

На правах рукописи

Федотов Александр Юрьевич

ПОРИСТЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ  
ФОСФАТНО-КАЛЬЦИЕВАЯ КЕРАМИКА –  
БИОПОЛИМЕР ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНЫХ  
ТКАНЕЙ

Специальность 05.17.11 – Технология силикатных и тугоплавких  
неметаллических материалов

Специальность 05.16.06 – Порошковая металлургия и  
композиционные материалы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата технических наук

Москва 2010

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

- Научный руководитель: доктор технических наук, член-корреспондент РАН  
Баринов Сергей Миронович
- Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор  
Кудинов Владимир Владимирович
- доктор технических наук  
Суздальцев Евгений Иванович
- Ведущая организация: Российский химико-технологический  
университет имени Д.И. Менделеева.

Защита диссертации состоится «    » Ноября 2010 г. в «    » часов на заседании специализированного совета Д 002.060.04 в Учреждении Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН по адресу: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д.49.

С диссертацией можно ознакомиться на сайте института и сайте совета молодых ученых ИМЕТ РАН:

<http://www.imet.ac.ru/>.

Автореферат разослан «    » Октября 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат технических наук

В.С. Комлев

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Поражения костных тканей в результате патологических заболеваний, таких как остеомиелит, остеосаркома, остеопороз, или травм занимают одно из первых мест среди причин смертности, временной нетрудоспособности и развития инвалидности. Для восстановления работоспособности человека поврежденные участки костной ткани замещают имплантатами из биологически инертных (металлы, пластмассы) или активных материалов (фосфатно-кальциевая керамика, биостёкла, костные алло- и аутографты). Однако такой подход не всегда приводит к положительным результатам из-за возможного отторжения организмом инертных материалов, деградации здоровой костной ткани в месте контакта, механический несовместимости ткани-хоста и имплантата, опасности иммунных реакций (аллографты), необходимости вторичных хирургических операций (аутографты).

В последнее десятилетие активно развивается принципиально иная концепция – так называемая тканевая инженерия. Она основана не на замещении, а на регенерации костной ткани. Организм сам может восстанавливать поврежденную костную ткань, если для этого созданы надлежащие условия: имеется матрикс соответствующей архитектуры, на котором происходит наращивание ткани, и необходимые стимулы для остеогенеза. Одним из ключевых моментов этой медицинской технологии является материал матрикса, который должен обладать определенными качествами. Он должен быть биологически совместим с организмом; иметь взаимосвязанные поры размером от 100 мкм до 1 мм и каналами между порами от 10 до 100 мкм, необходимые для обеспечения биологических потоков, прорастания костной ткани, сосудов и нервных окончаний в имплантат; обладать кинетикой биологической деградации (резорбции) в организме, согласующейся с кинетикой остеогенеза; должен обладать достаточными показателями механических свойств, чтобы выдерживать физиологические нагрузки в переходный период.

Полагают, что оптимальным материалом матрикса является композит фосфатно-кальциевая керамика – биополимер, моделирующий по фазовому составу и микроструктурной организации костную ткань. Наиболее перспективными фосфатами кальция для

изготовления композитов является гидроксиапатит (ГА), трикальцийфосфат (ТКФ) и карбонат-замещенный ГА (КГА), а биологическими полимерами – хитозан, желатин и их комбинация.

Разработка физико-химических основ технологии композиционных материалов, сочетающих биосовместимость и твердость фосфатно-кальциевой керамики с регулируемой резорбируемостью и эластичностью, свойственной биополимерам, является актуальной, пока еще не решенной задачей, имеющей важное социальное значение. Представляет интерес провести исследование в широком диапазоне составов: от полностью керамического до биополимерного, что потребует сочетания разных технологических подходов.

**Цель работы.** Разработка физико-химических основ формирования микроструктуры и свойств, и создание пористых композиционных материалов в системе фосфатно-кальциевая керамика – биополимер с керамической и биополимерной матрицами для применения в тканевой инженерии.

