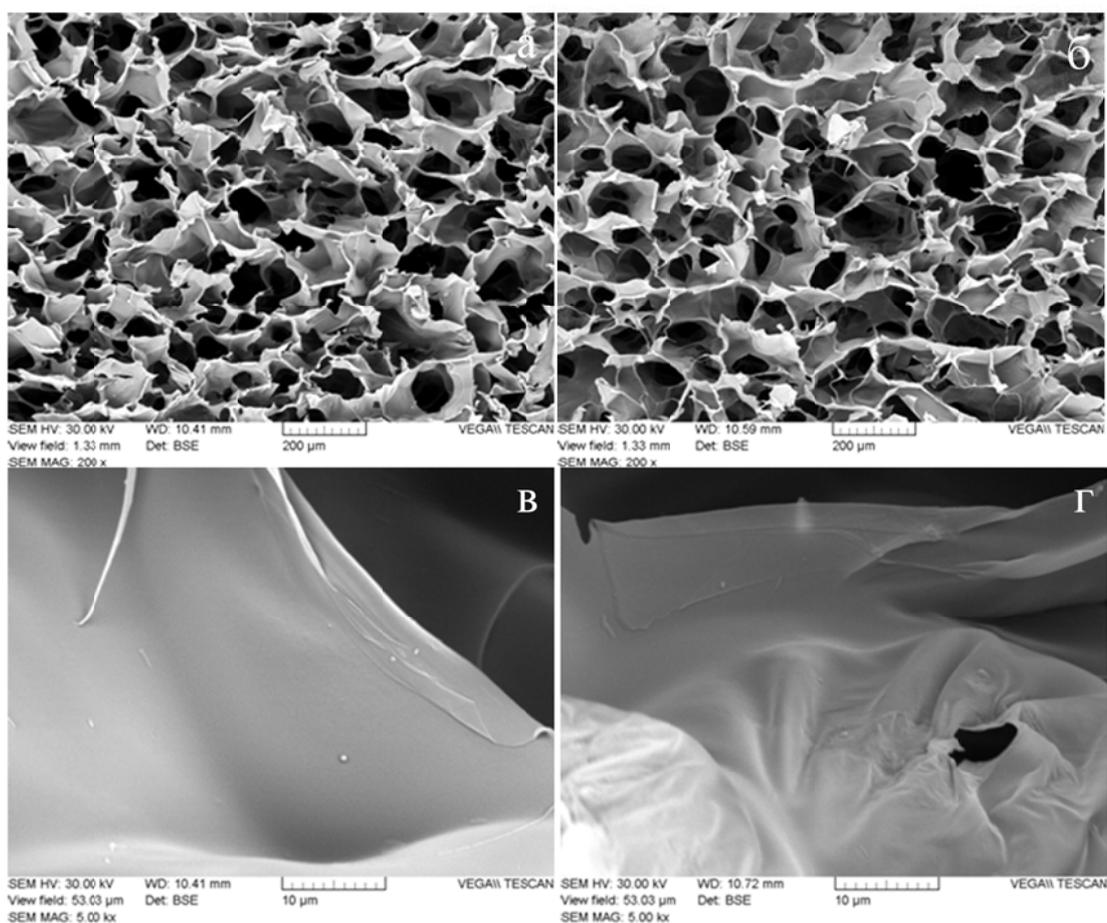


Рисунок 6.2.2. - Микроструктура хитозановых образцов а, б - до облучения; в, г - после γ -облучения 30 кГр

Таким образом, установлено, что воздействие γ -излучения на хитозановый матрикс при дозе более 15 кГр приводит к его деструкции.

Для определения острой цитотоксичности были выполнены эксперименты на модели тест - культуры адгезионной клеточной линии иммортализованных фибробластов человека (ФЧ), штамм 1608 hTERT (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва). Для проведения эксперимента были выбраны следующие составы разработанных композиционных КФЦ:

- 1 – КФЦ на основе 3 % хитозана в растворе 3 % фосфорной кислоты;
- 2 – КФЦ, армированный 3 масс. % гранул альгината натрия (300-500 мкм);
- 3 – КФЦ, армированный 20 масс. % гранул ТКФ (300-500 мкм);

4 – КФЦ, с замещением по магнию 5 масс. %;

5 - КФЦ, с замещением по цинку 5 масс. %.

Показано, что в контроле (культуральный пластик полистирен) за время наблюдения популяция ФЧ постоянно нарастала, о чем свидетельствуют как значения оптической плотности раствора формазана (0,210→0,481→0,786 усл.ед.), так и рассчитанная величина прироста пула ФЧ (таблица 6.2.2 и рисунок 6.2.3). Получены данные, свидетельствующие об отсутствии острой цитотоксичности всех исследуемых образцов КФЦ в отношении тест – культуры ФЧ и наличии матричных свойств поверхности разной степени выраженности. Наиболее перспективными представляются образцы КФЦ, модифицированные катионами цинка (5 масс. %). Данные образцы обеспечивают эффективную адгезию культуры ФЧ, их распластывание и длительную пролиферацию (рисунок 6.2.4).

