

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ТОРОПКОВ НИКИТА ЕВГЕНЬЕВИЧ

**РАЗРАБОТКА БИОРЕЗОРБИРУЕМЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ
МАТЕРИАЛОВ И ТЕХНОЛОГИИ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

05.17.11 – Технология силикатных и тугоплавких неметаллических материалов

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук, доцент
Петровская Татьяна Семеновна

Томск – 2021 г.

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО РАЗРАБОТКЕ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ.....	13
1.1. Требования к костным имплантатам.....	13
1.2. Состав и структура костной ткани	16
1.3. Фосфаты кальция. Классификация, получение, свойства, применение.....	20
1.4. Структура гидроксиапатита.	28
1.5 Полимерные композиты, содержащие фосфаты кальция.....	31
1.6. Постановка цели и задач исследования.	43
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Характеристика веществ, используемых для синтеза и исследования свойств материалов на основе кальциевых фосфатов и полилактида.....	45
2.2. Получение композиционных материалов.....	46
2.2.1. Композиционные материалы	46
2.2.2. Получение композиционной нити.....	46
2.3. Методы исследования.....	47
2.3.1 Методы исследования дисперсности	47
2.3.2 Термические методы исследования	48
2.3.3 Методы исследования структуры.....	49
2.3.4. Определение элементного состава	51
2.3.6 Методы определения физико-механических свойств	52
2.4. Методы формования композиционных образцов.....	52
2.4.1. Инжекционное литье под давлением	52
2.4.2. 3D-печать	52
2.5 Исследование биосовместимости и биоактивных свойств.....	53

2.5.1. Прогностическая оценка активности поверхности	53
2.5.2. Исследования в модельных растворах фосфатного буфера и внеклеточной жидкости.....	53
2.5.3. Оценка стерилизующей способности.	54
2.5.4. <i>In vitro</i> исследования.....	55
2.5.5. <i>In vivo</i> исследования.....	56
ГЛАВА 3. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ .	60
3.1. Синтез фосфатов кальция.....	61
3.2. Исследование фазового состава продуктов синтеза.....	62
3.3. Исследование дисперсности продуктов синтеза	68
Выводы по третьей главе.....	70
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СОСТАВОВ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ	71
4.1. Разработка составов композитов	72
4.2. Исследование физико-химических процессов при термообработке композитов	76
4.3. Исследование поверхностной активности разработанных композиционных материалов.	81
Выводы по четвертой главе.....	83
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗДЕЛИЙ ИЗ КОМПОЗИТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ 3D-ПЕЧАТИ	85
5.1. Получение композиционной нити.....	85
5.2. Разработка режимов 3D-печати	91
5.3. Механические характеристики 3D-печатных образцов.....	94
Выводы по пятой главе.....	96
ГЛАВА 6. ОЦЕНКА БИОАКТИВНЫХ СВОЙСТВ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ	97

6.1. Исследования в условиях <i>in vitro</i>	97
6.2. Исследование цитотоксичности разработанных композитов	104
6.3. Исследование остеогенного потенциала композитов <i>in vivo</i>	105
Выводы по шестой главе.	109
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	111
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	115
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы:

В настоящее время в ортопедии и травматологии используются, главным образом, имплантаты на основе металлов, сплавов, а также биоинертная керамика. Однако имеются области регенеративной медицины, где незаменимой является кальциево-фосфатная керамика и изделия на ее основе. При этом невысокая прочность кальциево-фосфатной керамики не позволяет ее использовать в качестве объемных элементов способных нести поддерживающую функцию, поэтому кальций-фосфатная керамика находит широкое применение в качестве покрытий на металлические имплантаты, снижая риск отторжения в первые периоды приживания.

Обширные дефекты костей (например, при онкологии) требуют использования имплантатов со сложной геометрией, что остается трудно решаемой задачей. Отсутствие полной геометрической конгруэнтности имплантата с окружающими тканями приводит к локальному отторжению эндопротеза в зонах с недостаточной интеграцией, к объёмным образованиям фиброзной ткани. Задача соответствия имплантата форме дефекта может быть решена совместным использованием данных рентгеновской томографии, моделирования архитектуры имплантата и его 3D-печати. Такой подход открывает перспективы создания индивидуальных имплантатов любой формы.

Для создания биорезорбируемых материалов для имплантатов подходящими являются термопластичные полимеры карбоновых кислот, благодаря чему они широко применяются в восстановительной медицине для лечения переломов, в том числе заменяя металлические штифты. В то же время, имеются данные, что изделия из биополимеров приводят к неполной деградации. Другим недостатком полимеров карбоновых кислот является снижение pH биологических жидкостей, омывающих имплантат, что наряду с другими факторами способствует развитию асептического воспаления и образованию капсулы из соединительной ткани между имплантатом и костью. Возникает микроподвижность имплантата и неизбежное его удаление.

Ослабление отрицательного влияния полимера может быть достигнуто путем сочетания в одном композите биополимера и фосфатов кальция. Применение кальций-фосфатных компонентов в композите обеспечит высокую биосовместимость и остеоинтеграционный потенциал. Такие композиты, как ожидается, должны контролируемо замещаться костной тканью с последующим зарастанием дефекта кости. Увеличение доли кальциево-фосфатного керамического компонента в композите должно нормализовать pH прикостных жидкостей и уменьшить влияние растворения полимера с образованием новой кости. Использование термопластичных полимеров открывает возможность применения 3D-печати и получения имплантатов любой формы.

Настоящее исследование, посвященное разработке композиционных материалов, обладающих вышеперечисленными свойствами, является актуальным.

Диссертационная работа выполнялась при поддержке гранта РФФИ по теме «Физико-химические основы создания биоактивных композиционных материалов с повышенной прочностью для имплантатов кости» (№ 19-33-90188), а также грантом «УМНИК» по теме «Разработка составов биорезорбируемых чернил для 3D-печати костных имплантатов» (11848ГУ/2017).

Степень разработанности темы исследования:

Исследования в области биокompозитов, содержащих фосфаты кальция с применением аддитивных технологий, проводятся научными группами: Томского политехнического университета (Твердохлебов С.И., Больбасов Е.Н. и др.) – композиты для 3D-печати на основе полилактида, поликапролактама и др. и гидроксиапатита; Томского государственного университета (Курзина И.А. Лыткина Д.Н., Васенина И.В.) – биокompозиты, содержащие полилактид и гидроксиапатиты, в том числе ион-модифицированные; Технологический университет "МИСиС" (Сенатов Ф.С., Задорожный М.Ю.) – биокompозиты с различными полимерами и гидроксиапатитом; Университет Сан-Паулу (Д.К. Соуза, Э.Л. Вахиа де Абреу, Л.Э. Каталани) – биокompозиты на основе октакальциевых фосфатов и полилактида с применением 3D-печати; Аньхойский университет Сан-Лянь (В. Ян, К. Я. Чжан) – биокompозиты из полилактида и

наноразмерного гидроксиапатита; Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (Путляев В.И., Сафронова Т.В. и др.) – биокомпозиты для стереолитографической 3D-печати, биоинспирированные имплантаты, исследование их структуры и свойств; Омский государственный университет им. Ф.М. Достоевского (Голованова О.А. и др.) – получение биокомпозитов на основе ортофосфатов кальция в присутствии органических и неорганических агентов.

Системных исследований по высоконаполненным органоминеральным биокомпозитам, пригодным для получения изделий сложной формы, нет.

Цель и задачи работы

Целью работы является разработка биорезорбируемых композиционных материалов на основе фосфатов кальция и полилактида, пригодных для 3D-печати и технологии получения изделий из них по методу FDM.

В соответствии с целью работы в диссертации решаются следующие **задачи**:

1. Исследование условий получения фосфатов кальция, пригодных для создания композиционного материала.
2. Разработка составов композитов и исследование влияния составов на их физико-химические свойства.
3. Исследование физико-химических процессов, происходящих при нагревании композитов.
4. Исследование режимов 3D-печати композитов. Определение механических свойств образцов, полученных при различных режимах 3D-печати.
5. Исследование основных биологических свойств полученных композитов: биорезорбции, биоактивности и биосовместимости.

Научная новизна

1. Установлено, что осаждение из водных растворов кальций- и фосфатсодержащих солей позволяет получать смесь высокодисперсных фосфатов кальция (ВФК), состоящую из гидроксиапатита, карбонатзамещенного и аморфного гидроксиапатита, фосфата кальция, характеризующуюся средним отношением $Ca/P = 1,60-1,62$, средним размером частиц до 100 нм и удельной поверхностью 50-60 м²/г. Эти характеристики достигаются при следующих

условиях синтеза: смешение исходных компонентов в турбулентном режиме, температура синтеза 100 °С, выдерживание осадка в маточном растворе не менее 14 дней, поддержание значения pH в течение всего процесса на уровне 9.

2. Установлено, что добавки глицерина и сорбитола суммарной концентрации от 1,5 до 7,5 % мас. обеспечивают гомогенное распределение смеси высокодисперсных фосфатов кальция (ВФК) в полилактиде и позволяют получить композиционные материалы с содержанием ВФК до 70 % мас., превосходящие аналоги по совокупности механических свойств. При этом содержание ВФК в композите от 50 до 70% обеспечивает достижение показателей предела прочности при сжатии 50-61 МПа, при изгибе 32-43 МПа, ударной вязкости 4,5-5,9 кДж/м², числа циклов нагружения 4200-4800, что сопоставимо с характеристиками натуральной губчатой кости.

3. Установлено, что нагревание композитов на основе ВФК и полилактида в процессе 3D-печати сопровождается стеклованием и конденсацией лактида в диапазоне температур от 60 до 160 °С, а также полиморфным переходом гидроксиапатита из моноклинной в гексагональную модификацию в диапазоне 200 - 230 °С. Эти процессы обуславливают переход от линейной к пространственной структуре полимера, возникновение водородной связи между гидроксильными группами гидроксиапатита и карбоксильными группами полилактида и обеспечивают высокие механические характеристики композитов.

Практическая значимость работы

Разработаны составы композиционных материалов на основе полилактида с содержанием смеси высокодисперсных фосфатов кальция от 10 до 60% с добавками глицерина и сорбитола в суммарной концентрации от 1,5 и до 7,5%, отличающиеся более высокими показателями механической прочности по сравнению с известными: предел прочности при сжатии от 50 до 61 МПа, предел прочности при изгибе от 32 до 43 МПа, ударная вязкость от 4,5 до 5,7 кДж/м², число циклов нагружения от 4200 до 4800. По совокупности биологически значимых свойств: смачиваемости физиологическими растворами, низкому показателю цитотоксичности, биоактивности *in vitro* и остеогенному потенциалу *in vivo* -

разработанные композиты рекомендованы для применения в регенеративной медицине для замещения костных дефектов.

Разработаны технологические основы получения изделий из разработанных композиционных биоматериалов заданной архитектуры и формы с комплексом заданных функциональных свойств, включающие блок 3D-печати.

Новые результаты защищены патентами RU2679127C1 «Композит для 3d-печати медицинских изделий», RU2679632C1 «Композит для 3d-печати медицинских изделий».

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в получении новых данных по синтезу фосфатов кальция требуемого состава и степени дисперсности. В развитии представлений в области получения органоминеральных композиционных материалов, предназначенных для применения в восстановительной медицине. В создании научных основ технологии получения композитов на основе высокодисперсных фосфатов кальция и полилактида с применением 3D-печати.

Положения, выносимые на защиту

- Положение об условиях получения комплекса фосфатов кальция, обладающих функциональной совокупностью структурно-фазовых, химических и дисперсных характеристик: отношением $Ca/P=1,60-1,62$, со средним размером частиц до 100 нм, удельной поверхностью 50-60 м²/г; включающих температуру реакции равную 100 ± 5 °С, турбулентный режим смешивания, поддержание pH на уровне $9,0\pm 0,3$.
- Положение о формировании составов, определяющих функциональные и технологические свойства композиционных материалов, а именно: введение комплекса высокодисперсных фосфатов кальция от 10 до 70%, диспергаторов-пластификаторов глицерина и сорбитола суммарной концентрацией от 1,5 до 7,5%, что обеспечивает достижение целевых показателей механической прочности и биологически значимых свойств.
- Положение о граничных условиях перехода от линейной к пространственной структуре полимера и возникновения химических связей между

органическим и минеральным компонентом композита в процессе 3D-печати в диапазоне температур 200-230 °С.

Методология и методы исследования.

Объектами исследования являются композиционные материалы на основе фосфатов кальция и полилактида.

Предметом исследования являются процессы получения высокодисперсных фосфатов кальция и композиционных материалов на их основе с применением термопластичного полимера полилактида.

Научная гипотеза работы состоит в следующем. Целевые функциональные свойства композиционного материала определяются его компонентным составом, структурой на молекулярном, микро- и макроуровнях, а также технологическими характеристиками исходных компонентов. Регулирование биологически значимых свойств композита обеспечивается совокупностью структурно-фазовых, химических и дисперсных характеристик минеральной фазы, представленной фосфатами кальция.

Основными методами исследования в работе являются методы синхронного термического анализа и электронной микроскопии, рентгеноструктурного, дисперсного анализа и ИК-спектроскопии. Методы испытания основных биологических свойств и определения механических характеристик материалов основаны на требованиях ГОСТ.

Достоверность и обоснованность результатов

Достоверность и обоснованность результатов, полученных в диссертационной работе, обеспечивается использованием современных высокоинформативных методов исследования в аттестованных лабораториях на сертифицированном оборудовании; с использованием современных стандартных методик, приборов и технических средств; достаточным для статистической оценки количеством образцов и проведенных измерений.

Апробация

Основные результаты работы доложены и обсуждены на следующих научных мероприятиях (конференциях и симпозиумах): «Молодежь, наука, технологии: идеи и перспективы», Томск, Россия 2017г.; «Современные техника и технологии», Томск, Россия, 2017г.; XIV «Перспективы развития фундаментальных наук», Томск, Россия, 2017г., 2018г., 2019г.; «Ломоносов-2017, 2018», Москва, Россия, 2017г., 2018г.; «Химия и химическая технология в XXI веке» Томск, Россия 2017-2020г.; «Функциональные материалы: разработка, исследование, применение», Томск-Тамбов, Россия, 2017г.; конкурс Научно-технического творчества молодежи НТТМ-2017, Москва, Россия 2017г.; «Всероссийский инженерный конкурс», Москва, Россия, 2017г.; Всероссийский нанотехнологический инженерный конкурс для студентов и аспирантов, Москва, Россия, 2017г.; «Высокие технологии в современной науке и технике» Томск, Россия, 2017г.; "Новые технологии создания и применения биокерамики в восстановительной медицине", Томск, Россия, 2016г.; «Биоматериалы в медицине» Москва, Россия, 2017г.; Macro- and Supramolecular Architectures and Materials: Multifunctional Materials and Structures (MAM-17), Москва, Россия, 2017г.; «Физическая мезомеханика. Материалы с многоуровневой иерархически организованной структурой и интеллектуальные производственные технологии», Томск, Россия, 2019 - 2021г.; Международный симпозиум имени академика М.А. Усова студентов и молодых ученых, Томск, Россия, 2017 - 2020г.

Получено 2 акта об апробации результатов работы.

Личный вклад

Автором сформулирована научная гипотеза диссертационной работы, выбраны методы для проведения исследований. Принято участие в постановке цели и задач исследования. Автором проведены все экспериментальные исследования с применением инструментальных методов, получены фосфаты кальция и композиционные материалы, проведены эксперименты *in situ* и *in vitro*. Разработаны технологические основы изготовления изделий из разработанных композитов с применением 3D-печати. Проведены расчетные и

экспериментальные исследования, результаты которых интерпретированы и подготовлены к публикации. Анализ полученных результатов и формулирование выводов проводились совместно с научным руководителем. При публикации результатов диссертационной работы вклад соавторов не превышал 30%. По результатам проведенных работ автором предложена новая технология получения композитов, содержащих высокодисперсные фосфаты кальция и полилактид, с применением 3D-печати для создания имплантатов сложной формы.

Публикации

Результаты работы представлены в 28 публикациях, из которых 1 статья в журнале, рекомендованном ВАК, 2 статьи в журналах и 6 трудов конференций в изданиях, индексируемых в Scopus и Web of Science. В рамках выполнения работы получено 2 патента.

Структура и объем работы.

Работа состоит из введения, 6 глав, заключения и списка использованных литературных источников. Общий объем работы составляет 145 страницы, включая 41 рисунок, 21 таблицу, 253 библиографических источника.

ГЛАВА 1. СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО РАЗРАБОТКЕ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ.

1.1. Требования к костным имплантатам

Костные имплантаты используются для увеличения или стимулирования образования новой кости в таких случаях, как заживление переломов скелета или между двумя костями через больной сустав, для замены и восстановления утраченной кости в результате травмы, инфекции или заболевания; или для улучшения реакции на заживление кости и регенерации костной ткани вокруг хирургически имплантированных устройств, таких как протезы искусственных суставов или пластины, винты, шины, пины и штифты, используемые для выравнивания кости. О высокой частоте этих состояний свидетельствует 2,2 миллиона костных трансплантатов, используемых в ортопедических процедурах ежегодно [1-3]. Существует три основных типа костных трансплантатов – аутоотрансплантаты, аллотрансплантаты и заменители костного трансплантата [2, 4].

Использование костных трансплантатов является стандартом для многих случаев лечения переломов скелета или для замены и восстановления утраченной кости, о чем свидетельствует большое количество операций по трансплантации кости, выполняемых во всем мире. Наиболее распространенным из них является аутоотрансплантат (пересадка собственного костного материала пациента), однако его использование может привести к таким осложнениям, как воспаление (в том числе хроническое), инфекция, рубцевание и кровопотеря. Также при обширных дефектах материала аутоотрансплантата бывает недостаточно [1]. Альтернативой являются аллотрансплантаты (трансплантация костного материала от донора), но они не обладают остеоактивной способностью аутоотрансплантатов и несут в себе риск переноса инфекционных агентов или иммунного отторжения [5]. Другие подходы, такие как искусственные заменители костного трансплантата, направлены на повышение его эффективности или каркасы включающие клетки-предшественники кости и факторы роста для стимуляции клеток [1, 3, 6, 7]. Идеальный костный имплантат или каркас должен быть изготовлен из

биоматериалов, имитирующих структуру и свойства естественного костного внеклеточного матрикса, обеспечивающих сохранение всех необходимых биологических сигналов, обнаруженные в естественной кости. Однако создание конструкций из материалов, которые структурно, функционально и механически сопоставимы с естественной костью, является сложной задачей.

В последнее время создание искусственных материалов с предсказываемыми свойствами, контролируемой резорбцией, сопоставимой с костью механическими характеристиками стало неотъемлемой частью медицинского материаловедения [7, 8].

Большим классом материалов являются имплантаты из искусственных материалов, в основе которых лежат металлы и сплавы на основе титана, ниобия, железа, циркония и других металлов, а также биоинертная керамика (алюмо-циркониевая, циркониевая, иттриево-циркониевая и др.) [1, 7-10]. Однако имеются области регенеративной медицины, где наиболее эффективной является кальциево-фосфатная керамика и изделия на ее основе [7, 11]. При этом невысокая прочность кальциево-фосфатной керамики не позволяет ее использовать в качестве объемных элементов способных нести поддерживающую функцию, поэтому кальций-фосфатная керамика находит применение в трех направлениях:

- покрытия на металлические и керамические имплантаты, с целью снижения риска отторжения в первые периоды приживания [1, 5, 7, 11, 12].
- объемно пористые изделия (пористость достигает 70-80%) для использования в репаративной регенерации недостающих фрагментов кости при имплантации масштабных поддерживающих конструкций на основе биоинертных металлов [1, 3, 7, 13-15],
- композиционные материалы из кальций-фосфатной керамики с добавками, повышающими ее плотность и прочность однако при этом снижается ее способность к остеоинтеграции [14, 16, 17].

На данный момент в области медицинского материаловедения для травматологии и ортопедии активно используется подход естественной регенерации, где материал имплантата под действием биологических жидкостей

организма подвергается деградации с последующей его резорбцией, при этом попутно происходит процесс восстановления поврежденной костной ткани, таким образом, что материал имплантата замещается костной тканью носителя. Поэтому исследования в области материалов близких по своей структуре, составу и функциональным свойствам к свойствам натуральной костной ткани проводятся до сих пор.

Для того чтобы приблизиться к свойствам натуральной кости при создании имплантатов, необходима актуальность поиска материалов и условий их получения, соответствующих следующим требованиям [1-3, 6, 7, 14, 16, 20-22]:

- материал имплантата должен быть *биосовместимым* – не вызывать воспалительных реакций или отрицательного иммунного ответа в следствие его токсичности, не отторгаться организмом как инородное тело;

- материал, вживляемый в кость, должен обладать биологической активностью, т.е. *остеостимулирующим* действием, для обеспечения врастания в костную ткань и как следствие его надежной фиксации в организме;

- материал должен инициировать образование костной ткани (*остеоиндуктивность*), так как скелет человека неизбежно самообновляется со временем, и при естественно резорбции на поверхности имплантата должна образовываться новая кость;

- *механические свойства* материалов должны быть соизмеримыми или немного превосходящими свойства костной ткани человека и не подвергаться изменениям во время обработки имплантата и во время нормальной жизнедеятельности пациента после его имплантации. Избыточно прочные и твердые имплантаты не смогут полноценно прижиться, так как при их эксплуатации будут возникать микротрещины, дефекты, напряжения, которые разупрочняют место имплантации, что приводит к разрушению кости.

- материалы должны выдерживать *стерилизацию* без изменения свойств. Так, например, при стерилизации распространенным методом автоклавной обработки изделия выполненный из биополимеров подвергаются деструкции и изменению формы [23], а УФ-стерилизация титановых имплантатов образует на

поверхности имплантата избыточное количество свободных радикалов, которые исключают фактор приживания [24].

– материалы костных имплантатов, используемых при контакте с трабекулярной костью, должны иметь систему *взаимосвязанных пор*, диаметром не менее 100 мкм, при общей пористости не менее 70 % для обеспечения взаимодействия организма с имплантируемым материалом;

– материалы для костной пластики должны легко подвергаться *механической обработке* или другому способу корректировки формы в процессе операции;

1.2. Состав и структура костной ткани

Создание костных биомиметичных имплантатов включает построение правильного представления кости, что требует понимания биологии и физиологии кости. Кость следует рассматривать как композитный материал с со сквозной пористостью, состоящий из белков внеклеточного матрикса, остеогенных клеток, минеральных кальциевых фосфатов преимущественно в форме гидроксиапатита кальция, сложной сосудистой системы и других факторов оказывающих влияние на рост кости [7, 13, 24].

Кость – это резервуар кальция, содержащий 99% кальция в организме. Минеральная часть кости в основном (85%) состоит из смеси гидроксиапатита (ГАП, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), с карбонатом кальция (10%), фторидом кальция (2-3%) и фторидом магния (2-3%) [7, 17, 25].

Природный гидроксиапатит содержит карбонат-ионы в качестве замещающих групп в фосфатных и гидроксильных центрах структуры гидроксиапатита. Наибольший размер этих кристаллов – 20 нм. Прочность и жесткость кости выше вдоль ее продольной оси [1, 26, 27]. Это связано с тем, что волокна коллагена и кристаллы минералов ориентированы в этом направлении, при этом минеральная часть обеспечивает жесткость, микропластичность и твердость, а фибриллы коллагена придают кости трещиностойкость, жесткость на поперечную нагрузку и устойчивость к циклическим нагрузкам [28, 29].

На гистологическом уровне существует два основных структурных типа

кости: кортикальная кость, которая образует плотную внешнюю оболочку, и губчатая или трабекулярная кость, которая образует пористое внутреннее ядро. Обе они классифицируются на основе их пористости, структуры и метаболической активности, которые влияют на их функцию и физиологию (рисунок 1.1).

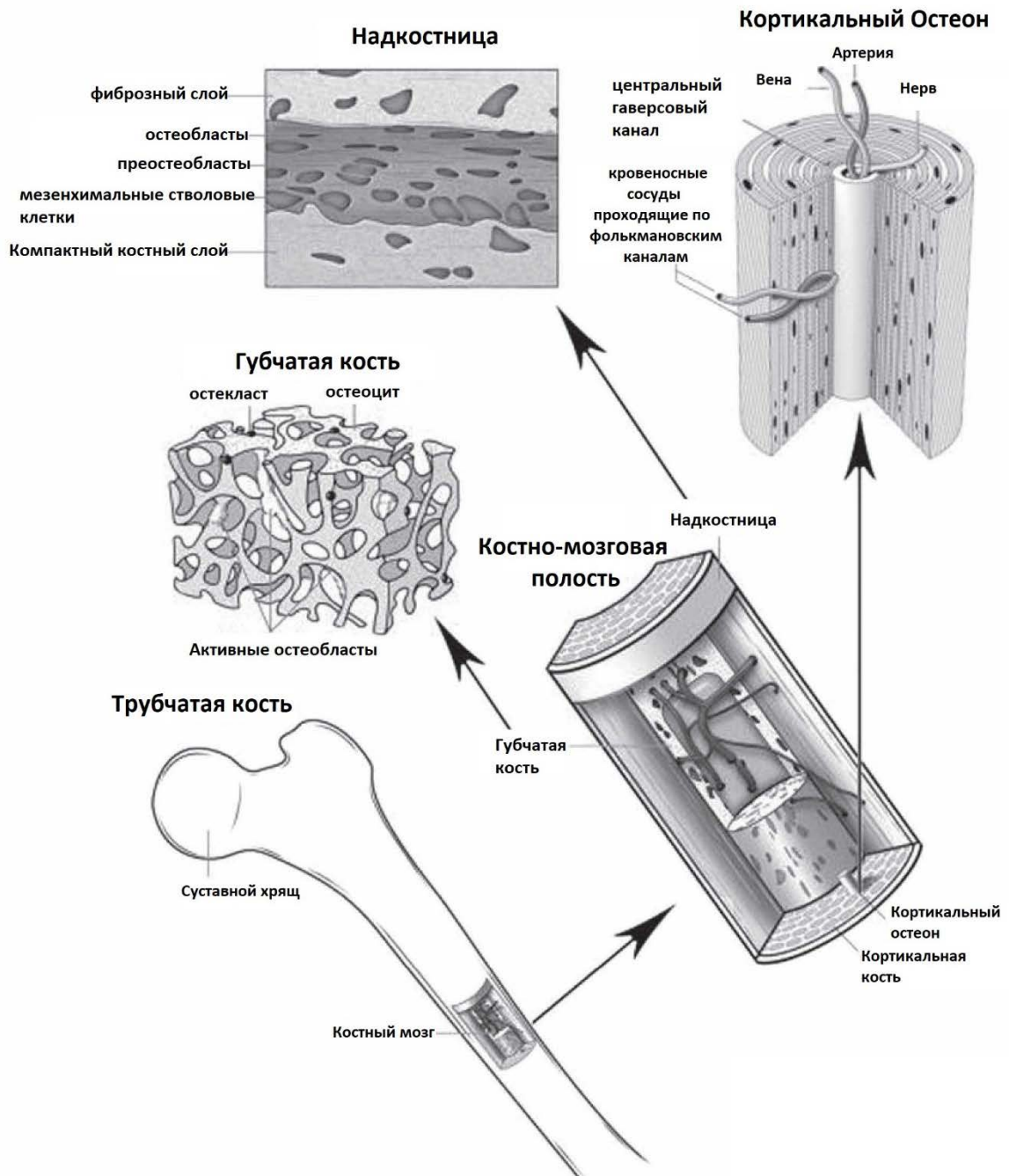


Рисунок 1.1 – Уровни организации костной ткани [30].

Кортикальная кость очень плотная и состоит из иерархических структур, каждая из которых имеет разную шкалу размеров [30], (таблица 1.1). Остеоны придают кортикальной кости прочность и включают центральный гаверсовый

канал, который состоит из кровеносных сосудов, соединенных с сосудами на поверхности кости через перфорирующие каналы (рисунок 1.1.). Основная функция кортикальной кости - обеспечение сопротивления скручиванию и изгибу, а также прочности на сжатие.

Напротив, губчатая кость очень пористая и состоит из взаимосвязанной сети трабекул, которые обычно заполнены костным мозгом. Ее иерархическая структура разнообразна и составлена твердым костным макроматериалом (> 3 мм), трабекулами (75-200 мкм), ламеллами (1-20 мкм) и коллаген-минеральным композитом (60-600 нм) [28]. Пористые трабекулы обеспечивают большую площадь поверхности, которая обеспечивает диффузию питательных веществ и воздействие циркулирующих факторов роста. Это позволяет губчатой костной ткани быть метаболически активной и подвергаться ремоделированию (резорбции) активнее, чем кортикальная костная ткань [28, 30, 31].

В отличие от обычных пластин цилиндрической формы в кортикальной кости, губчатые костные пластинки состоят из неправильной полукруглой формы, что позволяет испытывать упругую деформацию и поглощению нагрузок.

Помимо этого, кость выполняет роль ткани, которая является носителем таких клеток, как остеобласты, остеокласты и остеоциты [37].

Остеобласты – это клетки с одним ядром, которые синтезируют кость. Однако в процессе костеобразования остеобласты функционируют группами связанных клеток. Отдельные клетки не могут образовывать кость. Группа организованных остеобластов вместе с костью, образованной единицей клеток, обычно называется остеоном. При росте костной ткани вблизи наблюдается очень много остеобластов. [7]. После заполнения костных дефектов остеобласты превращаются в покоящиеся остеоциты [7, 10, 14].

Остеоциты – сплюснутая форма костной клетки с дендритными отростками, наиболее часто встречающаяся в зрелой костной ткани и способная жить столько же, сколько и сам организм. Они происходят из клеток-остеопрогениторов, некоторые из которых дифференцируются в активные остеобласты (которые в дальнейшем могут дифференцироваться в остеоциты) [26].

Таблица 1.1. Структурно-механические свойства кортикальной и губчатой кости.

Тип кости - нагрузка	Пористость, %	Плотность, г/см ³	Модуль Юнга, ГПа	Прочность при растяжении, МПа	Прочность на сжатие, МПа	Предел прочности на сдвиг при кручении, МПа
Кортикальная продольная	5-10 [28, 30-32]	1,99-2,01 [32]	17-20 [33]	79-151 [33]	131-224 [33]	65±9 [34]
Кортикальная поперечная			6-13 [33]	51-56 [33]	106-133 [33]	
Губчатая продольная	75-90 [28, 30-32]	0,05-1,0 [32]	20 [35]	1,6-2,42 [31]	2-5 [33]	6,35±2 [36]
Губчатая поперечная			15-20 [35]		1,5-9,3 [34]	

Кроме вышеназванных клеток, в костной ткани находятся также *остеокласты* – тип костной клетки, разрушающей костную ткань. Эта функция имеет решающее значение для ремонта, резорбции и ремоделирования костей скелета позвоночника. Остеокласт разбирает и переваривает смесь гидратированного белка и минералов на молекулярном уровне, выделяя кислоту и коллагеназу, процесс, известный как резорбция кости. Этот процесс также помогает регулировать уровень кальция в крови.

В биологическом цикле в зависимости от условий возможно образование нескольких фаз фосфатов кальция. Одним из важных показателей является pH прикостных жидкостей, при пониженных его значениях происходит подкисление среды, что приводит к образованию минералов типа дикальцийфосфат гидрата ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), октакальцийфосфата ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), образование таких минералов сопровождается дефектообразованием на микроуровне, что в долгосрочной перспективе может приводить к изменению метаболизма, что в свою очередь приводит в дальнейшем к остеопорозу.

1.3. Фосфаты кальция. Классификация, получение, свойства, применение.

Использование различных материалов на основе фосфатов кальция (ФК) в различных применениях в восстановительной медицине и ортопедии осуществляется уже более 100 лет, однако создание селективных комбинаций кальциевых фосфатов, как по морфологии, так и по приживаемости и дальнейшей резорбции и варьированию их физико-химических, биохимических, механических характеристик, является актуальной проблемой по сей день. В настоящее время материалы на основе ФК, в числе которых особняком стоит гидроксиапатит (ГАП), рекомендованы к различным применениям в медицине [1, 7, 8, 11, 14, 17, 38, 41]: биосовместимая керамика для замены поврежденных участков костной ткани и исправления дефектов кости [5, 13, 16, 38], адресная доставка лекарств [42-47], биологически активные покрытия на металлические костные имплантаты [5, 11-13, 48, 49], кальций-фосфатные цементы [29, 44-46, 50, 51], остеоиндуктивные

матриксy для челюстно-лицевой хирургии [47] и др. Предложено условно разделять все ФК на две категории [5, 7, 54]:

I низкотемпературные ФК – синтезированные при относительно невысоких температурах, не подвергнутые термической обработке.

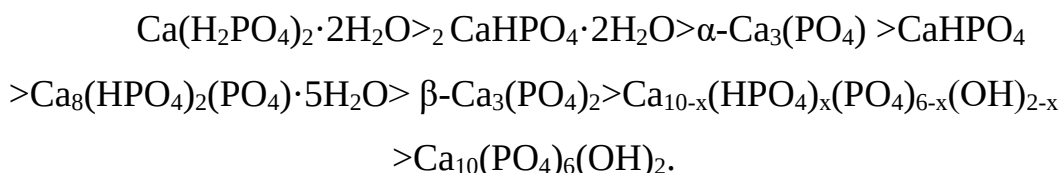
Осаждением из водных растворов при нормальном давлении можно выделить пять фосфатов кальция, имеющих различные рентгенограммы [5, 7, 17, 29, 41]. К ним относятся:

- 1) дигидрофосфат кальция $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$;
- 2) моногидрат дигидрофосфата кальция $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$;
- 3) гидрофосфат кальция (дикальций фосфат) CaHPO_4 ;
- 4) дигидрат гидрофосфата кальция $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;
- 5) кристаллический осадок переменного состава, имеющий рентгенограмму гидроксиапатита, состав которого обычно выражают формулой $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$,

II высокотемпературные ФК – окристаллизованные ФК, подвергнутые термической обработки [29]. Традиционные ФК, получаемые в ходе твердофазного синтеза и применяемые в медицине, в основном представлены следующим рядом: α -, β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (α -, β -ТКФ), $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ и композиты типа β -ТКФ-ГАП [29].

Диаграммы фазового равновесия в системах $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ и $\text{CaO-H}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ (при 25, 40, 50, 70, 75 и 100 °C) описаны в работе Ван-Везера [53].

Важно понимание таких свойств фосфатов кальция, как их растворимость в воде. Так как это позволяет предсказать их поведение *in vivo* при омывании физиологическими жидкостями организма. Величины растворимости в моделированных физиологических растворах помогает предсказать поведение материала и его способность к резорбции (растворению в живом организме). Например, растворимость гидроксиапатита существенно меньше натуральной кости, в следствие этого, его резорбция с дальнейшей деградацией идет крайне медленно в отличии от быстро растворимых форм таких, как дикальциевый фосфат и монокальциевый фосфат. Зная изотермы растворимости [55], можно представить ряд фосфатов кальция по скорости деградации *in vivo* следующим образом:



Все способы получения фосфатов кальция условно можно разделить на следующие группы: твердофазный, жидкофазный и гидротермальный, а также их разновидности с различными вариативными изменениями условий синтеза.

В таблице 1.2 приведены фосфаты кальция и показана их растворимость в зависимости от состава и мольного соотношения Ca/P и основные реакции получения [46, 56-61].

С целью создания биосовместимых кальций-фосфатных материалов с оптимальной биорезорбируемостью, целесообразно рассмотреть гидроксиапатит, трикальцийфосфат и гидрофосфат кальция как по отдельности, так и в смеси.

Гидроксиапатит – преобладающий компонент костной ткани, проявляющий свойства уникальной биологической совместимости и повышенной активности к остеointеграции.

Известно, что растворимость синтетического ГАП является слишком низкой для использования его в чистом виде в качестве имплантируемого материала [5, 7, 60], в связи с чем требуются дополнительные манипуляции, повышающие общую растворимость (биорезорбируемость) материалов на его основе. С этой целью должен быть осуществлен переход к фосфатам кальция с меньшим, чем у ГАП, отношением Ca/P. Так, переход от ГАП с Ca/P = 1.67 к трикальциевому фосфату (ТКФ) $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ с отношением Ca/P = 1.5 приводит к увеличению растворимости почти на порядок (таблица 1.2). Разрабатываются композиционные структуры на основе ГАП и $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , других ФК, имеющих повышенную, относительно ГАП, растворимость в жидкостях организма [56].

Кость представлена в основном мало растворимыми формами кальциевых фосфатов, в то время как для репаративной регенерации кости и замещении дефектов кости используются в основном дикальциевый фосфат, монокальциевый фосфат и в последнее время октакальциевый фосфат [5, 13, 26, 43, 95-97].

Таблица 1.2 – Показатели молярных соотношений Ca/P, химические формулы, морфология, основные реакции получения ортофосфатов кальция и их растворимость при 25 °С и 37 °С

Фосфат кальция (формула, название)	Соотношение Ca/P	Интервал стабильности pH (25 °С)	Основные реакции получения	Литература
1	2	3	4	5
Монокальциевый фосфат $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,50	< 1 ^a	$2\text{CaHPO}_4 + \text{P}_2\text{O}_5 + 3\text{H}_2\text{O} = 2\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ $2\text{CaHPO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_{4(\text{конц.})} \rightarrow \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \downarrow + 4\text{CaSO}_4 \downarrow$ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 4\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow 3\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \downarrow$	[64, 65]
Монокальциевый фосфат моногидрат $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,50	0 – 2	$\text{Ca}^{2+} + 2\text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	[64, 66-68]
Дикальциевый фосфат дигидрат $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00	2 – 6	$\text{CaCl}_2 + \text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{NaCl}$ $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	[61, 67]
Дикальциевый фосфат CaHPO_4	1,00	a	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaHPO}_4 + 2\text{H}^+ + \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2(\text{насыщ.}) + \text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow \text{CaHPO}_4 \downarrow + 2\text{NaH}_2\text{PO}_4$	[69]
Октакальциевый фосфат $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	5,5 – 7	$8\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{CH}_3\text{COONa} \rightarrow \text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + 2\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2\text{CH}_3\text{COOH}$ $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \downarrow + \text{Ca}(\text{OH})_2$	[8, 15, 70-74]
Аморфный фосфат кальция $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot z\text{H}_2\text{O}$	1,20 – 2,20	> 5	$x\text{Ca}^{2+} + y\text{HPO}_4^{2-} + y\text{OH}^- + (n-y)\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O} \downarrow$	[51, 75]
Гидрок시아патит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	9,5 – 12	$5\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + 3(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 + 4\text{NH}_4\text{NO}_3 \rightarrow \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH} + 10\text{NH}_4\text{NO}_3 + 3\text{H}_2\text{O}$ $10\text{Ca}(\text{OH})_2 + 6(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 12\text{NH}_3 + 18\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O} + \text{CaHPO}_4 \rightarrow \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	[29, 41, 53, 76]
Нестехиометрический осажденный гидрок시아патит (кальций дефицитный) $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	1,5 – 1,67	6,5 – 9,5	$3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)\text{OH} + (3n-1)\text{H}_2\text{O}$ $3\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{HPO}_4)\text{OH}$	[29, 77]
α -Трикальциевый фосфат $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50	б	$T = 1180\text{-}1400\text{ }^\circ\text{C (твердофазн.) } \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \rightarrow \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ $2\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + 3\text{CaCO}_3 \rightarrow \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + 3\text{CO}_2 \uparrow + 3\text{H}_2\text{O} + 2\text{NH}_3 \uparrow$ $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 + \text{CaCO}_3 \rightarrow \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CO}_2 \uparrow$	[51, 78, 79]

Продолжение таблицы 1.3.