Для достижения указанной цели в работе решались следующие основные задачи:

- разработка основ формирования микроструктуры и свойств высокопористых композиционных материалов (ПКМ) с керамическим каркасом, пропитанных биополимером, и установление влияния химического и фазового состава керамической и полимерной компонент на микроструктуру и свойства ПКМ;

- разработка основ формирования микроструктуры и свойств ПКМ с биополимерным каркасом, армированных частицами фосфатно-кальциевого наполнителя; изучение влияния технологических параметров, химического, фазового состава и дисперсности наполнителя на формирование микроструктуры, механических и химических свойств ПКМ;

- изготовление лабораторных партий ПКМ и проведение сравнительных биологических испытаний *in vitro* и *in vivo* с целью прогнозирования поведения материалов в организме человека.

**Научная новизна** полученных результатов заключается в следующем:

1) Установлен интервал соотношения компонентов шликера из порошков фосфатов кальция и полиакриламида, и температурный режим термической обработки для изготовления керамики с пористостью 55 – 75%, размером пор 200 – 500 мкм методом пропитки ячеистого полиуретанового темплата с последующим его выжиганием и спеканием керамического каркаса.

2) Созданы высокопористые композиционные материалы с гидроксипатитовым и трикальцийфосфатным керамическим каркасом, пропитанным хитозаном разной молекулярной массы. Установлены закономерности влияния пропитки на прочность ПКМ; показано, что прочность керамики возрастает до 12 раз в результате залечивания трещин при пропитке. Выявлено, что пропитка позволяет снизить чувствительность прочности пористых ГА и ТКФ матриц к пористости: коэффициент уравнения М.Ю. Бальшина с ростом концентрации раствора хитозана снижается до 2-х раз. Использование высокомолекулярного хитозана более эффективно для упрочнения керамических каркасов.

3) Разработаны основы формирования микроструктуры и свойств ПКМ с биополимерным каркасом, армированных частицами и гранулами фосфатно-кальциевого наполнителя: ГА, ТКФ и КГА. Технология основана на вспенивании суспензий с последующей сублимационной сушкой.

4) Установлено влияние вида и количества (до 85 об.%) наполнителя на микроструктуру, эластичность и кинетику растворения ПКМ в жидкости, моделирующей внеклеточные жидкости организма. Растворимость уменьшается в ряду ТКФ>ГА>КГА вследствие изменения рН от 7 до 9. Эластичность ПКМ с биополимерной матрицей линейно снижается с увеличением содержания наполнителя. Наименьшей эластичностью обладают ПКМ, армированные КГА, обладающего наибольшим значением рН.

**Практическая значимость** работы состоит в следующем:

Разработаны основы формирования микроструктуры и свойств ПКМ на основе керамического и полимерного каркасов. Изготовлены лабораторные партии ПКМ, доклинические испытания которых в медицинских учреждениях продемонстрировали высокую

биологическую совместимость и перспективность применения ПКМ в клинической практике, в частности для восстановления костной ткани в онкологии.

**На защиту выносятся:**

1) Параметры технологии ПКМ с керамическим каркасом, пропитанных биополимером, и результаты исследования их микроструктуры, фазового состава и свойств.

2) Параметры технологии ПКМ с полимерным каркасом, армированным фосфатами кальция, и результаты исследования их микроструктуры, фазового состава, кинетики растворения и механических свойств.