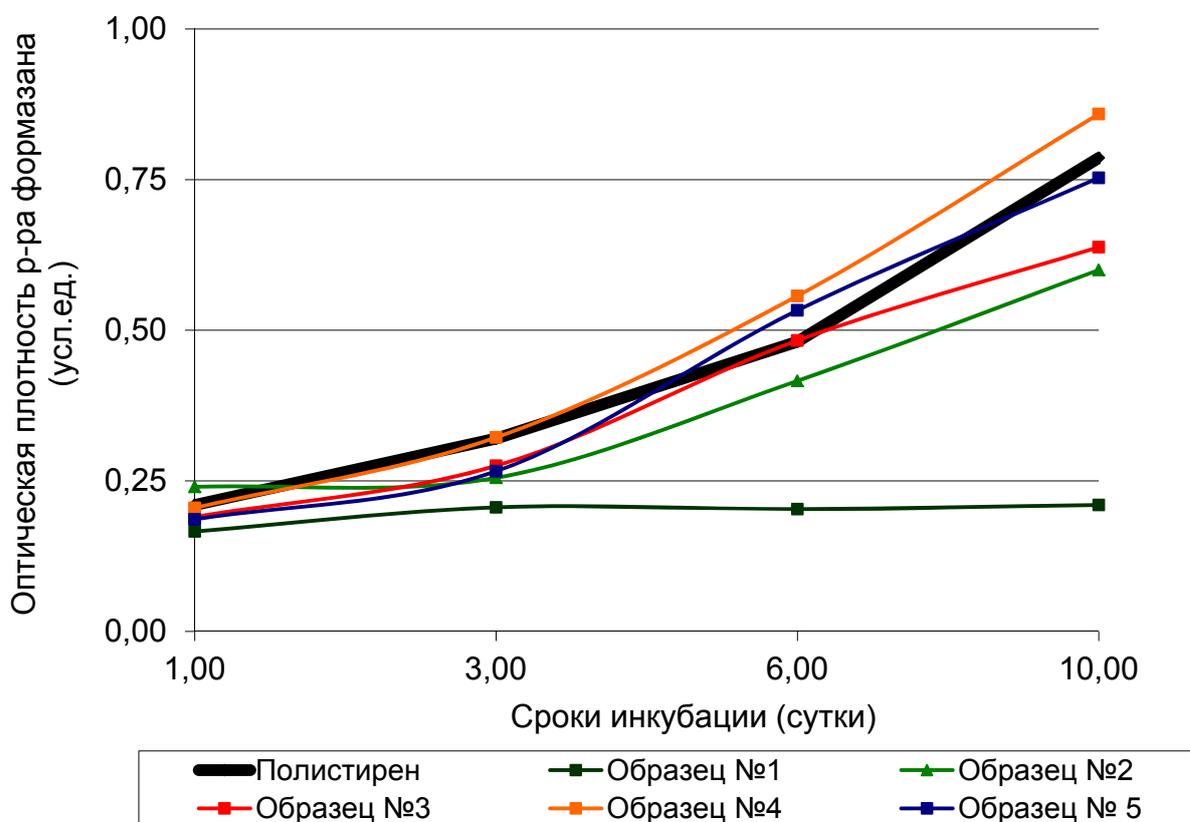


Рисунок 6.2.3. - Динамика роста популяции ФЧ при культивировании на лабораторных образцах КФЦ

Таблица 6.2.2. - Величина оптической плотности раствора формазана (ОД, МТТ-тест) и пула жизнеспособных ФЧ (ПЖК) в динамике культивирования на полистирене (контроль) и лабораторных образцах КФЦ

| Материалы | ОД (усл.ед.) и ПЖК (в %, относительно контроля) в различные сроки эксперимента (сутки) | | | |
|--|--|--------------------------|---------------------------|----------------------|
| | 1сут. | 3сут. | 6сут. | 10сут. |
| Контроль (полистирен) | 0,210±0,005 1100 | 0,320±0,009 100 | 0,481±0,011 100 | 0,786±0,029 100 |
| Образец №1 КФЦ на основе 3 % хитозана в 3 % ортофосфорной кислоте | 0,166±0,006 * 79,0 | 0,206±0,002 * 64,4 | 0,203±0,006 * 42,2 | 0,210±0,041* 26,7 |
| Образец №2 КФЦ, армированный гранулами AlgNa 300 -500 мкм | 0,240±0,018 114,3 | 0,255±0,025 79,7 | 0,416±0,034 86,5 | 0,600±0,016* 76,3 |
| Образец №3 КФЦ, армированный гранулами ТКФ 300 -500 мкм | 0,190±0,005 * 90,5 | 0,275±0,003 * 85,9 | 0,483±0,017 100,4 | 0,638±0,034* 81,2 |
| Образец №4 КФЦ, модифицированы катионами магния (5 масс. %) | 0,205±0,003 97,6 | 0,322±0,000 100,6 | 0,557±0,017 * 115,8 | 0,859±0,095 109,3 |
| Образец №5 КФЦ, модифицированы катионами цинка (5 масс. %) | 0,186±0,006 * 88,6 | 0,266±0,008 * 83,1 | 0,533±0,028 110,8 | 0,753±0,039 95,8 |

* - статистически достоверная разница с контролем (p<0,05).