1	2	3	4	5
β -Трикальциевый фосфат β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50	б	$T < 1150^\circ\text{C}$ (твердофазн.) $\text{CaCO}_3 + \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \rightarrow \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CO}_2\uparrow$ $T \sim 800^\circ\text{C}$ $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH} \rightarrow \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O}$	[77, 80-84]
Тетракальциевый фосфат $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	2,00	б	$T > 1300^\circ\text{C}$ (твердофазн.) $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 + 2\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9 + \text{CO}_2\uparrow$ $2\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{CaCO}_3 \rightarrow \text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O} + 2\text{CO}_2 + 5\text{H}_2\text{O}$	[85-88]
Оксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	1,67	б	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x + x\text{H}_2\text{O}$ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O} + (1-x)\text{H}_2\text{O}$	[89, 90]
Фторапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1,67	б	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH} + x\text{F}^- \rightarrow \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_{1-x}\text{F}_x + x\text{OH}^-$	[91]
α -Пирофосфат кальция α - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1	б	$2\text{CaHPO}_4 \xrightarrow{>100^\circ\text{C}} \text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}$	[92-94]
β -Пирофосфат кальция β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1	б	$\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \rightarrow (1140^\circ\text{C}) \beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	[51, 93, 94]

^aустойчив при $T > 100^\circ\text{C}$, ^бтвердофазный синтез (реакция не проходит в водной среде)

Данные материалы хороши только в ситуации замещения микродефектов, линейный размер которых не превышает 5х5х5 мм [98]. При более обширных дефектах необходимо учитывать факторы вставания, резорбции, частичной механической нагрузки на имплантат и прочие факторы роста кости. С этой точки зрения привлекательными выглядят гидроксиапатит и трикальциевый фосфат.

Однако в чистом виде такие кальциевые фосфаты на практике не применяются. Например, компания Cambioceramics (Недерланды) использует кальций фосфатные блоки с содержанием мало растворимых форм кальциевых фосфатов (трикальциевый фосфат и гидроксиапатит) с содержанием до 60% масс. Композиции на основе комбинаций мало и быстро растворимых форм кальциевых фосфатов успешно показывают себя при регенерации малых дефектов, челюстно-лицевой хирургии, а также в стоматологии. [98, 99]. Однако быстрорастворимые кальциевые фосфаты плохо показывают себя при регенерации обширных дефектов и крупных переломов [38, 42, 58, 96, 100]

Описанные ранее кальциевые фосфаты (таблица 1.2) имеют различное биологическое действие с точки зрения *in vitro* и *in vivo*. Использование синтетического фосфата кальция в качестве заменителя кости требует знания о влиянии на соседние клетки.

На молекулярном уровне заживление перелома контролируется множеством факторов роста, цитокинов и гормонов [101]. Эти биохимические агенты оказывают плеiotропное действие на различные клеточные популяции, включая воспалительные клетки, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и костно-специфические клетки (остеобласты, остециты и остеокласты). Этот регулируемый процесс паракринной, аутокринной и юстакринной передачи сигналов очевиден из первого события после образования травмы – гематомы с активацией тромбоцитов [102, 103].

Сложные сигнальные события запускают высвобождение факторов роста, инициируя воспалительный процесс, и активируются моноциты-макрофаги, лимфоциты, фибробласты и эндотелиальные клетки, чтобы очистить поврежденную ткань. Следовательно, продуцируется каскад передачи сигналов

цитокинов (IL-1, TNF- α , IL-6) и фактора роста (TGF- β , PDGF, ILG и VEGF), ведущий к стадии грануляции, на которой клетки-остеопрогениторы рекрутируются через поколение хемотаксических градиентов и начинают размножаться (митогенез). В результате секреции проангиогенного VEGF остеопрогениторами и скавенджерными клетками начинают формироваться сосуды новой крови (ангиогенез), как показано экзогенным применением VEGF, что значительно ускоряет заживление переломов [102, 103] (Рисунок 1.2). Важно отметить, что ряд физиологических и патологических состояний изменяет экспрессию важных биохимических молекул и, в частности, активных форм кислорода (АФК), чтобы нарушить регуляцию заживления костей [104].

Реакция заживления на травму кости характеризуется тремя перекрывающимися биологическими процессами (реактивным, репаративным и ремоделирующим) через [26]:

- воспаление и образование гематом. В начальной фазе образование гематом и сужение сосудов затрудняет кровоток и увеличивает местное давление. Возникающая гипоксия в сочетании с механической стимуляцией способствует выработке внеклеточного матрикса с фибрином, необходимого для регенерации кости (4-7 дней);
- Мягкое образование костной мозоли с наступающим окостенением со стороны надкостницы (7-14 дней);
- Минерализация костной мозоли и последующее остеокластическое ремоделирование минерализованной костной ткани. (более 28 дней).

С этих точек зрения рационально рассматривать материалы, которые удовлетворяют принципам заживления организма и при этом оказывают минимальное негативное воздействие на соседние клетки. Важным фактором является продуцирование на поверхности материала клеток организма, таких как остеобласты, преостеобласты, остеобластоподобные клетки, мезенхимальные стволовые клетки.

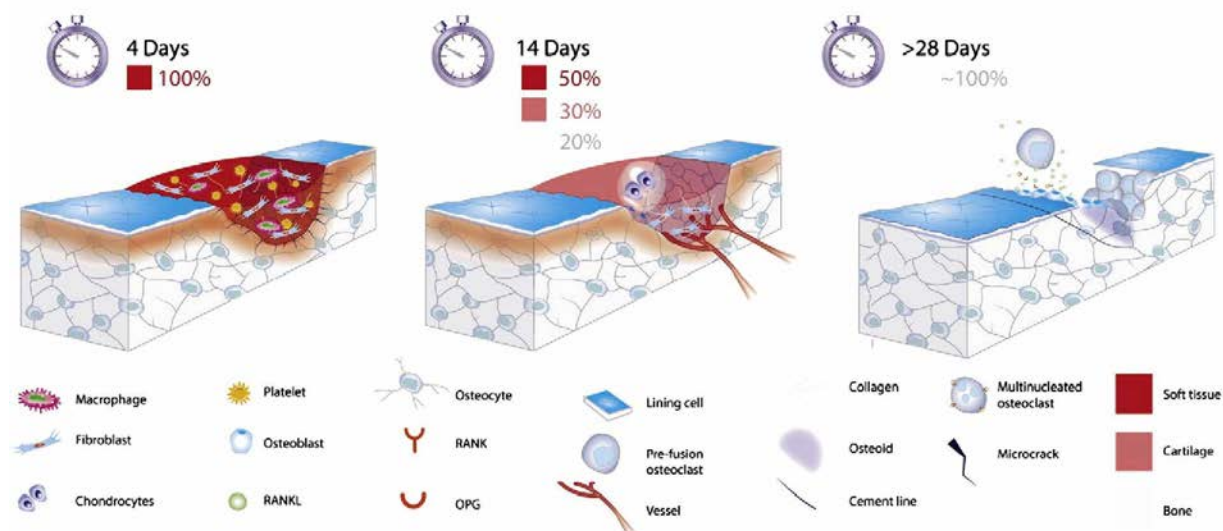


Рисунок 1.2. Временная прогрессия заживления перелома [26].

Любой перелом является воспалением, где происходит трансформация тканей, в следствие чего клетки испытывают «стресс». Клетки иммунитета в период заживления (до 14 дней) находятся в возбужденном состоянии [10, 71, 99, 105]. Важным фактором является степень межфрагментарного движения в прогрессировании заживления перелома, так как в случае чрезмерной предрасположенности к псевдоартрозу несоответствующая эндохондриальная оссификация находится в умеренной степени и внутримембранозная оссификация, когда она минимальна / отсутствует, происходит образование избыточного количества соединительной ткани, которая может легко трансформироваться (при наличии такой возможности) в клетки опухоли [10, 71, 99].

Классическими маркерами удовлетворительной приживаемости *in vivo* являются клетки:

- MC3T3-E1 (клеточная линия предшественников остеобластов)
- ROS 17/2.8 (клеточная линия остеобластной остеосаркомы)
- мезенхемальных стволовых клетках (МСК).

В таблице 1.3 приведены сводные описания влияние на специфические клетки в условиях *in vitro* в MC3T3-E1, ROS 17/2.8 и мезенхемальных стволовых клетках (МСК).

Как видно из таблицы удовлетворительными показателями обладают монокальциевый фосфат, дикальциевый фосфат, трикальциевый фосфат, гидроксиапатит и октакальциевый фосфат.

Таблица 1.3. Описание влияния кальциевых фосфатов in vitro.

Фосфат кальция (формула, название)	МСЗТЗ-Е1	ROS 17/2.8	МСК
Монокальциевый фосфат $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ [99, 106]	+++	0	+++
Дикальциевый фосфат CaHPO_4 [107-109]	++	-	+++
Октакальциевый фосфат $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [110-112]	+	-	+
Аморфный фосфат кальция $\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot z\text{H}_2\text{O}$ [113]	+++	0	+++
Гидроксиапатит $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ [99, 114, 115]	+++	-	++
Нестехиометрический осажденный гидроксиапатит (кальций дефицитный) $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ [115, 116]	++	0	0
β -Трикальциевый фосфат $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [108, 115, 117-120]	+++	+	+++
α -Трикальциевый фосфат $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [115, 119, 121]	+++	+	+++
Тетракальциевый фосфат $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ [121]	++	0	0
α -Пирофосфат кальция $\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ [122]	+	0	0

«+++» - продуцирование новых клеток, клетки обнаруживаются на поверхности спустя 3, 7 и 14 дней, поддерживается их жизнедеятельность

«++» - продуцирование клеток не происходит, клетки обнаруживаются на поверхности спустя 3, 7 и 14 дней.

«+» - клетки в целом жизнеспособны и обнаруживаются спустя 3, 7 и 14 дней.

«0» - представленных данных недостаточно для описания поведения клеток.

«<» - клеточный рост и пролиферация затруднена

«--» - обнаруживаются единичные клетки спустя 14 дней.

«---» - не способны продуцироваться на поверхности материала.

1.4. Структура гидроксиапатита.

Гидроксиапатит имеет гексагональную решетку с кристаллической структурой, принадлежащей к пространственной группе $\text{P6}_3/\text{m}$ [76].

Общая формула ГАП может быть представлена $[\text{Ca}_4]^{(1)}[\text{Ca}_6]^{(2)}[(\text{PO}_4)_6][\text{OH}]_2$, где $^{(1)}$ – позиция Ca(1) (4f), а $^{(2)}$ – позиция Ca(2) (6h) (рисунок 1.3). Впервые такая структура была описана на фтор апатите ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) как одномерная туннельная

структура апатита: эти туннели (гексагональные каналы) были образованы ионами кальция и содержали ионы фтора [123].

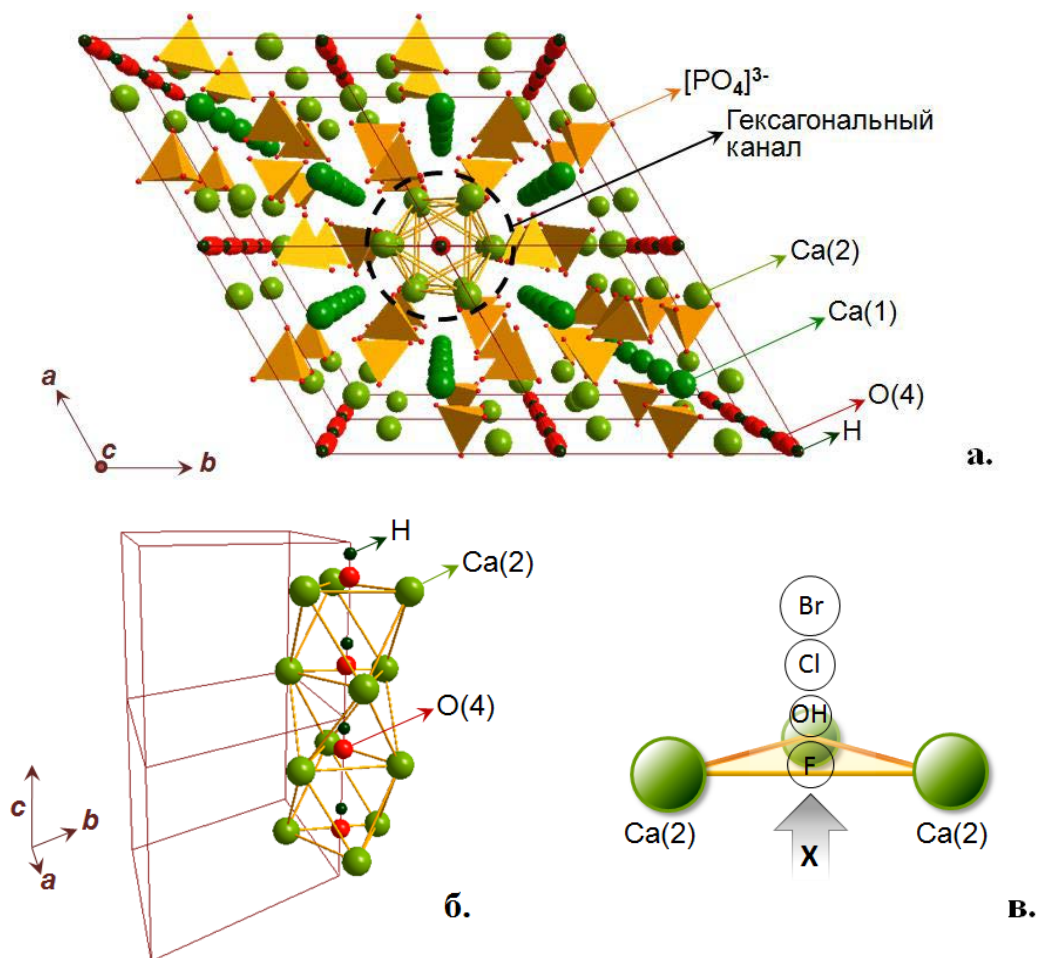


Рисунок 1.3. а. - Кристаллическая структура апатита (пространственная группа $P6_3/m$) общего состава $[Ca_4]^{(1)}[Ca_6]^{(2)}[(PO_4)_6][X]_2$, б. - схема гексагонального канала, сформированного катионами Ca в позиции Ca(2); в. - зависимость расположения внутриканального аниона X относительно плоскости треугольника $Ca(2)_3$ от его природы [128].

Параметры элементарной ячейки кальциевого гидроксиапатита состава $Ca_5(PO_4)_6(OH)_2$ были впервые установлены методом рентгеноструктурного анализа в 1958 году [63]: $a = 9.432 \text{ \AA}$, $c = 6.881 \text{ \AA}$, $V = 530.1 \text{ \AA}^3$. Описанный гидроксиапатит был синтезирован гидротермальным методом из $CaHPO_4$.

С помощью порошковой синхротронной рентгеновской дифракции и нейтронной дифракции авторами [63] были уточнены параметры элементарной ячейки: $a = 9.4302(5) \text{ \AA}$, $c = 6.8911(2) \text{ \AA}$, $V = 530.7 \text{ \AA}^3$. Кальциевый гидроксиапатит

в данной работе был синтезирован методом осаждения из растворов $\text{Ca}(\text{OH})_2$ и H_3PO_4 и последующим прокаливанием при 900°C . Ион кислорода внутриканальной OH^- группы занимает позицию (0, 0, 0.298) [63].

Ориентация внутриканальных анионов OH^- приводит к появлению двух модификаций кальциевого гидроксиапатита: моноклинную $P2_1/b$ и гексагональную $P6_3/m$. Рядом авторов было подтверждено, что в случае гексагональной модификации OH^- группы расположены беспорядочно относительно оси вертикального отражения m [55, 125-127]. В случае моноклинной модификации внутриканальные OH^- группы ориентируются вдоль оси сонаправлено внутри одного гексагонального канала (в соседних гексагональных каналах OH^- группы направлены в противоположную сторону), что приводит к замещению плоскости m плоскостью скольжения b .

Моноклинная модификация стабильна в условиях термообработки при относительно низких температурах (менее $211,5^\circ\text{C}$), в то время как гексагональная структура стабильна при более высоких температурах. Переход между моноклинной и гексагональной модификациями наблюдается при температуре $211,5^\circ\text{C}$ [125].

Гексагональная модификация кальциевого гидроксиапатита стабильна в достаточно широком диапазоне температур и, что очень важно, в широком диапазоне молярного отношения Ca/P [127, 129]. Диаграмма построена на исследованиях образцов полученных жидкофазным методом и прокаленным при различных температурах.

При рассмотрении фазовых диаграмм системы $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ можно наблюдать отсутствие фазы апатита при термообработке в обезвоженной атмосфере [129]. В то же время, фазовая диаграмма той же системы $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ в атмосфере с давлением паров воды 65,5 кПа содержит фазу гидроксиапатита [130].

При постепенном нагревании кальциевого гидроксиапатита, его разложение начинается при 1360°C . Однако, даже при температурах, превышающих это значение, кальциевый гидроксиапатит все еще остается основной фазой. Полное

разложение кальциевого гидроксиапатита наблюдается при температурах выше 1400 °С.

Наличие гексагональных каналов апатита обуславливает высокую эластичность структуры апатита, которая сохраняется даже при достаточно радикальных искажениях, возникающих в ходе катионного и анионного замещения, образования вакансий и при появлении ионов внедрения.

1.5 Полимерные композиты, содержащие фосфаты кальция

Важным ориентиром при создании биоматериалов для имплантации является воспроизведение основных особенностей натуральной костной ткани, таких как химический состав, структура, морфология. На данный момент накоплен опыт использования полимерных биосовместимых материалов, как в чистом виде, так и в сочетании с керамическими наполнителями.

Условно можно разделить используемые полимеры на две группы:

- Биорезорбируемые, то есть с течением времени они растворяются и замещаются на кость носителя (PLA, PGA, PEG, PCL и др.);
- Условно биоинертные. Такие материалы выполняют четкую механическую функцию. Они остаются в теле организма на протяжении почти всей жизни человека. (PE, PP, PEEK, PEKK, силиконы и др.).

Чисто полимерные имплантаты практически не используются ввиду их малой приживаемости и склонности погружаться в фиброзную капсулу, которая мешает как деградации, так и остеоинтеграции [105, 133-135]. Даже используемые в последнее время полимерные штифты из чистого полилактида для закрепления обширных переломов модифицируют кальциевыми фосфатами для увеличения приживаемости и резорбции [105, 133, 134, 136, 137].

Скорость нарастания новой костной ткани на поверхности кальциевых фосфатов выше, чем на поверхности полимеров [1, 22, 26, 134, 138]. Однако не все кальциевые фосфаты одинаково хорошо наращивают костный матрикс. Монокальциевый фосфат и дикальциевый фосфат растворяются в биологических жидкостях раньше, чем новая кость успевает образоваться [8, 64, 67, 78, 137]. В

результате при применении таких кальциевых фосфатов полимерная матрица из-за вымывания биокерамического наполнителя будет разупрочняться, при этом новая кость не будет успевать нарастать, будет возникать микроподвижность, что приведет к воспалению места имплантации и извлечению имплантата из тела пациента. Такие кальциевые фосфаты как трикальциевый фосфат (ТКФ), гидроксиапатит (ГАП) и октакальциевый фосфат (ОКТ) существенно менее активно растворяются в теле организма при омывании биологическими жидкостями, чем высокорастворимые формы фосфатов кальция: дикальциевый фосфат и монокальциевый фосфат [56, 61, 69, 70, 135, 138-142].

Золотым стандартом принято считать ГАП, так как на нем пролиферация остеобластов происходит самым активным образом [114, 138]. Однако концепция применения только ГАП является устаревшей, так как в ходе исследования ученых обнаружено чем более состав полифазен, тем более благоприятно идет процесс приживаемости, врастания и резорбции имплантата [137, 138, 143-146].

Используемые коммерческие продукты компаний CAM Bioceramics B.V. (Netherlands), Berkeley Advanced Biomaterials (USA), Implant Direct Sybron International LLC (USA) представляют собой бифазные и мультифазные биокерамические блоки для наращивания костных дефектов при избыточной резорбции зубного канала или недостаточной толщине кости при имплантации штифтов. Эти полифазные блоки представлены преимущественно смесью ТКФ, ГАП и малым содержанием дикальциевых фосфатов.

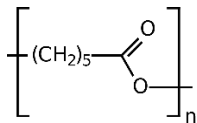
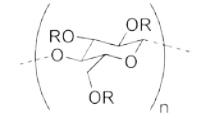
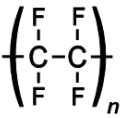
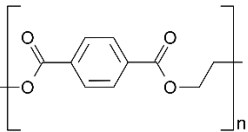
Для применения в медицинском материаловедении в последнее время используются следующие материалы: полилактид (PLA) и полигликолид (PGA), их сополимеры (PLGA), различные полиэтилены (PE, HDPE), полиметилметакрилат (PMMA), полиуретаны, политетрафторэтилен (PTFE), полисилоксаны и др. Основные представители полимеров, их применение в медицине, преимущества и недостатки приведены в таблице 1.4.

В настоящее время накоплен большой опыт использования различных композиций биополимер-кальциевые фосфаты.

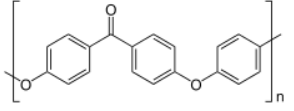
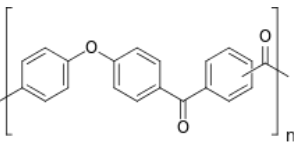
Таблица 1.4 – Синтетические полимеры медицинского назначения, их преимущества и недостатки

Название полимера	Структурное звено	Применение в медицине	Преимущества	Недостатки	Биодеградиремость	Литература
1	2	3	4	5	6	7
Полиэтилен (PE)	$\left[\text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right]_n$	Эндопротезирование: вкладыши протезов тазобедренных суставов, коленные протезы и имплантаты для позвоночника, имплантаты для пластики	Биологическая инертность, высокие прочность и износостойкость, низкие значения ползучести под нагрузкой и коэффициента трения	Быстрое старение, отсутствие эластичности, содержит остаточные свободные радикалы, приводящие к окислительной деградации изделия, низкий ПТР (показатель текучести расплава) и перерабатывается только литьём	–	[170-173]
Полиметил-метакрилат (PMMA)	$\left[\text{CH}_2 - \underset{\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} - \text{CH}_3 \end{array}}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}} \right]_n$	Офтальмология: жёсткие газонепроницаемые контактные линзы и жёсткие интраокулярные линзы; хирургия: утрамбовочный материал при замене суставов	Невысокая стоимость, удобство в эксплуатации, эстетика, низкая плотность, высокие механические показатели	Примеси в составе полимера, появляющиеся в результате его синтеза. Токсичность мономеров при деградации (могут индуцировать рак печени). Низкие показатели ударной вязкости, склонен к деформации	–	[22, 174, 175]
Полиамид (PA)	$\left[\text{R} - \text{NH} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{R}' \right]_n$	Шовная, пластическая, микро- и общая хирургия. Изготовление протезов, хирургических нитей, искусственных кровеносных сосудов	Эластичность и прочность, устойчивость к истиранию; мономер обладает высокими манипуляционными свойствами, гибкостью, легкой удаляемостью	Подвергается усадке, склонность к деформации, гигроскопичность, быстрая потеря механической прочности <i>in vivo</i>	2-5 лет	[176, 177]
Поливиниловый спирт (PVS)	$\left[\underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \text{CH}_2 \right]_n$	Имплантаты кератопротезы, полимерная составляющая костных имплантатов	Высокая степень гидрофильности и полупроницаемость для кислорода и питательных веществ, низкая стоимость	Высокая скорость биодеградации – гидрогели; отсутствие биодеградации у криогелей. Низкие механические показатели	6-8 месяцев	[178-180]

1	2	3	4	5	6	7
Полилактид (PLA)		Хирургические нити, штифты, пористые биоразлагаемые подложки и матрицы для реконструкции поврежденных тканей и органов, крепежные изделия (штифты, винты и другие), оболочки для систем доставки лекарств пролонгированного действия	Биодеградируемость, отсутствие побочных продуктов синтеза и распада в организме, продукты биодеструкции выводятся без остатка из организма	Технологические сложности в производстве, плохая смачиваемость, при высокой молекулярной массе (которая повышает прочность) снижается скорость деградация.	5-10 лет	[181, 182]
Поли-гликолид (PGA)			Высокая прочность, удобство в эксплуатации (не слипаются, легко стерилизуются), продукты биодеструкции выводятся без остатка из организма	Высокая жесткость, малая эластичность, высокая деградация. При большом содержании может оказывать местное воспалительное действие.	5-10 лет	[183, 184]
Полилактид-со-гликолид (PLGA)			Возможность регулирования скоростью биорезорбции и эластичности за счет изменения соотношения мономерных звеньев; хороший стимулятор роста и регенерации тканей	Зачастую сроки биодеградации и полной потери прочности материала в организме недостаточны для заживления большинства медленно заживающих ран.	> 5 лет	[185-188]
Полиэтиленгликоль (PEG)		Композиционные материалы с 3 и более компонентами, мази, кремы, физиологические растворы, биомембраны, оболочки для систем доставки лекарств	Растворимость в воде, возможность регулировать резорбцию молекулярной массой. Продуцирует создание кровяных телец.	При увеличении длины молекулярной цепи растворимость в воде падает. Обладает сильным осмотическим эффектом, обезвоживая клетки.	6-10 месяцев	[189, 190]
Поликапролактан (PCL)		Шовный материал, само рассасывающиеся имплантаты пролонгированного действия (филлеры), материал для получения волокнистых каркасов тканеинженерных конструкций.	Разрешен FDA для биомедицинского применения. Полностью деградируем в живых организмах до капроновой кислоты, воды и углекислого газа.	Жесткий и хрупкий полимер, требует пластификации или использования с другими полимерами	1-3 года	[191-193]

1	2	3	4	5	6	7
Поликапролактam (PCL)		Шовный материал, само рассасывающиеся имплантаты пролонгированного действия (филлеры), материал для получения волокнистых каркасов тканеинженерных конструкций.	Разрешен FDA для биомедицинского применения. Полностью деградируем в живых организмах до капроновой кислоты, воды и углекислого газа.	Жесткий и хрупкий полимер, требует пластификации или использования с другими полимерами	1-3 года	[191-193]
Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ)	 R = H or CH ₂ CO ₂ H	Наполнитель для силиконовых имплантатов	При повреждении оболочки силиконового имплантата не оказывает токсического, воспалительного или мутагенного действия. Схож органолептически с жировой тканью.	Быстро деградируемый полимер, способен к набуханию, не используется в биокompозитах.	1-2 месяца	[194-196]
Политетрафторэтилен		Имплантаты для сердечно-сосудистой системы, общей хирургии, стоматологии, офтальмологии, носоперегородки, чашки для суставной пары трения	Разрешен FDA, абсолютно инертен для организма, фрикционный пластик, высокотемпературный.	Не возможно использование в композитах, жесткий пластик не поддающийся термообработке.	-	[197-199]
Полиэтилентерефталат (PET)		Материал для получения волокнистых каркасов тканеинженерных конструкций. Полимерный матрикс для эндопротезов.	Биотолерантный материал, имеет высокую прочность, низкий коэффициент трения и ползучести, не стареет.	Отсутствие эластичности, низкий ПТР (показатель текучести расплава) и перерабатывается только литьём	-	[200-202]

Продолжение таблицы 1.5.

1	2	3	4	5	6	7
Полиэфирэфиркетон (РЕЕК)		Межпозвоноквые диски, материал для сшивания нервов, чашки в паре трения коленных и тазобедренных суставов. В пластической хирургии лица и черепа. Имплантаты используемые при лечение черепно-мозговых травм и дентальной хирургии.	Высококонструкционный пластик, имеющий самую высокую температуру плавления. Обладает высокой устойчивостью к биоразложению. Устойчив во всех органических растворителях.	Трудно поддающиеся обработке, литью и любым методам формования. Практически невозможно получить композиты на их основе, так как любой из методов компактирования неизбежно будет уменьшать молекулярную массу полимера, что снижает конструктивные свойства.	-	[203-206]
Полиэфиркетон (РЕКК)					-	[207-209]

Использование полимерных композитов привлекательно не только ввиду синергии их химических и механических свойств, но и с точки зрения аддитивных технологий. Термопластичные биополимеры позволяют использовать в технологиях производства сложнопрофильных изделий [137, 139-141, 147, 148].

На данный момент методы производства имплантатов из биорезорбируемых материалов сложной формы сводятся к методам: чернильной печати (3D-Plotting, 3D-P), селективного лазерного спекания (Selective Laser Sintering, SLS), лазерной биопечати (Laser-assisted bioprinting, LAB), лазерной стереолитографии (Stereolithography, SLA), послойного нанесения расплава (Fused deposition modeling, FDM), роботизированного нанесения расплава композита или композита, отверждаемого при специальных условиях (Robotic assisted deposition / Robocasting) [149-169].

В таблице 1.5 представлены материалы, используемые в каждом методе и сравнение их между собой. Такие методы пригодны не только для создания индивидуальных имплантатов сложной формы, но и прочных пористых скаффолдов. Известно, что создание пористой структуры имплантата или скаффолдов позитивно сказывается на приживаемости. Управление пористостью и формой открывает новые перспективы для уже изученных материалов [140, 141, 144, 148, 210-212].

Помимо материалов, приведенных в таблице 1.5, используются и другие материалы, с помощью которых можно производить 3D-печать (крахмал, желатин, хитозан, альгинат, полимер валериановой кислоты, сахараиды и т.п.) [147, 213-218]. Однако, помимо крайне высокой специфичности по отношению к резорбции, такие материалы еще и обладают крайне малой прочностью и не пригодны для создания объемных конструкций для замещения или восполнения костных дефектов. На данный момент в инженерии кости и костных дефектов зарекомендовали себя такие биорезорбируемые полимеры, как полилактид (PLA), полигликолид (PGA), поликапролактан (PCL), сополимер лактида и гликолида (PLGA), полиэтиленгликоль (PEG) и полигидроксибутираты [135, 139, 141, 188, 219-222].

Таблица 1.5. Методы прототипирования в аддитивных технологиях для изготовления костных скаффолдов.

Метод	Особенности процесса	Используемые материалы для инженерии костной ткани	Достоинства (+) и недостатки (-)	Источник
1	2	3	4	5
3D-P	• Экструзия пасты или вязкого материала (в виде раствора) на основе предварительно разработанной структуры • Послойное напыление с постоянной скоростью и определенным давлением • Печать каплями на отрыв	• PCL + ГАП • ГАП • Биоактивные стекла • Биостекла + Альгинат • Биостекла + альгинат + желатин • PLA + PEG + ГАП • Поли(гидроксиметилгликолидеко-ε-капролактон) (PHMGCL)	+: • Мягкие условия получения изделий позволяют использовать в составе композита некоторые лекарственные препараты и биомолекулы. -: • Для некоторых материалов требуется нагревание/ постобработка, что ограничивает включение биомолекул. • Малая прочность готовых изделий.	[149-154]
LAB	• Нанесение материала на прозрачный кварцевый диск (ленту) • Контроль наплавки по энергии лазерного импульса • Контроль разрешения по расстоянию между лентой и подложкой, размеру пятна и перемещению предметного столика	• ГАП + Остеобластоподобные клетки • наноГАП • наноГАП + белковый матрикс	+: • Печать при температуре окружающей среды • Подходит для органических, неорганических материалов и клеток • Количественно контролируемый -: • Нужны однородные ленты полимеры • Малая толщина печати • Малая механическая прочность	[155-158]

Продолжение таблицы 1.6.

1	2	3	4	5
SLS	• Нанесение слоя порошкового материала • Послойное добавление порошка • Спекание каждого слоя в соответствии с файлом CAD с использованием лазерного источника	• ГАП+ PHBV (поли (гидроксibuтират-со-гидроксивалерат)) • ГАП • Карбонат ГАП + PLA • ТКФ + PLA • ТКФ	+: • Нет необходимости в поддержках • Пост-обработка не требуется • Высокое разрешение -: • Строгий фракционный состав порошка • Сферическая форма частиц • Дорогое оборудование • Невозможно сделать полые изделия • Трудность печати первого слоя	[159-162]
SLA	• Погружение платформы в фотополимерную жидкость. • Воздействие сфокусированного света в соответствии с желаемым дизайном • Полимер затвердевает в фокусе, необлученный полимер остается жидким, • Послойное изготовление на платформе движением вниз	• Поли (пропилен фумарат) (PPF) / диэтилфумарат (DEF) + ГАП • Метилакрилат + ГАП • Метилакрилат + ТКФ • PLA+фотополимерная смола + ГАП	+: • Можно получить сложные внутренние структуры • Управление факторами роста, белками и формирование клеточного паттерна -: • Применимо только для фотополимеров • Малая прочность полученных композитов • Малая наполненность керамическими компонентами	[140, 144, 160, 162-164]
FDM + Robocasting	Послойное нанесение расплава полимера+керамики через сопло	• PP+ГАП • PLA+ГАП • PLA+ТКФ • PCL+ГАП • PCL+ТКФ • PET+ФК • PLA+PEG+ГАП • PLA+PGA+ГАП • PLA+PCL+ГАП	+: • Дешевизна и доступность метода • Экспресность метода • Управление пористостью и микроструктурой • Возможность использовать • Точный контроль размеров -: • Ограничение по материалам из-за необходимости расплавленной фазы • Разрешение принтеров не превышает 0,1 мм.	[135, 139, 163, 165-169, 219-221, 223-226]

Несмотря на привлекательность термопластичных биополимеров с точки зрения формирования объектов сложной формы [139, 188, 221], они обладают малой механической прочностью, что не позволяет изготавливать их пористыми. Имеются данные, что изделия, выполненные из биополимеров, приводят к неполной деградации даже через 5 лет, а полимерные штифты из полилактида (PLA) и полигликолида (PGA) вовсе не подвергаются полному рассасыванию и замещению на кость, что ведет к рискам переломов и воспалениям ввиду возникающих микротрещин [139, 188].

Из данных, полученных клиническим путем [134, 146, 220, 227-229], основными проблемами биodeградируемых полимеров являются: сложность управления скоростью деградации полимеров в естественных условиях, слабая адгезия биокерамического наполнителя к полимерной матрице, неудовлетворительная пролиферация клеток на полимерных поверхностях, цитотоксичность продуктов распада, образующихся при процессе деградации полимеров, а также низкие механические показатели, несравнимые с естественными показателями твердых тканей.

Другим недостатком биополимеров на основе карбоновых кислот является снижение pH биологических жидкостей, омывающих имплантат, что наряду с другими факторами способствует развитию асептического воспаления и образованию толстой капсулы из соединительной ткани между имплантатом и костью [219, 230-235]. Возникает микроподвижность имплантата, инфекционное воспаление и неизбежное его удаление [231].

Ослабление отрицательного влияния полимера может быть достигнуто путем сочетания в одном композите биополимера и кальций-фосфатной керамики [217, 219]. Такие композиты контролируемо замещаются костной тканью, с последующим зарастанием дефекта кости [234, 235]. Известны исследования по материалам с содержанием гидроксиапатита (ГАП) и полилактида (PLA) в отношении 5:95, 10:90, 15:85, 20:80, 30:70, 40:60, способные к растворению и врастанию в костную ткань человека-реципиента [134, 139, 217, 219-221, 226, 231, 234, 236-239]. Создание композитов на основе смеси ГАП и PLA можно выделить

в качестве отдельного направления [134, 217, 219, 234, 237-239] для решения задачи создания материала, максимально приближенного к натуральной кости по своим механическим характеристикам и обладающего долговременной стабильностью *in situ* при реальных физических нагрузках.

В контексте 3д-печати методом FDM эти композиты имеют следующие недостатки:

- Неравномерность распределения минеральной фазы в полимере;
- Деградация полимера при переработке и 3D-печати.

Второй пункт имеет особое значение, так как 3D-печать производится при температуре свыше 200 °С, когда в полимерах происходят процессы деградации с выделением мономеров. Такие мономеры зачастую представлены в виде карбонильных кислот, которые могут вступать в реакцию с минеральной частью композита, образуя токсичные продукты реакции. Деструкция полимеров во время печати приводит к различной скорости потока, и, следовательно, к низкой точности печати. По этой причине и в результате деструкции полимера снижается механическая прочность изделий.

Анализ приведенных результатов исследования приводит к следующим выводам.

Внутренние свойства трехмерных каркасов должны имитировать свойства натуральной костной ткани, чтобы давать инструкции окружающим клеткам, чтобы стимулировать их адгезию, миграцию, пролиферацию и дифференциацию. В этом смысле регулирование физико-механических свойств имплантатов для имитации свойств натурального костного материала при включении агентов с биоактивным компонентом для клеточной адгезии в пределах химии одного объемного каркаса представляет собой минимальное требование при разработке 3D-печатных биорезорбируемых имплантатов для регенерации кости.

Поиск эффективных материалов для медицинских имплантатов и создание композитов на основе кальциевых фосфатов и различных биополимеров требует особых подходов, так как исследования такого рода находятся на стыке химии, медицины и механики. Разработка способов улучшения механических,

химических, биологических и других важных свойств композитов на основе кальциевых фосфатов включает три основные задачи:

- 1) получение композитов на основе полимеров, которые способны связывать ФК и упрочнять результирующий материал;
- 2) поиск оптимального соотношения органического и неорганического компонентов;
- 3) изучение физико-химических взаимодействий между компонентами с целью управления функциональными свойствами материалов.

Решив эти задачи, можно существенно улучшить процесс регенерации кости в месте контакта с имплантатом. В натуральной кости гидроксиапатит как основной неорганический компонент костной ткани несет основную механическую нагрузку в организме, а эластичность и гибкость кости придает, как известно, биополимер – коллаген [38, 39].

Главной проблемой применения на практике чистого PLA является несостоятельность эндопротезов, вызывающая нарушения в обменных процессах костной ткани вокруг компонентов эндопротеза и ведущая к её разрушению с нарушением функции суставов прилегающих в воспаленному участку [217, 239]. Для избегания асептического расшатывания и образования осколков имплантируемого материала существует 2 пути:

- 1) повышение износостойкости биоматериала для уменьшения концентрации частиц износа;
- 2) повышение биосовместимости и биологической активности биоматериала с целью уменьшения негативных биологических реакций.

Поэтому важным шагом по улучшению механических характеристик современных минерал-полимерных композитов является поиск и разработка методов увеличения биосовместимости и биологической активности материала или образования устойчивых химических связей между поверхностью микрочастиц кальциевых фосфатов и полимерной матрицей. Для этого необходимо понимание влияния каждого из них на полимерную матрицу.

1.6. Постановка цели и задач исследования.

Из проведенного анализа состояния исследований следует, что создание биорезорбируемых имплантатов, обладающих биосовместимостью и биоактивностью, является наиболее перспективным направлением в разработке имплантатов для ортопедии и травматологии. Вместе с тем, остается целый ряд открытых вопросов, для решения которых недостаточно научной базы. Для обеспечения контролируемой биорезорбции необходима разработка керамического компонента композита на основе смеси фосфатов кальция, обладающих различной растворимостью в биологических жидкостях организма.

Отдельной проблемой является расширение номенклатуры имплантатов, что сдерживается ограничениями традиционных технологий формований биоизделий. Концепция персонифицированной медицины РФ предусматривает все большее применение индивидуальных имплантатов, совершенствование технологий их получения и технологий лечения и реабилитации. Создание индивидуальных имплантатов позволит решить задачу геометрической конгруэнтности имплантата с костью – главное условие остеоинтеграции биоматериала. Разработка биоматериала пригодного для 3D-печати позволит решить задачу создания имплантатов сложных форм.

Исходя из вышеизложенного, **целью настоящей работы** является разработка научных основ получения биорезорбируемых композиционных материалов на основе фосфатов кальция и полилактида, пригодных для 3d-печати по методу FDM.

Достижение цели будет обеспечено решением следующих задач:

1. Исследование условий получения фосфатов кальция, пригодных для создания биорезорбируемого композиционного материала,
2. Разработка составов композитов и исследование влияния состава на их физико-химические свойства,
3. Исследование физико-химических процессов, происходящих при нагревании композитов,

4. Исследование режимов 3D-печати композитов. Определение комплекса механических свойств образцов, полученных при различных режимах 3D-печати. Разработка технологических основ получения изделий из композитов,
5. Исследование основных биологических свойств полученных композитов: биосовместимости, биорезорбции и биоактивности.