**Апробация работы и публикации.** Материалы диссертационной работы доложены на конференциях: «Международный форум по нанотехнологиям» Москва, 2009г.; «Нанотехнологии в онкологии» Москва, 2009г.; «Всероссийской конференции аспирантов и молодых научных сотрудников» Москва, ИМЕТ РАН, 2008, 2009 гг., 1-й Международной конференции «Функциональные наноматериалы и высокочистые вещества», Суздаль, 2008; «Международном конгрессе по костной и тканевой инженерии» Германия, Ганновер, 2008г.; конференции «Деформация и разрушение порошковых материалов» Словакия, Стара Лесна, 2008г.; «Третьем конгрессе по регенеративной биологии и медицине, и третьем конгрессе немецкого общества по изучению стволовых клеток» Германия, Штутгарт, 2008г.; конференции «Керамика, клетки и ткани» Италия, Фаенца, 2009г.

Работа выполнена в соответствии с планом НИР Учреждения Российской Академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН; поддержана проектами программы Президиума РАН П7, Отделения химии и наук о материалах 50X; проектом программы Президиума РАН Фундаментальные науки – медицине "Разработка и медико-биологические испытания наноструктурированных и биогибридных материалов, пригодных для имплантации, в том числе для клеточной терапии»; государственным контрактом Миннауки РФ №02.513.12.3008 «Биосовместимые резорбируемые композиты для клеточной регенерации поврежденной

костной ткани»; грантами РФФИ № 06-03-08028офи, № 08-03-09418-моб\_з, № 08-08-00224-а.

Основное содержание работы изложено в 17 научных работах (2 патента), 8 из которых - в списке отечественных журналов, рекомендованных ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов и списка используемой литературы, включающего 134 наименования. Диссертация содержит 149 страниц, в том числе 6 таблиц, 50 рисунков.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и решаемые в работе задачи.

В первой главе представлен аналитический обзор литературы по пористым композиционным кальций-фосфатным и полимерным материалам, предназначенным для использования в качестве матриц в инженерии костной ткани. Приведены данные о составе, структуре и свойствах естественной костной ткани. Описаны свойства и структура фосфатов кальция, и биополимеров. Рассмотрены известные подходы к созданию высокопористых композиционных материалов в системе фосфаты кальция – биополимер. На основании данных литературного обзора сформулированы цели и задачи исследования. Обоснован выбор двух типов разрабатываемых материалов, а также выбор ГА, ТКФ, КГА, хитозана и желатина в качестве компонентов ПКМ.

Во второй главе описаны материалы для исследования, приведены сведения по исходным реагентам и синтезу фосфатов кальция. Описаны методики измерения удельной поверхности, пористости, линейной усадки, прочности, эластичности, проведения рентгеновского фазового анализа (РФА), ИК-спектроскопии, термогравиметрического и дифференциального термического анализа, сканирующей электронной микроскопии с локальным анализом, просвечивающей электронной микроскопии, растворимости, проведения биологических испытаний *in vitro* и *in vivo*.

В работе использовали следующие реагенты: нитрат кальция  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , гидрофосфат аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , водный раствор аммиака 25%, оксид кальция  $\text{CaO}$ , карбонат аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , уксусная

кислота  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , этиловый спирт  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  98%, полиакриламид ( $-\text{CH}_2\text{CHCONH}_2-$ )<sub>n</sub>, желатин Aldrich, хитозан среднемoleкулярный (с.м.х., 100-300 кДа) и высокомолекулярный (в.м.х., 500 кДа) Aldrich и ПАВ лаурилсульфат натрия  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ .

Площадь удельной поверхности (УП) порошков определяли методом низкотемпературной адсорбции азота по методу Брунауэра-Эммета-Теллера (БЭТ) на приборе Tristar Micromeritics. Линейную усадку определяли посредством измерения линейных размеров образцов до и после спекания. Общую пористость материалов оценивали по массе и геометрическим размерам. Рентгенофазовый анализ проводили на дифрактометре Shimadzu D-6000 с высокотемпературной камерой. Идентификацию фаз осуществляли по картотеке JCPDS. ИК-спектроскопические исследования проводили на спектрометре Nicolet Avatar 330 FT-IR. ДТА и ТГ проводили на приборе синхронного термического анализа STA 409 Luxx в температурном диапазоне от комнатной до 1200 °С при скорости нагревания 10 °/мин.