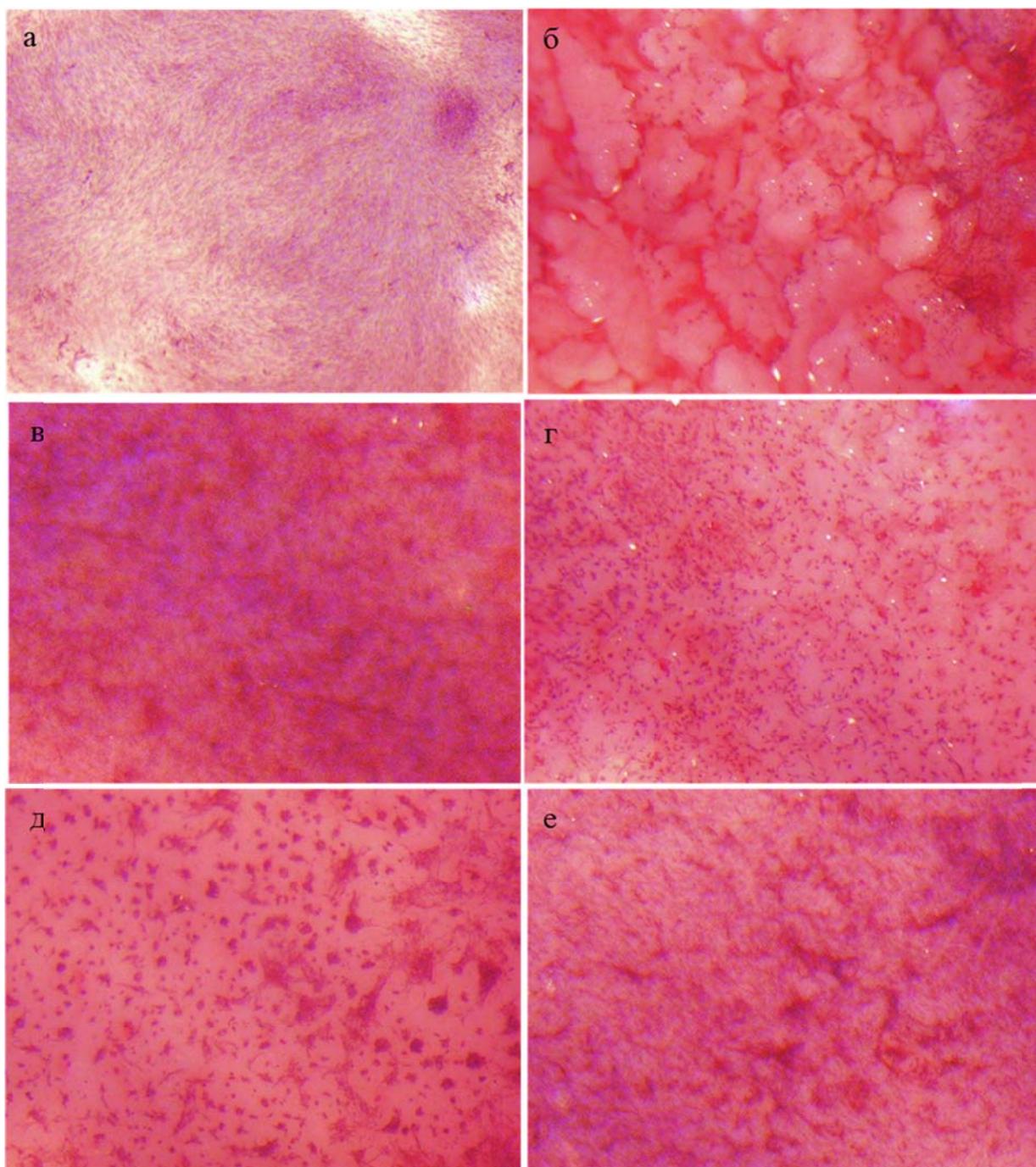


Рисунок 6.2.4. – Поверхность КФЦ через 6 суток проведения МТТ-теста:
а – контрольный образец; б - КФЦ на основе 3 % хитозана в 3 % ортофосфорной кислоте в - КФЦ, армированный гранулами AlgNa; г - КФЦ, армированный гранулами ТКФ; д - КФЦ с содержанием магния 5 масс.%; е - КФЦ с содержанием цинка 5 масс.%. Увеличение – 60 крат.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Разработаны композиционные КФЦ с непрерывным хитозановым каркасом на основе АФК, ТТКФ и 1-3 % раствора хитозана в 1-3 % растворах ортофосфорной, глутаминовой и молочной кислот с варьируемым временем схватывания от 15 до 30 минут и значениями $pH = 7,5 - 7,6$. Установлено, что основной фазой продукта взаимодействия является апатитоподобная фаза. Значения прочности разработанных композиционных КФЦ при сжатии составляет 7 МПа при твердении на воздухе и 1,3 МПа при твердении в SBF. Предельная деформация до разрушения таких КФЦ составляет 20-25 %.

2. Разработаны армированные композиционные КФЦ, содержащие до 30 масс. % гранул ТКФ размером 100 -200 и 300 – 500 мкм. Установлено, что зависимость прочности армированных композиционных КФЦ от содержания упрочняющей дисперсной фазы немонотонна - положение максимума зависит от вида и дисперсности армирующей фазы. Для КФЦ, армированного гранулами ТКФ максимальное значение прочности при сжатии достигается с введением 20 масс. % гранул 100 – 200 мкм – 12 МПа при твердении на воздухе и 1,8 МПа при твердении в SBF.

3. Разработаны композиционные КФЦ, армированные 1 – 5 масс. % частицами резорбируемого полисахарида – альгината натрия – размером 100 – 200 мкм и 300- 500 мкм. Показано, что максимальное значение прочности при сжатии достигается при введении 1 масс. % частиц альгината натрия 100 - 200 мкм и составляет при твердении на воздухе 18 МПа и 1 МПа при твердении в SBF. С увеличением содержания гранул альгината (размер частиц 100-200 мкм) прочность композиционного материала монотонно уменьшается до 8,5 МПа и 0,6 МПа, соответственно.

4. Получены композиционные КФЦ на основе АФК, с замещением до 5 масс. % кальция физиологически важными катионами магния и цинка. Установлено, что введение магния и цинка не влияло на время схватывания, которое составляло от 15 до 30 минут. Для цементов всех разработанных

составов характерно начальное значение $pH = 7,1 - 7,3$ и основным продуктом твердения – апатитоподобная фаза. Показано, что модифицирование КФЦ катионами магния и цинка не оказывает существенного влияния на прочностные характеристики. Значения прочности при сжатии КФЦ с замещением кальция 5 масс. %, при твердении на воздухе достигает 16 МПа и 1,2-1,4 МПа при твердении в SBF. Разработанные цементы имеют высокую деформируемость при сжатии (до 30 %).

5. Выявлены кинетические особенности растворения разработанных материалов. Для композиционных цементов КФЦ, установлено, что переход во времени закона растворения к экспоненциальному, соответствует кинетике скоростей реакций первого порядка. Армирование композиционных КФЦ гранулами ТКФ не оказывает влияния на растворимость цементов, а армирование гранулами AlgNa приводит к обратной зависимости. Введение магния и цинка в состав композиционного КФЦ увеличивает скорость растворения системы до 16 и 11, 5 масс. % к 28 суткам.

6. На основании проведенных исследований разработан технологический регламент «Композиционные материалы на основе фосфатов кальция и биополимеров» и изготовлены лабораторные партии образцов. Проведены сравнительные доклинические биологические исследования экспериментальных образцов разработанных композиционных КФЦ *in vitro*, которые продемонстрировали отсутствие острой цитотоксичности материалов в отношении тест – культуры ФЧ и наличие матричных свойств поверхности разной степени выраженности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chow L.C., Takagi S.A. natural bone cement – A laboratory novelty led to the development of revolutionary new biomaterials // J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol. 2001. V. 106. P. 1029-1033.
2. Hench L.L., Polak J.M. Third-generation biomedical materials // Science. 2002. V. 295. P. 1014-1017.
3. Баринов С.М., Комлев В.С., Биокерамика на основе фосфатов кальция. // М.: Наука, 2005. с. 204.
4. Komath M., Varma H.K. Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications // Bull. Mater. Sci. 2003. V. 26, N 3. P. 415-422.
5. Dorozhkin S.V. Amorphous calcium phosphates // J. Biomimetics, Biomaterials and Tissue Engineering 2010. V. 7. P. 27-53.
6. Brown W.E., Chow L.C. A new calcium phosphate, water setting cement. In: Cements Res. Progress, ed. W.E. Brown. Ohio: ACerS, 1987. P. 352-379.
7. Komath M., Varma H.K. Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications // Bull. Mater. Sci. 2003. V. 26, N 3. P. 415-422.
8. Albee F., Morrison H. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis // Ann. Surg. 1920. V. 71. P. 32-38.
9. Bohner M. Reactivity of calcium phosphate cements // J. Mater. Chem. 2007. V. 17. P. 3980-3986.
10. Am. National Stand. Inst. / Am. Dent. Assoc.. Specification No.61 for zinc polycarboxylate cement // J. Am. Dent. Assoc. 1980. V. 101. P. 669-671.
11. Копейкин В.А., Петрова А.П., Рашкован И.Л. Материалы на основе металлофосфатов. М.: Химия, 1976 - с. 152.
12. Эппле М., Биоматериалы и биоминерализация. // Томск: Изд-во "Ветер", 2007. С. 166.

13. Fernandez E., Planell J.A., Best S.M. Precipitation of carbonated apatite in the cement system $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3$ // J. Biomed. Mater. Res. 1999. V. 47. P. 466-471.
14. Miyatomo Y., Toh T., Ishikawa K., Yuasa T.. Effect of added NaHCO_3 on the basic properties of apatite cement // J. Biomed. Mater. Res. 2001. V. 54. P. 311-319.
15. Bohner M., Malsy A.K., Camire C.L., Gbureck, U. Combining particle size distribution and isothermal calorimetry data to determine the reaction kinetics of α -tricalcium phosphate – water mixtures // Acta Biomater. 2006. V. 2. P. 343-348.
16. 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.
17. Martin R.I., TenHuissen K.S., Leamy P., Brown P.W. Enthalpies of formation of compounds in the $\text{P}_2\text{O}_5 - \text{CaO} - \text{H}_2\text{O}$ system // J. Phys. Chem. B. 1997. V. 101. P. 9375-0379.
18. Burg K.J., Porter S., Kellam J.F., Biomaterial developments for bone tissue engineering. // Work. 2000. V. 2. P. 188-190.
19. Fernandez E., Gil F.J., Ginebra M.P., Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry. // J. Mater. Sci.: Mater. Med. 1999. V. 10. P. 169-176.
20. LeGeros R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials // Chem. Rev. 2008. V. 108. P. 4742-4753.
21. Bohner M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitutions // Eur. Cells and Mater. 2010. V. 20. P. 1-12.
22. Safronova T.V., Secheiko P.A., Putlyaev V.I., Multiphase ceramics based on powders synthesized from sodium pyrophosphate and soluble calcium salts