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика веществ, используемых для синтеза и исследования свойств материалов на основе кальциевых фосфатов и полилактида

При выполнении экспериментальных работ были использованы реактивы марки «хч», «чда» и «осч». Реактивы, их назначения в работе, CAS номера и марки по степени чистоты приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Перечень реактивов и их марки по чистоте

Назначение	Название	Формула	Марка чистоты	CAS
Синтез ГАП	Тетрагидрат нитрата кальция	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	чда	13477-34-4
	Гидрофосфат аммония	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	чда	7783-28-0
	Гексагидрат хлорида кальция	$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	чда	10043-52-4
	Гидрофосфат натрия	Na_2HPO_4	чда	7558-79-4
Синтез ГАП, буферная смесь	Аммиак	NH_4OH конц.	осч	7664-41-7
	Гидроксид натрия	NaOH	чда	1310-73-2
Получение композиционных материалов	Трихлорметан	CHCl_3	осч	67-66-3
	Ацетон	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$	хч	67-64-1
	Глицерин	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	хч	56-81-5
	Сорбитол	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	хч	50-70-4
Определение биоактивности в PBS	Хлорид натрия	NaCl	осч	7647-14-5
	Хлорид калия	KCl	осч	10043-52-4
	Гидрофосфат натрия	Na_2HPO_4	осч	7558-79-4
	Гидрофосфат калия	KH_2PO_4	осч	7758-11-4
SBF-исследования	Хлорид калия	KCl	осч	10043-52-4
	Тригидрат гидрофосфата калия	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	осч	7758-11-4
	Соляная кислота	HCl	осч	7647-01-0
	Гексагидрат хлорида магния	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	осч	7786-30-3
	Сульфат натрия	Na_2SO_4	осч	7757-82-6
	Гидрокарбонат натрия	NaHCO_3	осч	144-55-8
	Гексагидрат хлорида кальция	$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	осч	10043-52-4

Для получения композиционного материала использовался полимер молочной кислоты (Natural Works Ingeo 40-43d, NatureWorks LLC, США).

2.2. Получение композиционных материалов

2.2.1. Композиционные материалы

Для получения композита фосфаты кальция вводились в 20% (масс.) раствор полилактида в трихлорметане. Для увеличения пластических характеристик вводилось определенное количество глицерина и сорбитола. Смесь перемешивалась магнитной мешалкой при температуре 30-45 °С, до образования геля с вязкостью 40-45 Па·с. Вязкость контролировалась ротационным вискозиметром Брукфильда DV3T. Полученный гель выливался тонким слоем на фторопластовую подложку и высушивался в тонком слое высотой 2-2,5 мм при $t=80^{\circ}\text{C}$ и $p=10^{-3}-10^{-4}$ Па до образования пленки. Для сравнения свойств полученного композита также использовался чистый ПЛА.

Таблица 2.2. Состав композиционных смесей

№	ФК, масс. %	ПЛА, масс. %	Сорбитол, масс. %	Глицерин, масс. %	Показатель текучести расплава, г/10мин
1	0	100	0	0	15,3±0,5
2	10	88,50	0,50	1,00	14,4±0,5
3	20	78,20	0,60	1,20	14,2±0,5
4	30	67,75	0,75	1,50	15,3±0,5
5	40	57,15	0,95	1,90	14,9±0,5
6	50	46,25	1,25	2,50	15,1±0,5
7	60	34,75	1,75	3,50	15,1±0,5
8	70	22,50	2,5	5,00	15,1±0,5

2.2.2. Получение композиционной нити

Перед переработкой композита на шнековом экструдере (рисунок 2.1) в филамент, полученная композиционная пленка подвергалась измельчению до частиц со средним размером 2 мм. Особенностью используемого экструдера является отдельная зона транспортировки-уплотнения материала и нагрева, что обеспечивает равномерную подачу и отсутствие захваченных газов в материале. Была получена непрерывная нить диаметром $1,75\pm 0,01$ мм. После экструзии нить хранилась в герметичной таре.

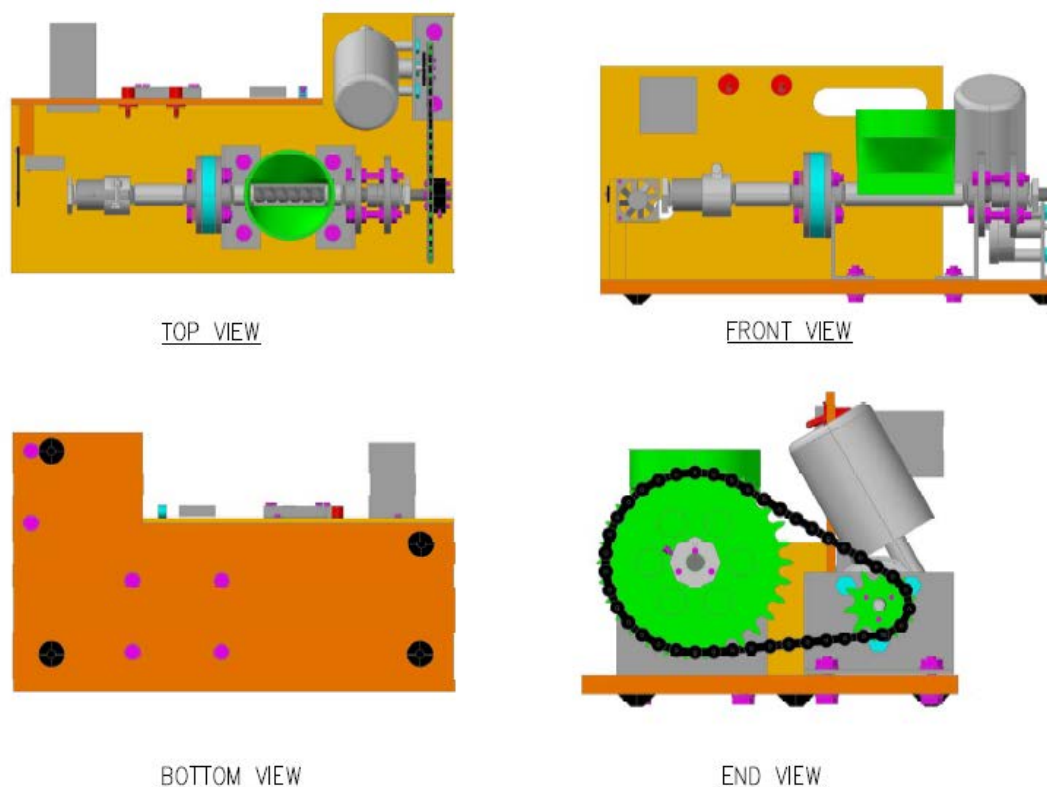


Рисунок 2.1. Экструдер для получение композиционной нити для 3D-печати (филамента).

2.3. Методы исследования

2.3.1 Методы исследования дисперсности

1) Лазерный дифракционный седиментационный анализ

Для анализа размеров частиц и их распределения в общей массе как один из самых точных способов используют лазерные дифракционные анализаторы.

Метод основан на измерении углового распределения интенсивности рассеянного излучения при прохождении лазерного луча через диспергированный образец в проницаемой среде с известным углом преломления. Крупные частицы рассеивают свет под малыми углами к нормали лазерного пучка, а мелкие - под большим. Все частицы представляются в виде сфер, и на выходе определяется их диаметр.

Исследование проводилось на лазерном дифракционном анализаторе размеров частиц Shimadzu SALD-7101 (диапазон измерения от 10 нм до 300 мкм)

2) Метод низкотемпературной адсорбции азота

Газовая адсорбция — наиболее точный из применяемых в материаловедении метод определения площади поверхности твердого тела. Для определения площади поверхности необходимо иметь соответствующие значения площади поверхности адсорбирующейся молекулы и знать число молекул, образующих монослой. Теория БЭТ основана на кинетической модели адсорбционного процесса, выдвинутой Лэнгмюром. В этой модели поверхность твердого тела рассматривается как совокупность адсорбционных мест. В состоянии динамического равновесия скорость конденсирующихся на свободных местах молекул газовой фазы равна скорости испарения молекул с занятых мест. Наиболее удобной формой уравнения БЭТ для его приложения к экспериментальным данным является:

$$\frac{1}{(W(\frac{P}{P_0})-1)} = \frac{1}{W_m C} + \frac{C-1}{W_m C} (\frac{P}{P_0}) \quad (2.1)$$

где P — давление газа, P_0 — давление его насыщенных паров, W - масса газа, адсорбированного при относительном давлении P/P_0 , W_m — вес адсорбированного вещества, образующего покрывающий всю поверхность монослой, C — константа БЭТ, относящаяся к энергии адсорбции в первом адсорбированном слое и, следовательно, ее значение характеризует взаимодействие адсорбент/адсорбат.

Анализ проводился на приборе Quantachrome NOVA 2200 e. Анализатор удельной площади поверхности и размеров пор Quantachrome NOVA. NOVA e-Series — полностью автоматизированный анализатор, для измерения удельной площади поверхности по методу БЭТ, а также анализа размеров пор и их распределения по размерам.

2.3.2 Термические методы исследования

1) Дифференциально-термический анализ

Метод дифференциально сканирующей калориметрии основан на измерении количества тепла при нагревании или охлаждении образца с определённой скоростью, Запись временной зависимости разницы температур или количества

тепла между исследуемым образцом и образцом сравнения, не претерпевающим никаких изменений в рассматриваемом температурном интервале (образец из Al_2O_3). Метод может быть выполнен совместно с термогравиметрическим исследованием, которое показывает потерю или прирост массы в зависимости от температуры. Исследование выполнялось на термоаналитической системе для проведения синхронных ДСК/ДТА/ТГ STA 449 F3 Jupiter.

2) Определение текучести расплава.

Показатель текучести расплава исследуемых композитов определялся на экструзионном пластометре MP1200. Полученные данные использовались для подбора режимов экструдирования. Показатель текучести расплава выражается как количество материала, выраженное в граммах за 10 мин.

2.3.3 Методы исследования структуры

1) Метод инфракрасной спектроскопии

Метод колебательной спектроскопии основан на исследовании поглощения электромагнитного излучения с веществом в ИК диапазоне. Поглощение в этой области обусловлено с колебательными переходами в молекулах и кристаллах. ИК спектры поглощения оригинальных образцов чистых полимеров и композитов на их основе (без дополнительной обработки) зарегистрированы на приборе Nicolet 5700 с приставкой НПВО (нарушенное полное внутреннее отражение) с Ge-кристаллом в диапазоне $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$. Идентификация полос поглощения произведена по таблицам характеристических частот на основании литературных и справочных данных [54, 55].

2) Рентгенофазовый анализ

В основе рентгеновских методов исследования кристаллических тел лежит уравнение Вульфа - Брэггов.

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (2.2)$$

n - называют порядком отражения ($n = 1, 2, 3$).

Оно используется для расчета межплоскостных расстояний d , которые являются характеристикой конкретной кристаллической решетки. Θ и λ - данные эксперимента. Выполнение условия Вульфа - Брэггов при изменении угла падения рентгеновского излучения регистрируется на рентгенограмме возникновением максимума. Интенсивность этого максимума или почернения соответствует интенсивности отраженного луча, которое в свою очередь зависит от количества атомов, составляющих данное семейство плоскостей, то есть от "заселенности" атомной плоскости. Поэтому интенсивность отраженного луча также является характеристикой изучаемого объекта.

Рентгеновский метод фазового анализа основан на том, что каждое кристаллическое вещество дает специфическую интерференционную картину с определенным количеством, расположением и интенсивностью интерференционных линий, которые определяются природой и расположением атомов в данном веществе.

Исследуемые образцы подвергались рентгенофазовому анализу на дифрактометре ДРОН-3М (монохроматическое Cu_α -излучение, длина волны 1,54056 Å) при следующих параметрах съемки: ускоряющее напряжение 90 кВ, ток пучка 30 мА, шаг сканирования 0,03° в диапазоне углов 10–70°, время набора сигнала 1 с. Расчет степени кристалличности образцов проводили с использованием пакета программ POWDERCELL 2.4 и Crystallographica Search-Match. В качестве эталона использован ГАП ICDD 2007 №01-074-0565, рефлексы которого получены при аналогичных условиях съемки.

Средний размер кристаллитов определяли по формуле Шеррера:

$$L = k\lambda/\beta \cos \theta \quad (2.3);$$

Анализ проводился по характерному для ГАП пику (002), где L — средняя величина кристаллитов; k — константа, близкая к единице; λ — длина волны рентгеновского излучения ($\text{Cu}_{K\alpha} = 1,54056 \text{ Å}$); β — уширение рентгеновского рефлекса $\beta = (B^2 - b^2)^{1/2}$, где B — полуширина дифракционной линии (002); b — полуширина дифракционной линии (002) эталонного поликристаллического образца; θ — брегговский угол дифракционной линии (002) [93].

3) Сканирующая электронная микроскопия

Принцип растровой электронной микроскопии заключается в сканировании участка исследуемого образца узкофокусированным электронным зондом и детектировании возникающих за счет различных процессов (эмиссия вторичных, отраженных и Оже электронов, рентгеновское излучение, генерация электронно-дырочных пар и др.) при этом сигналов.

Исследование морфологии порошков проводили методом сканирующей электронной микроскопии на приборах JEOL JSM 6000 (Jeol, Япония) и LEO EVO 50 (Zeiss, Германия) при ускоряющих напряжениях 1 – 30 кВ с использованием детекторов вторичных и обратно-рассеянных электронов; съемку осуществляли без предварительного напыления проводящих материалов на поверхность образцов), приставка к которому использовалась для элементного анализа и Zeiss Supra 55VP (ускоряющее напряжение 20 кВ).

4) Оптическая микроскопия

Исследование морфологии шлифов разработанных композитов исследовалось на оптическом микроскопе "AXIOVERT-200MAT" (Zeiss, Германия). Шлифы приготавливались на дисковой шлифованной машине Allied M-Prep5.

2.3.4. Определение элементного состава

Рентгеноспектральный микроанализ (РСМА) – метод определения микроскопических количеств химических элементов в микрообъеме вещества. В случае применения *энергодисперсионного рентгеноспектрального анализа*, осуществляемого с помощью приставки к сканирующему электронному микроскопу, атомы исследуемого образца возбуждаются, испуская характерное для каждого химического элемента рентгеновское излучение. Исследуя энергетический спектр такого излучения, можно сделать выводы о качественном и количественном составе образца.

Качественный и количественный элементный анализ, а также распределение элементов по поверхности порошков ГАП и полимерных композитов на основе ГАП проведено методами рентгеноспектрального микроанализа (сканирующий электронный микроскоп Leo Supra 50VP с использованием детектора Oxford Instruments X-Max; сканирующий электронный микроскоп JEOL JSM 6000) как в отдельных точках, так и по площадям.

2.3.6 Методы определения физико-механических свойств

Проводились испытания на определение предела прочности при сжатии (МПа) и изгибе (МПа); измерение ударной вязкости по Шарпи (кДж/м²) и циклы нагружения образца до разрушения.

Испытания на трёхточечный изгиб и сжатие проводились на установках Shimadzu EZ-LX и Instron 1195 со скоростью нагружения 50 мкм/мин. Прочность на изгиб вычислялась по формуле:

$$\sigma_{\text{и}} = 3Pl/2bh^2 \quad (2.4)$$

где P – нагрузка (Н), l – расстояние между опорами трёхточечного изгиба (8 мм), b – ширина образца (м), h – высота образца (м).

Прочность на сжатие вычислялась по формуле:

$$\sigma_{\text{с}} = P/A \quad (2.5)$$

где P – нагрузка (Н), A – площадь поперечного сечения образца (м²).

2.4. Методы формования композиционных образцов

2.4.1. Инжекционное литье под давлением

Инжекционное литье под давлением композиционных образцов проводилось на термопласт автомате Formolder IMS-55 (Россия). Давление инжектирования составляло 100-200 бар. Температура материала – 170-220 °С, температура матрицы – 45-55 °С. Время выдерживания в матрице – 1 мин.

2.4.2. 3D-печать

Печать композиционным филаментом производилась методом послойного нанесения расплава (FDM, Fused Deposition Method) на 3D-принтере Ultimaker2 с

модифицированной печатной головкой. Структурная характеристика принтера приведена в главе 5 на рисунке 5.10. Моделирование образцов для печати производилось в среде Siemens NX, кодировка модели объекта на слои для печати в программе Slic3r.

2.5 Исследование биосовместимости и биоактивных свойств

2.5.1. Прогностическая оценка активности поверхности

Для прогноза поведения материала в организме изучали смачиваемость композита изотоническим раствором (9% NaCl) на приборе KRUSS DSA30. Измерение краевого угла смачивания производилось на дисках диаметром 25 мм и высотой 1 мм. С одной стороны диск имел зеркальную поверхность, другая сторона диска имела шероховатую поверхность. Капли изотонического раствора высаживались на зеркальную поверхность диска. Для уменьшения гравитационной погрешности объем капли составлял 1 мл. Частота измерения угла составляла 30 кадров/с.

2.5.2. Исследования в модельных растворах фосфатного буфера и внеклеточной жидкости

Для исследования поведения в модельных растворах использовались образцы сетчатых дисков диаметром 10 мм и высотой 5 мм с размером ячейки 0,5х0,5мм, напечатанные на 3D-принтере (рисунок 2.2). Образцы взвешивали и инкубировали при 36,9°C в течение различных периодов времени в физиологическом растворе с фосфатным буфером (PBS) (pH=7,4). В конце каждого периода образцы промывали 3 раза дистиллированной водой и сушили в сушильном шкафу при 40 ° C в течение 24 часов. Оценивали потерю массы от начальной.

Высвобождение кальция из композита измеряли методом пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии с использованием спектрометра Solaar S2.

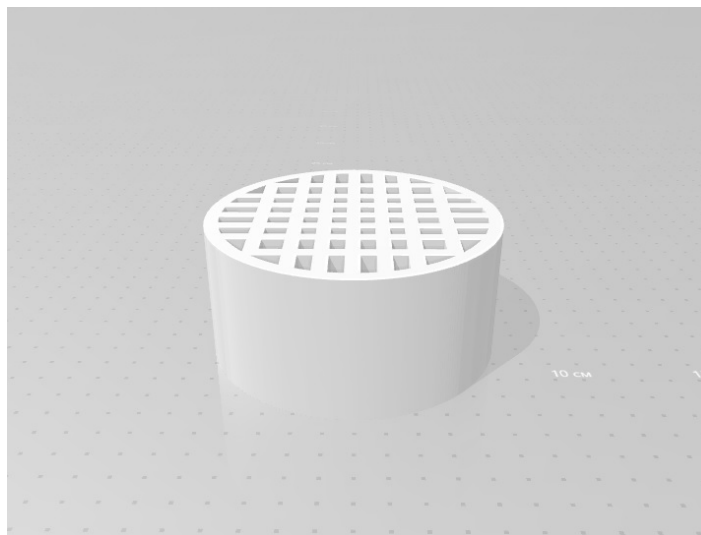


Рисунок 2.2. Изображения образца для 3D-печати.

Прогностическую оценку биоактивности проводили путем погружения образцов в внеклеточную модельную среду (Simulate Body Fluid, SBF) с концентрациями ионов и pH, почти равными плазме крови человека. Раствор готовили в соответствии с инструкцией Международной организацией по стандартизации ISO/FDIS 23317 (142,0 mM Na⁺; 5,0 mM K⁺; 1,5 mM Mg²⁺; 2,5 mM Ca²⁺; 147,8 mM Cl⁻; 4,2 mM HCO₃⁻; 1,0 mM HPO₄²⁻; 0,5 mM SO₄²⁻, Трис и 1 M HCl; pH 7,4). Сетчатые диски из PLA и PLA/ГАП взвешивали и инкубировали в 25 мл раствора SBF, выдерживая при 37±1 °C в течение 28 суток. После выдерживания образцы тщательно промывали дистиллированной водой для удаления растворимых солей, сушили в печи при 40 °C при влажности 50% в течение 48 часов и взвешивали. Взаимодействия между субстратами и раствором SBF были определены количественно с помощью гравиметрического анализа.

2.5.3. Оценка стерилизующей способности.

Для оценки стерилизующей способности использовали методику, описанную в ISO 22196 «Measurement of antibacterial activity on plastics and other non-porous surfaces» в отношении *Escherichia coli* ATCC 25922 и MRSA ATCC 43300.

Инкубированную при 37°C на плотной питательной среде в течение 18 часов бактериальную культуру суспендировали в питательном агаре (НИЦФ,

Санкт-Петербург), разбавленном физиологическим раствором (0.85 % NaCl) в соотношении 1:500. Концентрация бактерий в суспензии составляла 1.0×10^6 КОЕ/мл. На стенку тестируемого образца помещали 0,2 мл бактериальной суспензии и образец помещали в стерильный пластиковый пакет. Упакованный образец инкубировали при 37°C и относительной влажности воздуха 90 %.

Образец подвергался ионизирующему излучению с дозой 20 кГр, 40кГр, 50кГр и 60 кГр ортогонально к противоположной поверхности, на которую нанесена культура клеток.

После процедуры стерилизации образец помещали в 20 мл физиологического раствора и встряхивали в течение 1 минуты для открепления прилипших бактерий. 100 мкл раствора и растворов, полученных разбавлением исходного в 100 и 1000 раз, помещали на чашки Петри с питательным агаром. После инкубации чашек с питательным агаром при 37 °С в течение 24 ч подсчитывали количество колоний.

Показатель стерилизационной эффективности (R) рассчитывали по уравнению:

$$R = (A-B)/A \times 100 \% \quad (2.6)$$

где A – количество бактерий в отрицательном контроле; B - количество бактерий после стерилизации. Проводили не менее 5 параллельных измерений.

2.5.4. *In vitro* исследования

Для проведения исследования *in vitro* использовали клеточную культуру Neuro-2a – нейробластома мыши, клон линии клеток neuro C-1300. Фибробластоподобные и нейроноподобные клетки с ядрами различной формы, содержащие крупные глыбки хроматина, ядрышки различной формы и величины. Для проведения эксперимента культуры клеток рассеивали в культуральные чашки Петри, для получения монослоя клеток оптимальной плотности. Монослой формировался на 3-4 сутки. Сформированный монослой промывали версеном, трипсинизировали клетки с 3 мл трипсин-версена и добавляли 3 мл ростовой питательной среды в каждую чашку. Полученную суспензию клеток

центрифугировали при 400 об/мин в течение 5 минут. Затем надосадочную жидкость сливали и добавляли свежей питательной среды, перемешивали путем многократного пипетирования. Далее готовили 10 мл суспензии клеток определенной концентрации, а именно, 5000 клеток и по 0,1 мл помещали в каждую лунку 96-луночного планшета. Клетки инкубировали 24 ч при температуре 37 °C и CO₂ 5%. После инкубации клетки промывали с помощью DPBS. Затем предварительно приготовленную вытяжку из образцов помещали на монослой клеток. Планшеты инкубировали в течение 24ч. Далее удаляли питательную среду, содержащую вытяжки образцов, двукратно промывали раствором DPBS и проводили МТТ-тест. Определяли влияние наноструктур на жизнеспособность клеток. Для этого строили график зависимости количества (%) жизнеспособных клеток от концентрации наноструктур (мг/мл).

2.5.5. *In vivo* исследования

Проверку остеиндуктивных свойств тестируемых образцов выполняли на 50 инбредных мышах линии BALB/c в сертифицированной лаборатории Сибирского государственного медицинского университета. В зависимости от типов объектов исследований, предоставленных Заказчиком, животных распределили на 6 исследуемых групп:

- группа 0 (контрольная) – животным этой группы имплантировали образцы основе PLA 100000Да;
- группа 0-1 - животным этой группы имплантировали образцы основе PLA + 1% глицерина;
- группа 1 – животным этой группы имплантировали композитные образцы PLA 70% ВФК 30%;
- группа 2 - животным этой группы имплантировали композитные образцы основе PLA 69%, ВФК 30%, глицерина 1%;
- группа 3 - животным этой группы имплантировали композитные образцы основе PLA 47%, ВФК 50%, глицерина 3%;

- группа 4 - животным этой группы имплантировали композитные образцы основе PLA 25%, ВФК 70%, глицерина 5%;

В качестве контроля влияния разреза на местную реакцию подкожной клетчатки и общее состояние животного использовали 6 ложнооперированных животных (без имплантации образцов).

В каждой группе было по 4 исследуемых мышей, что соответствует требованиям ГОСТ ISO серии 10993 (не менее 3-х животных). Для проведения испытаний использовали мышей-самцов линии BALB/с. Эксперименты были выполнены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ Минздрава СССР от 12.08.77) и в соответствии с принципами, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и в Хельсинской декларации.

Имплантацию образцов выполняли методом ингаляции эфирным наркозом. После наступления медикаментозного сна животные фиксировались на препаровочном столике в положении на спине. Обработка операционного поля осуществлялась раствором кожного антисептика (0,01 % мирамистин, ООО "ИНФАМЕД К", Россия). Хирургические манипуляции выполнялись хирургическим инструментарием, стерилизованным путем автоклавирования (СанПиН 2.1.3.2630-10). Лабораторным животным, после рассечения кожи живота и формирования подкожного «кармана» в подмышечной области справа в проекции над печенью, вводили по 1 образцу с нанесенным в асептических условиях *in vitro* столбиком сингенного костного мозга, предварительно взятого из бедренной кости.

Для адгезии клеток органную культуру костного мозга на тестируемом образце предварительно культивировали *in vitro* при 37°C в течение 30-45 мин в культуральной среде DMEM/F12 (ООО "Пан Эко", Москва), содержащей 95 % среды и 5 % эмбриональной телячьей сыворотки.

После подкожного размещения образцов, на кожу животных накладывали узловые швы атравматичным шовным материалом, нитью 4.0. Кожа вокруг швов обрабатывалась антисептиком. Каждое животное взвешивали на электронных

весах GR-202 (AND, Япония) и помещали в клетки по 3-4 особи. После «пробуждения» животные восстанавливали свою двигательную активность в течение 15 мин, активно передвигались в пределах клетки, пили воду из поилок. В течение всего срока эксперимента, в первую неделю – ежедневно, в дальнейшем еженедельно, каждое животное осматривалось. Отслеживали состояние операционной раны и шва, локализацию имплантата, поведение животных, их двигательную и пищевую активность.

Через 45 дней животных умертвили углекислым газом, взвесили на электронных весах, имплантаты извлекли и оценивали состояние мягких тканей, окружающих имплантаты. При вскрытии мышей оценивали состояние мягких тканей подкожной клетчатки, окружающих имплантаты. Объекты исследования извлекались из подкожной клетчатки вместе с комплексом тканей (тканевыми пластинками), сформировавшихся на их поверхности из костного мозга, предварительно нанесенного *in vitro*.

Результаты вскрытия считали положительными, если на поверхности имплантатов формировались тканевые пластинки. Визуально оценивали состояние мягких тканей вокруг зоны имплантации: наличие/отсутствие признаков воспаления, а при наличии воспаления – выраженность воспалительной реакции в виде гиперемии сосудов реципиентного ложа, наличие экссудата и его характер, в том числе гнойные выделения.

Извлеченные имплантаты фиксировали 24 ч в 10% нейтральном формалине, декальцинировали в смеси (1:1) 20 % муравьиной кислоты и 20 % ацетата натрия в течение 7 дней до состояния, позволяющего делать гистологические срезы. Промывали в течение 24 ч от декальцинирующего раствора, затем помещали объекты испытаний в 10% сульфат натрия на 24 ч, который промывали водой в течение 24 ч. Обезвоживание проводили в 8-ми сменах дегидратирующего раствора на основе изопропанола по схеме производителя (IsoPrep, Biovitrum, Россия) и помещали для пропитки в парафин. Заливали объекты исследования в парафиновую среду ГИСТОМИКС, на микротоме выполняли тонкие (5-7 мкм) срезы перпендикулярно поверхности тканевых пластинок. Смонтированные на

предметных стёклах срезы окрашивали гематоксилином Джилла и эозином для гистологических исследований в стандартных условиях. Микроскопировали окрашенные срезы в световом микроскопе, делают цифровые снимки (изображения) окрашенных гистологических срезов.

Позитивным результатом считали рост кости с костным мозгом либо без такового в составе тканевой пластинки на поверхности имплантата, негативным – развитие соединительной, мышечной или жировой ткани. Вычисляли способность объектов исследования продуцировать рост костной ткани в тесте эктопического остеогенеза на лабораторных животных как процент имплантатов, способствующих росту кости с костным мозгом либо без такового (СР), от общего числа имплантированных объектов испытаний по формуле:

$$CP (\%) = [N2/N1] \times 100\%, \quad (2.7)$$

где N1 – число имплантированных образцов; N2 – число образцов, на которых выявлен рост кости с костным мозгом или без такового.

ГЛАВА 3. СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ

Использование фосфатов кальция (ФК) в композиционных материалах открывает новые возможности для медицинского материаловедения. В соответствии с концепцией регенерации костной ткани, материал имплантата должен контролируемо замещаться на кость одновременно с остеинтеграцией, при этом скорость резорбции имплантата должна быть ниже или равна скорости образования новой кости.

Фосфаты кальция, как общепризнано исследователями, разработчиками и потребителями, являются необходимым компонентом в материале имплантата, поскольку определяют его биосовместимость и биоактивность - ключевые свойства биоматериала согласно концепции регенерации костной ткани.

Известна различная растворимость ФК в водных растворах и биологических средах (таблица 1.2). Учет их растворимости является важным фактором при использовании ФК в биоматериалах, поскольку позволяет влиять на скорость деградации изделий из них на химическом уровне. Использование комплекса ФК, отличающихся произведением растворимости в водных средах, является перспективным для получения биорезорбируемых материалов с биоинспирированными свойствами для восстановительной медицины.

Другим важным фактором при использовании ФК в композитах является их дисперсность. Использование высокодисперсных частиц увеличивает удельную поверхность фосфатного компонента композита, что в свою очередь, определяет размер поверхности контакта ФК с омывающими биологическими жидкостями в организме.

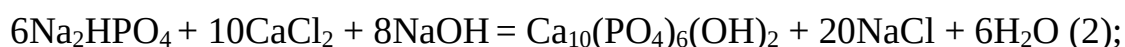
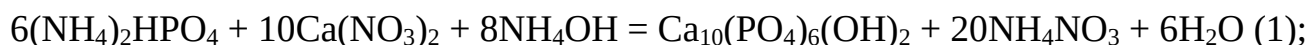
Высокая дисперсность также важна с точки зрения технологии получения композиционных материалов, так как обуславливает гомогенное распределение ФК в объеме матрицы. Химическая однородность материала определяет качество конечных изделий, их приживаемость, биоактивность, биорезорбцию и остеинтеграцию.

В данной главе приводятся результаты исследования условий получения высокодисперсных фосфатов кальция, отличающихся скоростью растворения в

водных средах, пригодных для использования в целевом композиционном материале с полилактидом.

3.1. Синтез фосфатов кальция

Для получения в одном синтезе различных фосфатов кальция, способных растворяться в водных средах с различной скоростью, были выбраны способы жидкофазного синтеза гидроксиапатита, так как побочными продуктами в таких реакциях являются легкорастворимые формы:



Растворы готовили из дегазированного кипячением дистиллята, при соотношении концентраций $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{PO}_4^{3-}] = 0,5\text{M}/0,3\text{M}$ и $\text{pH} = 8,73$. Значение pH контролировалось электронным pH -метром Mettler Toledo S700 с электродом на гелевом электролите [242].

Условия синтеза ФК приведены в таблице 3.1. Образцы 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 и 1-6 получены по реакции (1), образцы 2-1, 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6 по реакции (2). Часть продуктов реакций выдерживалась в маточном растворе (1-5, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6). Все продукты промывались в дистилляте не менее 4 раз до нейтрального значения pH , центрифугировались, обезвоживались и сушились при 105°C , за исключением 1-6. Часть образцов подвергалось прокаливанию. Образец 1-6 прокаливался при температуре 400°C для разложения нитрата натрия – побочного продукта. Образцы 2-2, 2-4 и 2-6 были прокалены при температуре 800°C .

Температура синтеза установлена на основании расчета энергии Гиббса (3.1) и обеспечивает смещение равновесия в сторону продуктов реакции.

$$\Delta G = \sum n \cdot \Delta G_{\text{пр}} - \sum n \cdot \Delta G_{\text{исх}} \quad (3.1)$$

Продукты синтеза представляют собой полидисперсные осадки белого цвета разной плотности. Выход по реакциям зависит от условий синтеза и реакции. По первой реакции максимальное значения выхода по реакции составило 96,4% в образцах 1-5, в прокаленных образцах 1-6 – 94,7%. По второй реакции

максимальное значения выхода составило 96,6% в образцах 2-5, в прокаленных образцах 2-6 – 92,9%.

Таблица 3.1. Условия синтеза фосфатов кальция методом химического осаждения.

Шифр	Т _{реакции} , °С	ΔG, кДж	Выдерживание в маточном растворе		Выход реакции,	Са/Р	Т _{прокаливания} , °С
			Время, сут	Т, °С			
1-1*	60	-1134	-	-	87,3	1,59	-
1-2**	60	-1134	-	-	89,2	1,58	-
1-3*ψ	60	-1134	-	-	92,9	1,57	-
1-4**	100	-3381	-	-	94,0	1,59	-
1-5**	100	-3381	1	25	96,4	1,60	-
1-6**	60	-1134	-	-	94,7	1,61	400
2-1**	100	-824	-	-	93,6	1,60	-
2-2**	100	-824	-	-	90,6	1,50	800
2-3**	100	-824	1	37	94,5	1,60	-
2-4**	100	-824	1	37	92,4	1,60	800
2-5**	100	-824	14	37	96,6	1,60	-
2-6**	100	-824	14	37	92,9	1,62	800

* - капельное смешение, ** смешение путем полного сливания реагентов. ψ – СВЧ нагрев.

3.2. Исследование фазового состава продуктов синтеза

Фазовый состав и кристалличность высушенных осадков исследовали методом РФА с последующей обработкой дифрактограмм в программе Crystallographica Search-Match. Расчет степени кристалличности образцов проводили с использованием пакета программ POWDERCELL 2.4, в качестве эталона использован ГАП ICDD 2007 №01-074-0565, рефлексы которого получены при аналогичных условиях съемки (см. главу 2).

На рисунках 3.1 и 3.2 приведены дифрактограммы порошкообразных продуктов синтеза, полученных при разных условиях, в сравнении с эталоном. Фазовый состав и средний размер кристаллитов продуктов приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. Фазовый состав и средний размер кристаллитов продуктов синтеза

Шифр образцов		1-1	1-2	1-3	1-4	<u>1-5</u>	1-6	2-1	<u>2-2</u>	2-3	<u>2-4</u>	2-5	<u>2-6</u>
Содержание, масс. %	Моноклинный ГАП	30	45	15	44	-	<u>62</u>	38	-	47	-	<u>61</u>	-
	Гексагональный ГАП	25	12	41	19	<u>72</u>	<u>6</u>	3	<u>64</u>	13	<u>71</u>	<u>8</u>	<u>78</u>
	Карбонат замещенный ГАП	2	4	4	6	<u>8</u>	<u>6</u>	7	<u>2</u>	6	<u>7</u>	<u>6</u>	<u>2</u>
	ТКФ	31	25	22	14	<u>20</u>	<u>16</u>	37	<u>34</u>	16	<u>22</u>	<u>15</u>	<u>20</u>
	Аморфный ГАП	12	14	18	17	-	<u>10</u>	15	-	18	-	<u>10</u>	-
<u>Размер кристаллитов, нм</u>		~34	~35	~37	~28	<u>~28</u>	~24	~37	<u>~40</u>	~35	<u>~40</u>	~20	<u>~33</u>

Примечание: Жирным выделены образцы, полученные прокаливанием продуктов синтеза; подчеркиванием выделены образцы с высоким выходом по реакции.

Из представленных дифрактограмм (рисунки 3.1 и 3.2) и таблицы 3.2. можно сделать вывод, что сливание подогретых прекурсоров при температуре кипения и выдерживание их в маточном растворе более 1 сут при прочих равных условиях обеспечивают повышение доли кристаллической фазы. Быстрое извлечение из раствора приводит к росту доли мелкокристаллической фазы в продукте по сравнению с выдерживанием в маточном растворе. Из сравнения термодинамических условий протекания реакций (1) и (2) следует, что уменьшение энергии Гиббса положительно влияет на увеличение доли ГАП с наименьшим размером (1-4, 1-5, 2-1, 2-3, 2-5).

Как видно из рисунка 3.1 и таблицы 3.2., порошки, полученные по реакции (1) представлены продуктами с содержанием ГАП в разных модификациях, включая карбонат замещенный, от 57% до 80%, а в прокаленных порошках до 80%. Содержание ТКФ в осадках составляет от 16% до 31%, а в прокаленных – до 20%. Выдерживание осадка в маточном растворе приводит к уменьшению содержания ТКФ примерно на 30% и уменьшению аморфной фазы примерно на 25%.

Содержание аморфной фазы в продуктах синтеза составляет от 10% до 18% и уменьшается при выдержке осадка в маточном растворе.

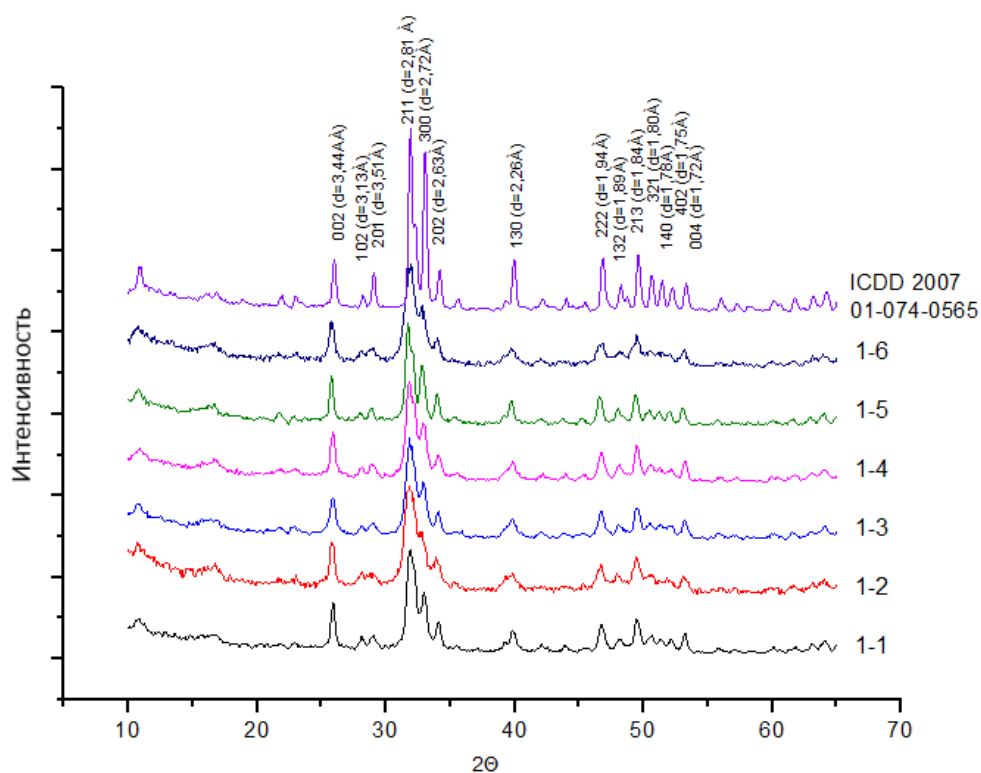


Рисунок 3.1. Дифрактограммы продуктов реакции (1) в сравнении с эталоном.

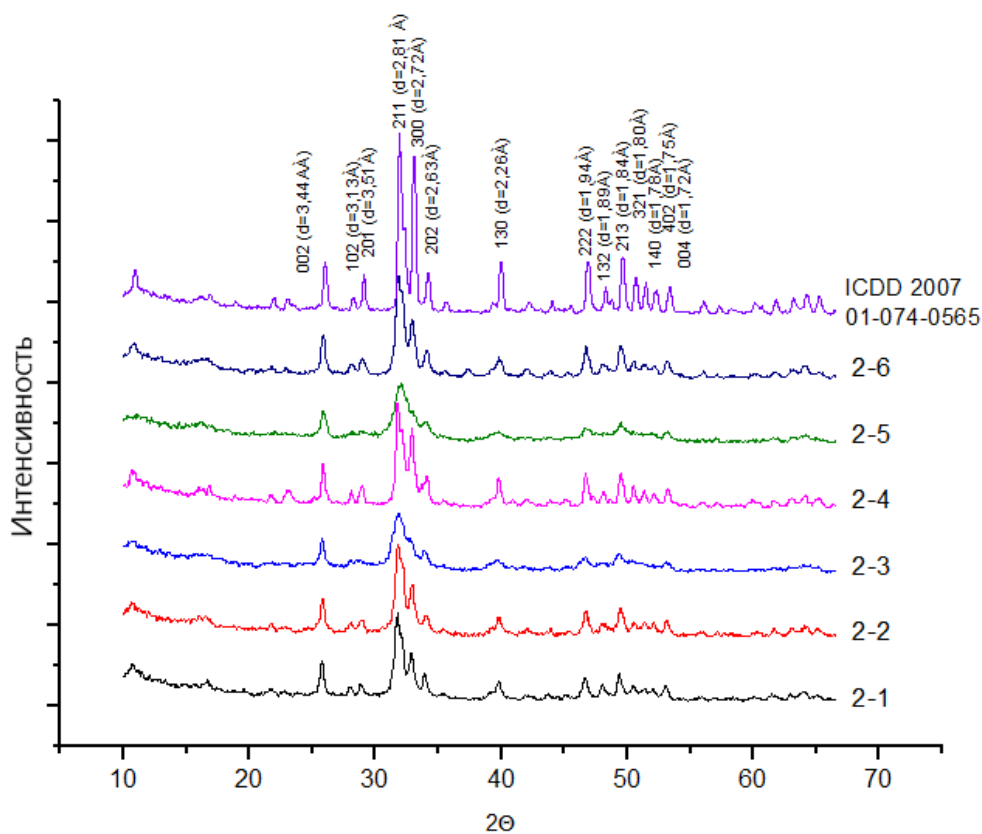


Рисунок 3.2. Дифрактограммы продуктов реакции (2) в сравнении с эталоном.