- using mechanical activation. // Glass and Ceramics. 2012. N. 69V. (7-8). P. 276–282.
23. LeGeros R.Z. Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification // Z. Kardiol, 2001. N. 90. V. 3. P. 116-124.
24. Hench L.L. Bioceramics // J. Am. Ceram. Soc. 1998. N. 81. V. 7. P. 1705.
25. Barinov S.M., Komlev V.S. Calcium phosphate based bioceramics for bone tissue engineering. Zuerich: Trans Tech Publ. 2008. P. 204.
26. Sun J.S., Tsuang Y.H., Liao C.J., Hang Y.S., Lin F.H., The effect of sintered-dicalcium phosphate particle size on newborn wistar ratosteoblasts // Artificial Organs, 1999. N. 23. V.4. P. 331-338.
27. Fabbri M., Celotti G.C., Ravaglioli A., Hydroxyapatite based porous aggregates: physico-chemical nature, structure, texture and architecture // Biomaterials, 1995. N. 16. V. 15. P. 225-228.
28. Suchanek W., Yoshimura M., Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. // J. Mater. Res. 1998. N. 13. V. 1. P. 94-117.
29. Hench L.L. Bioceramics // J. Am. Ceram. Soc. 1998. N. 81. V. 7. P. 1705.
30. Brown W.E. Solubilities of phosphates and other sparingly soluble compounds. Chapter 10. Environmental Phosphorus Handbook. N.Y.: Willey and Sons, 1973. P. 203-239.
31. Chow L.C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials // Dental Mater. J. 2009. V. 28. N. 1. P. 1-10.
32. Bigi A., Panzavolta S., Rubini K. Setting mechanism of a biomimetic bone cement // Chem. Mater. 2004. V. 16(19). P 3740–3745.
33. Fernández E., Planell J.A., Best S.M., Precipitation of carbonated apatite in the cement system α -Ca₃(PO₄)₂ – Ca(H₂PO₄)₂ – CaCO₃. // J. Biomed. Mater. Res., 1999. V. 47. P. 466-471.
34. Dekker R.J., de Bruijn J.D., Stigter M., Barrere F., Layrolle P., van Blitterswijk C.A. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite

- and crystalline octacalcium phosphate coated titanium discs // *Biomaterials*. 2005. V. 26. P. 5231-5239.
- 35.Knaack D., Goad M., Resorbable calcium phosphate bone substitute. // *J. Biomed. Mater. Res.*, 1998. V. 4. P. 399-409.
- 36.Bohner M., Brunner T.J., Doebelin N., Stark W.J., Effect of thermal treatments on the reactivity of nanosized tricalcium phosphate powders. // *Journal of Materials Chemistry*, 2008. V. 18. P. 4460-4467.
- 37.Fukase Y., Eanes E., Chow L.C., Setting reactions and compressive strengths of calcium phosphate cements. // *J. Dent. Res.*, 1990. 69: p. 1852-1856.
- 38.Kenny S.M., Burggy M. Bone cements and fillers: a review // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003. V. 14. P. 923-938.
- 39.Ohura K., Bohner M., Hardouin P., Lemaître J., Pasquier G., Flautre B., Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. // *J. Biomed. Mater. Res.*, 1996. V. 30. P. 193-200.
- 40.Bohner M., van Landuyt P., Composition effects on the pH of a hydraulic calcium orthophosphate cement. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 1997. V. 8. P. 675-681.
- 41.Constantz B.R., Barr B.M., Ison I.C., Fulmer M.T., Baker J., Mckinney L., Histological , Chemical, and Crystallographic Analysis of Four Calcium Phosphate Cements in Different Rabbit Osseous Sites. // *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997. V. 2. P. 451-461.
- 42.Li D.X., Fan H.S., Zhu X.D., Tan Y.F., Xiao W.Q., Lu J., Xiao Y.M., Chen J.Y., Zhang X.D. Controllable release of salmon-calcitonin in injectable calcium phosphate cement modified by chitosan oligosaccharide and collagen polypeptide // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007. V. 18. P. 2225-2231.

43. Le D., Hacking S.A., Gbureck U., Komarova S.V., Barralet J.E., Biomaterials The use of RANKL-coated brushite cement to stimulate bone remodelling. // *Biomaterials*, 2008. V. 29. P. 3253-3259.
44. Grover L.M., Gbureck U., Wright A.J., Tremayne M., Barralet J.E., Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro. // *Biomaterials*, 2006. V. 27. P. 2178-2185.
45. Chaung H.M., Hong C.H., Chiang C.P. et al. Comparison of calcium phosphate cement mixture and pure calcium hydroxide as direct pulp-capping agents// *J. Formos. Med. Assoc.* 1996. V. 95. P. 545-550.
46. Böhner M., Merkle H.P., Van Landuyt P., Trophard G., Lemaître J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2000. V. 11. P. 111-116.
47. Böhner, M. Calcium orthophosphates in medicine, from ceramics to calcium phosphate cements // *Injury*. 2000. V. 3. P. 37-47.
48. Habraken W.J.E.M., de Jonge L.T., Wolke J.G.C., Yubao L., Mikos A.G., Jansen J.A. Introduction of gelatin microspheres into an injectable calcium phosphate cement // *J. Biomed. Mater. Res. A* 2008. V. 87. P. 643-655.
49. Markovic M., Takagi S., Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cements through the use of mannitol crystals // *Key Eng. Mater.* 2001. V. 192-195. P. 773-776.
50. Takagi S., Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2001. V. 12. P. 135-139.
51. Sarda S., Nilsson M., Balcells M., Fernández E. Influence of surfactant molecules as airtrapping agent for bone cement macroporosity // *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003. V. 65. P. 215-221.
52. Almirall A., Larrecq G., Delgado J.A., Martínez S., Planell J.A., Ginebra M.P. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste // *Biomaterials*. 2004. V. 25. P. 3671-3680.

53. Wang XP., Ye JD., Li X., Dong H. Production of in-situ macropores in an injectable calcium phosphate cement by introduction of cetyltrimethyl ammonium bromide // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008. V. 19. P. 3221-3225.
54. Смирнов В.В. Пористые цементы для заполнения дефектов костной ткани // *Материаловедение.* 2009. № 8. С. 16-19.
55. Ключникова Н.В., Влияние пористости на свойства керамометаллических композитов // *Scientific researchers their practical application. Modern state and ways development,* 2012.
56. Gbureck U., Spatz K., Thull R. Improvement of mechanical properties of self-setting calcium phosphate bone cements mixed with different metal oxides // *Mat.-Wiss. u. Werkstofftech.* 2003. V. 34. P. 1036-1040.
57. Zhang Y., Xu H.H.K. Effects of synergistic reinforcement and absorbable fiber strength on hydroxyapatite bone cement // *J. Biomed. Mater. Res. A* 2005. V. 75. P. 832-840.
58. Buchanan F., Gallagher L., Jack V., Dunne N. Short-fibre reinforcement of calcium phosphate bone cement // *Proc. Inst. Mech. Eng. H: J. Eng. Med.* 2007. V. 221. P. 203-212.
59. Simon Jr. C.G., Khatri C.A., Wight S.A., Wang F.W. Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres // *J. Orthop. Res.* 2002. V. 20. P. 473-482.
60. Li M., Liu X., Liu X., Ge B., Chen K. Creation of macroporous calcium phosphate cements as bone substitutes by using genipin – crosslinked gelatin microspheres // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009. V. 20. P. 925-934.
61. Böhner M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery // *Eur. Spine J.* 2001. V. 10. P. 114-121.
62. Chow L.C. Calcium phosphate cements: chemistry, properties, and applications // *Mater. Res. Symp. Proc.* 2000. V. 599. P. 27–37.

63. Rajzer I., Castaño O., Engel E., Planell J.A. Injectable and fast resorbable calcium phosphate cement for body-setting bone grafts // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010. V. 21. P. 2049-2056.
64. Gbureck U., Barralet J.E., Spatz K., Grover L.M. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement // *Biomaterials.* 2004. V. 25. P. 2187-2195.
65. Böhner M., Baroud G. Injectability of calcium phosphate pastes // *Biomaterials.* 2005. V. 26. P. 1553-1563.
66. Taş A.C. Preparation of porous apatite granules from calcium phosphate cement // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008 V. 19. P. 2231-2239.
67. Gbureck U., Dembski S., Thull R., Barralet J.E. Factors influencing calcium phosphate cement shelf-life // *Biomaterials.* 2005. V. 26. P. 3691-3697.
68. Qu X.Y., Jiang D.M., Li M., Zhang D.W., Qin J.Q., Liu C.K. Deproteinized osteoarticular allografts integrated with calcium phosphate cement and recombinant human vascular endothelial cell growth factor plus recombinant human bone morphogenetic protein-2, an immunological study // *J. Clin. Rehabil. Tissue Eng. Res.* 2008. V. 12. P. 8067-8070.
69. Stallmann H.P., de Roo R., Faber C., Amerongen A.V.N., Wuisman P.I.J.M. In vivo release of the antimicrobial peptide hLFi-11 from calcium phosphate cement // *J. Orthop. Res.* 2008. V. 26. P. 531-538.
70. Sasaki T., Ishibashi Y., Katano H., Nagumo A., Toh S. In vitro elution of vancomycin from calcium phosphate cement // *J. Arthroplasty.* 2005. V. 20. P. 1055-1059.
71. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate cements and concretes // *Materials.* 2009. V. 2. P. 221-291.
72. Баринов С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М: Наука, 2005 – С. 206.

- 73.Смирнов В.В., Егоров А.А., Баринов С.М., Шворнева Л.И. Композиционные кальций-фосфатные костные цементы, упрочненные дисперсными частицами титана // ДАН. 2007. Т. 413, № 4. С. 489-492.
- 74.Smirnov V.V., Rau J.V., Generosi A., Rossi Albertini V., Ferro D., Barinov S.M. Elucidation of real-time hardening mechanism of two novel high-strength calcium phosphate bone cements // J. Biomed. Mater. Res. B. 2009. V. 93. P. 74-83.
- 75.Neira I.S., Kolen'ko Yu.V., Kommareddy K.P., Manjubala I., Yoshimura M., Guitian F. Reinforcing of a calcium phosphate cement with hydroxyapatite crystals of various morphologies // ASM Appl. Mater. Interfaces. 2010. V. 2. N. 11. P. 3276-3284.
- 76.Xu H.H.K., Quinn J.B. Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity // Biomaterials. 2002. V. 23. P. 193-202.
- 77.Егоров А.А., Смирнов В.В., Баринов С.М. Влияние размера частиц титана на механические свойства костных кальций-фосфатных цементов // Материаловедение. 2011. № 1. С. 11-14.
- 78.Баринов С.М., Шевченко В.Я. Прочность технической керамики. М: Наука, 1996 – С. 184.
- 79.Khairoun I., LeGeros R.Z., Daculsi G., Bouler J.M., Gauthier O., Guicheux, J. Macroporous, resorbable and injectable calcium phosphate-based cements (MCPC) for bone repair: Augmentation, regeneration and osteoporosis treatment. Patent No. WO/2005/077049, August 25, 2005.
- 80.Speirs A.D., Oxland T.R., Masri B.A., Poursartip A., Duncan C.P. Calcium phosphate cement composites in revision hip arthroplasty // Biomaterials. 2005. V. 26. P. 7310-7318.
- 81.dos Santos L.A., Carrodeguas R.G., Boschi A.O., de Arruda, A.C.F. Fiber-enriched double setting calcium phosphate bone cement // J. Biomed. Mater. Res. A 2003. V. 65. P. 244-250.

82. Gbureck U., Spatz K., Thull R. Improvement of mechanical properties of self-setting calcium phosphate bone cements mixed with different metal oxides // *Mat.-Wiss. u. Werkstofftech.* 2003. V. 34. P. 1036-1040.
83. Zhang Y., Xu H.H.K. Effects of synergistic reinforcement and absorbable fiber strength on hydroxyapatite bone cement // *J. Biomed. Mater. Res. A* 2005. V. 75. P. 832-840.
84. Buchanan F., Gallagher L., Jack V., Dunne N. Short-fibre reinforcement of calcium phosphate bone cement // *Proc. Inst. Mech. Eng. H: J. Eng. Med.* 2007. V. 221. P. 203-212.
85. Speirs A.D., Oxland T.R., Masri B.A., Poursartip A., Duncan C.P. Calcium phosphate cement composites in revision hip arthroplasty // *Biomaterials*. 2005. V. 26. P. 7310-7318.
86. dos Santos L.A., Carrodeguas R.G., Boschi A.O., de Arruda, A.C.F. Fiber-enriched double-setting calcium phosphate bone cement // *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003. V. 65. P. 244-250.
87. Xu H.H.K., Quinn J.B. Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity // *Biomaterials*. 2002. V. 23. P. 193-202.
88. Смирнов В.В., Егоров А.А., Баринов С.М., Шворнева Л.И. Композиционные кальций-фосфатные костные цементы, упрочненные дисперсными частицами титана // *ДАН.* 2007. Т. 413. № 4. С. 489-492.
89. Hesaraki S., Sharifi D., Nemati R., Nezafati N. Preparation and characterisation of calcium phosphate cement made by poly(acrylic/itaconic) acid // *Advan. Applied Ceram.* 2009. V. 108. P. 106-110(5).
90. Khashaba R.M., Moussa M.M., Mettenburg D.J., Rueggeberg F.A., Chutkan N.B., Borke J.L. Polymeric-calcium phosphate cement composites – material properties: in vitro and in vivo investigation // *Int. J. Biomater.* 2010. doi:10.1155/2010/691452.