Как видно из рисунка 3.2, порошки, полученные по реакции (2) представлены продуктами с содержанием ГАП в разных модификациях, включая карбонат замещенный, от 48% до 85%, а в прокаленных порошках до 80%. Содержание ТКФ в осадках составляет от 15% до 37%, а в прокаленных – от 20% до 34%. Выдерживание осадка в маточном растворе в течение 14 дней приводит к уменьшению содержания ТКФ примерно на 30%.

Прокаливание приводит к некоторому увеличению содержания ГАП и уменьшению ТКФ. Содержание аморфной фазы в продуктах синтеза составляет от 10% до 18% и уменьшается при выдержке осадка в маточном растворе.

Как видно из приведенных данных, наибольшее содержание ГАП в продукте равное 80% обеспечивают смешение реагентов путем сливания и синтез при 100°C и выдерживание в маточном растворе в течение 14 дней (образец 2-6); наименьшее 48% (образец 2-1) - сливание прекурсоров и поддержание температуры 100°C с извлечением продуктов сразу после синтеза; размер кристаллов составляет соответственно 37 и 33 нм. Полное сливание подогретых прекурсоров и проведение реакции при 100°C приводит к образованию мелкокристаллического продукта с размером кристаллитов 24 нм (1-6); при этом содержание ГАП в 72% достигается при дополнительной термообработке осадка при 400 °C. Выдерживание осадка в маточном растворе в течение 1 сут при комнатной температуре не дает такого эффекта, как подогрев в случае образца 1-5. [95]. Применение СВЧ-нагрева не способствует повышению выхода ГАП или снижению размера кристаллов. Согласно закону Онзагера эти данные могут быть объяснены тензорной направленностью реакции в сторону повышенных температур и быстрым извлечением (осаждением) продуктов из реакционной зоны.

Средний размер кристаллитов в образцах 2-1, 2-3, 2-5, выдержанных в маточном растворе при 37°C равен соответственно 37 нм, 35 нм, и 20 нм после двухнедельной выдержки осадка в маточном растворе (2-5). На дифрактограммах отмечается относительно низкая интенсивность рефлексов. Однако после прокаливания при 800 °C в них происходит увеличение доли кристаллической фазы ГАП до 90%.

ИК-спектроскопия подтверждает данные РФА по фазовому составу.

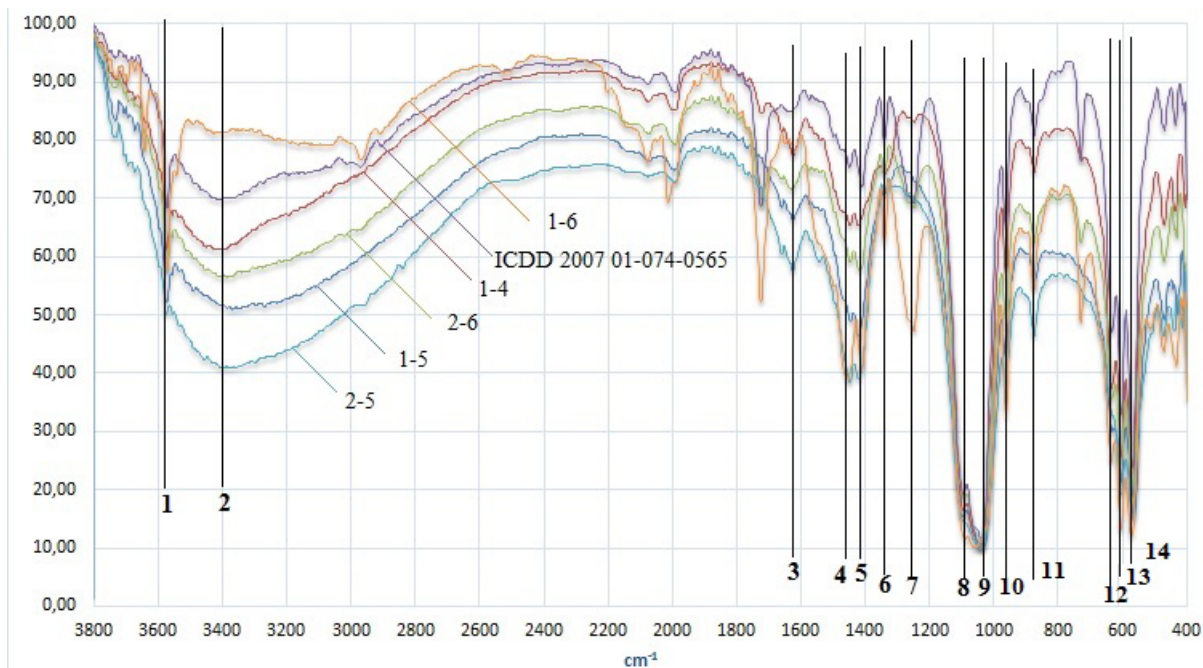


Рисунок 3.3. ИК-Фурье спектры образцов фосфатов кальция.

В ИК-спектрах образцов (рисунок 3.3, таблица 3.3) определяются полосы, соответствующие колебаниям фосфатных групп в интервалах волновых чисел 955-962, 1020-1090 и 520-660 см^{-1} [97]. Широкая полоса деформационных колебаний OH^- -групп при 3440-3570 см^{-1} соответствует адсорбированной воде. Низкая интенсивность полос в областях 3570 см^{-1} и 630 см^{-1} , отвечающих валентным и деформационным колебаниям OH^- -групп в составе ГАП, полученного без выдерживания осадка в маточном растворе (образец 1-6), свидетельствует о низком содержании фазы ГАП. Колебания, соответствующие полосам в интервалах 870-875 см^{-1} и 1300-1500 см^{-1} относятся к связям $\text{C}=\text{O}$ в карбонатных группах. Наличие карбонатных групп в структуре образцов обусловлено адсорбцией углекислого газа из атмосферы воздуха в процессе синтеза и наблюдается у всех образцов. Также в спектрах прокаленных образцов (1-6, 2-6) значительно снижается интенсивность соответствующих пиков в интервалах 1300-1500 см^{-1} , 3440-3570 см^{-1} и 1630-1650 см^{-1} , что связано с десорбцией молекул воды и углекислого газа с поверхности порошка и разложением карбонатсодержащего ГАП [98]. Приведенные выше данные доказывают наличие карбонатной группы в продуктах реакции [242].

Таблица 3.3. Инфракрасные моды колебаний в продуктах синтеза.

№	Характеристические частоты	Колебательные частоты ν см ⁻¹						
		1-4	1-5	1-6	2-5	2-6	эталон	данные [95,96]
1	ОН структурная	3570	3571	3573	3570	3572	3572	3572
2	ОН деформационная	3400-3570	3400-3570	-	3400-3570	3400-3570	3400-3570	3420-3570
3	СО ₃ структурная	1632	1634	1635	1631	1634	1632	1630-1650
4	СО ₃ групповая ν^3	1453	1456	1453	1454	1454	1459	1450-1460
5	СО ₃ групповая ν^3	1414	1416	1413	1420	1420	1420	1429
6-7	Группы адсорбированной Н ₂ О	1100-1300	1100-1300	-	1100-1300	-	-	1100-1300
8	РО ₄ изгиба ν^3	1022	1040	1032	1030	1044	1040	1050
9	РО ₄ изгиба ν^3	1090	1089	1087	1086	1088	1089	1090
10	РО ₄ растяжения ν^1	963	962	960	963	961	965	961
11	СО ₃ групповая ν^3	879	873	870	880	881	879	879
12	ОН структурная	627	630	630	650	631	631	635
13	РО ₄ изгиба ν^4	602	602	598	610	601	601	607
14	РО ₄ изгиба ν^4	573	573	573	564	574	574	571

Выдерживание в маточном растворе повышает содержание кристаллической фазы, и, как показывают ИК-спектры, карбонатной группы, предположительно, в составе карбоната кальция и карбонатсодержащего ГАП. Включение карбонат-аниона в структуру ГАП в небольшом количестве не изменяет фазового состава и не проявляется на дифрактограммах [99]. Различий в ИК-спектрах образцов 2-5 и 2-6 нет, прокаливание не приводит к увеличению содержания кристаллической фазы в продукте.

Таким образом, полифазный состав продуктов реакции отвечает поставленной задаче – в продуктах присутствуют соединения, отличающиеся произведением растворимости в водных средах при $t=37^\circ\text{C}$: $\text{pPP}(\text{ГАП}) = 58,6$, $\text{pPP}(\text{карбонатзамещенный ГАП}) = 50-45$, $\text{pPP}(\text{аморфный ГАП}) = 25-32$, $\text{pPP}(\text{ТКФ}) = 29,5$.

По совокупности полученных данных, для дальнейших исследований выбраны продукты 1-5 и 1-6, и 2-5 и 2-6, перспективные по фазовому составу и микроструктуре (размер кристаллитов).

3.3. Исследование дисперсности продуктов синтеза

Дисперсность имеет важное значение в производстве высоконаполненных композитов. Высокая дисперсность обуславливает дальнейшую хорошую гомогенность распределения ФК в объеме композита, а это в свою очередь обеспечит высокое качество печати и воспроизводимость функциональных свойств. На графиках дифракционной лазерной спектрометрии (рисунки 3.4, 3.5 и 3.6) и в таблице 3.4. представлена дисперсность частиц продуктов синтеза.

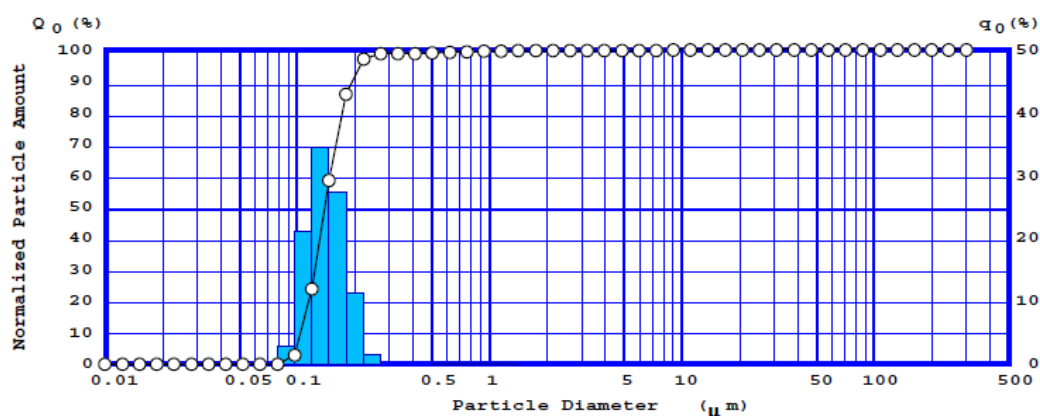


Рисунок 3.4. Распределение размера частиц фосфатов кальция образца 1-4

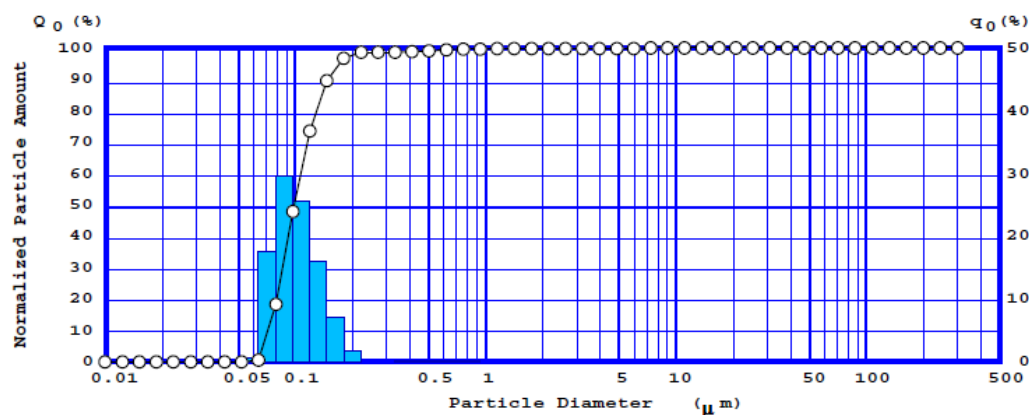


Рисунок 3.5. Распределение размера частиц фосфатов кальция образца 2-5

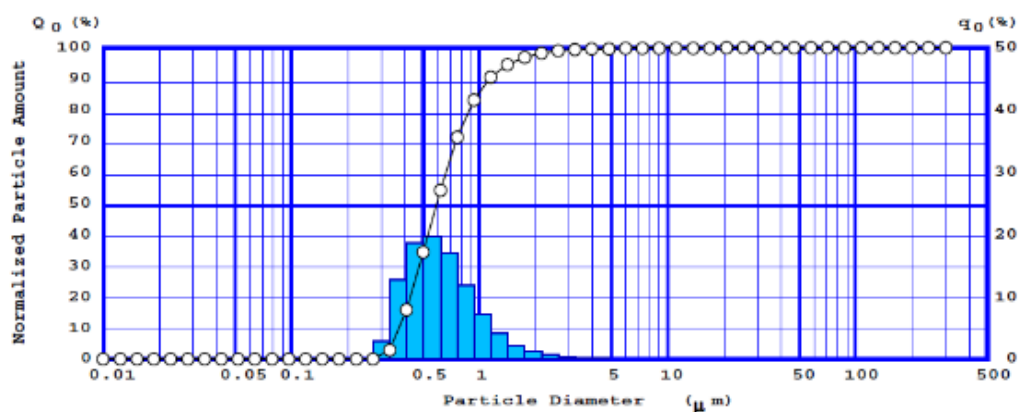


Рисунок 3.6. Распределение размера частиц фосфатов кальция образца 2-6

Удельная поверхность по методу БЭТ и рассчитанный размер частиц при плотности 3,14 г/см³ также приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4. Дисперсность по методу БЭТ и лазерной дифракции (SALD)

Шифр	1-4	1-5	2-5	2-6
Суд, м ² /г	45,4	34,8	55,7	4,7
Размер частиц, нм ($\rho \sim 3,14$ г/см ³)	42,09	54,91	34,31	406,56
D10, мкм	0,075	0,087	0,045	0,372
D50, мкм	0,098	0,139	0,078	0,591
D90, мкм	0,150	0,292	0,105	1,142

На рисунке 3.7. представлены микрофотографии сканирующей электронной микроскопии, которые иллюстрируют данные дисперсионного анализа.

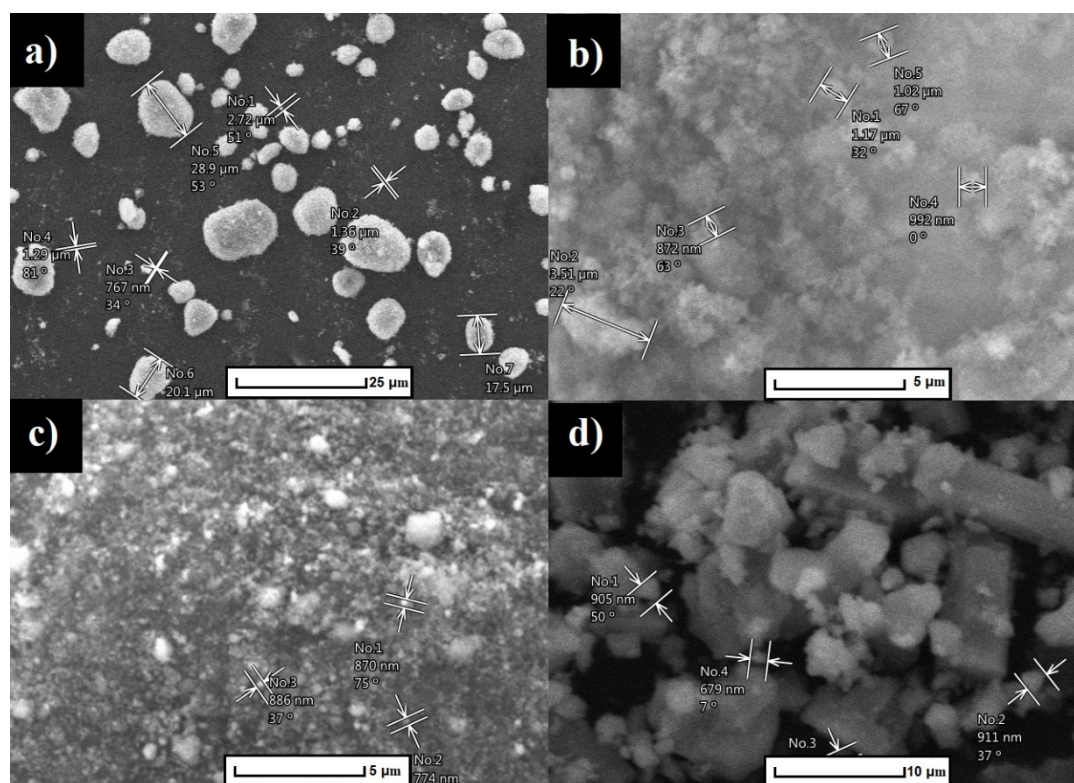


Рисунок 3.7. СЭМ-фотографии образцов а) 1-4; б) образец 1-5; в) 2-5; д) 2-6.

Все продукты представляют собой порошкообразные системы, в которых в силу поверхностной активности образуются агрегаты размерами 10-100 мкм (рис. 3.7а). Агрегаты, как и сами осадки, имеют рыхлую структуру (рис. 3.7б), в которой

распределяется кристаллическая фаза. Исключение составляет образец 2-5 (рис. 3.7с), выдержанный в маточном растворе 2 недели, который представлен преимущественно аморфными частицами неправильных форм размером от 100 до 500 нм, причем более крупные частицы (более 500 нм) имеют более плотную структуру. По всей вероятности, эволюция осадка идет по такому же пути, что и в других образцах. В первые сутки осадок имеет рыхлую структуру, при этом происходит частичная кристаллизация. При выдерживании в растворе в течение 2-х недель происходит накопление кристаллического продукта и образование пластинчатых кристаллов с правильной огранкой.

Способ синтеза незначительно влияет на отношение Ca/P, как показывает элементный анализ (таблица 3.5). Выдерживание в маточном растворе приближает отношение Ca/P к стехиометрическому значению.

Таблица 3.5. Элементный состав (ат. %) синтезированных образцов.

Шифр	Ca	P	O	C	Ca/P
1-4	16,02	10,16	39,93	10,81	1,59
1-5	19,98	12,09	35,52	17,74	1,65
2-5	21,01	12,89	30,11	15,04	1,63
эталон	14,01	8,01	40,8	20,87	1,67

Выводы по третьей главе.

1. Условиями получения высокодисперсных фосфатов кальция (ВФК) с высоким выходом в реакции (более 96%) и отношением Ca/P = 1,60-1,62 являются сливание исходных компонентов и смешение в турбулентном режиме, температура реакции 100 ± 5 °С, выдерживание в маточном растворе не менее 14 дней с поддержанием pH в области значения $9,0 \pm 0,3$ в течение всего процесса.

2. Фазовый состав продуктов реакции с высоким выходом представлен гидроксиапатитом (60-80%), карбонатзамещенным гидроксиапатитом (до 6%), фосфатом кальция (до 15%) и аморфным гидроксиапатитом (до 10%).

3. Дисперсность продуктов реакции с высоким выходом характеризуется мономодальностью с показателями: размер фракции ВФК до 100 нм составляет 60-70%, средний размер частиц 50-60 нм, удельная поверхность – 50-60 м²/г.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА СОСТАВОВ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ

Проектирование составов композиционных материалов проводилось исходя из задач, поставленных в работе, с учетом литературных данных. Как показано в главе 1, композиционные материалы на основе полилактида обладают рядом свойств, выгодно отличающих их от кальцеевофосфатной керамики – идеального материала для остеосинтеза, которая хорошо приживается и выполняет роль фундамента для образования новой костной ткани.

Однако в имеющихся разработках в качестве минеральных наполнителей используются, главным образом гидроксиапатит или его комбинации с ОКФ и ТКФ, что не позволяет регулировать резорбцию материала, соответственно контролировать остеоинтеграцию имплантата. Кроме того, нет убедительных данных об оптимальном содержании и составе фосфатов кальция в композите, обеспечивающих целевые свойства биоматериала.

Концепция данного исследования базируется на трех установленных научных фактах:

1) Смесь фосфатов кальция (ФК), обладающих различным произведением растворимости, обеспечивает последовательное растворение ФК в водных растворах и биологических жидкостях, что позволяет регулировать биорезорбцию материала.

2) Высокая дисперсность ФК обеспечивает гомогенность распределения наполнителя в матрице полимера при высоких содержаниях и, соответственно, постепенный выход ионов кальция и фосфата, стимулируя образование биологического ГАП и активность ростовых факторов кости.

3) Введение многоатомных спиртов способствует диспергированию смеси высокодисперсных ФК (склонных к агломерации), обеспечивая химическую однородность композита. Этот фактор предопределяет образование пористой структуры материала в процессе постепенного выщелачивания ФК и образование каналов движения биологических жидкостей по мере резорбции материала имплантата.

4.1. Разработка составов композитов

В таблице 4.1. представлены проектные составы композиционных материалов на основе полученных высокодисперсных фосфатов кальция (ВФК) и полилактида.

Таблица 4.1. Составы термопластичных композиционных смесей

№	ВФК, масс. %	ПЛА, масс. %	Сорбитол, масс. %	Глицерин, масс. %	Показатель текучести расплава, г/10мин
1	0	100	0	0	15,3±0,5
2	10	88,50	0,50	1,00	14,4±0,5
3	20	78,20	0,60	1,20	14,2±0,5
4	30	67,75	0,75	1,50	15,3±0,5
5	40	57,15	0,95	1,90	14,9±0,5
6	50	46,25	1,25	2,50	15,1±0,5
7	60	34,75	1,75	3,50	15,1±0,5
8	70	22,50	2,5	5,00	15,1±0,5

Исследуемые композиты содержат ВФК в диапазоне от 10 до 70% и добавки пластификатора. Известно, что ФК сравнительно легко распределяются в растворе ПЛА при введении в количестве до 10% [11, 12, 243]. В результате образуется однородный полидисперсный раствор. Увеличение содержания ФК до 40% оказывает влияние на эволюцию дисперсной системы, при этом имеет место агрегация частиц фосфатов кальция. Формирование агрегатов со средним размером более 50мкм приводит к их седиментации, которая тем более активна, чем большее количество минерального компонента вводится в полимер. Для предотвращения агрегации фосфатов в составы введены глицерин и сорбитол, которые также выступают пластификаторами в композиционных системах.

Схема подготовки композиций представлена на рисунке 4.1.

Фосфаты кальция вводились в количестве от 10 до 70% (здесь и далее масс.) в раствор полимера в полярном растворителе [243]. Для увеличения пластических характеристик вводилось от 1,5 до 7,5 % пластификатора: сорбитола и глицерина в соотношении 1:2. Количество пластификатора вводилось в соответствии с пластическими характеристиками композита до достижения показателя текучести

расплава 14-16 г/10мин (при температуре 200 °С и нагрузке 25Н), что соответствует показателю текучести исходного ПЛА.

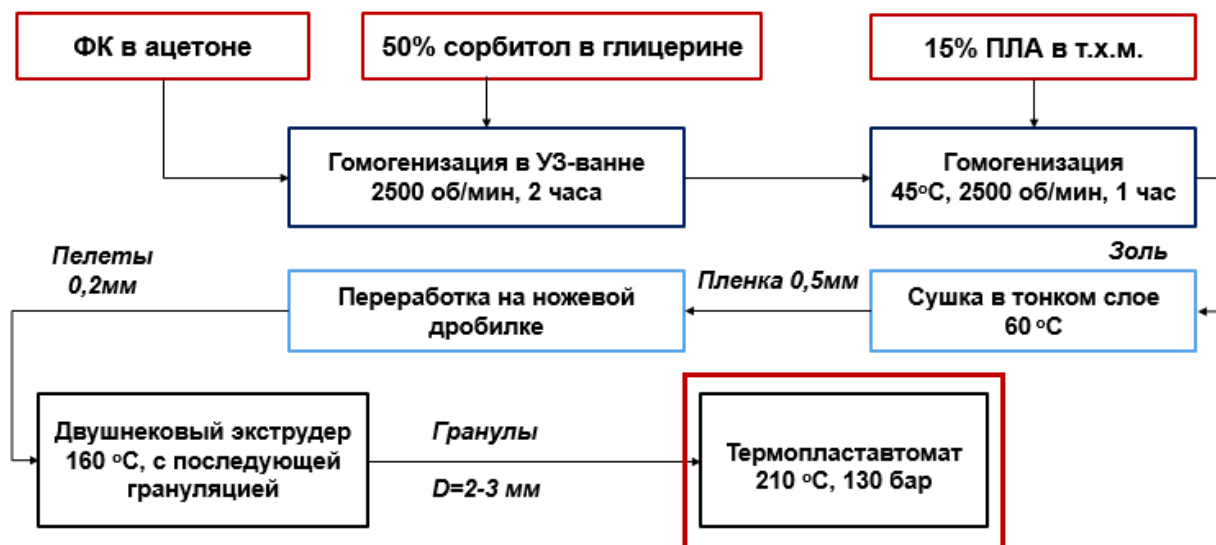


Рисунок 4.1. Схема подготовки композиционных образцов.

Кальциевые фосфаты и пластификатор вводились в 15% раствор ПЛА в трихлорметане. Смесь перемешивалась роторной мешалкой оригинальной формы при температуре 30-45 °С на водяной бане до образования геля (20-30 Па*с). Вязкость контролировалась ротационным вискозиметром Брукфильда DV3T. Полученный гель выливался тонким слоем на фторопластовую подложку и высушивался в тонком слое при $t=45-50^{\circ}\text{C}$ и $p=10^{-3}-10^{-4}$ Па до образования пленки. Затем полученный композит дробился на ножевой дробилке до среднего размера гранул 2-3мм. Для сравнения свойств полученного композита также использовался чистый ПЛА.

На рисунке 4.2 приведены фотографии шлифов композитов исследуемых составов. Агрегация минеральной фазы наиболее выражена в составе с ее содержанием 40%. Введение глицерина и сорбитола позволяет исключить седиментацию и обеспечить однородность композитов, что является важным условием качественной печати. Таким образом многоатомные спирты выполняют роль пептизаторов в исследуемых композициях.

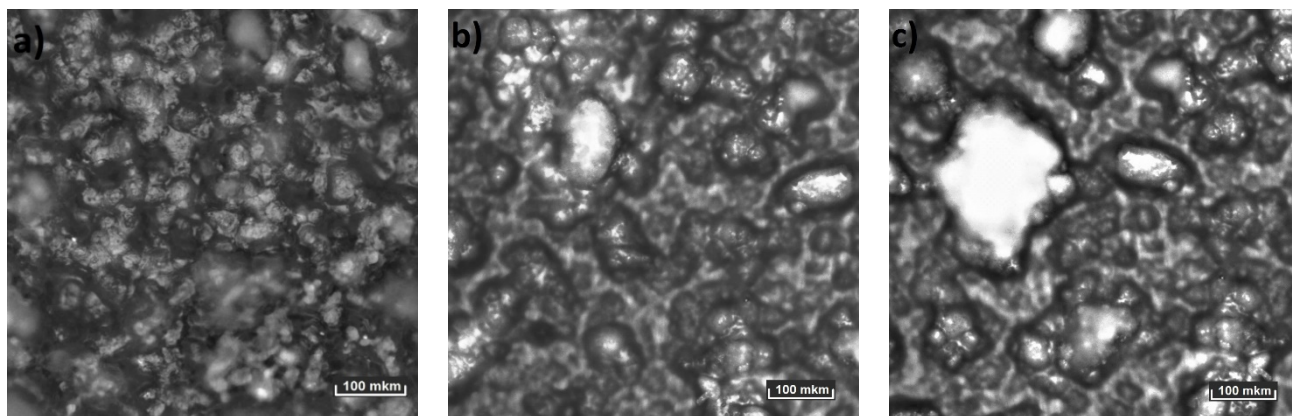


Рисунок 4.2. Микрофотографии шлифов композитов, содержащие высокодисперсные фосфаты кальция: а) – 5%, б) – 20%, с) – 40%.

На рисунках 4.3 и 4.4. приведены прочностные характеристики образцов, полученных инъекционным литьем в термопластавтомате под давлением 120 бар и температуре 210°C. Прочность композиционных образцов при увеличении содержания ФК от 5 до 70% при сжатии увеличивается от 50 ± 2 до 61 ± 2 МПа (на 10-18%), при изгибе увеличивается от 32 ± 2 до 43 ± 2 (на 10-16%). Ударная вязкость по Шарпи, характеризующая прочность при динамической нагрузке, увеличивается на 40% в этом ряду составов и изменяется от $4,5 \pm 0,5$ до $5,9 \pm 0,5$ кДж/м². Важной характеристикой имплантата является усталостная прочность, определяемая в циклах нагружения, поскольку она является индикатором надежности при длительном применении. В ряду исследованных составов число циклов нагружения увеличивается соответственно от 4200 ± 100 до 4800 ± 100 .

Механические характеристики композитов разработанных составов (рисунки 4.3 и 4.4) соответствуют и превосходят показатели естественной кости (таблица 4.2): прочность на сжатие губчатой кости – 32-42 МПа, прочность на изгиб – 10-40 МПа, энергия разрушения 3,4-5,4 кДж/м² [1,2,22,23,24,25], а также ПЛА (прочность на сжатие – 52 МПа, прочность на изгиб – 32 МПа, энергия разрушения 3,90 кДж/м², циклы нагружения - 4200), и значительно превосходят показатели кальций фосфатной керамики [15].

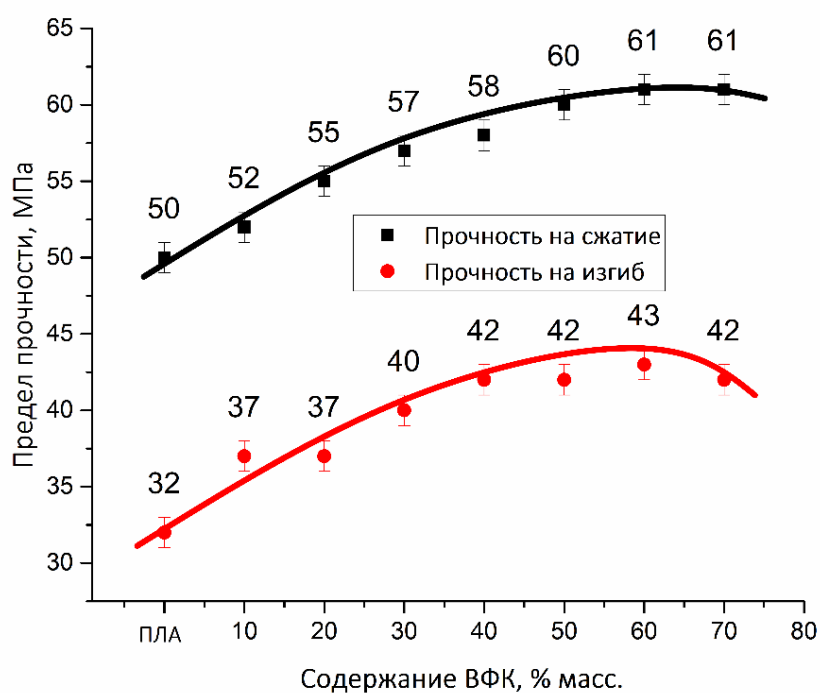


Рисунок 4.3. Механические характеристики исследуемых композитов, содержащих ВФК от 10 до 70%, в сравнении с чистым полилактидом.

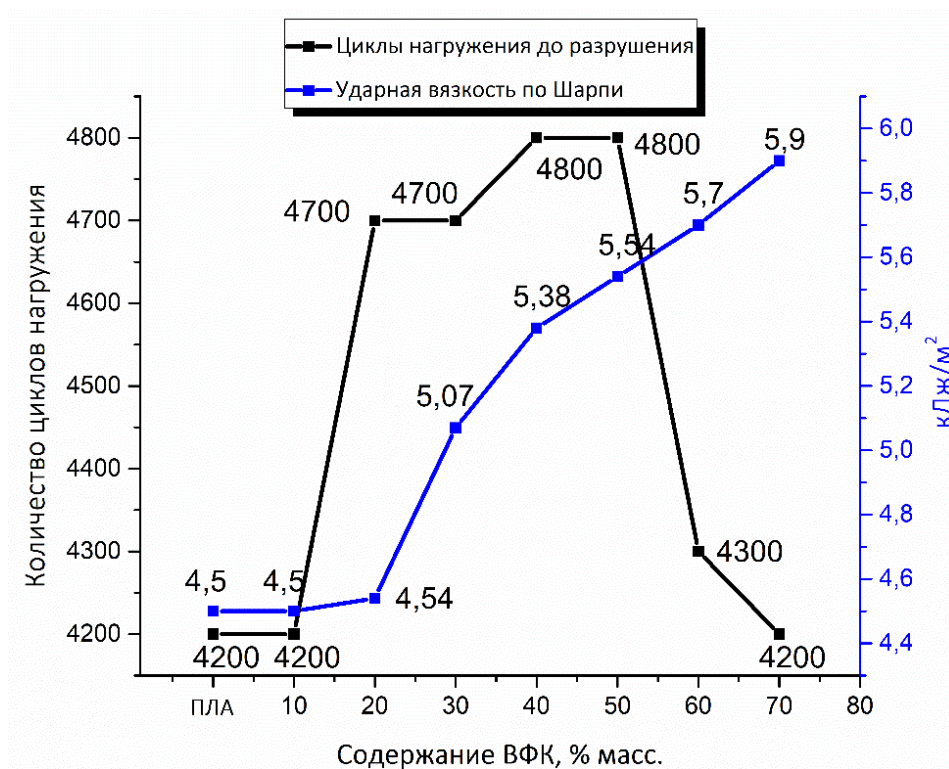


Рисунок 4.4. Механические характеристики исследуемых композитов, содержащих ВФК от 10 до 70%, в сравнении с чистым полилактидом.

Таблица 4.2. Сравнительные прочностные показатели кости и разработанных материалов.

Материал	$\sigma_{\text{сжатия}},$ МПа	$\sigma_{\text{изгиб}},$ МПа	Ударная вязкость, кДж/м ²	Плотность $\rho,$ г/см ³
Губчатая кость [1]	10-40	32-42	3,4-5,4	0,05-1
Кортикальная кость[1]	69-151	65-100	10-12	1,99-2,01
Композит 50% ВФК	60	42	5,54	1,89
Композит 60% ВФК	61	43	5,7	1,92
Композит 70% ВФК	61	42	5,9	1,99

4.2. Исследование физико-химических процессов при термообработке КОМПОЗИТОВ

Как было ранее отмечено, процедура приготовления композита предусматривает термообработку, что также имеет место в 3D-печати.

В связи с тем, что процесс получения композита связан с термообработкой и присутствием термопластичного полимера в связке с органическим пластификатором, методом ДСК изучены физико-химические процессы при нагревании до 300°C модельных композитов, содержащих 70% минеральной фазы (рисунки 4.5 и 4.6). В первом случае содержание моноклинной фазы ГАП, превышало 60% (образец 2-5 из таблицы 3.2), во втором случае композит не содержал моноклинной фазы ГАП (образец 2-6 из таблицы 3.2).

Первый пик на диаграммах соответствует диапазону стеклования от 50 до 100°C, второй пик соответствует деградации полилактида и конденсации лактида. При сравнении двух диаграмм (рисунок 4.5 и 4.6) виден пик от 210 до 220 °C, который соответствует переходу моноклинной фазы ГАП в гексагональную. Это подтверждается как проведенным сравнительным РФА анализом образцов композита, содержащих 70% минеральной фазы до и после нагрева 230°C с выдерживанием в течение 1 часа (рисунок 4.7), так и литературными данными [55, 125-127, 244]. В соответствии с калориметрическим расчетом площадь пика и его

ширина не соответствует содержанию моноклинного ГАП в композите, из чего можно предположить, что энергия затрачивается на протекание иных превращений.

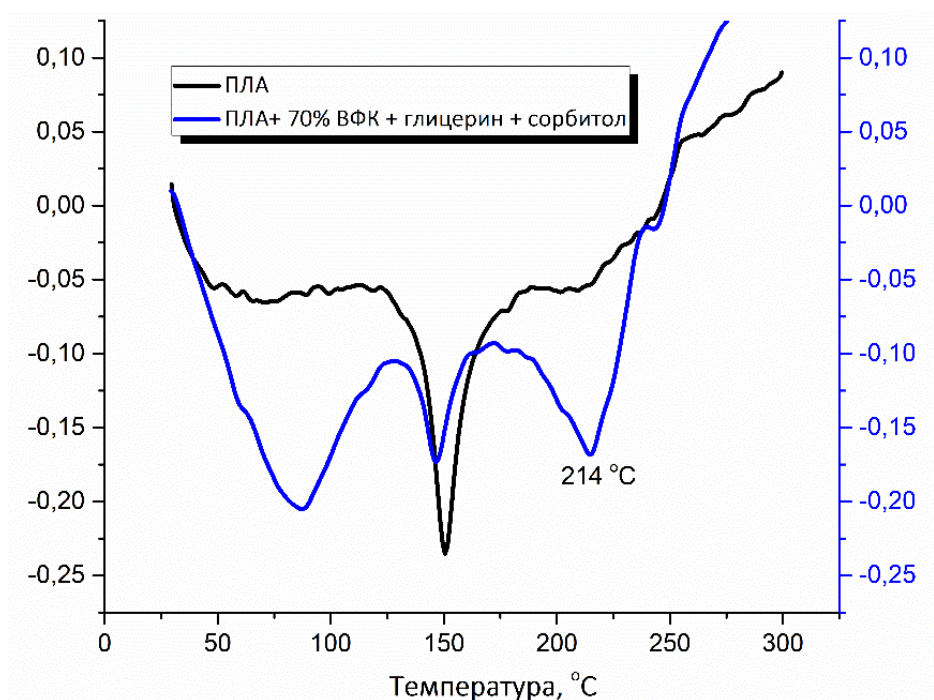


Рисунок 4.5. Сравнительные ДСК кривые полилактида и образца, содержащего моноклинный гидроксиапатит.

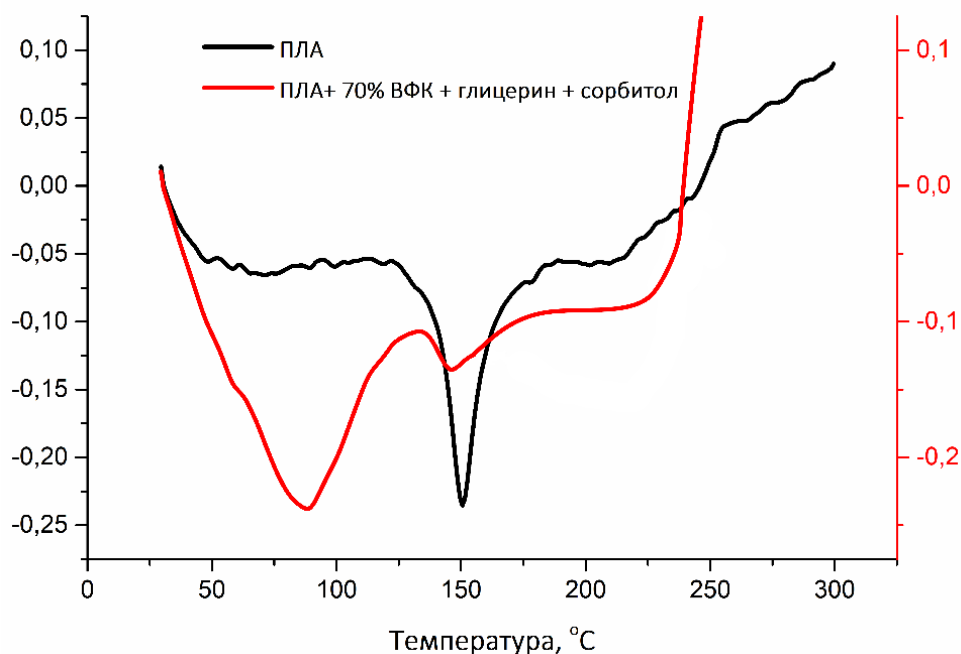


Рисунок 4.6. Сравнительные ДСК кривые полилактида и образца, содержащего гексагональный гидроксиапатит, обожжённый при 800°С.

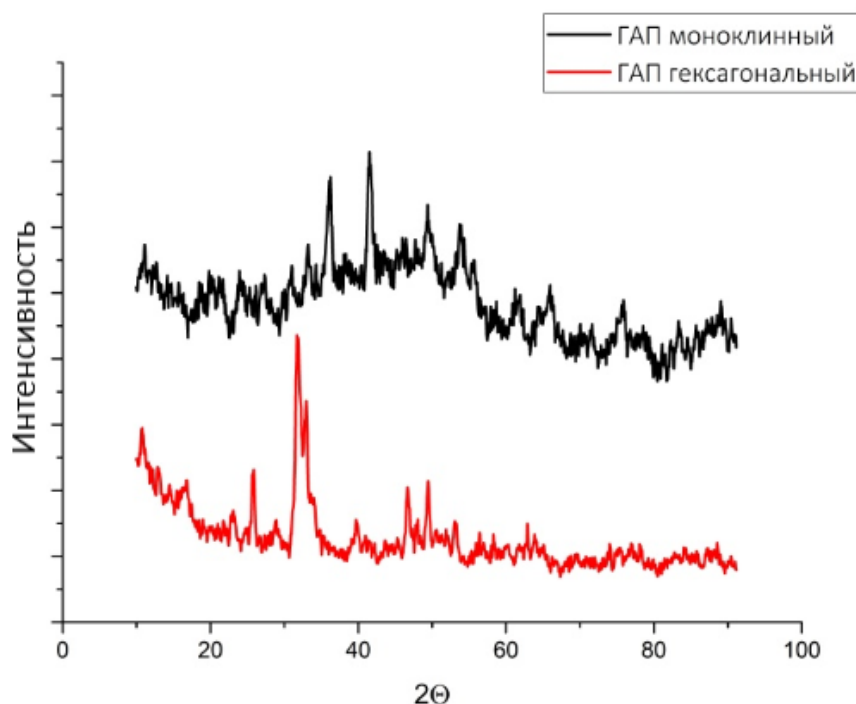


Рисунок 4.7. Дифрактограммы композита полилактид + 70% фосфатов кальция до (черный, сверху) и после термообработки 230°C (красный, снизу)

На рисунке 4.8. представлена сравнительная ИК-спектрограмма образцов чистого ПЛА, ВФК, композита, содержащего 50% ВФК, 40% ПЛА и 10% глицерина, а также для сравнения состав ПЛА + 10% глицерина. Как видно из рисунка основные характерные пики ГАП (PO_3^{4-} , OH^-), который преимущественно содержится в ВФК, и ПЛА (C-O , C-H) появились в композите ПЛА+ВФК. В композите вибрация связи C=O чистого ПЛА при 1761 см^{-1} сместилась до 1767 см^{-1} . Это движение может быть связано с образованием водородной связи между OH гидроксиапатита и C=O полилактида. Полосы $2880\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ (растяжение) и $1360\text{--}1460\text{ см}^{-1}$ (деформационные) принадлежат связи C-H в группах $\text{—CH}_2\text{—}$ и —CH_3 в мономерах молочной кислоты и в глицерине. Полосы при $1050\text{--}1270\text{ см}^{-1}$ (растяжение) принадлежали связи C-O сложноэфирной группы и полосы $870\text{--}930\text{ см}^{-1}$ свободной карбоксильной группы (на конце цепи олигомера), не прореагировавшей с глицерином [245]. Полосы при $1640\text{--}1760\text{ см}^{-1}$ (растяжение) принадлежали связи C=O сложноэфирной группы между мономерами молочной кислоты или молочной кислоты и глицерина. Однако, эта связь не проявилась в составе ПЛА и 10% глицерина. По всей видимости, гидроксиапатит выступает как

слабый катализатор реакции поликонденсации между глицерином и полилактидом в композите. Также колебания группы $-\text{OH}$, которая соответствовала бы многоатомным спиртам и гидроксиапатиту, существенно меньше в сравнении с чистым ГАП, из чего можно сделать вывод, что образовался лактат глицерина.

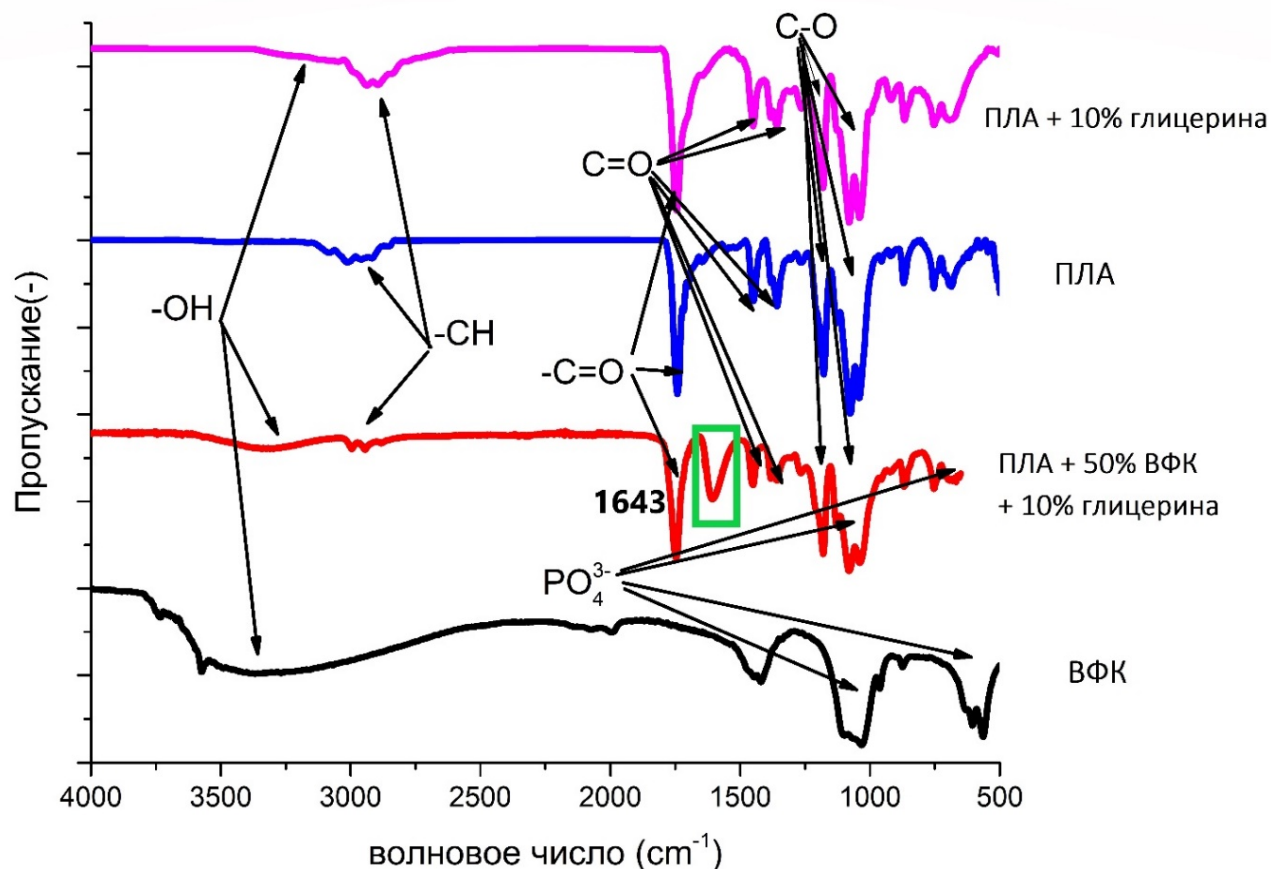


Рисунок 4.8. Сравнительные ИК-Фурье диаграммы полилактида; высокодисперсных фосфатов кальция; композита, содержащего полилактид + 50% высокодисперсные фосфаты кальция + 10% глицерина; и композита полилактид + 10% глицерина.

Таким образом в ходе взаимодействия между глицерином и полилактидом в композите под действием ВФК образуется полиоловый эфир глицерина и полимолочной кислоты (лактат глицерина) по реакции приведенной на рисунке 4.9.

Для оценки влияния глицерина на поведение ПЛА при нагревании, что важно во время экструзии для получения филамента и во время 3D-печати было проведен синхронный термический анализ композитов полилактида, содержащих от 10 до 70% ВФК и от 1 до 10% глицерина.

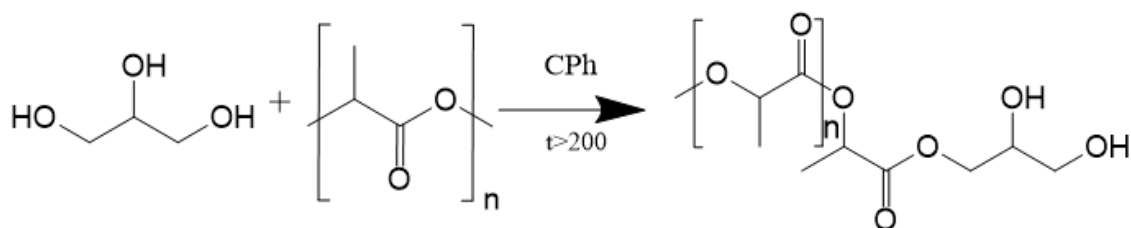


Рисунок 4.9. Схема реакции между глицерином и полилактидом под действием кальциевых фосфатов.

В таблице 4.3 приведены данные синхронного термического анализа с измерением потери массы для образцов композита ПЛА, содержащих 10, 20, 40, 50, 60, 70% масс. высокодисперсных фосфатов кальция (ВФК).

Таблица 4.3. Потери массы композиционных материалов по данным СТА.

№	Содержание , масс%		25-120 °С		120-220 °С		220-260 °С		Общие потери, при 300 °С, %
	ФК	Глицерин	ПЛА T _g , °С	Потери, %	L-ПЛА T _{cond} , °С	Потери, %	Temp., °С	Потери, %	
1	0	0	60-90	0	150,6	0,2	260	0,1	0,58
2	0	5	60-90	0	147,3	2,68	191	2,64	5,22
3	0	10	60-90	0	148,3	3,19	183,1	5,54	10,57
4	10	1	60-94	0	149,5	3,82	213,8	1,1	1,92
5	20	3	60-90	0	147,2	1,26	210	1,21	3,12
6	40	4	40-90	2,15	146,2	1,23	191,3	6,8	3,71
7	50	5	60-90	3,16	146,2	1,42	184,6	4,05	2,51
8	60	6	60-90	3,25	146,8	1,06	202	3,02	2,83
9	70	7	60-90	3,95	146,6	0,76	214,6	3,68	2,86

Как видно из таблицы, введение глицерина в чистый ПЛА оказывает влияние на температуру конденсации L-лактида (T_{cond}) и температуру начала деградации PLA в диапазоне температур 220-260 °С. Площадь пика, связанная с разложением лактида (мономера), тем больше, чем выше его содержание. Такой эффект связан с тем, что глицерин и лактид при нагревании могут образовывать сомономеры, которые при дальнейшем нагревании выше температуры 220 °С легко разлагаются с выделением молочной кислоты. Этот тепловой эффект идентичен с точки зрения температурного диапазона с эффектом разложения лактида до молочной кислоты [181, 186, 187, 241]. Однако при совместном введении глицерина с фосфатами

кальция такой эффект становится маловыраженным, как было выше описано ввиду образования лактат глицерина.

При введении фосфатов кальция совместно с глицерином в ПЛА диапазон стеклования практически не меняется, однако при введении свыше 15% кальциевых фосфатов наблюдаются потери по массе в композите до 90 °С. Этот эффект, скорее всего, обусловлен гигроскопичностью минеральной части композита, где при температуре до 120 °С происходит удаление воды. Введение фосфатов кальция влияет на деградацию ПЛА, что подтверждается другими исследователями [181, 246].

Как видно из таблицы 4.3, все образцы, содержащие ВФК, имеют пик разложения лактида ниже, чем чистый ПЛА. Это обусловлено тем, что при нагревании до 170 °С лактиды и низкомолекулярные полилактиды могли сшиться с глицерином и гидроксиапатитом, и это объясняет малые потери по массе при нагревании выше 230 °С, по сравнению с образцами 2 и 3, где потери соизмеримы с количеством введенного глицерина.

Как было выше замечено, по данным ДТА при нагревании свыше 210 °С в композитах, содержащих ВФК и глицерин, происходит образование новых связей, что приводит к упрочнению матрицы композита. Это предположение подтверждается данными механических испытаний на сжатие и изгиб полученных композиционных образцов (таблица 4.2 и рисунки 4.3 и 4.4.).

4.3. Исследование поверхностной активности разработанных композиционных материалов.

Реакция организма на вводимый материал определяется комплексом физико-химических и биохимических процессов, протекающих в период имплантации между материалом имплантата и биохимическими жидкостями организма. Первичное взаимодействие происходит на поверхности имплантата и на первом этапе в большей степени определяется явлением смачивания поверхности имплантата биологическими жидкостями.

С целью оценки влияния содержания фосфатов кальция на смачиваемость поверхности композитов, исследована зависимость краевого угла смачивания физиологическим раствором композитов в диапазоне исследуемых составов.

На рисунке 4.10 приведена характеристика угла смачивания исследуемых композитов в сравнении с ПЛА и керамикой на основе ГАП.

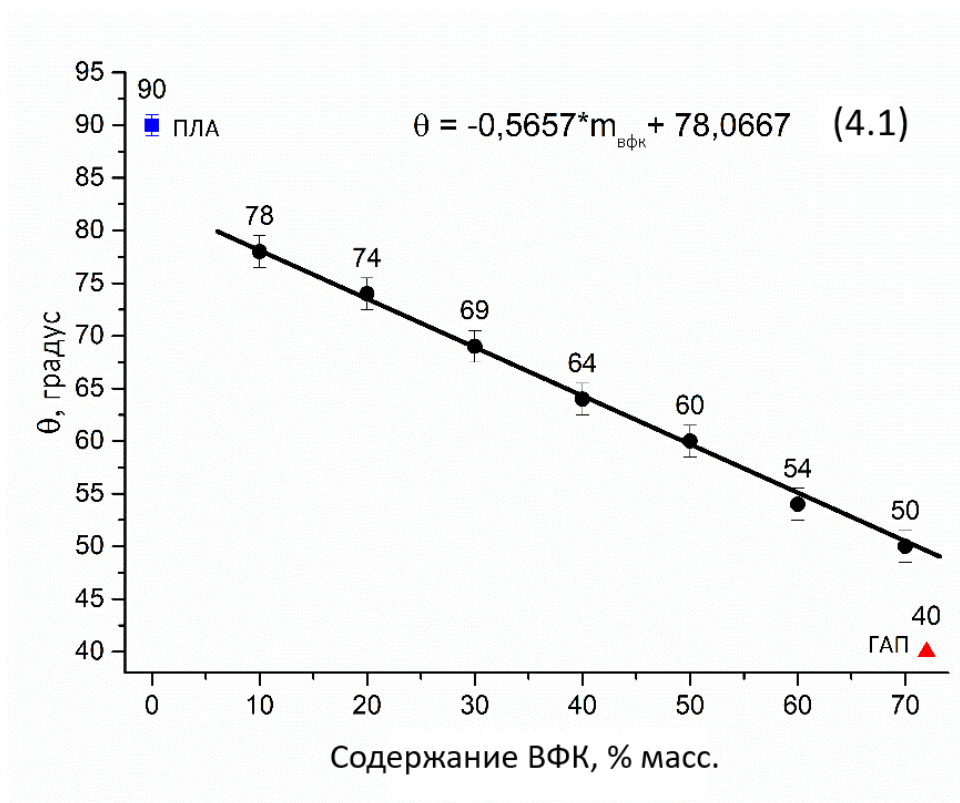


Рисунок 4.10. Краевой угол смачивания композитов изотоническим раствором при различном содержании высокодисперсных фосфатов кальция.

Известна плохая смачиваемость чистого ПЛА ($92-90^\circ$) [228] физиологическими жидкостями, что, как правило, приводит к воспалительным процессам и вызывает необходимость их подавления. Введение ВФК в ПЛА, как видно из рисунка 4.9, приводит к уменьшению краевого угла смачивания до 50° . Зависимость краевого угла смачивания от содержания ВФК в композите линейна и выражается уравнением (4.1) (на рисунке 4.10), полученным с помощью математической аппроксимации экспериментальных данных. Как видно из таблицы в сопоставлении с прочностными характеристиками губчатой кости композит показывает хорошую перспективу использования при содержании ФК

выше 50%. Также плотность таких материалов сопоставима с плотностью самой кости.

Выводы по четвертой главе.

1. Разработанные композиционные материалы на основе полилактида с содержанием высокодисперсных фосфатов кальция от 10 до 70% обладают химической однородностью за счет введения глицерина и сорбитола суммарной концентрации от 1,5 и до 7,5%.

2. Механические характеристики композитов увеличиваются при содержании высокодисперсных фосфатов кальция от 10 до 60%: предел прочности при сжатии от 50 до 61 МПа, предел прочности при изгибе от 32 до 43 МПа, ударная вязкость от 4,4 до 5,9 кДж/м², число циклов нагружения от 4200 до 4800. Увеличение содержания до 70% увеличивает ударную вязкость до 5,9 кДж/м²; предел прочности при сжатии и изгибе и циклы нагружения уменьшаются при содержании ВФК более 60%

3. Введение высокодисперсных фосфатов кальция в количестве до 70% уменьшает краевой угол смачивания композитов до 50°. Зависимость краевого угла смачивания от содержания высокодисперсных фосфатов кальция в композите носит линейный характер и выражается выражением $\theta = -0,5657 \cdot m_{\text{вфк}} + 78,0667$.

4. При нагревании композитов от 25 до 230 °С в компонентах композита происходит структурная перестройка, соответствующая:

- процессу стеклования полилактида в диапазоне температур 60-90 °С,
- конденсации лактида в диапазоне температур 100-160 °С,
- полиморфному переходу ГАП из моноклинной в гексагональную модификацию в диапазоне температур 200-230 °С

5. Комплексом методов ДТА и ИК-спектроскопии установлено образование новых атомных групп с участием полилактида и глицерина, которые могут указывать на переход от линейной структуры полимера к пространственной.

6. Новая слабодозрешенная полоса на ИК-спектре (1645 см⁻¹) композита, нехарактерная для отдельных компонентов композита, может быть обусловлена

образованием полиолового эфира глицерина и полилактида. Анализ ИК-Фурье диаграмм указывает на вероятность образования водородной связи между –ОН группой гидроксипатита и группой –C=O полилактида. Предположительно, это взаимодействие вносит вклад в увеличение механических характеристик композитов при увеличении содержания ВФК.

7. Композиты, содержащие 50-70% фосфатов кальция, представленные гидроксипатитом - 65%, трикальциевым фосфатом – 15%, карбонат замещенным гидроксипатитом 10% и аморфными фосфатами кальция до 10%, характеризуются сопоставимыми с натуральной губчатой кости механическими свойствами и могут быть рекомендованы для использования в восстановительной медицине

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ОСНОВ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗДЕЛИЙ ИЗ КОМПОЗИТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ 3D-ПЕЧАТИ

В основу разработки технологии получения изделий из композитов с применением 3D-печати положены экспериментальные данные по исследованию химического состава композиционных материалов из синтезированных ВФК и полилактида, данные исследования физико-химических процессов в композициях при нагревании, а также изложенные ниже результаты экспериментов по изготовлению нити для 3D-печати (филамента).

5.1. Получение композиционной нити

Для приготовления композиционных филаментов использовались ВФК из таблицы 3.1. под шифром 2-5, содержащие моноклинный ГАП – 61%, гексагональный ГАП - 8%, карбонат замещенный ГАП – 6%, ТКФ – 15% и аморфный ГАП – 10%. Из данных по размеру частиц (глава 3 раздел 3.3) видно, что минеральная фаза содержит нанодисперсию. Увеличение нанодисперсии приводит к увеличению площади поверхности порошка, который необходимо смачивать жидким полимером. Наличие несмоченного порошка может привести к образованию локального недостатка связующего и, соответственно, к пористости и неоднородности сырья.

Анализ композитов методом ДСК представлен на рисунке 5.2. Исследовался композит под шифром 6 (таблица 4.1.), содержащий 50% ВФК, 2,5% глицерина и 1,25% сорбитола. Композит нагревался несколько раз до температуры 230 °С (до температуры начала потери массы).

Как видно из рисунка 5.1. при нагревании в первый раз композит имеет два выраженных эндотермических пика на 87 °С и 225°С, который как выше отмечено, соответствуют стеклованию ПЛА и поликонденсации ПЛА с глицерином. При нагревании второй раз (синяя кривая) пики стеклования и поликонденсации смещаются в низкотемпературные зоны: 74 °С и 217 °С соответственно. Одновременно уменьшается площадь эндотермических пиков. При третьем

нагревании (фиолетовая кривая) происходит уменьшение пика стеклования, а пик поликонденсации смещается к температуре 190 °С. При четвертом нагревании кривая практически не изменена от кривой третьего нагрева. Эти результаты использованы для выбора температуры и режимов получения филамента и 3D-печати.

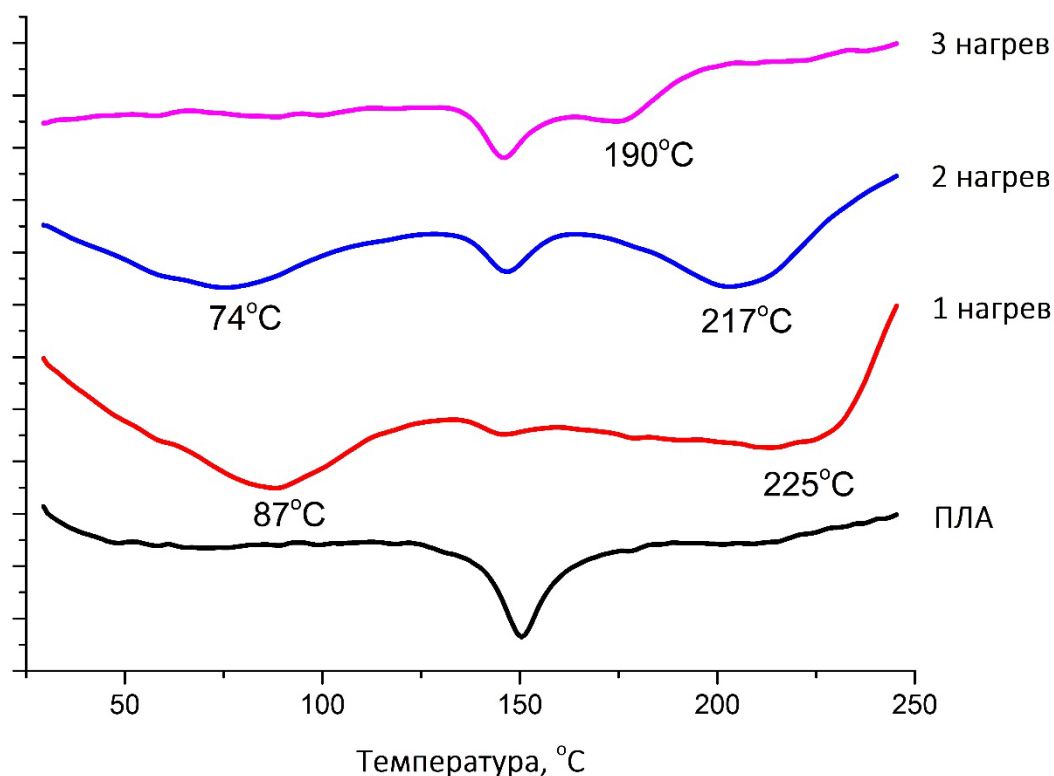


Рисунок 5.1. ДСК- кривые композита, содержащего 50% высокодисперсных фосфатов кальция (ВФК) в разные циклы нагревания в сравнении с чистым полилактидом.

Перед переработкой композита на шнековом экструдере и получения из него филамента, полученная композиционная пленка подвергалась измельчению до частиц со средним размером 2 мм. Особенностью используемого экструдера является отдельная зона транспортировки-уплотнения материала и нагрева (рисунок 5.2), что обеспечивает равномерную подачу и отсутствие захваченных газов в материале. Температура экструзии для получения филамента варьировалась от 160 °С до 170 °С в зависимости от состава, для обеспечения полужёсткой

экструзии. Температура выбрана исходя из показателей температуры конденсации и поликонденсации (рисунок 5.1.).

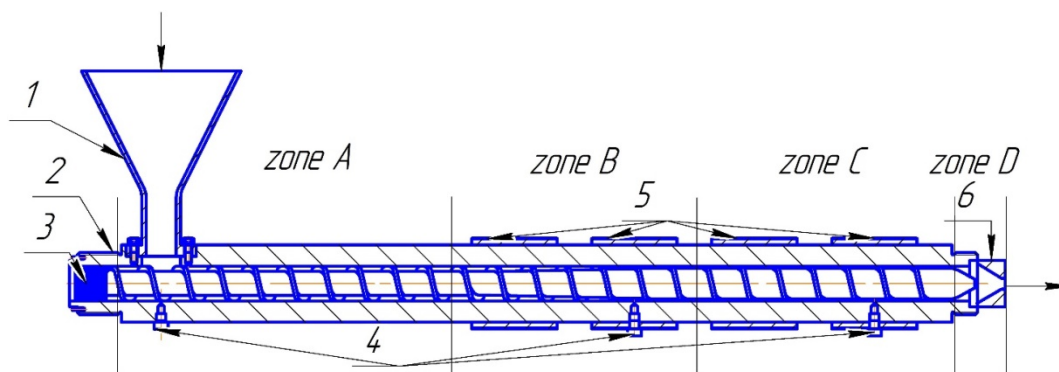


Рисунок 5.2. Экструдер для получения филамента. Zone A – зона подачи и транспортировки, zone B – зона пластификации, zone C – зона выталкивания, zone D – зона формования. 1-бункер, 2-корпус, 3-шнек, 4-термодатчики, 5- кольцевой нагреватель, 6-формующая головка.

Для каждого композита опытным путем определена температура начала пластификации и показатель текучести расплава при этой температуре и температуре 220 °C при нагрузке 25Н (таблица 5.1.). Полученные данные использовались для подбора режимов экструдирования и 3D-печати. Как видно из таблицы, при введении ВФК от 10 до 70% в композит наряду с глицерином и сорбитолом, возрастает температура начала пластификации и уменьшается текучесть расплава при этой температуре на от $10,4 \pm 0,5$ до $9,7 \pm 0,5$ см³/10мин (примерно на 7%). Однако, при дальнейшем повышении температуры до 220 °C у композитов, содержащих ВФК более 50%, вместо ожидаемого уменьшения вязкости (увеличения показателя текучести) происходит ее увеличение до показателя $8,7 \pm 0,5$ см³. Отсюда следует вывод, что при получении филамента для его равномерной и более легкой экструзии необходимо использовать температуру близкую к температуре начала пластификации. Этот эффект объясняется, по всей видимости, описанным процессом поликонденсации при повышенной температуре.

Таблица 5.1. Термические характеристики разработанных композитов

№	ВФК, масс. %	ПЛА, масс. %	Сорбит ол, масс. %	Глицерин, масс. %	Температура начала пластификации, $T_{\text{пласт.}}^{\circ}\text{C}$	Показатель текучести расплава при $T_{\text{пласт.}}$, $\text{см}^3/10\text{мин}$	Показатель текучести расплава при $T=220^{\circ}\text{C}$, $\text{см}^3/10\text{мин}$
1	0	100	0	0	170	$11,7\pm 0,5$	$15,7\pm 0,5$
2	10	88,50	0,50	1,00	170	$10,4\pm 0,5$	$10,4\pm 0,5$
3	20	78,20	0,60	1,20	172	$10,6\pm 0,5$	$10,2\pm 0,5$
4	30	67,75	0,75	1,50	175	$10,5\pm 0,5$	$10,4\pm 0,5$
5	40	57,15	0,95	1,90	176	$10,5\pm 0,5$	$10,1\pm 0,5$
6	50	46,25	1,25	2,50	178	$9,7\pm 0,5$	$9,7\pm 0,5$
7	60	34,75	1,75	3,50	180	$9,6\pm 0,5$	$9,1\pm 0,5$
8	70	22,50	2,5	5,00	182	$9,7\pm 0,5$	$8,7\pm 0,5$

Важным условием точной печати является постоянство диаметра филамента. Известно, что под воздействием адсорбированной воды ПЛА подвергается деградации в интервале температур плавления [227, 243, 247, 248]. На рисунке 5.3 приведены кривые синхронного термического анализа композита с содержанием ВФК 30%. На кривой ДТА имеются 3 эффекта. При нагревании ПЛА до 50 °C (1) происходит его стеклование, в интервале 140-147 °C (2) наблюдается конденсация L-лактида, а при 152-156 °C (3) разложение мономера L-лактида с образованием летучих продуктов [248]. Кривая ТГ показывает потери веса в 10%, которые обусловлены удалением продуктов разложения (до 5%) и воды [243, 247, 248].

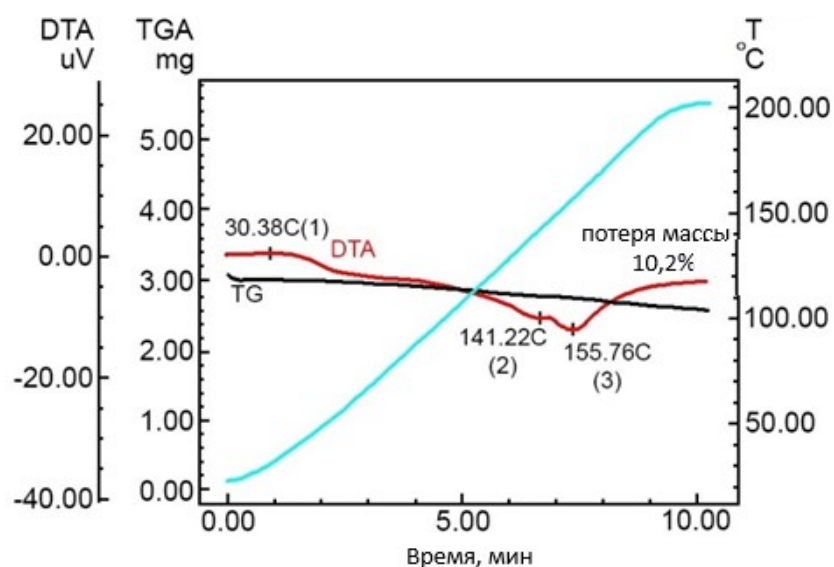


Рисунок 5.3. Результаты синхронного термического анализа композита, содержащего 30% ВФК без сушки компонентов.

При плавлении композита в экструдере (режим соответствует приведенному на рисунке 5.3) в зоне пластификации (В) продукты разложения и остаточная вода образуют распределенную газовую фазу. В этой зоне газы находятся под давлением и переходят в зону выталкивания (С), где может происходить дополнительное образование газовой фазы. Если выделяемое количество газовой фазы не превышает 10%, то процесс выхода композита из зоны формования (D) остается стабильным, а отклонение диаметра филамента не превышает 1%. Если количество выделяемой газовой фазы превышает 10%, то происходит локальное увеличение диаметра на отдельных участках филамента, что приводит к дефектам печати (рисунок 5.4).

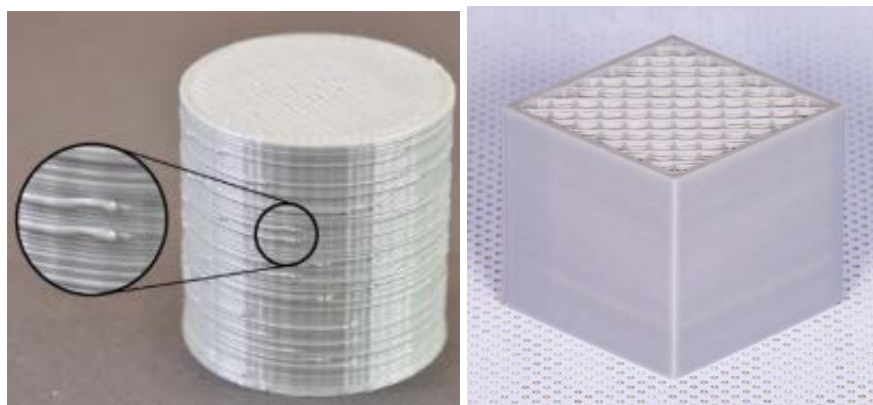


Рисунок 5.4. Пример образца, напечатанного филаментом с непостоянным диаметром (слева) и с заданным диаметром 1,75 мм (справа).

С учетом этих явлений, для минимизации содержания влаги в композите прекурсоры подвергались предварительной обработке: ВФК высушивались при температуре 100°C, ПЛА и пластификаторы подвергались обезвоживанию в вакууме. Все реагенты хранились в герметичной таре с адсорбентами влаги. Предварительная обработка позволяет уменьшить содержание летучих компонентов до 8% и получить филамент с допустимыми отклонениями в диаметре.

Температура оказывает влияние на форму филамента, так как перегрев может способствовать провисанию филамента, в результате целевой профиль окружности может деформироваться в эллиптический, что может быть отражено

среднечисленным отклонением диаметра. На рисунке 5.5 показано, что оптимальной температурой является диапазон 175-190 °С.

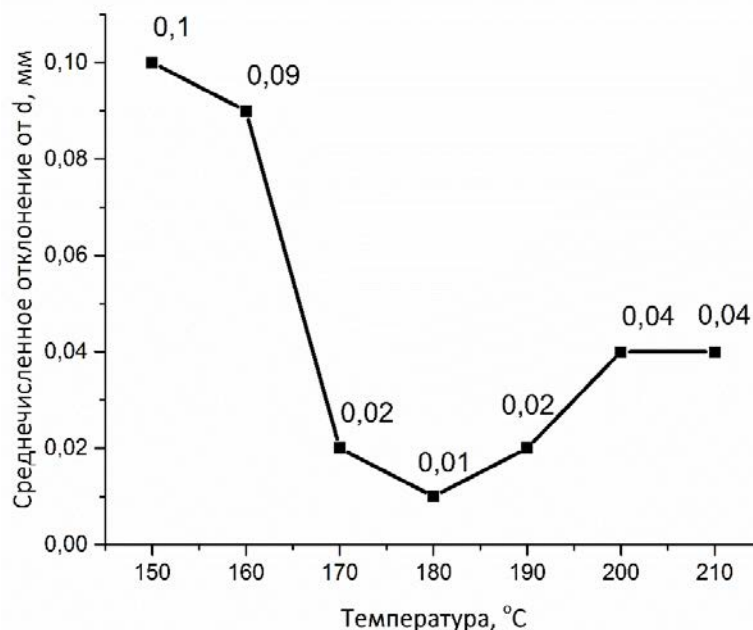


Рисунок 5.5. Зависимость среднечисленного отклонения диаметра филамента от температуры формования.

На рисунке 5.6. приведены параметры экструзии при формировании филамента из разработанных композитов.

В диапазоне температур 185-200 °С происходит устойчивая экструзия расплава композитов, отличающихся содержанием ВФК от 10 до 70%. При увеличении доли фосфатов кальция от 10 до 70 % температура экструзии увеличивается на 2-3%, на каждые 10% вводимых ВФК. Также стоит обратить внимание, что частота вращения шнека, которая влияет на давления в зоне пластификации экструдера, также увеличивается с введением ВФК на 1-2%, на каждые 10% вводимых ВФК. Как было ранее замечено, максимальной эффективной температурой при формировании филамента является 190 °С, однако при повышении содержания ВФК ввиду из повышенной теплоемкости необходимо подвести большую тепловую энергию, и также отвести ее впоследствии. Поэтому на выходе из экструдера устанавливался дополнительный воздушный обдув на расстоянии 10 мм от сопла. Обдув производился перпендикулярно потоку выхода филамента, скорость воздушного потока была не менее 50 мм/с.

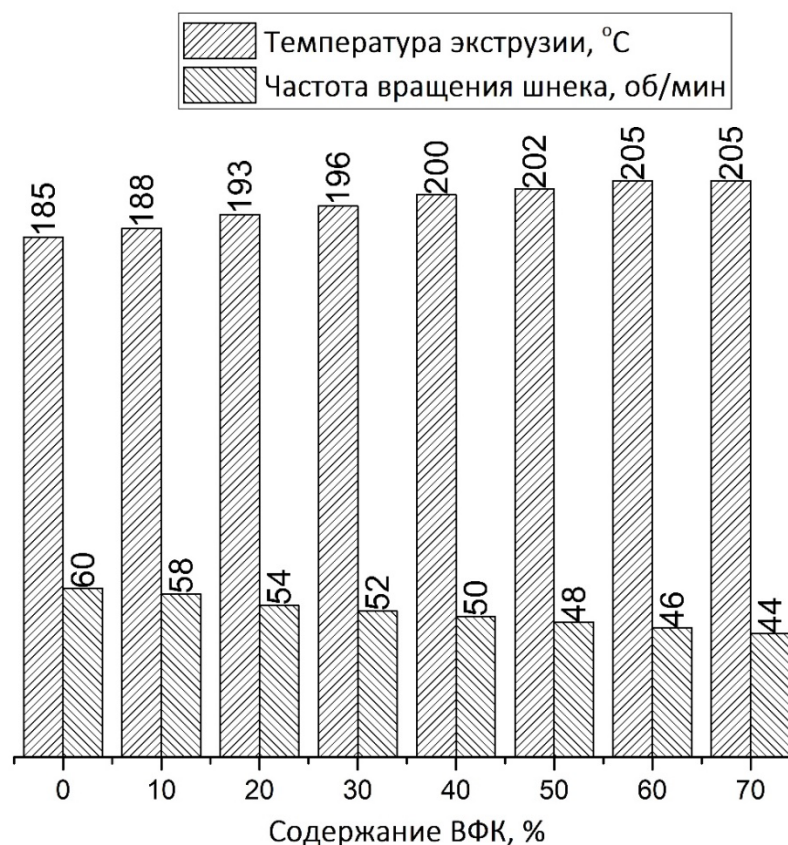


Рисунок 5.6. Параметры экструзии для получения композиционного филамента в зависимости от содержания высокодисперсных фосфатов кальция (ВФК).

В результате для каждого композита была получена непрерывная нить (филамент) диаметром $1,75 \pm 0,01$ мм на длине 10м пригодная для точной 3D-печати. После экструзии нить хранилась в герметичной таре.

5.2. Разработка режимов 3D-печати

При разработке режимов 3D-печати использовались базовые параметры 3D-печати: латунное сопло для печатной головки типа E3D-V6 с диаметром 0,5 мм; высота печатного слоя равная 0,2 мм; заполнение - 100%; паттерн заполнения – сетка, количество периметров – 1. Исследовались такие параметры как температура печати (°C), максимальная эффективная скорость печати (мм/с) и обдув модели при печати (мм/с).

Скорость печати зависит от состава, и с увеличением доли минерального компонента скорость печати уменьшается до 50 мм/с, в то время как оптимальная скорость печати чистым ПЛА составляет 80 мм/с. Это обусловлено тем, что

количество тепла, необходимое для нагревания филамента в рабочей зоне печатной головки до заданной температуры, увеличивается при увеличении минерального компонента в его составе. По этой причине время пребывания в зоне нагрева возрастает, а скорость печати уменьшается на каждые 1-3% на каждые 5% ВФК. (рисунок 5.7) Таким образом, в диапазоне температур 200-230°C обеспечивается непрерывная печать образцов, при этом образцы характеризуются регулярной укладкой филамента, равномерной каркасной структурой и соответствуют заданной геометрии [243].