91. le Nihouannen D., Hacking S.A., Gbureck U., Komarova S.V., Barralet J.E. The use of RANKL-coated brushite cement to stimulate bone remodeling // *Biomaterials*. 2008. V. 29. P. 3253-3259.
92. Reinstorf A., Ruhnnow M., Gelinsky M., Pompe W., Hempel U., Wenzel K.W., Simon P. Phosphoserine-a convenient compound for modification of calcium phosphate bone cement collagen composites // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2004. V. 15. P. 451-455.
93. Lian Q., Li D.C., He J.K., Wang Z. Mechanical properties and in-vivo performance of calcium phosphate cement-chitosan fibre composite // *Proc. Inst. Mech. Eng. H*. 2008. V. 222. P. 347-353.
94. Beam H.A., Bradbury T., Chesmel K.D., Gaylo C., Litwak A.A., Liu Q., Materna P.A., Monkhouse D., Patterson J., Pryor T.J., Saini S., Surprenant H.L., Wang C.-C., West T.G., Yoo J. Method and apparatus for engineered regenerative biostructures such as hydroxyapatite substrates for bone healing applications // 20030065400 US - N 10/122129; Заявл. 12.04.2002.
95. Mickiewicz R.A., Mayes A.M., Knaack, D. Polymer – calcium phosphate cement composites for bone substitutes // *J. Biomed. Mater. Res.* 2002. V. 61. P. 581-592.
96. Fernández E., Sarda S., Hamcerencu M., Vlad M.D., Gel M., Valls S., Torres R., López J. High-strength apatitic cement by modification with superplasticizers // *Biomaterials*. 2005. V. 26. P. 2289-2296.
97. Majekodunmi A.O., Deb S. Poly(acrylic acid) modified calcium phosphate cements, the effect of the composition of the cement powder and of the molecular weight and concentration of the polymeric acid // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007. V. 18. P. 1883-1888.
98. Chen W.C., Ju C.P., Wang J.C., Hung C.C., Lin J.H.C. Brittle and ductile adjustable cement derived from calcium phosphate cement/polyacrylic acid composites // *Dent. Mater.* 2008. V. 24. P. 1616-1622.

99. Duracan C., Brown P.W. Calcium-deficient hydroxyapatite-PGLA composites: mechanical and microstructural investigation // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. V. 51. N 4. P. 726-734.
100. 20100145469 US. A61F 2/28, B05D 3/10. Bioceramic implants having bioactive substance / Barralet J.E., Gbureck U. – N 12/526223; Заявл. 07.02.2008.
101. 8,236,350 US. A61K 9/24. Polymer for tissue engineering applications and drug delivery / Migneco F., Huang Y. C., Birla R.K., Hollister S.J. (The Regents of The University of Michigan) – N 12/533,368; Заявл. 31.07.2009.
102. Majekodunmi A.O., Deb S., Nicholson J.W. Effect of molecular weight and concentration of poly(acrylic acid) on the formation of a polymeric calcium phosphate cement // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003. V. 14. P. 747-752.
103. Xu H.H.R., Takagi S., Sun L., Hussain L., Chow L.C., Guthrie W.F., Yen J.H. Development of nonrigid, durable calcium phosphate cement for use in periodontal bone repair // *J. Am. Dent. Assoc.* 2006. V. 137. P. 1131-1138.
104. Bohner M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitutions // *Eur. Cells and Mater.* 2010. V. 20. P. 1-12.
105. le Nihouannen D., Hacking S.A., Gbureck U., Komarova S.V., Barralet J.E. The use of RANKL-coated brushite cement to stimulate bone remodeling // *Biomaterials.* 2008. V. 29. P. 3253-3259.
106. le Nihouannen D., Hacking S.A., Gbureck U., Komarova S.V., Barralet J.E. The use of RANKL-coated brushite cement to stimulate bone remodeling // *Biomaterials.* 2008. V. 29. P. 3253-3259.
107. Hong S.J., Park Y.K., Kim J.H., Lee S.H., Ryu K.N., Park C.M., Kim Y.S. The biomechanical evaluation of calcium phosphate cements for use in vertebroplasty // *J. Neurosurg. Spine.* 2006. V. 4. P. 154-159.

- 108.Ooms E.M., Wolke J.G.C., ven der Waerden J.P.C.M., Jansen J.A.
Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca-P) cement // J. Biomed. Mater. Res. 2002. V. 61. P. 9-18.
- 109.Liverneaux P., Vernet P., Robert C., Diacono P. Cement pinning of osteoporotic distal radius fractures with an injectable calcium phosphate bone substitute, report of 6 cases. Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol. 2006. V. 16. P. 10-16.
- 110.Liverneaux P., Khallouk R. Calcium phosphate cement in wrist arthrodesis: three cases // J. Orthop. Sci. 2006. V. 11. P. 289-293.
- 111.Aral A., Yalçın S., Karabuda, Z.C., Anıl A., Jansen J.A., Mutlu, Z.
Injectable calcium phosphate cement as a graft material for maxillary sinus augmentation: an experimental pilot study // Clin. Oral Implants Res. 2008. V. 19. P. 612-617.
- 112.Sinikovic B., Kramer F.J., Swennen G., Lubbers H.T., Dempf R.
Reconstruction of orbital wall defects with calcium phosphate cement: clinical and histological findings in a sheep model // Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2007. V. 36. P. 54-61.
- 113.Reddi S.P., Stevens M.R., Kline S.N., Villanueva P. Hydroxyapatite cement in craniofacial trauma surgery, indications and early experience // J. Cran. Maxillofac. Trauma. 2000. V. 5. P. 7-12.
- 114.Friedman C.D., Costantino P.D., Synderman C.H., Chow L.C., Takagi, S.
Reconstruction of the frontal sinus and frontofacial skeleton with hydroxyapatite cement // Arch. Facial Plast. Surg. 2000. V. 2. P. 124-129.
- 115.Lobenhoffer P., Gerich T., Witte F., Tscherne H. Use of an injectable calcium phosphate bone cement in the treatment of tibial plateau fractures: a prospective study of twenty-six cases with twenty-month mean follow-up // J. Orthop. Trauma. 2002. V. 16. P. 143-149.
- 116.Cassidy C., Jupiter J.B., Cohen M., Delli-Santi M., Fennell C., Leinberry C., Husband J., Ladd A., Seitz W.R., Constantz B.R. Norian SRS® cement