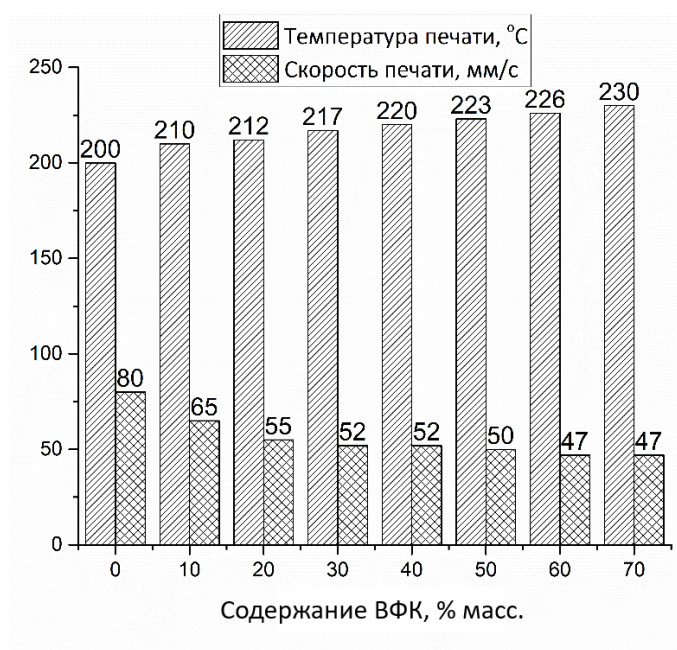


Рисунок 5.7. Основные параметры экструзии и печати композитами, содержащих высокодисперсные фосфаты кальция (ВФК).

Важной особенностью 3D-печати является возможность печатать сложные объекты. Зачастую, сложные структуры объекта печати включают расположение элементов таким образом, что некоторые ее элементы получаются нависающими. Для определения максимального угла нависания и подбора режима обдува модели была напечатана модель для каждого композита, изображенная на рисунке 5.8.

При разработанной температуре и скорости печати исследовались такие параметры как скорость обдува модели и температура печатного стола (подложки) после печати первым слоем. Известно для лучше адгезии и усадке материала ПЛА при печати необходимо печатать на подогреваемой подложке. Для стандартных

ПЛА пластиков температура подложки составляет 60-80 °С. Однако при печати маленьких элементов полимер не будет успевать остывать, и в результате деталь будет печататься с дефектами, что в конечном итоге может привести к браку изделия.

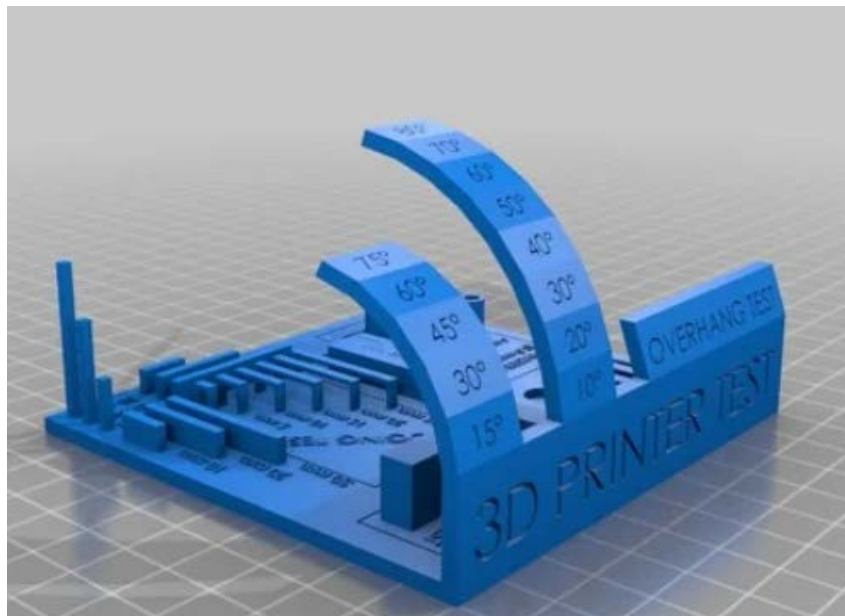


Рисунок 5.8. Фотография тестовой 3D-модели для разработки режимов печати.

В таблице 5.2. показана зависимость угла нависания от режима обдува образцов. Исследовалась скорость обдува от 10 до 100 мм/с, также рассматривался режим без обдува.

Как видно из таблицы, максимальный угол нависания при максимальном режиме обдува составляет 80°. Для композитов, содержащих от 10 до 70% ВФК угол нависания при максимальном режиме обдува (100 мм/с) составляет от 70 до 60°. Это может быть обусловлено перегревом до 230°C, который необходим для равномерной экструзии при 3D-печати. Без обдува угол нависания составляет для композитов от 10 до 70% от 45° до 20°, что соответствует практически вертикальной поверхности с минимальным отклонением. Рекомендацией при работе с композитами, содержащими свыше 50% на таких режимах может служить уменьшение высоты слоя, что может позитивно сказаться на адгезии и на более тщательном остывании более тонкого слоя материала.

Таблица 5.2. Максимальный угол нависания для композитов с различными режимами обдува.

Скорость обдува, м/с	ПЛА	Содержание ВФК в композите, % масс.						
		10	20	30	40	50	60	70
0	45	45	40	35	30	25	20	20
10	45	45	40	35	35	30	30	30
20	50	45	45	40	35	30	30	30
30	55	45	45	45	45	35	35	35
40	60	50	50	50	45	35	35	40
50	65	50	50	50	50	40	40	40
60	65	50	50	50	50	45	45	45
70	70	55	55	55	55	50	50	45
80	80	65	65	60	60	55	50	50
90	80	70	70	60	60	60	55	55
100	80	70	70	65	65	60	60	60

5.3. Механические характеристики 3D-печатных образцов

На рисунке 5.9 приведены прочностные характеристики 3D-печатных образцов, полученных при установленных параметрах печати.

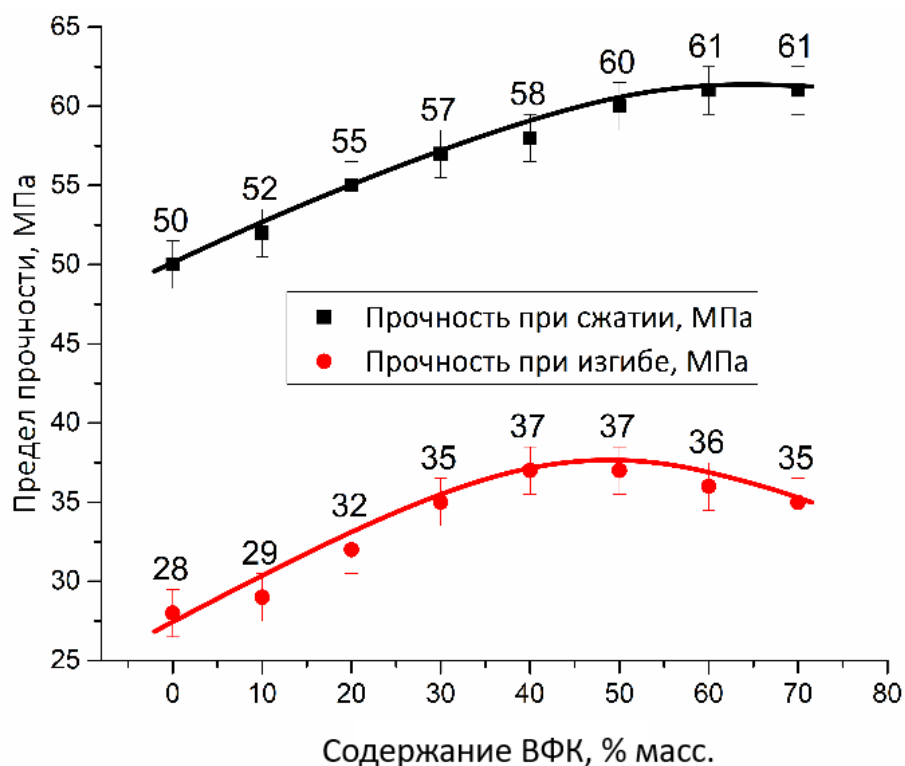


Рисунок 5.9. Механические характеристики 3D-печатных образцов

Прочность образцов из композита при сжатии и изгибе увеличивается от $50,5 \pm 1,5$ до 61 ± 2 МПа (на 10-18%) при увеличении содержания ВФК от 10 до 70%. Такие же характеристики были получены у монолитных образцов полученных инъекционным литьем. Механические характеристики 3D-печатных образцов разработанных составов (рисунок 5.10.) также соответствуют и превосходят показатели естественной кости: прочность на сжатие губчатой кости – 32-42 МПа, прочность на изгиб – 10-40 МПа, и значительно превосходят показатели кальций фосфатной керамики [15].

На рисунке 5.10 приведена технологическая схема 3D-печати изделий из разработанных композитов.

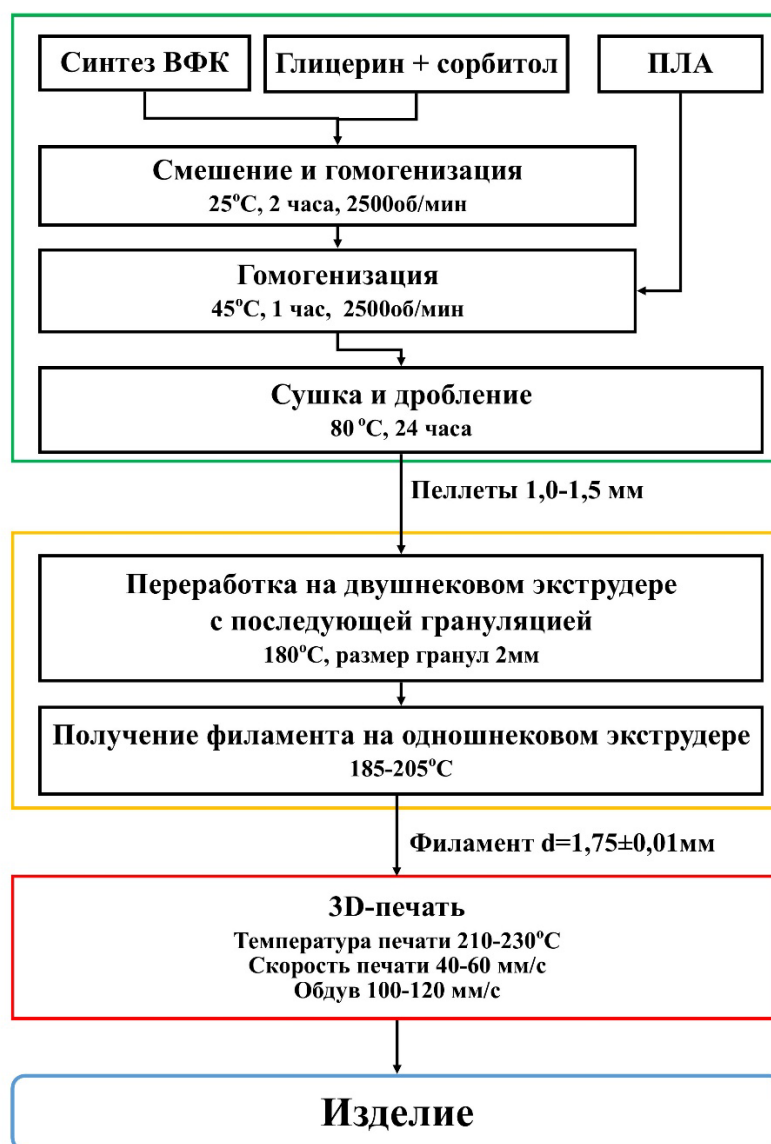


Рисунок 5.10. Технологическая схема 3D-печати изделий из разработанных КОМПОЗИТОВ.

Выводы по пятой главе.

1. Разработаны технологические основы получения изделий из разработанных композиционных биоматериалов заданной архитектуры и формы с комплексом функциональных свойств, включающие 3 блока: подготовка композиций, получение филамента, блок 3D-печати изделий.
2. Блок подготовки композиций включает обработку и смешение прекурсоров, двухступенчатую гомогенизацию сначала фосфатов кальция с глицерином и сорбитолом и после с полилактидом, сушку и дробление полученного композита и завершается получением твердых пеллетов размером 1,0-2мм.
3. Блок получения филамента включает последовательную экструзию в двушнековом экструдере при температуре 180 °С, затем в одношнековом экструдере в диапазоне температур 185-205 °С. Основным выходным параметром филамента определен его диаметр равный $1,75 \pm 0,1$ мм. Постоянство диаметра филамента обеспечивается температурой нагрева композита на выходе из экструдера. При увеличении содержания минеральной фазы в композите от 10 до 70% количество оборотов шнека при формовании увеличивается на 1-2% при каждом увеличении содержания ВФК на 10 %.
4. Для составов композитов, содержащих от 10 до 70% ВФК, определены параметры 3D-печати: температура печати 210-230°C, скорость печати 50-80 мм/с. Как при получении филамента, так и при печати температурное отклонение не должно превышать 1°C.
5. Механические характеристики 3D-печатных образцов из разработанных композитов практически не отличаются от механических характеристик образцов полученных методом литья под давлением. При введении ФК от 10 до 60%: предел прочности при сжатии от 50 до 61 МПа, предел прочности при изгибе от 28 до 37 МПа.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА БИОАКТИВНЫХ СВОЙСТВ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ

Оценка биологического поведения композитов проводилась в условиях *in vitro* и *in vivo*.

In vitro при инкубации в модельных физиологических жидкостях: фосфатном буфере PBS (phosphate-buffered saline) изучены процессы выщелачивания и растворения исследуемых композитов, а в SBF (simulate body fluid) - имитации внеклеточной жидкости тела - оценили возможность формирования костоподобного апатита на поверхности разработанных материалов.

С помощью МТТ-теста на примере линии опухолевых клеток Neuro-2a изучена цитотоксичность композитов.

Исследование остеогенного потенциала разработанных композитов проведено в эксперименте *in vivo*.

6.1. Исследования в условиях *in vitro*

Исследование проводилось на составах композитов, содержащих 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 % синтезированных высокодисперсных фосфатов кальция и полилактид (ПЛА) с добавками глицерина и сорбитола (таблица 6.1). Для сравнения влияния глицерина и сорбитола в тестах *in situ* и *in vitro* были испытаны композиты, содержащие 10, 20, 30, 40% ВФК в чистом ПЛА (таблица 6.1) и с добавками глицерина и сорбитола.

Таблица 6.1. Составы композиционных смесей, содержащие фосфаты кальция, полилактид и глицерин с сорбитолом.

№	ПЛА, %масс.	ВФК, %масс.	Сорбитол, %масс.	Глицерин, %масс.
1	90	10	-	-
2	80	20	-	-
3	70	30	-	-
4	60	40	-	-
5	88,50	10	0,50	1,00
6	78,20	20	0,60	1,20
7	67,75	30	0,75	1,50
8	57,15	40	0,95	1,90
9	46,25	50	1,25	2,50
10	34,75	60	1,75	3,50
11	22,50	70	2,5	5,00

Высвобождение кальция из исследуемых образцов измеряли в растворе фосфатного буфера (PBS) (рисунок 6.1 и 6.2). Как видно из графика на рисунке 6.1 вклад глицерина и сорбитола в высвобождение катионов кальция довольно существенен и проявляется при концентрациях ВФК в композите выше 20%. Кинетика высвобождения образцов, содержащих одинаковое количество минеральной фазы, идентична. При этом вклад в высвобождение кальция в фосфатный буфер довольно значителен: на 21 сутки концентрация катионов кальция у композитных образцов содержащих глицерин и сорбитол выше на 5-7%.

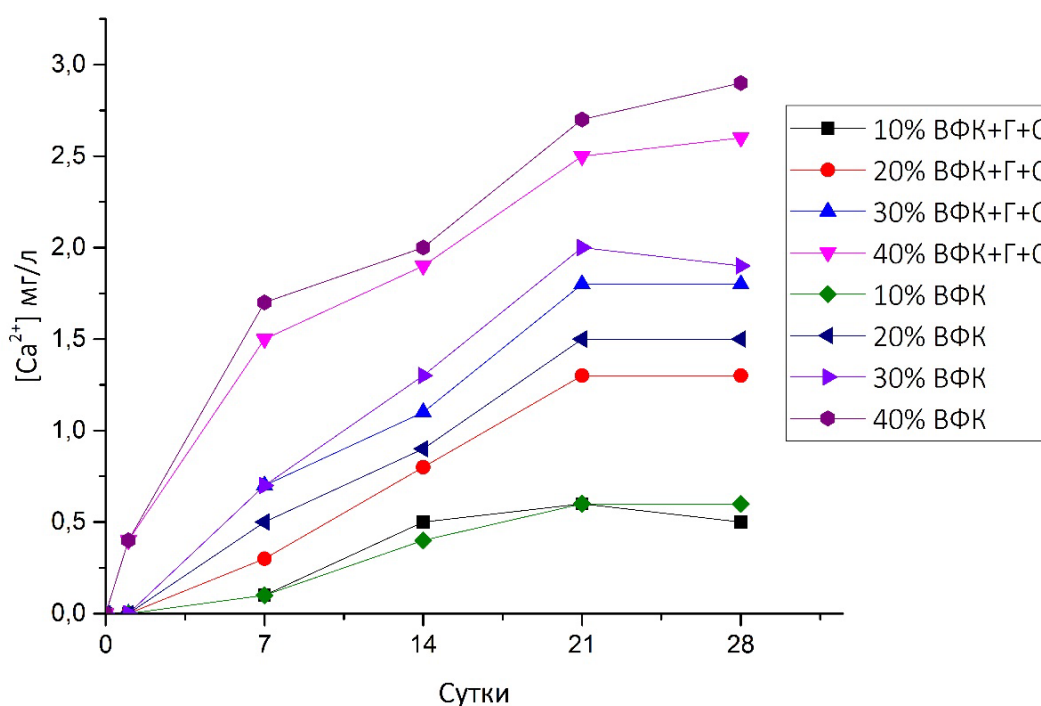


Рисунок 6.1. Динамика высвобождения кальция в фосфатном буферном растворе (PBS, pH 7,4) из образцов композитов с содержанием ВФК от 10% до 40%, содержащих и не содержащих глицерин и сорбитол.

В эксперименте *in vitro* при инкубации в фосфатном буфере все образцы показывают выраженную потерю массы и активное высвобождение катионов кальция, что показывает их способность к биорезорбции.

Из графиков 6.1 и 6.2 видно, что степень высвобождения катиона кальция из композита тем выше, чем выше содержание ВФК в образце. Повышенная скорость высвобождения кальция в PBS у композитов, содержащих выше 40% минеральной

фазы в первые 7 дней, объясняется содержанием трикальцевого фосфата, имеющего $pPP=27$ при $pH\ 4,2-8,0$, в отличие от ГАП, имеющего $pPP=58$ при том же pH . Известно, что трикальцевый фосфат в PBS преимущественно в основной своей массе растворяется в первые 14 дней, ГАП обладает стабильностью в водных средах выше, чем другие фосфаты кальция в диапазоне $pH\ 4,2-8,0$. [29, 41, 53, 76] На 21 сутки высвобождение катиона кальция приостанавливается и на 28 сутки увеличение содержания катионов кальция практически не происходит.

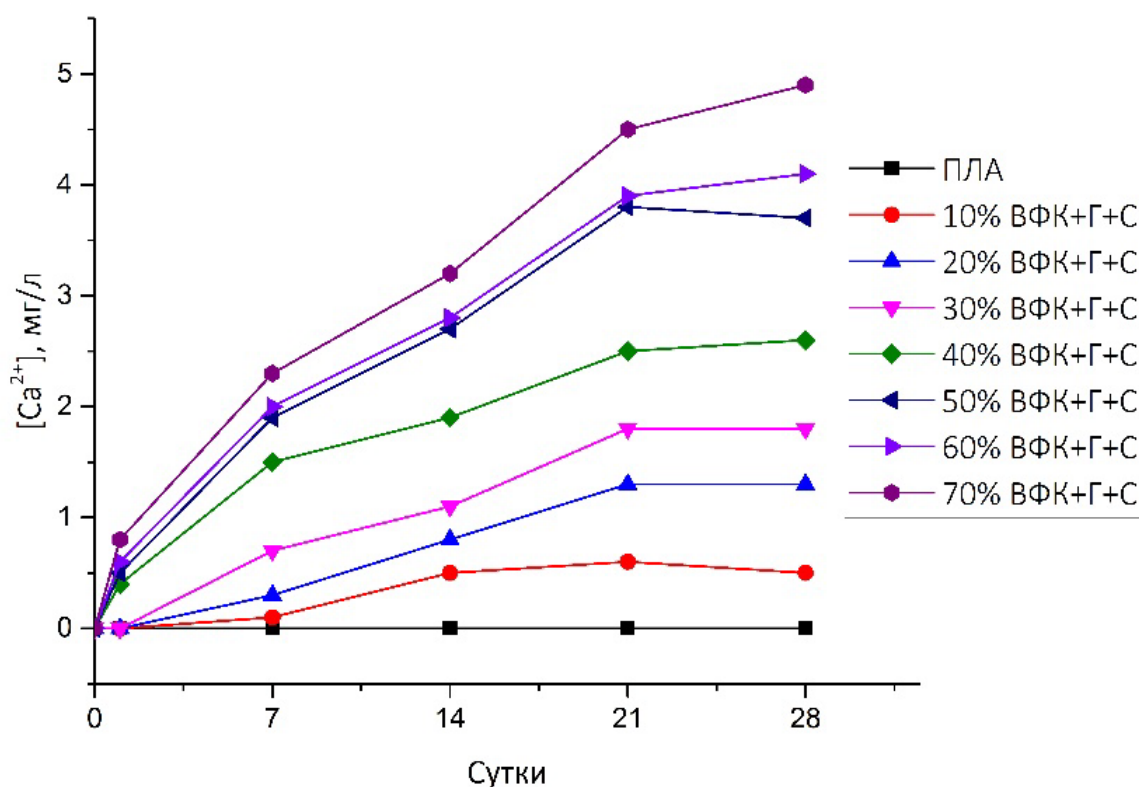


Рисунок 6.2. Динамика высвобождения кальция в фосфатном буферном растворе (PBS, $pH\ 7,4$) из образцов композитов с содержанием ВФК от 10% до 70%, содержащих глицерин и сорбитол.

Анализ изменения массы образцов композитов после выдерживания в PBS на 1,7,14,21 и 28 суток (рисунок 6.3) показывает, что содержание минеральной фазы свыше 40% оказывает существенный вклад в потерю массы у таких образцов. Потери массы составили более 15% на 28 суток. Стоит обратить внимание, что при увеличении содержания минеральной фазы, изменяется скорость изменения массы. Чистый ПЛА напротив увеличил свою массу на 28 суток на $\sim 3\%$. Данный факт

говорит о существенном влиянии фосфатов на растворение таких материалов в моделирующих жидкостях, что позволяет корректировать скорость деградации в композитах в первый и самый важный период приживания имплантата.

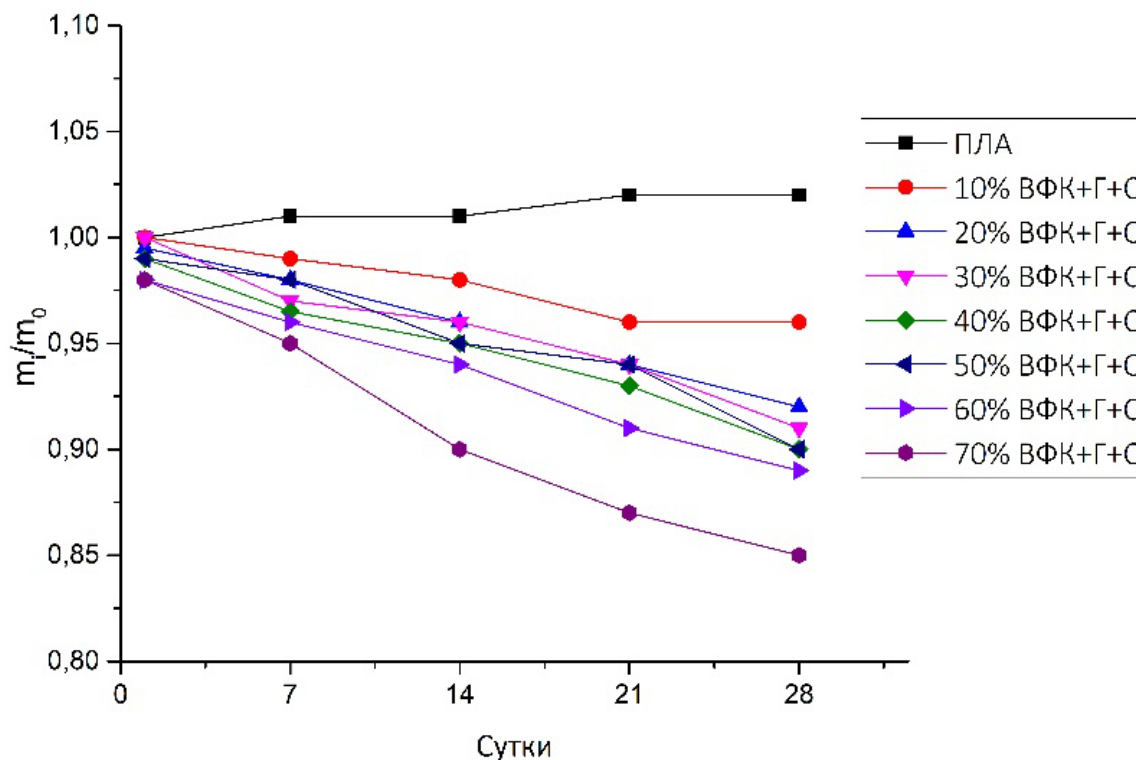


Рисунок 6.3. Изменение массы исследуемых композиционных образцов после выдерживания в растворе PBS (pH 7,4).

На рисунке 6.4. показаны СЭМ-изображения поверхности образцов из ПЛА и ПЛА/ВФК (70%) после 28 дней выдерживания в PBS. На рисунке 6.4б видны участки, свидетельствующие о вымывании минеральной фазы. Морфология поверхности чистого ПЛА существенно не изменилась по сравнению с образцом ПЛА/ВФК (50%). Напротив, ПЛА/ВФК (50%) имели неровную поверхность, обнаженные минеральные частицы и отверстия на поверхности. Помимо этого, по форме растворенных частиц можно судить о вымывании игольчатых частиц, что соответствует морфологии гексагонального ВФК. Испытания в SBF описываются как метод прогнозирования минерализации образца *in vivo* и *in vitro* [138]. На рисунке 6.5 показаны СЭМ-изображения образцов после выдерживания в SBF 28 дней. ПЛА не показал минерализацию на своей поверхности. Этот результат

демонстрирует, что ПЛА не является биологически активным материалом. Кроме того, не было отмечено различий в морфологии после инкубационного периода, что показывает, что ПЛА также не может вызывать отложение апатита из-за его гидрофобной природы. Известно, что минерализация поверхности с помощью испытаний SBF была более интенсивна на гидрофильных поверхностях.

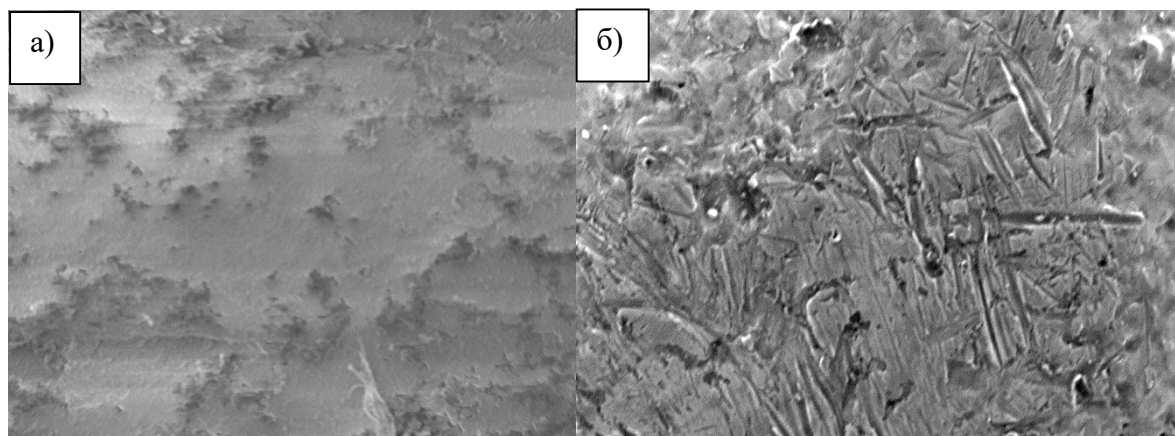


Рисунок 6.4. СЭМ-изображения поверхности образцов: а) ПЛА и б) ПЛА/ФК (50%) после 28 дней деградации в PBS.

Таким образом, получение композитов путем добавления неорганических частиц в полимерные матрицы является способом контроля их гидрофобных свойств. Отложения апатитов происходили только на биокompозитах, а не в чистых образцах из ПЛА, что указывает на критическую роль, которую фосфаты кальция играют в качестве предшественников зародышеобразования апатита.

Хотя осаждение фосфатов кальция происходило на всех композитах, содержащих минеральную фазу, глицерин и сорбитол, было отмечено, что осаждение минералов на поверхности композитов с содержанием меньше 30% ВФК, было значительно ниже. Участки либо не имели покрытия осадком, либо необильное покрытие характеризовалось низкой кристалличностью. С другой стороны, отложение апатитовых минералов наблюдалось на субстрате, имеющем содержание ФК 70%. Эти минералы состояли из пластинчатых кристаллов, что соответствует морфологии гидроксиапатита.

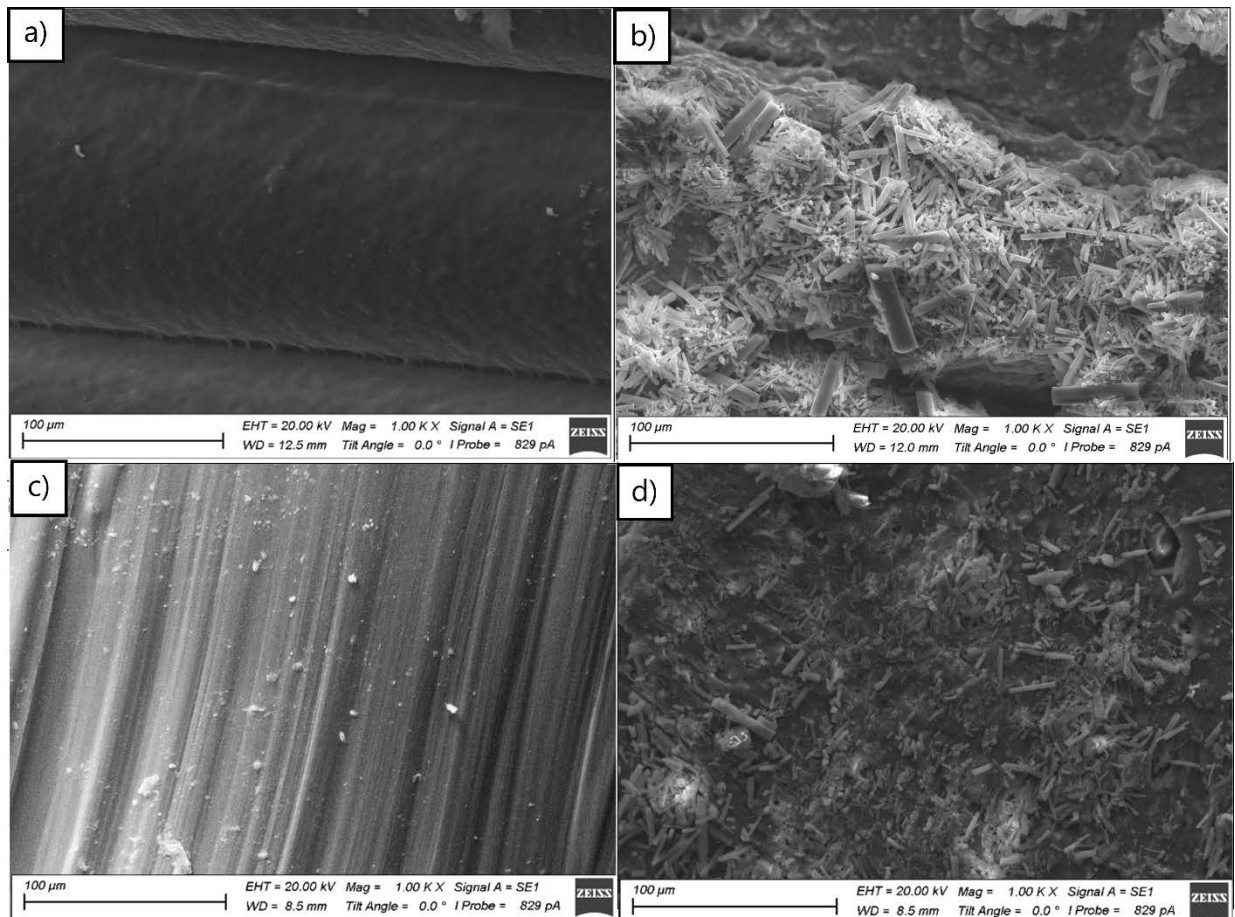


Рисунок 6.5. Микрофотографии образцов после инкубации в SBF (28 сут).

Боковая поверхность: а) - ПЛА, б) - композита (60% ФК);

верхняя поверхность: с) - ПЛА, d) - композита (60% ФК).

Как видно из рисунка 6.6 образцы композитов показали выраженный прирост массы в течение первых семи дней инкубации в SBF. У образца, содержащего 30% ВФК, прирост массы составил 5%, у образца, содержащего 70% ВФК – прирост 15%. Образцы из чистого ПЛА не показали увеличения массы в этот период. В конце 28 дней прирост массы составил: 41%, 56% и 5% для ПЛА/ФК (30%), ПЛА/ВФК (70%) и чистого ПЛА, соответственно. Таким образом, образцы, содержащие большее количество ВФК в качестве минеральной фазы, создают более богатое апатитовое покрытие. Это наблюдение согласуется с изображениями, полученными с помощью СЭМ, которые уже выявили большее минеральное отложение костного апатита на его поверхности (рисунок 6.5).

Вопреки многим литературным данным, здесь осаждение апатита выявило только раннюю стадию минерализации на поверхности субстрата ПЛА/ВФК. Этот

результат, скорее всего, связан со структурой самого комплекса фосфатов кальция, содержащегося в композите. В настоящем исследовании ГАП, полученный растворным синтезом имел большое содержание моноклинной фазы (до 12% масс.), которая способна сшивать полимер, в результате чего снижается скорость солюбилизации такого ВФК. Эта гипотеза подтверждается повышенной прочностью композитов, содержащих большое количество ВФК. Таким образом, ионы кальция и фосфора, присутствующие в растворе, накапливаются путем растворения самого ВФК, который обладает низкой скоростью солюбилизации, что приводит к медленной минерализации.

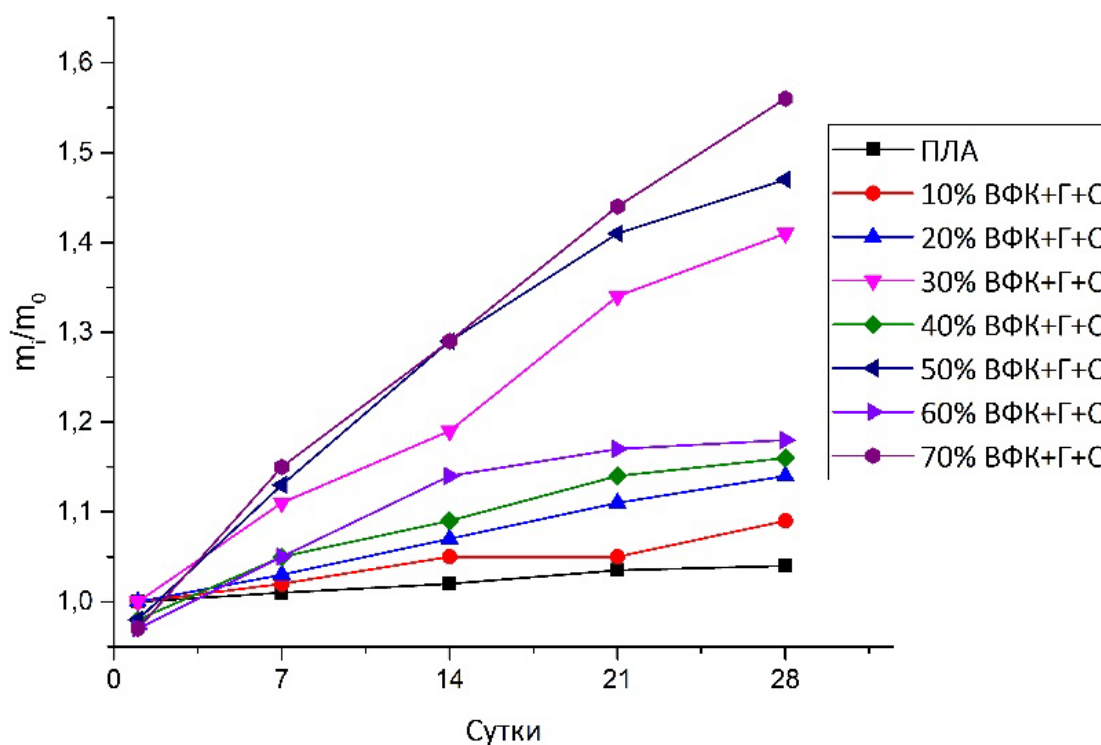


Рисунок 6.6. Изменение массы исследуемых композитов (при выдержке в SBF (pH 7,4) в сравнении с ПЛА.

Влияние пластифицирующих добавок глицерина и сорбитола также было испытано на 1,7,14,21 и 28 сутки в SBF. Как видно из графика 6.7, влияние глицерина и сорбитола минимально. Графики прироста массы практически идентичны и различаются в пределах погрешности.

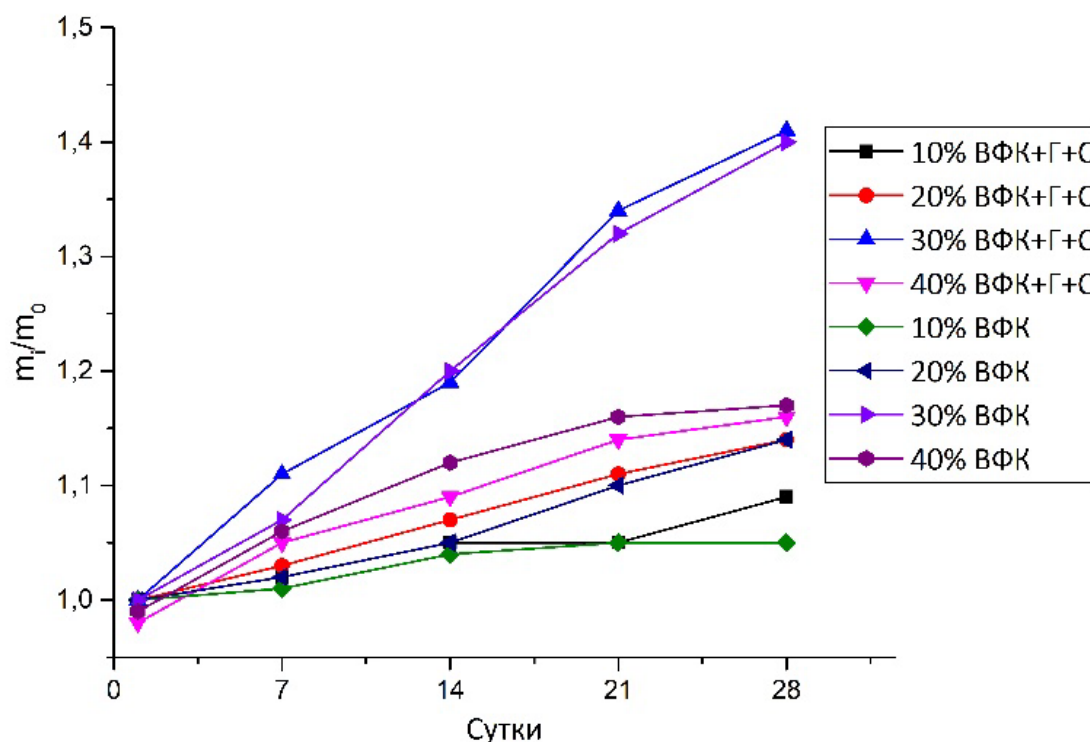


Рисунок 6.7. Изменение массы композитов (содержащих сорбитол и глицерин и не содержащих) при выдержке в SBF (pH 7,4) в сравнении с ПЛА.

Из проведенных исследований *in situ* можно сделать заключение, что влияние глицерина и сорбитола на резорбцию композитов в PBS и химическое осаждение фосфатов кальция в SBF незначительно. При увеличении содержания ВФК увеличивается скорость резорбции композитов и образования на их поверхности кальциевых фосфатов апатитовой природы.

6.2. Исследование цитотоксичности разработанных композитов

Влияние ВФК/ПЛА образцов на митохондриальную активность клеток с помощью микротитриметрического теста (МТТ-теста) было изучено на примере линии опухолевых клеток Neuro-2a. Исследования показали ($p < 0,05$, рисунок 6.8), что образцы из 100% ПЛА и содержащие 10 и 20% ВФК с глицерином и сорбитолом вызывали цитотоксическое воздействие на пролиферацию опухолевых клеток, что приводило к уменьшению количества жизнеспособных клеток (на более чем 40%) [249]. Следует отметить, что образцы, содержащие 30% и 40% ВФК без глицерина, имеют меньшее цитотоксическое действие, чем образцы,

содержащие его. Примечателен тот факт, что при увеличении содержания ВФК от 40% до 70% существенного изменения в количестве живых клеток не происходит. Это наблюдение приводит к выводу, что повышенное содержание (более 50%) не оказывает влияния на дальнейшее уменьшение цитотоксического влияния оказываемого полимерной матрицей.

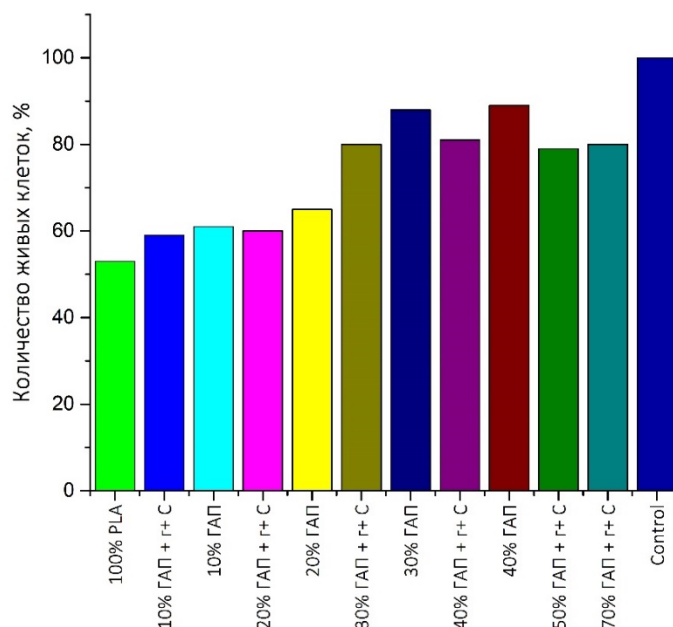


Рисунок 6.8. Пролиферация опухолевых клеток с исследуемыми образцами

Таким образом, в лабораторных условиях на культурах опухолевых клеток установлено, что все синтезированные образцы оказывают некоторый цитотоксический эффект на опухолевые клетки в зависимости от состава образца. Образцы, содержащие 30 и 40% ВФК, являются практически не токсичными для линии клеток Neuro-2a.

6.3. Исследование остеогенного потенциала композитов *in vivo*.

Для проведения испытаний *in vivo* необходимо понимание о методе стерилизации. Так как сами композиты подразумевают использование 3D-печати, где потенциальный патоген может быть запечатан в межслоевую структуру имплантата, то для метода стерилизации необходимо использование объемной стерилизации. Из потенциальных методов подходят: ионизационный метод и термическое автоклавирование. Так как термическое автоклавирование

невозможно ввиду температурного искажения формы полимерной матрицы, в качестве эффективного и потенциально безвредного метода стерилизации для самого композита было выбрано ионизирующее излучение. Известно, что гарантированной дозой стерилизации является доза ионизирующего излучения в 50-150 кГр. При более высоких дозах может наблюдаться деструкция полимерной матрицы и снижение прочности материала, а также протекание побочных ионизирующих процессов в полимере [251-253]. Облучение осуществлялось эжектируемым электронным пучком микротрона Томского политехнического университета (ТПУ) [251-253].

Как видно из таблицы 6.2 стерилизационная эффективность по отношению к метициллинрезистентному золотистому стафилококку (MRSA) как на чистом ПЛА, так и с содержанием ВФК-70% достигается уже при 20кГр. Для кишечной палочки (*E. coli*) стерилизационная эффективность в 100% достигается при дозе 50 кГр.

Таблица 6.2. Данные стерилизационной эффективности по отношению к бактериям MRSA и *E. Coli* для образцов ВФК/ПЛА 70/30 и ПЛА при различных дозах стерилизации.

Доза, кГр	Наименование образца	Жизнеспособность бактерий <i>E.coli</i> , КОЕ/мл	R, %	Жизнеспособность бактерий MRSA, КОЕ/мл	R, %
0	Контроль (PBS only)	110000±3200	–	88000±1500	–
20	Образец чистого ПЛА	120±4	99,9	0	100
20	Образец ПЛА-30%, ВФК-70%	220±4	99,8	0	100
40	Образец чистого ПЛА	30±1	99,9	0	100
40	Образец ПЛА-30%, ВФК-70%	40±1	99,9	0	100
50	Образец чистого ПЛА	0	100	0	100
50	Образец ПЛА-30%, ВФК-70%	0	100	0	100
60	Образец чистого ПЛА	0	100	0	100
60	Образец ПЛА-30%, ВФК-70%	0	100	0	100

Поэтому для дальнейших испытаний *in vivo* и *in vitro* образцы для стерилизации были подвергнуты ионизирующему излучению в 60 кГр для

гарантированного обезвреживания объема имплантируемого материала от патогенов.

Пластинки композитов размером 5 мм в диаметре и 3 мм в высоту имплантировались мышам линии BALB/c на период 45 суток в лаборатории СибГМУ (ГОСТ ISO 10993-6-2011). После имплантации не отмечено снижения массы животных, что свидетельствовало об отсутствии реакции стресс на имплантацию и системной токсичности тестируемых образцов. Напротив, животные прибавили в массе тела в среднем на 0,7-1,5 г, что соответствует возрастной динамике показателя.

Через 45 суток после подкожного введения изучаемых изделий не отмечалось макроскопических признаков острой воспалительной реакции, побочных системных реакций. Макроскопическое исследование реакции тканей показало (таблица 6.3), что в течение всего эксперимента не отмечено выраженных негативных местных тканевых реакций.

Таблица 6.3 – Тканевые и воспалительные реакции (в баллах) на экспериментальные образцы через 45 суток после имплантации

Группы образцов	Гиперемия вокруг образца	Нагноение	Прорезывание имплантата	Инкапсуляция имплантата	Число образцов, обнаруженных после вскрытия	Частота формирования тканевых пластинок, %
Группа 0 (ПЛА)	0	0	0	1	4 (из 4)	4/4 (100 %)
Группа 0-1 (ПЛА)	0	0	0	1	4(из 4)	4/4 (100 %)
Группа 1 ПЛА+ВФК	0	0	3	1,5	2 (из 4)	2/2 (100 %)
Группа 2 ПЛА+ВФК	0	0	2	1,5	3 (из 4)	3/3 (100 %)
Группа 3 ПЛА+ВФК	0	0	1	1,5	3 (из 4)	2/3 (67 %)
Группа 4 ПЛА+ВФК	0	0	0	1	4 (из 4)	4/4 (100 %)

Примечание: 0 - отсутствие реакции на имплантат, 1 - слабая реакция /прорезывание /инкапсуляция, 2 - умеренная реакция /прорезывание /инкапсуляция, 3 - выраженная реакция /прорезывание /инкапсуляция.

Таким образом, согласно макроскопическим признакам, тестируемые образцы не обладают (группы 0, 0-1, 4) или обладают слабым (группы 1,2,3) местным раздражающим действием при подкожной имплантации.

Гистологическое исследование показало формирование во всех случаях вокруг имплантата тонкой капсулы, образованной соединительной тканью, в которой тонкие пучки коллагеновых волокон были ориентированы строго параллельно поверхностям образцов. На образцах выявлен рост тканевых пластинок из сингенного костного мозга, нанесенного *in vitro*. При изучении капсулы на поверхности образцов и тканевых пластинок установлено, что возникающие на месте донорского сингенного красного костного мозга ткани относятся к соединительным тканям и представляют собой сочетание рыхлой и плотной соединительной ткани, жировую ткань, костную ткань, кроветворную ткань.

Тканевые пластинки содержат отличающиеся по размерам и архитектуре участки костной ткани, островки с каналами и лакунами, содержащими форменные элементы крови. Обнаружены участки костных структур, образованные как грубоволокнистой, так и пластинчатой костной тканью. На рисунке 6.9 представлены фрагменты типичной тканевой пластинки на образцах композитов.

Следует отметить, что на гистологических препаратах фрагменты материала самих образцов иногда включались в капсулу имплантатов (▼), что свидетельствует в пользу биорезорбции композитных образцов.

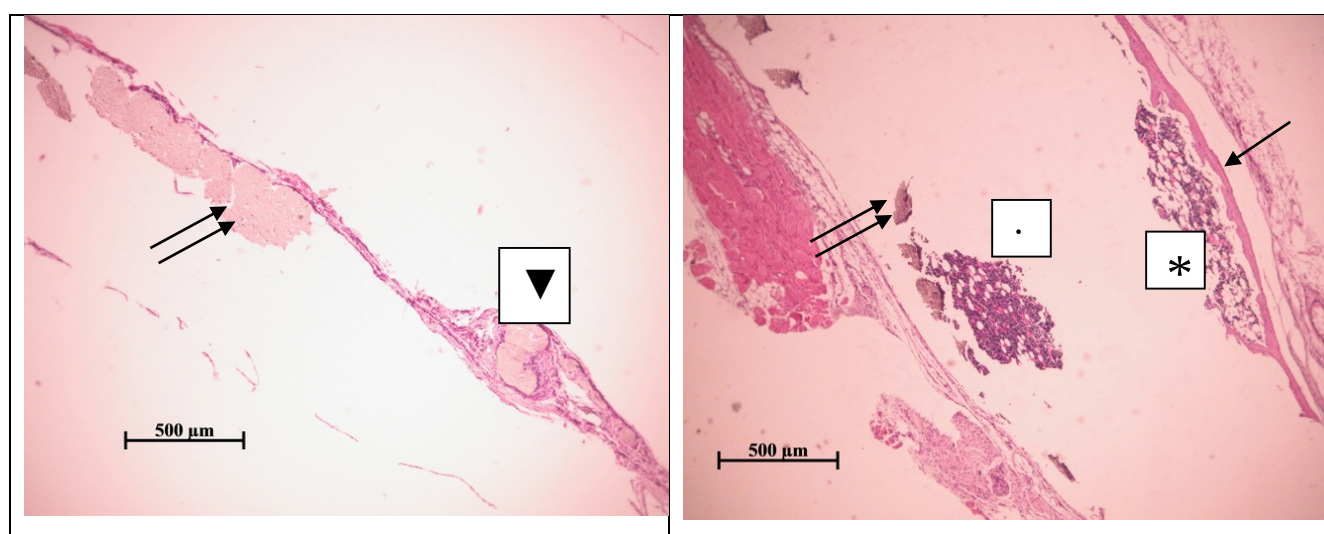


Рисунок 6.9 – Фрагменты капсулы и тканевой пластинки на образцах ПЛА/ВФК после 45 суток подкожной имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Образование костной ткани (стрелка) в тканевой пластинке образца. Фрагменты материала имплантата (двойная стрелка), красный костный мозг (*).

Суммарные результаты тестирования остеогенных свойств разработанных материалов представлены в таблице 6.4.

Таблица 6.4. Результаты анализа остеогенных свойств полимерной и композитной матриц образцов на гистологических срезах тканевых пластинок

Группа	Число тестируемых тканевых пластинок в каждой группе исследования				СР (%)
	1	2	3	4	
Группа 0 (ПЛА)	+	-	-	+	50
Группа 0-1 (ПЛА)	+	+	-	-	50
Группа 1 (ПЛА+ВФК)	-	+	X	X	50
Группа 2 (ПЛА+ВФК)	+	+	-	X	67
Группа 3 (ПЛА+ВФК)	-	+	-	X	33
Группа 4 (ПЛА+ВФК)	+	+	+	-	75

Примечание: (+) в составе тканевой пластинки выявлен рост костной ткани согласно гистологическому анализу; (-) развитие соединительной, мышечной или жировой ткани; СР (%) - процент образцов, способствующих росту костной ткани (ОИ); X – образцы выпали из подкожного кармана (или выгрызались мышами) вследствие раздражающего действия, поэтому не подвергались гистологическому анализу.

Результаты имплантации показали способность композиционных материалов разработанных составов индуцировать рост костной ткани.

Выводы по шестой главе.

1. Использование смеси высокодисперсных фосфатов кальция в качестве минеральной фазы композитов с полилактидом обеспечивает в растворе PBS резорбцию материала с водопоглощением, близким к нулю. Процесс выщелачивания кальция начинается на вторые сутки инкубации в статических условиях, развивается в течение трех недель, замедляясь на четвертой неделе. Это обусловлено ограниченной доступностью минеральной фазы композита в силу заданной архитектуры образцов. Степень резорбции *in vitro* определяется содержанием фосфатов кальция и возрастает пропорционально его росту,

вследствие чего потери массы к концу четвертой недели варьируются от 6 до 15 % в образцах с содержанием фосфатов от 20 до 60 % соответственно.

2. Способность исследуемых образцов к биорезорбции доказана в эксперименте *in vivo*, о чем свидетельствуют фотографии гистологических срезов имплантированных материалов.

3. При увеличении содержания фосфатов кальция до 40 % и более возрастает продуцирование кальциевых фосфатов апатитовой природы на поверхности композитов при инкубации в SBF *in vitro*.

4. Биоактивность разработанных композитов в форме индуцирования роста костной ткани (остеогенный потенциал) доказана в условиях *in vivo*.

5. В эксперименте *in vitro* установлено, что композиты в исследуемом диапазоне составов оказывают слабый цитотоксический эффект на клеточную культуру в разной степени в зависимости от состава образца. В условиях *in vivo* разработанные композиты не проявили макроскопических признаков острой воспалительной реакции, выраженных негативных местных тканевых реакций, побочных системных реакций, что доказывает их безопасность для живого организма.

6. Эффективным методом стерилизации композиционных биоматериалов на основе ВФК и полилактида является обработка ионизирующим излучением в 60 кГр, гарантирующая обезвреживание объема имплантируемого материала от патогенов.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Условиями получения высокодисперсных фосфатов кальция (ВФК) с высоким выходом в реакции (более 96%) и отношением $\text{Ca/P} = 1,60-1,62$ являются сливание исходных компонентов и смешение в турбулентном режиме, температура реакции 100 ± 5 °С, выдерживание в маточном растворе не менее 14 дней с поддержанием рН в области значения $9,0 \pm 0,3$ в течение всего процесса.

2. Фазовый состав продуктов реакции с высоким выходом представлен гидроксиапатитом (60-80%), карбонатзамещенным гидроксиапатитом (до 6%), фосфатом кальция (до 15%) и аморфным гидроксиапатитом (до 10%). Дисперсность продуктов реакции с высоким выходом характеризуется мономодальностью с показателями: размер фракции ВФК до 100 нм составляет 60-70%, средний размер частиц 50-60 нм, удельная поверхность – 50-60 м²/г.

3. Разработанные композиционные материалы на основе на основе полилактида с содержанием высокодисперсных фосфатов кальция от 10 до 70% обладают химической однородностью за счет введения глицерина и сорбитола суммарной концентрации от 1,5 и до 7,5%.

4. Механические характеристики композитов увеличиваются при содержании высокодисперсных фосфатов кальция от 10 до 60%: предел прочности при сжатии от 50 до 61 МПа, предел прочности при изгибе от 32 до 43 МПа, ударная вязкость от 4,4 до 5,9 кДж/м², число циклов нагружения от 4200 до 4800. Увеличение содержания до 70% увеличивает ударную вязкость до 5,9 кДж/м²; предел прочности при сжатии и изгибе и число циклов нагружения уменьшаются при содержании ВФК более 60%. Композиты, содержащие 50-70% фосфатов кальция, представленные ГАП - 65%, ТКФ – 15%, карбонат замещенным ГАП 10% и аморфными ФК до 10%, характеризуются сопоставимыми с натуральной губчатой кости свойствами и могут быть рекомендованы для использования в восстановительной медицине

5. Введение ВФК в количестве до 70% уменьшает краевой угол смачивания композитов до 50 град. Зависимость краевого угла смачивания от содержания ВФК

в композите носит линейный характер и описывается выражением: $\theta = -0,5657 \cdot m_{\text{ВФК}} + 78,0667$.

6. При нагревании композитов от 25 до 230 °С в компонентах композита происходит структурная перестройка, соответствующая:

- процессу стеклования полилактида в диапазоне температур 60-90 °С,
- конденсации лактида в диапазоне температур 100-160 °С,
- полиморфному переходу ГАП из моноклинной в гексагональную модификацию в диапазоне температур 200-230 °С

7. Комплексом методов установлено образование новых атомных групп с участием полилактида и глицерина, которые указывают на переход от линейной структуры полимера к пространственной. Новая слабозапрещенная полоса на ИК-спектре (1645 см^{-1}) композита, нехарактерная для отдельных компонентов композита, может быть обусловлена образованием полиолового эфира глицерина и полилактида.

Анализ ИК-Фурье диаграмм указывает на вероятность образования водородной связи между –ОН группой гидроксипатита и группой –С=О полилактида. Эти взаимодействия обеспечивают увеличение механических характеристик композитов при увеличении содержания ВФК.

8. Разработаны технологические основы получения изделий из композиционных биоматериалов заданной архитектуры и формы с комплексом функциональных свойств, включающие 3 блока.

Блок подготовки композиций включает обработку и смешение прекурсоров; двухступенчатую гомогенизацию фосфатов кальция с глицерином и сорбитолом и затем с полилактидом; сушку и дробление композита с получением гранул размером около 2 мм.

Блок получения филамента включает экструзию в двухшнековом экструдере с получением твердых пеллетов размером 1,0-1,5 мм и последующую экструзию в одношнековом экструдере с получением филамента. Основным выходным параметром филамента является его диаметр равный $1,75 \pm 0,1 \text{ мм}$. Постоянство диаметра филамента обеспечивается при температуре нагрева композита на выходе

из экструдера в диапазоне 170-180 °С. При увеличении содержания минеральной фазы в композите от 10 до 70% количество оборотов шнека при формовании увеличивается на 1-2% при увеличении содержания ВФК на каждые 10%.

Блок 3D-печати включает процесс печати на 3D-принтере в соответствии с установленными для соответствующих составов (содержание ВФК от 10 до 70%) композитов параметрами: температура печати от 210 до 230 °С, скорость печати от 50 до 80 мм/с. Отклонение температуры при получении филамента и при печати не должно превышать 1°С.

9. Использование смеси ВФК в качестве минеральной фазы композитов с полилактидом обеспечивает в растворе фосфатного буфера (PBS, *in vitro*) резорбцию материала с водопоглощением близким к нулю. Процесс выщелачивания кальция начинается на вторые сутки инкубации в статических условиях, развивается в течение трех недель, замедляясь на четвертой неделе. Это обусловлено ограниченной доступностью минеральной фазы композита в силу заданной архитектуры образцов. Степень резорбции определяется содержанием фосфатов кальция и возрастает пропорционально его росту, вследствие чего потери массы к концу четвертой недели варьируются от 6 до 15% в образцах с содержанием фосфатов от 20 до 60% соответственно. Способность разработанных композитов к биорезорбции доказана в эксперименте *in vivo*.

10. При увеличении содержания фосфатов кальция до 40% и более возрастает продуцирование кальциевых фосфатов апатитовой природы на поверхности композитов при инкубации в SBF *in vitro*, что доказывает биоактивность разработанных композитов. Биоактивность разработанных композитов в форме индуцирования роста костной ткани (остеогенный потенциал) доказана в условиях *in vivo*.

11. Установлено *in vitro*, что композиты оказывают слабый цитотоксический эффект на клеточную культуру в разной степени в зависимости от состава образца. В условиях *in vivo* разработанные композиты не проявляют признаков воспалительной реакции, негативных местных и системных реакций, что доказывает их безопасность для живого организма.

12. Показано, что эффективным методом стерилизации композиционных биоматериалов на основе ВФК и полилактида является обработка ионизирующим излучением дозой в 60 кГр, гарантирующая стерилизацию материала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показано, что разработка качественных биоматериалов, способных составлять достойную конкуренцию на современном рынке имплантатов, требует комплексного подхода, включающего критический анализ актуальных направлений, тенденций и «свободных мест» в научно-исследовательском пространстве, а также адекватную постановку цели и четкую формулировку задач исследования.

Диссертационная работа отличается от ранее выполненных работ по данной тематике тем, что разработанные биоразлагаемые полимерные композиты получены на основе веществ и материалов, синтезированных непосредственно в лаборатории, т.е. на базе НИ ТПУ. В работе подробно рассмотрены: способы синтеза неорганического наполнителя полимерной матрицы – фосфатов кальция; условия, определяющие необходимые физико-химические, поверхностные и гранулометрические характеристики минерального наполнителя; способы получения биорезорбируемых композитов на основе высокодисперсных фосфатов кальция, полилактида, глицерина и сорбитола, а также исследование физико-химических и биохимических свойств композитов.

Кроме того, в работе использован подход формирования композитов ВФК-ПЛА методом совместной экструзии с целью получения из них филаментов для 3D-печати. Применение такого способа позволяет избежать дополнительных технологических этапов в процессе получения изделий из композитов и определяет их новые свойства за счет взаимодействия реагентов исходной смеси с образованием новых составов и структур.

Итогом диссертационной работы стали способ получения высокодисперсных фосфатов кальция, биорезорбируемых композиционных материалов на их основе с использованием термопластичного полимера полилактида. Испытания *in vitro* и *in vivo* показали способность к биорезорбции, а также наличие потенциальных противовоспалительных и биоактивных свойств у композитов, что позволяет рекомендовать их к дальнейшему исследованию с целью создания имплантатов.

Благодаря примененным подходам, достигнуты повышенные прочностные характеристики разработанных биоактивных композиционных материалов.

Научная гипотеза, положенная в основу диссертационного исследования, доказана.

Процесс исследования описанных в диссертации композиционных материалов не закончен и будет активно продолжаться в направлении расширения их полезных свойств и эффективности применения, а также в направлении их внедрения в реальную медицинскую практику.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВФК – высокодисперсные фосфаты кальция;

FDM – fused deposition modeling (моделирование методом послойного наплавления);

ГАП – гидроксипатит кальция;

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия;

ФК – фосфат кальция;

ТКФ – трикальцийфосфат;

ПЛА – полилактид;

ПР – произведение растворимости;

РФА – рентгенофазовый анализ;

СТА – синхронный термический анализ;

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия;

ДТА – дифференциальный термический анализ;

ТГ – термогравиметрический анализ;

SBF – simulated body fluid (раствор, имитирующий внеклеточную жидкость по минеральному составу);

PBS – phosphate buffered saline (раствор фосфатного буфера);

DPBS – Dulbecco's phosphate-buffered saline (фосфатно-солевой буфер Дульбекко);

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия;

СВЧ – сверхвысокочастотный;

S_{уд} – удельная поверхность;

$\sigma_{\text{сжатия}}$ – предел прочности на сжатие;

$\sigma_{\text{изгиб}}$ – предел прочности на изгиб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Polo-Corrales L., Latorre-Esteves M., Ramirez-Vick J. E. Scaffold design for bone regeneration // *Journal of nanoscience and nanotechnology*. – 2014. – Т. 14, № 1. – С. 15-56.
2. Neighbour T. The global orthobiologics market: players, products and technologies driving change // *Espicom business intelligence*. – 2008. – Т. 2.
3. Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine. / Meyer U., Meyer T., Handschel J., Wiesmann H. P.: Springer, 2009.
4. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. / Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E.: Elsevier, 2004.
5. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей. / Хенч Л., Джонс Д.: Litres, 2017.
6. Струков В., Кислов А., Елистратов Д., Струкова-Джонс О. Актуальные проблемы диагностики и лечения остеопороза // *Актуальные вопросы диагностики, лечения и реабилитации*. – 2016. – С. 259.
7. Баринов С. М., Комлев В. С. Биокерамика на основе фосфатов кальция //. – 2005.
8. Баринов С. М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины // *Успехи химии*. – 2010. – Т. 79, № 1. – С. 15-32.
9. Li Y. Lili // *New developments of Ti-based alloys for biomedical applications. Materials*. – 2004. – С. 1709-1800.
10. Mankin H. J., Hornicek F. J., Raskin K. A. Infection in massive bone allografts // *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. – 2005. – Т. 432. – С. 210-216.
11. Petrovskaya T. S., Vereschagin V. I. Effectiveness of the technologies of titanium implants covering // *Key Engineering Materials*. – Т. 670 –Trans Tech Publ, 2016. – С. 183-188.
12. Богданова Е. А. и др. Использование различных форм гидроксиапатита для создания биоактивного покрытия на пористой титановой основе // *Физико-химические аспекты изучения кластеров, наноструктур и наноматериалов*. – 2018. – №. 10. – С. 133-141.

13. Sheikh Z., Sima C., Glogauer M. Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation // Materials. – 2015. – Т. 8, № 6. – С. 2953-2993.
14. Севастьянов В., Кирпичников М. Биосовместимые материалы // М.: МИА. – 2011. – Т. 569.
15. Богданова Е. А. и др. Влияние фторид-ионов на прочностные характеристики гидроксиапатита и композиционных материалов на его основе // Физико-химические аспекты изучения кластеров, наноструктур и наноматериалов. – 2017. – №. 9. – С. 99-107.
16. Голованова О. А., Герк С. А. Структурно-морфологические характеристики и растворение карбонатгидроксиапатита, полученного в присутствии пролина // Неорганические материалы. – 2020. – Т. 56. – №. 5. – С. 571-580.
17. Голованова О. А. Новый комплексный подход к синтезу модифицированных биоактивных материалов нового поколения на основе фосфатов кальция // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2017. – №. 1. – С. 86-86.
18. Николаенко А., Хобта Р., Иванов В., Меркулов В., Сапожников В. 3D-моделирование и аддитивные технологии в персонифицированной медицине // Новые технологии в онкологии –, 2017. – С. 116-117.
19. Краснов В., Ступина Т. Репаративная регенерации тазового симфиза при консервативном и оперативном лечении нестабильных повреждений таза (экспериментальное исследование) // Успехи современного естествознания. – 2015. № 9-3. – С. 434-438.
20. Краев А. Анатомия человека: учебник в двух томах // Москва: Медкнига. – 2007.
21. Лемешева С. А., Голованова О. А., Туренков С. В. Исследование особенностей состава костных тканей человека // Химия в интересах устойчивого развития. – 2009. – Т. 17, № 3. – С. 327-332.

22. Дженкинс М., Киселева О. И., Клячко Н. Л., Хохлов А. Полимеры в биологии и медицине // – 2011.
23. Albu M. G., Titorencu I., Chelaru C. The stability of some collagen hydrogels // Revista de Pielarie Incaltaminte. – 2011. – Т. 11, № 1. – С. 11.
24. Park J. H., Olivares-Navarrete R., Baier R. E., Meyer A. E., Tannenbaum R., Boyan B. D., Schwartz Z. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response // Acta biomaterialia. – 2012. – Т. 8, № 5. – С. 1966-1975.
25. Сергеева Н., Решетов И., Баринов С., Свиридова И., Кирсанова В., Комлев В., Фадеева И., Ахмедова С., Филюшин М., Сергеева В. Использование пористой наноструктурированной биокерамики в качестве матриц для клеточных культур с целью замещения костных дефектов при опухолевых заболеваниях головы и шеи // Сибирский онкологический журнал. – 2006. № S1.
26. Fernandez-Yague M. A., Abbah S. A., McNamara L., Zeugolis D. I., Pandit A., Biggs M. J. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies // Advanced drug delivery reviews. – 2015. – Т. 84. – С. 1-29.
27. Sasaki N., Matsushima N., Ikawa T., Yamamura H., Fukuda A. Orientation of bone mineral and its role in the anisotropic mechanical properties of bone—transverse anisotropy // Journal of Biomechanics. – 1989. – Т. 22, № 2. – С. 157-164.
28. Zioupos P., Currey J., Hamer A. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone // Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials. – 1999. – Т. 45, № 2. – С. 108-116.
29. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements // Injury. – 2000. – Т. 31. – С. D37-D47.
30. Buck D. W., Dumanian G. A. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals // Plastic and reconstructive surgery. – 2012. – Т. 129, № 6. – С. 1314-1320.

31. Rho J.-Y., Kuhn-Spearing L., Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone // *Medical engineering & physics*. – 1998. – T. 20, № 2. – C. 92-102.
32. Keaveny T. Cancellous bone // *Handbook of biomaterial properties* Springer, 1998. – C. 15-23.
33. Athanasiou K., Zhu C.-F., Lanctot D., Agrawal C., Wang X. Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone // *Tissue engineering*. – 2000. – T. 6, № 4. – C. 361-381.
34. Burstein A. H., Zika J., Heiple K., Klein L. Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone // *JBJS*. – 1975. – T. 57, № 7. – C. 956-961.
35. Wang X., Li Y., Hodgson P., Wen C. Nano-and macro-scale characterisation of the mechanical properties of bovine bone // *Materials forum*. – T. 31 –Institute of Materials Engineering Australasia, 2007. – C. 156-159.
36. Gotman I. Characteristics of metals used in implants // *Journal of endourology*. – 1997. – T. 11, № 6. – C. 383-389.
37. Ratanavaraporn J., Damrongsakkul S., Kanokpanont S., Yamamoto M., Tabata Y. Osteogenic differentiation of bone-marrow-derived stem cells cultured with mixed gelatin and chitooligosaccharide scaffolds // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2011. – T. 22, № 8. – C. 1083-1098.
38. Tevlin R., McArdle A., Atashroo D., Walmsley G., Senarath-Yapa K., Zielins E., Paik K., Longaker M., Wan D. Biomaterials for craniofacial bone engineering // *Journal of dental research*. – 2014. – T. 93, № 12. – C. 1187-1195.
39. Штильман М. И. Полимеры медико-биологического назначения // . – 2006.
40. Rezwan K., Chen Q., Blaker J. J., Boccaccini A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering // *Biomaterials*. – 2006. – T. 27, № 18. – C. 3413-3431.
41. Šupová M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: a review // *Ceramics international*. – 2015. – T. 41, № 8. – C. 9203-9231.

42. Navarro M., Michiardi A., Castano O., Planell J. Biomaterials in orthopaedics // *Journal of the royal society interface*. – 2008. – Т. 5, № 27. – С. 1137-1158.
43. Kheirallah M., Almeshaly H. Bone graft substitutes for bone defect regeneration. A collective review // *Int J Dentistry Oral Sci*. – 2016. – Т. 3, № 5. – С. 247-57.
44. Komlev V. S., Barinov S. M., Koplik E. V. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release // *Biomaterials*. – 2002. – Т. 23, № 16. – С. 3449-3454.
45. Буле Ж.-М., Бюжоли Б., Жанвье П., Каирун И., Ардженсон Ж.-Н. Инъецируемый кальций-фосфатный цемент в форме апатита, высвобождающий ингибитор резорбции костной ткани //. – 2012.
46. Bose S., Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review // *Acta biomaterialia*. – 2012. – Т. 8, № 4. – С. 1401-1421.
47. Dellinger J. G., Eurell J. A. C., Jamison R. D. Bone response to 3D periodic hydroxyapatite scaffolds with and without tailored microporosity to deliver bone morphogenetic protein 2 // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2006. – Т. 76, № 2. – С. 366-376.
48. Rau J. V., Generosi A., Laureti S., Komlev V. S., Ferro D., Cesaro S. N., Paci B., Albertini V. R., Agostinelli E., Barinov S. M. Physicochemical investigation of pulsed laser deposited carbonated hydroxyapatite films on titanium // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2009. – Т. 1, № 8. – С. 1813-1820.
49. Kuroda K., Nakamoto S., Ichino R., Okido M., Pilliar R. M. Hydroxyapatite coatings on a 3D porous surface using thermal substrate method // *Materials Transactions*. – 2005. – Т. 46, № 7. – С. 1633-1635.
50. Zhang J., Liu W., Schnitzler V., Tancret F., Bouler J.-M. Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties // *Acta biomaterialia*. – 2014. – Т. 10, № 3. – С. 1035-1049.

51. Fadeeva I., Filippov Y. Y., Fomin A., Petrakova N., Knotko A., Ryzhov A., Putlyaev V., Barinov S. Microstructure and properties of α -tricalcium phosphate-based bone cement // *Inorganic Materials*. – 2017. – Т. 53, № 3. – С. 292-299.
52. Sudhakar M., Kantam M. L., Jaya V. S., Kishore R., Ramanujachary K., Venugopal A. Hydroxyapatite as a novel support for Ru in the hydrogenation of levulinic acid to γ -valerolactone // *Catalysis communications*. – 2014. – Т. 50. – С. 101-104.
53. Ван В. Д. Фосфор и его соединения // М.: ИЛ. – 1962.
54. Boanini E., Gazzano M., Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature // *Acta biomaterialia*. – 2010. – Т. 6, № 6. – С. 1882-1894.
55. Богданова Е. А., Скачков В. М., Сабирзянов Н. А. Исследование влияния анионного замещения в гидроксиапатите на структуру и свойства керамики на его основе // *Физико-химические аспекты изучения кластеров, наноструктур и наноматериалов*. – 2018. – №. 10. – С. 142-149.
56. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications // *Biomatter*. – 2011. – Т. 1, № 2. – С. 121-164.
57. Vereecke G., Lemaître J. Calculation of the solubility diagrams in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ // *Journal of Crystal Growth*. – 1990. – Т. 104, № 4. – С. 820-832.
58. Wang L., Nancollas G. H. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution // *Chemical reviews*. – 2008. – Т. 108, № 11. – С. 4628-4669.
59. Fluorine and health: molecular imaging, biomedical materials and pharmaceuticals. / Tressaud A., Haufe G.: Elsevier, 2008.
60. Вересов А., Путляев В., Третьяков Ю. Химия неорганических биоматериалов на основе фосфатов кальция // *Российский химический журнал*. – 2004. – Т. 48, № 4. – С. 52-64.
61. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphates in dentistry // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2013. – Т. 24, № 6. – С. 1335-1363.

62. Комлев В., Фадеева И., Гурин А., Шворнева Л., Бакунова Н., Баринов С. Новые кальцийфосфатные цементы на основе трикальцийфосфата // Доклады Академии наук. – Т. 437 – Федеральное государственное унитарное предприятие Академический научно-издательский, производственно-полиграфический и книгораспространительский центр Наука, 2011. – С. 366-369.
63. Kim J. Y., Fenton R. R., Hunter B. A., Kennedy B. J. Powder diffraction studies of synthetic calcium and lead apatites // Australian Journal of Chemistry. – 2000. – Т. 53, № 8. – С. 679-686.
64. Keskinler B., Bayramoğlu M. Kinetics of phosphoric acid production by decomposition of monocalcium phosphate in ethanol // International journal of mineral processing. – 1992. – Т. 36, № 3-4. – С. 259-271.
65. Лидин Р., Молоко В., Андреева Л. Химические свойства неорганических веществ/Ред. РА Лидина // М.: Колос.–2006.–480 с. – 1996.
66. Sánchez-Enríquez J., Reyes-Gasga J. Obtaining $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, monocalcium phosphate monohydrate, via monetite from brushite by using sonication // Ultrasonics sonochemistry. – 2013. – Т. 20, № 3. – С. 948-954.
67. Jinawath S., Pongkao D., Suchanek W., Yoshimura M. Hydrothermal synthesis of monetite and hydroxyapatite from monocalcium phosphate monohydrate // International Journal of Inorganic Materials. – 2001. – Т. 3, № 7. – С. 997-1001.
68. Boonchom B., Danvirutai C. The morphology and thermal behavior of Calcium dihydrogen phosphate monohydrate ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) obtained by a rapid precipitation route at ambient temperature in different media // J. Optoelectron. Biomed. Mater. – 2009. – Т. 1. – С. 115-123.
69. Sawamura T., Mizutani Y., Okuyama M., Kasuga T. Setting time and formability of calcium phosphate cements prepared using modified dicalcium phosphate anhydrous powders // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2014. – Т. 25, № 7. – С. 1631-1636.
70. Комлев В., Фадеева И., Фомин А., Шворнева Л., Ферро Д., Баринов С. Синтез октакальцийфосфата осаждением из раствора // Book Синтез октакальцийфосфата осаждением из раствора / Editor ДАН, 2010.

71. Rau J. V., Fosca M., Komlev V. S., Fadeeva I. V., Rossi Albertini V., Barinov S. M. In situ time-resolved studies of octacalcium phosphate and dicalcium phosphate dihydrate in simulated body fluid: cooperative interactions and nanoapatite crystal growth // *Crystal growth & design*. – 2010. – Т. 10, № 8. – С. 3824-3834.
72. Zhan J., Tseng Y. H., Chan J. C., Mou C. Y. Biomimetic formation of hydroxyapatite nanorods by a single-crystal-to-single-crystal transformation // *Advanced Functional Materials*. – 2005. – Т. 15, № 12. – С. 2005-2010.
73. Putlyaev V., Kukueva E., Safronova T., Ivanov V., Churagulov B. Features of octacalcium phosphate thermolysis // *Refractories and Industrial Ceramics*. – 2014. – Т. 54, № 5. – С. 420-424.
74. Федотов А., Комлев В., Тетерина А., Сиротинкин В., Шамрай В., Фадеева И., Баринов С. Получение октакальциевого фосфата из карбоната кальция // *Неорганические материалы*. – 2013. – Т. 49, № 11. – С. 1238-1238.
75. Layrolle P., Ito A., Tateishi T. Sol-gel synthesis of amorphous calcium phosphate and sintering into microporous hydroxyapatite bioceramics // *Journal of the American Ceramic Society*. – 1998. – Т. 81, № 6. – С. 1421-1428.
76. White T. J., Dong Z. Structural derivation and crystal chemistry of apatites // *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*. – 2003. – Т. 59, № 1. – С. 1-16.
77. LeGeros R., Lin S., Rohanizadeh R., Mijares D., LeGeros J. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications // *Journal of materials science: Materials in Medicine*. – 2003. – Т. 14, № 3. – С. 201-209.
78. Sinitsyna O., Veresov A., Kovaleva E., Kolen'ko Y. V., Putlyaev V., Tretyakov Y. D. Synthesis of hydroxyapatite by hydrolysis of α -Ca₃(PO₄)₂ // *Russian chemical bulletin*. – 2005. – Т. 54, № 1. – С. 79-86.
79. Carrodegua R. G., De Aza S. α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications // *Acta biomaterialia*. – 2011. – Т. 7, № 10. – С. 3536-3546.
80. Kannan S., Lemos A. F., Rocha J. H., Ferreira J. M. Characterization and Mechanical Performance of the Mg-Stabilized β -Ca₃(PO₄)₂ Prepared from Mg-Substituted Ca-Deficient Apatite // *Journal of the American Ceramic Society*. – 2006. – Т. 89, № 9. – С. 2757-2761.

81. Евдокимов П., Путляев В., Мерзлов Д., Шаталова Т., Сафронова Т., Климашина Е., Чурагулов Б. Полиморфизм Са 3 (ро 4) 2 // Наносистемы: физика, химия, математика. – 2013. – Т. 4, № 1.

82. Koç N., Timuçin M., Korkusuz F. Fabrication and characterization of porous tricalcium phosphate ceramics // *Ceramics International*. – 2004. – Т. 30, № 2. – С. 205-211.

83. Salahi E., Heinrich J. Synthesis and thermal behaviour of β tricalcium phosphate precipitated from aqueous solutions // *British ceramic transactions*. – 2003. – Т. 102, № 2. – С. 79-82.

84. Bow J.-S., Liou S.-C., Chen S.-Y. Structural characterization of room-temperature synthesized nano-sized β -tricalcium phosphate // *Biomaterials*. – 2004. – Т. 25, № 16. – С. 3155-3161.