- compared with conventional fixation in distal radial fractures, a randomized study // *J. Bone Joint Surg. Am.* 2003. V. 85. P. 2127-2137.
- 117.Schmidt R., Cakir B., Mattes T., Wegener M., Puhl W., Richter M. Cement leakage during vertebroplasty, an underestimated problem? // *Eur. Spine J.* 2005. V. 14. P. 466-473.
- 118.Vlad M.D., Torres R., López J., Barracó M., Moreno J.A., Fernández E. Does mixing affect the setting of injectable bone cement? An ultrasound study // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007. V. 18. P. 347-352.
- 119.Krebs J., Aebli N., Goss B.G., Sugiyama S., Bardyn T., Boecken I., Leamy P.J., Ferguson S.J. Cardiovascular changes after pulmonary embolism from injecting calcium phosphate cement // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2007. V. 82. P. 526-532.
- 120.Russell T.A., Leighton R.K. Comparison of autogenous bone graft and endothermic calcium phosphate cement for defect augmentation in tibial plateau fractures. A multicenter, prospective, randomized study // *J. Bone Joint Surg. Am.* 2008. V. 90A. P. 2057-2061.
- 121.Dickson K.F., Friedman J., Buchholz J.G., Flandry F.D. The use of BoneSource™ hydroxyapatite cement for traumatic metaphyseal bone void filling // *J. Trauma.* 2002. V. 53. P. 1103-1108.
- 122.Libicher M., Hillmeier J., Liegibel U., Sommer U., Pyerin W., Vetter M., Meinzer H.P., Grafe I., Meeder P., Nöldge G., Nawroth P., Kasperk C. Osseous integration of calcium phosphate in osteoporotic vertebral fractures after kyphoplasty: initial results from a clinical and experimental pilot study // *Osteoporos. Int.* 2006. V. 17. P. 1208-1215.
- 123.Yoshikawa M., Terada Y., Toda T. Setting time and sealing ability of alpha-tricalcium phosphate cement containing titanic oxide // *J. Osaka Dent. Univ.* 1998. V. 32(2). P. 67-70.
- 124.Zhang W., Walboomers X.F., Jansen J.A. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA

- microparticles containing TGF- β 1 // *J. Biomed. Mater. Res. A* 2008. V. 85. P. 439-444.
- 125.Noetzel J., Kielbassa A.M. Calcium phosphate cements in medicine and dentistry--a review of literature // *Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.* 2005. V. 115. P. 1148-1156.
- 126.Ratier A., Freche M., Locout J.L., Rodriguez F. Behaviour of an injectable calcium phosphate cement with added tetracycline // *Int. J. Pharm.* 2004. V. 274. P. 261-268.
- 127.Kisanuki O., Yajima H., Umeda T., Takakura Y. Experimental study of calcium phosphate cement impregnated with dideoxy-kanamycin B // *J. Orthop. Sci.* 2007. V. 12. P. 281-288.
- 128.McNally A., Sly K., Lin S., Bourges X., Daculsi G. Release of antibiotics from macroporous injectable calcium phosphate cement // *Key Eng. Mater.* 2008. V. 361-363. P. 359-362.
- 129.Hofmann M.P., Mohammed A.R., Perrie Y., Gbureck U., Barralet J.E. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities // *Acta Biomater.* 2009. V. 5. P. 43-49.
- 130.Tamimi F., Torres J., Bettini R., Ruggera F., Rueda C., López-Ponce M., Cabarcos E.L. Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases // *J. Biomed. Mater. Res. A* 2008. V. 85. P. 707-714.
- 131.Young A.M., Ng P.Y.J., Gbureck U., Nazhat S.N., Barralet J.E., Hofmann M.P. Characterization of chlorhexidine-releasing, fast-setting, brushite bone cements // *Acta Biomater.* 2008. V. 4. P. 1081-1088.
- 132.Seeherman H.J., Li R., Wozney J.M. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors // *J. Bone Jt. Surg. A* 2003. V. 85. P. 96-111.
- 133.Edwards III R.B., Seeherman H.J., Bogdanske J.J., Devitt J., Vanderby R., Markee M.D. Percutaneous injection of recombinant human bone

- morphogenetic protein-2 in a calcium phosphate paste accelerates healing of a canine tibial osteotomy // *J. Bone Jt. Surg. A* 2004. V. 86. P. 1425-1438.
134. Seeherman H.J., Bouxsein M., Kim H., Li R., Li X.J., Aiolova M., Wozney J.M. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model // *J. Bone Jt. Surg. A* 2004. V. 86. P. 1961–1973.
135. Ginebra M.P., Traykova T., Planell J.A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review // *J. Control. Releas.* 2006. V. 113. P. 102-110.
136. Losee J.E., Karmacharya J., Gannon F.H., Slemp A.E., Ong G., Hunenko O., Gorden A.D., Bartlett S.P., Kirschner R.E. Reconstruction of the immature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate bone cement, interaction with bioresorbable mesh // *J. Craniofacial Surg.* 2003. V. 14. P. 117-124.
137. Ambard A.J., Mueninghoff L. Calcium phosphate cement, review of mechanical and biological properties // *J. Prosthodont.* 2006. V. 15. P. 321-328.
138. Kuemmerle J.M., Oberle A., Oechslin C., Böhner M., Frei C., Boeckel I., von Rechenberg B. Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty – an experimental study in sheep // *J. Cran. Maxillofac. Surg.* 2005. V. 33. P. 37-44.
139. Luaces-Rey R., García-Rozado A., Crespo-Escudero J.L., Seijas B.P., Arenaz-Búa J., López-Cedrún J.L. Use of carbonated calcium phosphate bone cement and resorbable plates for the treatment of frontal sinus fractures: two case reports // *J. Plastic Reconstr. Aesthetic Surg.* 2009. V. 62. P. 272-273.
140. Tamimi F., Torres J., Cabarcos E.L., Bassett D.C., Habibovic P., Luceron E., Barralet J.E. Minimally invasive maxillofacial vertical bone augmentation using brushite based cements // *Biomaterials.* 2009. V. 30. P. 208-216.

141. Baker S., Weinzweig J., Kirschner R. and Barlett S. Applications of a new carbonated calcium phosphate bone cement: early experience in pediatric and adult craniofacial reconstruction // *Plast. Reconstr. Surg.* 2002. V. 109. P. 1789-1796.
142. Stanton D.C., Chou J.C., Carrasco L.R. Injectable calcium-phosphate bone cement (Norian) for reconstruction of a large mandibular defect: a case report // *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004. V. 62. P. 235-240.
143. Lye K., Tideman H., Merckx M., Jansen J. Bone cements and their potential use in a mandibular endoprosthesis // *Tissue Eng. Part B.* 2009. V. 15. P. 485-496.
144. Magee W.P., Ajkay N., Freda N., Rosenblum R.S. Use of fast-setting hydroxyapatite cement for secondary craniofacial contouring // *Plast. Reconstr. Surg.* 2004. V. 114. P. 289.
145. Chen T.M., Wang H.J., Chen S.L., Lin F.H. Reconstruction of post-traumatic frontal-bone depression using hydroxyapatite cement // *Ann. Plast. Surg.* 2004. V. 52. P. 303.
146. Honig J.F., Merten H.A., Nitsch A., Verheggen R. Contouring of cranial vault irregularities with hydroxyapatite cement: A clinical and experimental investigation // *J. Craniofac. Surg.* 2005. V. 16. P. 457.
147. Cho Y.R., Gosain A.K. Biomaterials in craniofacial reconstruction // *Clin. Plast. Surg.* 2004. V. 31. P. 377.
148. Gosain A.K. Biomaterials in facial reconstruction // *Oper. Tech. Plast. Reconstr. Surg.* 2003. V. 9. P. 23.
149. Elshahat A., Shermak M.A., Inoue N., et al. The use of NovaBone and Norian in cranioplasty: A comparative study // *J. Craniofac. Surg.* 2004. V. 15. P. 483.