85. Moseke C., Gbureck U. Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – Т. 6, № 10. – С. 3815-3823.

86. Romeo H. E., Fanovich M. A. Synthesis of tetracalcium phosphate from mechanochemically activated reactants and assessment as a component of bone cements // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2008. – Т. 19, № 7. – С. 2751-2760.

87. Guo D., Xu K., Han Y. Influence of cooling modes on purity of solid-state synthesized tetracalcium phosphate // *Materials Science and Engineering: B*. – 2005. – Т. 116, № 2. – С. 175-181.

88. Matsuya Y., Matsuya S., Antonucci J. M., Takagi S., Chow L. C., Akamine A. Effect of powder grinding on hydroxyapatite formation in a polymeric calcium phosphate cement prepared from tetracalcium phosphate and poly (methyl vinyl ether-maleic acid) // *Biomaterials*. – 1999. – Т. 20, № 7. – С. 691-697.

89. Heimann R., Vu T. Effect of CaO on thermal decomposition during sintering of composite hydroxyapatite-zirconia mixtures for monolithic bioceramic implants // *Journal of materials science letters*. – 1997. – Т. 16, № 6. – С. 437-439.

90. Duff E. J. Orthophosphates—VII: Thermodynamical considerations concerning the stability of oxyapatite, $\text{Ca}_{10}\text{O}(\text{PO}_4)_6$, in aqueous media // *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. – 1972. – T. 34, № 3. – C. 853-857.
91. Wang H., Sun K., Li A., Wang W., Chui P. Size-controlled synthesis and characterization of fluorapatite nanocrystals in the presence of gelatin // *Powder technology*. – 2011. – T. 209, № 1-3. – C. 9-14.
92. Cheng P., Pritzker K. Pyrophosphate, phosphate ion interaction: effects on calcium pyrophosphate and calcium hydroxyapatite crystal formation in aqueous solutions // *The Journal of rheumatology*. – 1983. – T. 10, № 5. – C. 769-777.
93. Fleisch H., Russell R., Bisaz S., Termine J., Posner A. Influence of pyrophosphate on the transformation of amorphous to crystalline calcium phosphate // *Calcified Tissue Research*. – 1968. – T. 2, № 1. – C. 49-59.
94. Gras P., Rey C., Marsan O., Sarda S., Combes C. Synthesis and characterisation of hydrated calcium pyrophosphate phases of biological interest // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2013. – T. 2013, № 34. – C. 5886-5895.
95. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate bioceramics // *Ceramics International*. – 2015. – T. 41, № 10. – C. 13913-13966.
96. Best S., Porter A., Thian E., Huang J. Bioceramics: past, present and for the future // *Journal of the European Ceramic Society*. – 2008. – T. 28, № 7. – C. 1319-1327.
97. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials // *Journal of Materials Science*. – 2009. – T. 44, № 9. – C. 2343-2387.
98. Sugiura Y., Ishikawa K. Effect of calcium and phosphate on compositional conversion from dicalcium hydrogen phosphate dihydrate blocks to octacalcium phosphate blocks // *Crystals*. – 2018. – T. 8, № 5. – C. 222.
99. Alge D. L., Goebel W. S., Chu T. M. G. In vitro degradation and cytocompatibility of dicalcium phosphate dihydrate cements prepared using the monocalcium phosphate monohydrate/hydroxyapatite system reveals rapid conversion to HA as a key mechanism // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2012. – T. 100, № 3. – C. 595-602.

100. Habraken W., Habibovic P., Epple M., Bohner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? // *Materials Today*. – 2016. – T. 19, № 2. – C. 69-87.

101. Amini A. R., Laurencin C. T., Nukavarapu S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges // *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*. – 2012. – T. 40, № 5.

102. Eckardt H., Ding M., Lind M., Hansen E., Christensen K., Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model // *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. – 2005. – T. 87, № 10. – C. 1434-1438.

103. Street J. Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, and Filvaroff EH // Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. – T. 99. – C. 9656-9661.

104. Manolagas S. C., Parfitt A. M. What old means to bone // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. – 2010. – T. 21, № 6. – C. 369-374.

105. Ogueri K. S., Jafari T., Ivirico J. L. E., Laurencin C. T. Polymeric biomaterials for scaffold-based bone regenerative engineering // *Regenerative engineering and translational medicine*. – 2019. – T. 5, № 2. – C. 128-154.

106. Suzuki Y., Hayashi M., Yasukawa T., Kobayashi H., Makino K., Hirano Y., Takagi S., Chow L. C., Ogiso B. Development of a novel fluorapatite-forming calcium phosphate cement with calcium silicate: in vitro and in vivo characteristics // *Dental materials journal*. – 2015. – C. 2014-255.

107. Lee J. J., Shin Y. C., Song S.-J., Cha J. M., Hong S. W., Lim Y.-J., Jeong S. J., Han D.-W., Kim B. Dicalcium phosphate coated with graphene synergistically increases osteogenic differentiation in vitro // *Coatings*. – 2018. – T. 8, № 1. – C. 13.

108. Liu H., Chen R., Lin F., Fang H. Sintered β -dicalcium phosphate particles induce intracellular reactive oxygen species in rat osteoblasts // *Biomedical Engineering-Applications, Basis and Communications*. – 1999. – T. 11, № 5. – C. 259-264.

109. Hu Q., Tan Z., Liu Y., Tao J., Cai Y., Zhang M., Pan H., Xu X., Tang R. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells // *Journal of Materials Chemistry*. – 2007. – T. 17, № 44. – C. 4690-4698.
110. Wang J., de Boer J., de Groot K. Proliferation and differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells on biomimetically and electrolytically deposited calcium phosphate coatings // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2009. – T. 90, № 3. – C. 664-670.
111. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate-based bioceramics // *Materials*. – 2013. – T. 6, № 9. – C. 3840-3942.
112. Suzuki Y., Hayashi M., Tanabe N., Yasukawa T., Hirano Y., Takagi S., Chow L. C., Suzuki N., Ogiso B. Effect of a novel fluorapatite-forming calcium phosphate cement with calcium silicate on osteoblasts in comparison with mineral trioxide aggregate // *Journal of oral science*. – 2015. – T. 57, № 1. – C. 25-30.
113. Van den Vreken N. M., Pieters I. Y., Declercq H. A., Cornelissen M. J., Verbeeck R. M. Characterization of calcium phosphate cements modified by addition of amorphous calcium phosphate // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – T. 6, № 2. – C. 617-625.
114. Alliot-Licht B., Gregoire M., Orly I., Menanteau J. Cellular activity of osteoblasts in the presence of hydroxyapatite: an in vitro experiment // *Biomaterials*. – 1991. – T. 12, № 8. – C. 752-756.
115. Denry I., Kuhn L. T. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering // *Dental Materials*. – 2016. – T. 32, № 1. – C. 43-53.
116. Shao G. N., Kim H., Imran S. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092633731500346X> //. – 2016.
117. Wu S.-C., Hsu H.-C., Hsu S.-K., Wang W.-H., Ho W.-F. Preparation and characterization of four different compositions of calcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering // *Materials Characterization*. – 2011. – T. 62, № 5. – C. 526-534.

118. Mendes S., Tibbe J., Veenhof M., Bakker K., Both S., Platenburg P. P., Oner F., De Bruijn J., Van Blitterswijk C. Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age // *Tissue engineering*. – 2002. – T. 8, № 6. – C. 911-920.

119. Pereira R. C., Benelli R., Canciani B., Scaranari M., Daculsi G., Cancedda R., Gentili C. Beta-tricalcium phosphate ceramic triggers fast and robust bone formation by human mesenchymal stem cells // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2019. – T. 13, № 6. – C. 1007-1018.

120. Singh S. S., Roy A., Lee B. E., Banerjee I., Kumta P. N. MC3T3-E1 proliferation and differentiation on biphasic mixtures of Mg substituted β -tricalcium phosphate and amorphous calcium phosphate // *Materials Science and Engineering: C*. – 2014. – T. 45. – C. 589-598.

121. Ehara A., Ogata K., Imazato S., Ebisu S., Nakano T., Umakoshi Y. Effects of α -TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization // *Biomaterials*. – 2003. – T. 24, № 5. – C. 831-836.

122. Whited B. M., Skrtic D., Love B. J., Goldstein A. S. Osteoblast response to zirconia-hybridized pyrophosphate-stabilized amorphous calcium phosphate // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2006. – T. 76, № 3. – C. 596-604.

123. White T., Ferraris C., Kim J., Madhavi S. Apatite—an adaptive framework structure // *Reviews in mineralogy and geochemistry*. – 2005. – T. 57, № 1. – C. 307-401.

124. Posner A. S., Perloff A., Diorio A. F. Refinement of the hydroxyapatite structure // *Acta Crystallographica*. – 1958. – T. 11, № 4. – C. 308-309.

125. Van Rees H., Mengeot M., Kostiner E. Monoclinic-hexagonal transition in hydroxyapatite and deuterohydroxyapatite single crystals // *Materials Research Bulletin*. – 1973. – T. 8, № 11. – C. 1307-1309.

126. Ikoma T., Yamazaki A., Nakamura S., Akao M. Preparation and structure refinement of monoclinic hydroxyapatite // *Journal of Solid State Chemistry*. – 1999. – Т. 144, № 2. – С. 272-276.

127. Suetsugu Y., Tanaka J. Crystal growth and structure analysis of twin-free monoclinic hydroxyapatite // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2002. – Т. 13, № 8. – С. 767-772.

128. Погосова М. А. Синтез и спектральные характеристики медьсодержащих кальциевых фосфатов со структурой апатита с частичным катионным замещением // *Содержание, научная новизна, обоснованность и достоверность научных положений, результатов и выводов диссертации Представленная работа, изложена на*. – 2015. – Т. 253.

129. Osaka A., Miura Y., Takeuchi K., Asada M., Takahashi K. Calcium apatite prepared from calcium hydroxide and orthophosphoric acid // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 1991. – Т. 2, № 1. – С. 51-55.

130. Composition et stabilité des phases a structure d'apatite dans le système CaO-P₂O₅-oxyde de fer-H₂O à haute température. / Riboud P. V.: Masson & Cie, 1973.

131. Liao C.-J., Lin F.-H., Chen K.-S., Sun J.-S. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere // *Biomaterials*. – 1999. – Т. 20, № 19. – С. 1807-1813.

132. Kaneda K., Mizugaki T. Development of concerto metal catalysts using apatite compounds for green organic syntheses // *Energy & Environmental Science*. – 2009. – Т. 2, № 6. – С. 655-673.

133. Conte R., Di Salle A., Riccitiello F., Petillo O., Peluso G., Calarco A. Biodegradable polymers in dental tissue engineering and regeneration // *AIMS Materials Science*. – 2018. – Т. 5, № 6. – С. 1073-1101.

134. Mansourizadeh F., Asadi A., Oryan S., Nematollahzadeh A., Dodel M., ASGHARI V. M. PLLA/HA Nano composite scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering //. – 2013.

135. Salehi M., Bastami F. Characterization of wet-electrospun poly (ϵ -caprolactone)/poly (L-lactic) acid with calcium phosphates coated with chitosan for bone

engineering // Journal of "Regeneration, Reconstruction & Restoration"(Triple R). – 2016. – T. 1, № 2. – C. 69-74.

136. . – URL: <https://www.teknimed.com/portfolio-items/euroscREW>.

137. Turnbull G., Clarke J., Picard F., Riches P., Jia L., Han F., Li B., Shu W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering // Bioactive materials. – 2018. – T. 3, № 3. – C. 278-314.

138. Bayani M., Torabi S., Shahnaz A., Pournali M. Main properties of nanocrystalline hydroxyapatite as a bone graft material in treatment of periodontal defects. A review of literature // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2017. – T. 31, № 2. – C. 215-220.

139. de Souza D. C., de Abreu H. d. L. V., de Oliveira P. V., Capelo L. P., Passos-Bueno M. R., Catalani L. H. A fast degrading PLLA composite with a high content of functionalized octacalcium phosphate mineral phase induces stem cells differentiation // Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2019. – T. 93. – C. 93-104.

140. Dosovitskiy G., Karpyuk P., Evdokimov P., Kuznetsova D., Mechinsky V., Borisevich A., Fedorov A., Putlayev V., Dosovitskiy A., Korjik M. First 3D-printed complex inorganic polycrystalline scintillator // CrystEngComm. – 2017. – T. 19, № 30. – C. 4260-4264.

141. Goreninskii S. I., Bogomolova N., Malchikhina A., Golovkin A., Bolbasov E., Safronova T., Putlyaev V. I., Tverdokhlebov S. Biological effect of the surface modification of the fibrous poly (L-lactic acid) scaffolds by radio frequency magnetron sputtering of different calcium-phosphate targets // Bionanoscience. – 2017. – T. 7, № 1. – C. 50-57.

142. Kukueva E., Putlyaev V., Safronova T., Tikhonov A. Composite bioceramic based on octacalcium phosphate decomposition products // Glass and Ceramics. – 2017. – T. 74, № 1. – C. 67-72.

143. Schopper C., Moser D., Goriwoda W., Ziya-Ghazvini F., Spassova E., Lagogiannis G., Auterith A., Ewers R. The effect of three different calcium phosphate implant coatings on bone deposition and coating resorption: A long-term histological study in sheep // Clinical oral implants research. – 2005. – T. 16, № 3. – C. 357-368.

144. Putlyaev V., Evdokimov P., Safronova T., Klimashina E., Orlov N. Fabrication of osteoconductive $\text{Ca}_{3-x}\text{M}_{2x}(\text{PO}_4)_2$ ($\text{M} = \text{Na}, \text{K}$) calcium phosphate bioceramics by stereolithographic 3D printing // *Inorganic Materials*. – 2017. – Т. 53, № 5. – С. 529-535.

145. Богомолова Н. Н. Исследование биоактивных покрытий, сформированных методом высокочастотного магнетронного распыления кальций-фосфатных мишеней // . – 2016.

146. Hench L., Polak J., Xynos I., Buttery L. Bioactive materials to control cell cycle // *Material Research Innovations*. – 2000. – Т. 3, № 6. – С. 313-323.

147. Capra P., Dorati R., Colonna C., Bruni G., Pavanetto F., Genta I., Conti B. A preliminary study on the morphological and release properties of hydroxyapatite–alendronate composite materials // *Journal of microencapsulation*. – 2011. – Т. 28, № 5. – С. 395-405.

148. Borie E., Orsi I. A., de Araujo C. P. The influence of the connection, length and diameter of an implant on bone biomechanics // *Acta Odontologica Scandinavica*. – 2015. – Т. 73, № 5. – С. 321-329.

149. Luo Y., Wu C., Lode A., Gelinsky M. Hierarchical mesoporous bioactive glass/alginate composite scaffolds fabricated by three-dimensional plotting for bone tissue engineering // *Biofabrication*. – 2012. – Т. 5, № 1. – С. 015005.

150. Sobral J. M., Caridade S. G., Sousa R. A., Mano J. F., Reis R. L. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency // *Acta biomaterialia*. – 2011. – Т. 7, № 3. – С. 1009-1018.

151. Detsch R., Uhl F., Deisinger U., Ziegler G. 3D-Cultivation of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite scaffolds fabricated by dispense-plotting and negative mould technique // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2008. – Т. 19, № 4. – С. 1491-1496.

152. Wu C., Luo Y., Cuniberti G., Xiao Y., Gelinsky M. Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a

controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability // *Acta biomaterialia*. – 2011. – T. 7, № 6. – C. 2644-2650.

153. Serra T., Planell J. A., Navarro M. High-resolution PLA-based composite scaffolds via 3-D printing technology // *Acta biomaterialia*. – 2013. – T. 9, № 3. – C. 5521-5530.

154. Seyednejad H., Gawlitta D., Kuiper R. V., de Bruin A., van Nostrum C. F., Vermonden T., Dhert W. J., Hennink W. E. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly (ϵ -caprolactone) // *Biomaterials*. – 2012. – T. 33, № 17. – C. 4309-4318.

155. Fu Q., Saiz E., Tomsia A. P. Direct ink writing of highly porous and strong glass scaffolds for load-bearing bone defects repair and regeneration // *Acta biomaterialia*. – 2011. – T. 7, № 10. – C. 3547-3554.

156. Catros S., Fricain J.-C., Guillotin B., Pippenger B., Bareille R., Remy M., Lebraud E., Desbat B., Amédée J., Guillemot F. Laser-assisted bioprinting for creating on-demand patterns of human osteoprogenitor cells and nano-hydroxyapatite // *Biofabrication*. – 2011. – T. 3, № 2. – C. 025001.

157. Doraiswamy A., Narayan R., Harris M., Qadri S., Modi R., Chrisey D. Laser microfabrication of hydroxyapatite-osteoblast-like cell composites // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2007. – T. 80, № 3. – C. 635-643.

158. Harris M., Doraiswamy A., Narayan R., Patz T., Chrisey D. Recent progress in CAD/CAM laser direct-writing of biomaterials // *Materials Science and Engineering: C*. – 2008. – T. 28, № 3. – C. 359-365.

159. Guillotin B., Souquet A., Catros S., Duocastella M., Pippenger B., Bellance S., Bareille R., Rémy M., Bordenave L., Amédée J. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization // *Biomaterials*. – 2010. – T. 31, № 28. – C. 7250-7256.

160. Shuai C., Gao C., Nie Y., Hu H., Zhou Y., Peng S. Structure and properties of nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering with a selective laser sintering system // *Nanotechnology*. – 2011. – T. 22, № 28. – C. 285703.

161. Williams J. M., Adewunmi A., Schek R. M., Flanagan C. L., Krebsbach P. H., Feinberg S. E., Hollister S. J., Das S. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering // *Biomaterials*. – 2005. – T. 26, № 23. – C. 4817-4827.
162. Duan B., Wang M., Zhou W. Y., Cheung W. L., Li Z. Y., Lu W. W. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering // *Acta biomaterialia*. – 2010. – T. 6, № 12. – C. 4495-4505.
163. Bose S., Vahabzadeh S., Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing // *Materials today*. – 2013. – T. 16, № 12. – C. 496-504.
164. Qingxi H., Baigong M., Liulan L., Minglun F. Selective laser sintering of β -tricalcium phosphate for bionic scaffold //. – 2006.
165. Pereira T., Silva M., Oliveira M., Maia I., Silva J., Costa M., Thiré R. Effect of process parameters on the properties of selective laser sintered Poly (3-hydroxybutyrate) scaffolds for bone tissue engineering: This paper analyzes how laser scan spacing and powder layer thickness affect the morphology and mechanical properties of SLS-made scaffolds by using a volume energy density function // *Virtual and Physical Prototyping*. – 2012. – T. 7, № 4. – C. 275-285.
166. Lan P. X., Lee J. W., Seol Y.-J., Cho D.-W. Development of 3D PPF/DEF scaffolds using micro-stereolithography and surface modification // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2009. – T. 20, № 1. – C. 271-279.
167. Lee J. W., Ahn G., Kim D. S., Cho D.-W. Development of nano-and microscale composite 3D scaffolds using PPF/DEF-HA and micro-stereolithography // *Microelectronic Engineering*. – 2009. – T. 86, № 4-6. – C. 1465-1467.
168. Ronca A., Ambrosio L., Grijpma D. W. Preparation of designed poly (D, L-lactide)/nanosized hydroxyapatite composite structures by stereolithography // *Acta biomaterialia*. – 2013. – T. 9, № 4. – C. 5989-5996.
169. Bian W., Li D., Lian Q., Zhang W., Zhu L., Li X., Jin Z. Design and fabrication of a novel porous implant with pre-set channels based on ceramic stereolithography for vascular implantation // *Biofabrication*. – 2011. – T. 3, № 3. – C. 034103.

170. Noyes M. P., Meccia B., Spencer Jr E. E. Five-to ten-year follow-up with a partially cemented all-polyethylene bone-ingrowth glenoid component // *Journal of shoulder and elbow surgery*. – 2015. – Т. 24, № 9. – С. 1458-1462.
171. Chakrabarty G., Vashishtha M., Leeder D. Polyethylene in knee arthroplasty: A review // *journal of clinical orthopaedics and trauma*. – 2015. – Т. 6, № 2. – С. 108-112.
172. Ridwan-Pramana A., Wolff J., Raziei A., Ashton-James C. E., Forouzanfar T. Porous polyethylene implants in facial reconstruction: outcome and complications // *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. – 2015. – Т. 43, № 8. – С. 1330-1334.
173. Сенатов Ф. С. Микроструктура и свойства композитов медицинского назначения на основе СВМПЭ. Автореф.... канд. техн. наук // Автореф.... канд. техн. наук, М.: МИСиС. – 2013.
174. Pikis S., Goldstein J., Spektor S. Potential neurotoxic effects of polymethylmethacrylate during cranioplasty // *Journal of Clinical Neuroscience*. – 2015. – Т. 22, № 1. – С. 139-143.
175. Tan H., Ao H., Ma R., Tang T. Quaternised chitosan-loaded polymethylmethacrylate bone cement: biomechanical and histological evaluations // *Journal of Orthopaedic Translation*. – 2013. – Т. 1, № 1. – С. 57-66.
176. Zhang C., Jin R., Zhao P., Lin C. A family of cationic polyamides for in vitro and in vivo gene transfection // *Acta biomaterialia*. – 2015. – Т. 22. – С. 120-130.
177. Cho D., Zhmayev E., Joo Y. L. Structural studies of electrospun nylon 6 fibers from solution and melt // *Polymer*. – 2011. – Т. 52, № 20. – С. 4600-4609.
178. Фомина А., Лесовой Д., Артюхов А., Штильман М. Биodeградируемые полимерные гидрогели на основе производных крахмала и поливинилового спирта // *Успехи в химии и химической технологии*. – 2011. – Т. 25, № 3 (119).
179. Curley C., Hayes J. C., Rowan N. J., Kennedy J. E. An evaluation of the thermal and mechanical properties of a salt-modified polyvinyl alcohol hydrogel for a knee meniscus application // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2014. – Т. 40. – С. 13-22.

180. Sardinha V. M., Lima L., Belangero W., Zavaglia C., Bavaresco V., Gomes J. Tribological characterization of polyvinyl alcohol hydrogel as substitute of articular cartilage // *Wear*. – 2013. – T. 301, № 1-2. – C. 218-225.

181. Nofar M., Ameli A., Park C. B. A novel technology to manufacture biodegradable polylactide bead foam products // *Materials & Design*. – 2015. – T. 83. – C. 413-421.

182. Lasprilla A. J., Martinez G. A., Lunelli B. H., Jardini A. L., Maciel Filho R. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review // *Biotechnology advances*. – 2012. – T. 30, № 1. – C. 321-328.

183. Rokutanda S., Yanamoto S., Yamada S.-i., Naruse T., Inokuchi S., Umeda M. Application of polyglycolic acid sheets and fibrin glue spray to bone surfaces during oral surgery: a case series // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2015. – T. 73, № 5. – C. 1017. e1-1017. e6.

184. Day R. M., Boccaccini A. R., Shurey S., Roether J. A., Forbes A., Hench L. L., Gabe S. M. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds // *Biomaterials*. – 2004. – T. 25, № 27. – C. 5857-5866.

185. Maurus P. B., Kaeding C. C. Bioabsorbable implant material review // *Operative Techniques in Sports Medicine*. – 2004. – T. 12, № 3. – C. 158-160.

186. Athanasiou K. A., Niederauer G. G., Agrawal C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers // *Biomaterials*. – 1996. – T. 17, № 2. – C. 93-102.

187. Hassan K. S. Autogenous bone graft combined with polylactic polyglycolic acid polymer for treatment of dehiscence around immediate dental implants // *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. – 2009. – T. 108, № 5. – C. e19-e25.

188. Saito E., Liao E. E., Hu W. W., Krebsbach P. H., Hollister S. J. Effects of designed PLLA and 50: 50 PLGA scaffold architectures on bone formation in vivo // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2013. – T. 7, № 2. – C. 99-111.

189. Гильмутдинов И., Гильмутдинов И., Кузнецова И., Сабирзянов А. Получение композиционных частиц ибупрофен-полиэтиленгликоль 4000, метилпарабен-полиэтиленгликоль 4000 и исследование их морфологии и дисперсности // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16, № 13.

190. Estrada V., Brazda N., Schmitz C., Heller S., Blazycy H., Martini R., Müller H. W. Long-lasting significant functional improvement in chronic severe spinal cord injury following scar resection and polyethylene glycol implantation // *Neurobiology of disease*. – 2014. – Т. 67. – С. 165-179.

191. Антонова Л. В., Насонова М., Кудрявцева Ю., Головкин А. Возможности использования полиоксикапролатов и поликапролактона в качестве сополимерной основы для создания тканеинженерных конструкций в сердечно-сосудистой хирургии // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – Т. 11, № 1.

192. Low S., Ng Y., Yeo T., Chou N. Use of Osteoplug™ polycaprolactone implants as novel burr-hole covers // *Singapore Med. J.* – 2009. – Т. 50, № 8. – С. 777-780.

193. Beeley N. R., Rossi J. V., Mello-Filho P. A., Mahmoud M. I., Fujii G. Y., de Juan Jr E., Varner S. E. Fabrication, implantation, elution, and retrieval of a steroid-loaded polycaprolactone subretinal implant // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. – 2005. – Т. 73, № 4. – С. 437-444.

194. Шачнева Е. Ю., Магомедова З. А., Малачиева Х. З. Изучение физико-химических свойств частиц карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) в водных растворах // *Техника и технология пищевых производств*. – 2014. № 1 (32).

195. Stopek J., Elachchabi A., Broom D., Ebersole G. Therapeutic implant // *Book Therapeutic implant / EditorGoogle Patents*, 2014.

196. Arion H. Carboxymethyl cellulose (CMC) hydrogels for the filling of implants. Our experience since 15 years // *Ann Chir Plast Esthet.* – 2001. – Т. 46. – С. 55-9.

197. Джанаева З. Н., Хапчаев Р. Т., Томсон В. В. Экспериментальное обоснование использования пористого политетрафторэтилена для склеропластики // Офтальмологические ведомости. – 2008. – Т. 1, № 3.

198. Джанаева З. Н., Астахов Ю. С., Луковская Н. Г. Опыт применения пористого политетрафторэтилена для пломбирования разрывов сетчатки при ее отслоении и ретиношизисе // Офтальмологические ведомости. – 2011. – Т. 4, № 3.

199. Ham J., Miller P. J. Expanded polytetrafluoroethylene implants in rhinoplasty: literature review, operative techniques, and outcome // Facial plastic surgery. – 2003. – Т. 19, № 04. – С. 331-340.

200. Филиппова Е., Кривошеина О., Запускалов И. Интрастромальная имплантация трековых полимерных мембран в лечении эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы // Медицинский Вестник Башкортостана. – 2015. – Т. 10, № 2 (56).

201. Desai N. P., Hubbell J. A. Tissue response to intraperitoneal implants of polyethylene oxide-modified polyethylene terephthalate // Biomaterials. – 1992. – Т. 13, № 8. – С. 505-510.

202. Silva G. G., da Costa Valente M. L., Bachmann L., Dos Reis A. C. Use of polyethylene terephthalate as a prosthetic component in the prosthesis on an overdenture implant // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – Т. 99. – С. 1341-1349.

203. Ng Z. Y., Nawaz I. Computer-designed PEEK implants: a peek into the future of cranioplasty? // Journal of Craniofacial Surgery. – 2014. – Т. 25, № 1. – С. e55-e58.

204. Schwitalla A., Müller W.-D. PEEK dental implants: a review of the literature // Journal of Oral Implantology. – 2013. – Т. 39, № 6. – С. 743-749.

205. Kurtz S. M., Devine J. N. PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants // Biomaterials. – 2007. – Т. 28, № 32. – С. 4845-4869.

206. Roskies M., Jordan J. O., Fang D., Abdallah M.-N., Hier M. P., Mlynarek A., Tamimi F., Tran S. D. Improving PEEK bioactivity for craniofacial reconstruction using a 3D printed scaffold embedded with mesenchymal stem cells // Journal of biomaterials applications. – 2016. – Т. 31, № 1. – С. 132-139.

207. Alqurashi H., Khurshid Z., Yaqin S. A. U., Habib S. R., Rokaya D., Zafar M. S. Polyetherketoneketone (PEKK): An emerging biomaterial for oral implants and dental prostheses // *Journal of Advanced Research*. – 2020.

208. Wang M., Bhardwaj G., Webster T. J. Antibacterial properties of PEKK for orthopedic applications // *International journal of nanomedicine*. – 2017. – Т. 12. – С. 6471.

209. Dawson J. H., Hyde B., Hurst M., Harris B. T., Lin W.-S. Polyetherketoneketone (PEKK), a framework material for complete fixed and removable dental prostheses: A clinical report // *The Journal of prosthetic dentistry*. – 2018. – Т. 119, № 6. – С. 867-872.

210. Hamman N. M., Fleming J., Schlueter E. A., Janson I., Meridew J. D., Kumar M. Method and apparatus for forming porous metal implants // *Book Method and apparatus for forming porous metal implants / EditorGoogle Patents*, 2009.

211. Senatov F., Niaza K., Salimon A., Maksimkin A., Kaloshkin S. Architected UHMWPE simulating trabecular bone tissue // *Materials Today Communications*. – 2018. – Т. 14. – С. 124-127.

212. Yilgor P., Yilmaz G., Onal M. B., Solmaz I., Gundogdu S., Keskil S., Sousa R., Reis R., Hasirci N., Hasirci V. An in vivo study on the effect of scaffold geometry and growth factor release on the healing of bone defects // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2013. – Т. 7, № 9. – С. 687-696.

213. Жаркова И. И. Матрикс из биосинтетического сополимера поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем для инженерии костной ткани // М.: МГУ. – 2017.

214. Рустамов И. Р. Полиакрилимидобразующие сополимеры с низкой температурой имидизации и материалы биомедицинского применения на их основе; Российский химико-технологический университет имени ДИ Менделеева, 2014.

215. Горева А., Шишацкая Е., Волова Т., Сински Э. Д. Характеристика полимерных микрочастиц на основе резорбируемых полиэфиров окисалкановых

кислот в качестве платформы для депонирования и доставки препаратов // Высокомолекулярные соединения. Серия А. – 2012. – Т. 54, № 2. – С. 224-224.

216. Зеличенко Е. А. Разработка защитных биосовместимых керамических и полимерных покрытий на поверхности титана // Book Разработка защитных биосовместимых керамических и полимерных покрытий на поверхности титана / EditorСтаврополь, 2011.

217. Akkouch A., Zhang Z., Rouabhia M. A novel collagen/hydroxyapatite/poly (lactide-co- ϵ -caprolactone) biodegradable and bioactive 3D porous scaffold for bone regeneration // Journal of biomedical materials research Part A. – 2011. – Т. 96, № 4. – С. 693-704.

218. Nosrati H., Pourmotabed S., Sharifi E. A review on some natural biopolymers and their applications in angiogenesis and tissue engineering // Journal of Applied Biotechnology Reports. – 2018. – Т. 5, № 3. – С. 81-91.

219. Dubinenko G., Zinoviev A., Bolbasov E., Kozelskaya A., Shesterikov E., Novikov V., Tverdokhlebov S. Highly filled poly (l-lactic acid)/hydroxyapatite composite for 3D printing of personalized bone tissue engineering scaffolds // Journal of Applied Polymer Science. – 2021. – Т. 138, № 2. – С. 49662.

220. Lebedev S. M., Khlusov I. A., Chistokhin D. M. Poly (lactic acid) based polymer composites for biomedicine // AIP Conference Proceedings. – Т. 2310 –AIP Publishing LLC, 2020. – С. 020180.

221. Senatov F., Niaza K., Stepashkin A., Kaloshkin S. Low-cycle fatigue behavior of 3d-printed PLA-based porous scaffolds // Composites Part B: Engineering. – 2016. – Т. 97. – С. 193-200.

222. Сенатов Ф., Чердынцев В., Сенатова С. Структура пористых композиционных материалов на основе полигидроксibuтирата для тканевой инженерии // Современные проблемы науки и образования. – 2013. № 4. – С. 79-79.

223. Bose S., Darsell J., Kintner M., Hosick H., Bandyopadhyay A. Pore size and pore volume effects on alumina and TCP ceramic scaffolds // Materials Science and Engineering: C. – 2003. – Т. 23, № 4. – С. 479-486.

224. Darsell J., Bose S., Hosick H. L., Bandyopadhyay A. From CT scan to ceramic bone graft // *Journal of the American Ceramic Society*. – 2003. – Т. 86, № 7. – С. 1076-1080.

225. Bose S., Darsell J., Hosick H. L., Yang L., Sarkar D. K., Bandyopadhyay A. Processing and characterization of porous alumina scaffolds // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2002. – Т. 13, № 1. – С. 23-28.

226. Дружинина Т. В., Талалаев С. Я., Закиров Н. П., Щаденко С. В., Хабибуллин Ш. А., Хлусов И. А., Литвинова Л. С. Клеточные реакции на трехмерные матриксы из полимолочной кислоты и гидроксиапатита, полученные методом 3D-печати // *Бюллетень сибирской медицины*. – 2016. – Т. 15, № 5.

227. Zhang W.-x., Wang Y.-z. Synthesis and properties of high molecular weight poly (lactic acid) and its resultant fibers // *Chinese Journal of polymer science*. – 2008. – Т. 26, № 04. – С. 425-432.

228. Jukkala-Partio K., Laitinen O., Vasenius J., Partio E. K., Toivonen T., Tervahartiala P., Kinnunen J., Rokkanen P. Healing of subcapital femoral osteotomies fixed with self-reinforced poly-L-lactide screws: an experimental long-term study in sheep // *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. – 2002. – Т. 122, № 6. – С. 360-364.

229. Загородний Н. В., Королев А. В., Ахпашев А. А., Гнелица Н. Н., Ильин Д. О., Хасаншин М. М., Лягин А. С. Поведение имплантатов в костной ткани в различные сроки согласно МРТ-исследованию // Режим доступа: <http://www.lechenie-sustavov.ru/patient/articles/povedenie-implantatov-v-kostnoj-tkani-v-razlichnye-sroki-soglasno-mrt-issledovaniyu>.

230. Owens D. K., Wendt R. Estimation of the surface free energy of polymers // *Journal of applied polymer science*. – 1969. – Т. 13, № 8. – С. 1741-1747.

231. Eling B., Gogolewski S., Pennings A. Biodegradable materials of poly (l-lactic acid): 1. Melt-spun and solution-spun fibres // *Polymer*. – 1982. – Т. 23, № 11. – С. 1587-1593.

232. Zhang R., Ma P. X. Biomimetic polymer/apatite composite scaffolds for mineralized tissue engineering // *Macromolecular bioscience*. – 2004. – T. 4, № 2. – С. 100-111.

233. Agrawal C. M., Athanasiou K. A. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants // *Journal of biomedical materials research*. – 1997. – T. 38, № 2. – С. 105-114.

234. Xu N., Ye X., Wei D., Zhong J., Chen Y., Xu G., He D. 3D artificial bones for bone repair prepared by computed tomography-guided fused deposition modeling for bone repair // *ACS applied materials & interfaces*. – 2014. – T. 6, № 17. – С. 14952-14963.

235. Wang H., Li Y., Zhai L. Study on Degradable Poly Lactic Acid/Hydroxyapatite Hybrid Material II. Preparation and Degradation of Poly Lactic Acid/Hydroxyapatite Hybrid Material // *Polymer Materials Science And Engineering*. – 2006. – T. 22, № 3. – С. 247.

236. Hallab N. J., Bundy K. J., O'Connor K., Moses R. L., Jacobs J. J. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion // *Tissue engineering*. – 2001. – T. 7, № 1. – С. 55-71.

237. Senatov F. S., Niaza K. V., Zadorozhnyy M. Y., Maksimkin A., Kaloshkin S., Estrin Y. Mechanical properties and shape memory effect of 3D-printed PLA-based porous scaffolds // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. – 2016. – T. 57. – С. 139-148.

238. Senatov F., Zadorozhnyy M. Y., Niaza K., Medvedev V., Kaloshkin S., Anisimova N. Y., Kiselevskiy M., Yang K.-C. Shape memory effect in 3D-printed scaffolds for self-fitting implants // *European Polymer Journal*. – 2017. – T. 93. – С. 222-231.

239. Zhang C., Feng Q., Zhang T., Chen J., Lu C., Wu H. In vitro biologic evaluation on nano-hydroxyapatite/poly (L-lactic acid) biocomposites fabricated using in-situ growth method // *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi*= *Journal of biomedical engineering*= *Shengwu yixue gongchengxue zazhi*. – 2012. – T. 29, № 2. – С. 307-310.

240. Bourbigot S., Fontaine G., Gallos A., Bellayer S. Reactive extrusion of PLA and of PLA/carbon nanotubes nanocomposite: processing, characterization and flame retardancy // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2011. – T. 22, № 1. – С. 30-37.

241. Xu L., Xiong Z. C., Yang D., Zhang L. F., Chang J., Xiong C. D. Preparation and in vitro degradation of novel bioactive polylactide/wollastonite scaffolds // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2009. – T. 114, № 6. – С. 3396-3406.

242. Toropkov N. E. et al. Influence of synthesis conditions on the crystallinity of hydroxyapatite obtained by chemical deposition // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. – IOP Publishing, 2016. – T. 156. – №. 1. – С. 012038.

243. Petrovskaya T. S. Toropkov, N. E., Mironov, E. G., & Azarmi, F. 3D printed biocompatible polylactide-hydroxyapatite based material for bone implants // *Materials and Manufacturing Processes*. – 2018. – T. 33. – №. 16. – С. 1899-1904.

244. Petrovskaya, T., & Toropkov, N. (2020, December). Thermal behavior of PLA and calcium phosphate compositions. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2310, No. 1, p. 020253). AIP Publishing LLC.

245. Borowicz M., Paciorek-Sadowska J., Isbrandt M., Grzybowski Ł., Czupryński B. Glycerolysis of Poly(lactic acid) as a Way to Extend the “Life Cycle” of This Material // *Polymers*. – 2019. – T. 11, № 12. – С. 1963.

246. Mansourizadeh F., Asadi A., Oryan S., Nematollahzadeh A., Dodel M., Asghari V. M. PLLA/HA Nano composite scaffolds for stem cell proliferation and differentiation in tissue engineering //. – 2013.

247. Oreffo R. O., Driessens F. C., Planell J. A., Triffitt J. T. Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements // *Biomaterials*. – 1998. – T. 19, № 20. – С. 1845-1854.

248. Glotova V. N., Bikhullina T. N., Lukianov A. E., Novikov V. T., Poharukova Y. E. Lactide and lactic acid oligomer solubility in certain solvents // *Petroleum & Coal*. – 2016. – T. 58, № 5.

249. Петровская Т.С., Торопков Н.Е., Фоменко А.Н. Оценка биоактивных свойств минерально-полимерного композита "фосфаты кальция - полилактид" // *Стекло и керамика*. – 2021. – №8 – С. 22-28.

250. Petrovskaya T. S. Toropkov, N. E., Fomenko A.N. (2021) *Estimation of Bioresorption of a Highly Filled Mineral – Polymer Composite Calcium Phosphate – Polylactide. In AIP Conference Proceedings. AIP Publishing LLC.*

251. Stuchebrov, S. G., Bulavskaya, A. A., Cherepennikov, Y. M., Grigorieva, A. A., Miloichikova, I. A., Toropkov, N. E., & Shevelev, M. V. *Changes in the physical and structural properties of 3D-printed plastic samples under radiation exposure by nearly therapeutic dose //Journal of Instrumentation. – 2020. – T. 15. – №. 04. – C. C04046.*

252. Bulavskaya, A. A., Cherepennikov, Y. M., Grigorieva, A. A., Miloichikova, I. A., Toropkov, N. E., & Stuchebrov, S. G. (2021). *Investigation of the properties changes observed for plastic samples made by fused deposition modelling under radiation exposure. In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering (Vol. 1019, No. 1, p. 012068). IOP Publishing.*

253. Bulavskaya A. A. Stuchebrov, S. G., Cherepennikov, Y. M., Miloichikova, I. A., & Toropkov, N. E. *Changes of 3d-Printed Plastic Samples Mechanical Properties Caused by 6 MeV Electron Beam Irradiation //Radiation from Relativistic Electrons in Periodic Structures (RREPS-19): book of abstracts XIII International Symposium, September 15-20, 2019, Belgorod, Russian Federation.—Tomsk, 2019. – 2019. – C. 99.*