ИМЕТ РАН

НИР ИМЕТ РАН

Композиционные материалы на основе фосфатов кальция и биополимеров

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора ИМЕТ РАН
д.т.н.
Колмаков А.Г.
2016 г.

«08» ИЮНЯ



ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ

Настоящий технологический регламент предназначен для изготовления композиционных материалов на основе фосфатов кальция и биополимеров.

НИР ИМЕТ РАН

2. Характеристика исходного сырья

| №№ | Наименование | Обозначение | Марка | Требования |
|------|-------------------------------|--------------------------------|-------|------------|
| 2.1. | Хитозан высокомолекулярный | хитозан | «хч» | 600 кДа |
| 2.2. | Ортофосфорная кислота | H ₃ PO ₄ | «хч» | - |
| 2.3. | Тетракальций фосфат | ТТКФ | - | Д*=1 мкм |
| 2.4. | Аморфный фосфат кальция | АФК | - | Д*=100 нм |
| 2.5. | Дистиллированная вода | H ₂ O | - | pH=7.0-7.6 |

*Д – дисперсность материала

Хранение исходного сырья и материалов

Поступающее сырьё и материалы регистрируются в журнале, указывается дата поступления, номер партии, сертификат или паспорт (формуляр) с указанием наименования сырья или материала и его номер, объём партии, поставщик.

Поступающее сырьё и материалы должны храниться в хорошо оборудованном крытом складе, отдельно по видам, сортам, партиям прибытия. Отсеки склада должны быть изолированы друг от друга прочными стенами. Каждый отсек должен быть снабжён биркой - указанием наименования и сорта хранящегося материала. Материалы, поступающие в упаковке, должны храниться в сухих закрытых помещениях.

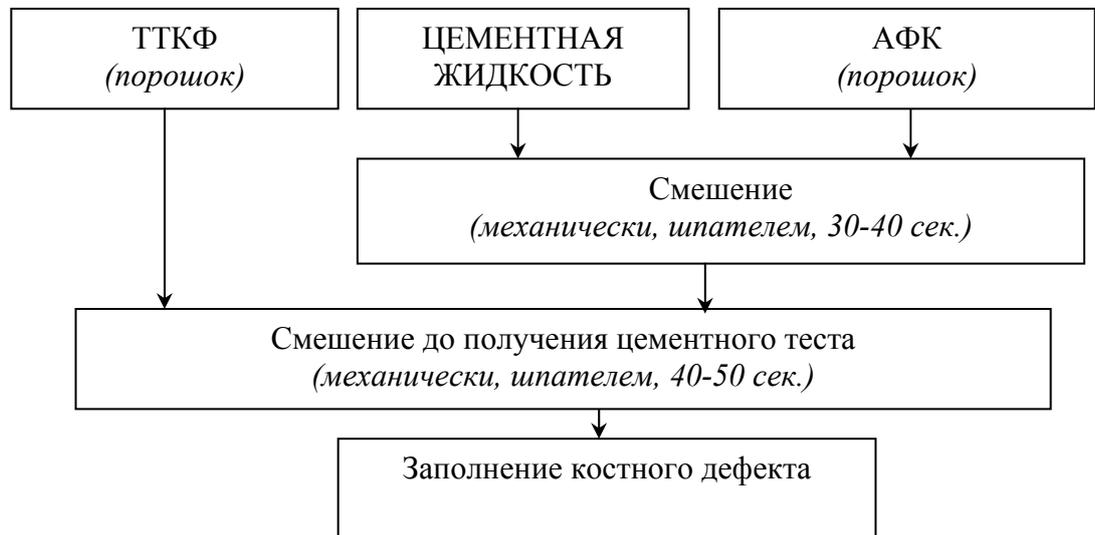
На складе сырья поддерживается запас основных видов сырья не менее чем на 1-2 месяца.

От каждой партии прибытия сырья в момент разгрузки отбирается средняя проба для проведения проверочных испытаний. До проведения проверочных испытаний без разрешения лаборатории использование сырья по целевому назначению запрещается. Сырьё, загрязнённое вредными примесями, или не соответствующее требованиям ГОСТ и ТУ, в производстве не используется.

Для проведения входного контроля сырья и материалов разработан перечень сырья и материалов, подлежащих входному контролю, содержащий: наименование и марку сырья, обозначение НТД, основное назначение (применение), вид контроля (сплошной или выборочный), параметры, подлежащие контролю, объём выборки или пробы, методы и средства проведения контроля.

НИР ИМЕТ РАН

4.2. Технологическая схема приготовления КФЦ



НИР ИМЕТ РАН

9. Основные параметры получаемой продукции**9.1. Упаковка для изготовления костного цемента включает следующие компоненты:**

Сухая компонента – цементный порошок:

Порошок тетракальций фосфата дисперсностью до 1 мкм,

Порошок аморфного фосфата кальция дисперсностью до 100 нм.

Жидкая компонента – цементная жидкость:

Водный раствор хитозана в ортофосфорной кислоте

9.2. Цемент после приготовления характеризуется:

Фазовый состав:

Апатитоподобная фаза не менее 80 масс. %,

Тетракальцийфосфат 20 - 10 масс.%,

Общая пористость до 12%.

Прочность при сжатии не менее 8 МПа.

рН после 30 мин. затворения не менее 7,2.

9.3. Контроль свойств.

Контроль фазового состава получаемых материалов осуществляется методом рентгеновской дифракции на основных этапах получения. Рентгенографические исследования проводят в режиме на отражение (геометрия Брегга-Брентано) с использованием $\text{Cu K}\alpha$ - излучения (длина волны $\lambda = 1.54183 \text{ \AA}$).

ИК-спектры поглощения образцов регистрируют в диапазоне 400-4000 см^{-1} с шагом сканирования 2 см^{-1} . Образцы запрессовывают в таблетки $\phi = 13 \text{ мм}$ с бромистым калием (усилие прессования 4 метрические тонны) из расчета 1 мг порошка на 300 мг КВг (для ИК).

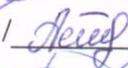
Микроструктуру и распределение компонентов в материале анализируют при помощи растрового электронного микроскопа Tescan Vega II SBU с возможностью режима отраженных электронов и системой энерго- дисперсионного рентгеновского спектрального анализа INCA Energy.

НИР ИМЕТ РАН

Разработчики регламента:

Егоров А.А. / 

Комлев В.С. / 

Тетерина А.Ю. / 

Федотов А.Ю. / 