Микроструктуру пористых композиционных материалов исследовали на сканирующих электронных микроскопах LEO 1420 Carl Zeiss, Cross Beam 1540 ESB, Leo Supra 50 VP и просвечивающем электронном микроскопе EMB-100BR с приставкой для дифракции электронов EG-100M.

Определение вязкости растворов проводили на синусоидальном вибровязкозиметре SV-10 с диапазоном определения вязкости от 0,3 до 10000 мПа\*сек. Частота вибрации сенсорных пластин 30 Гц. Точность измерения  $\pm 5\%$ .

Растворимость композиционных материалов определяли по потере массы при помощи весов AND GR-200 с точностью до  $10^{-4}$  г. Изучение растворимости керамических наполнителей и каркасов проводили в 0.1 М растворе NaCl, моделирующем внеклеточную жидкость организма. Концентрацию кальция в жидкой фазе измеряли с использованием иономера Эконикс-001 с ионселективным электродом.

Испытания для определения прочности при сжатии проводили на испытательной машине Instron 5581. Точность измерения нагрузки 0,25%. Скорость нагружения составляла 0,5 мм/мин. Оценку эластичности ПКМ с биополимерными матрицами проводили на испытательной машине Instron ElectroPuls E-3000, оснащенной ванной для испытаний в различных средах. Испытание на эластичность



проводили по модифицированному методу, описанному в ГОСТ 26605-93. Образцы помещали в физиологический раствор при 37°C на одни сутки, затем их циклически деформировали с шагом деформации 1% до такой ее предельной величины ( $e_{np}$ ), при которой размер образца переставал восстанавливаться до исходного значения после снятия нагрузки.

Биологические испытания были выполнены в ФГУ Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий (лаборатория прогноза под руководством д.б.н., проф. Сергеевой Н.С.) в рамках совместного проекта по госконтракту Миннауки РФ №02.513.12.3008. Испытания *in vitro* проводили на фибробластах человека (ФЧ). ФЧ высаживали на стерилизованные материалы и выдерживали их при 37°C в условиях насыщенной влажности при CO<sub>2</sub> 5%. Оценку цитотоксичности проводили по стандартному МТТ тесту. Для проведения испытаний *in vivo* использовали две модели: для оценки биосовместимости использовали модель подкожной трансплантации ПКМ мышам-самкам линии BDF<sub>1</sub>; для оценки динамики остеозамещения использовали модель ограниченного костного дефекта у крыс-самок линии Wistar

В третьей главе описаны результаты разработки физико-химических основ изготовления ПКМ, изучения микроструктуры и свойств ПКМ с керамическим каркасом.

Исходные порошки ГА и ТКФ после термообработки при 700°C состоят из агломератов размером до 1 мкм, которые сложены из частиц анизотропной формы, имеющих длину и ширину соответственно 30-100 нм и 20-60 нм. Для изготовления керамических матриц была выбрана технология пропитки ячеистого полимерного темплата с последующим его выжиганием. Данная технология позволяет получить материал с пористостью до 80% и взаимосвязанными порами размером до 500 мкм, необходимыми для тканевой инженерии. В качестве полимерного каркаса использовали пористый полиуретан (ПУ) с плотностью 19 кг/м<sup>3</sup>, поскольку он обладает необходимой структурой и при обжиге полностью удаляется. Керамическую суспензию готовили на основе водного раствора полиакриламида концентрацией 1 г/мл и порошка ГА или ТКФ с соотношением порошка к раствору 1/1, 1/1,2 и 1/1,4 по массе. Содержание фосфатов кальция в суспензии влияет на пористость конечных керамических матриц: для указанных соотношений получена керамика пористостью 55, 65 и 75%,

соответственно. При меньших концентрациях фосфата кальция образцы при обжиге разрушаются, а при больших концентрациях вязкость суспензии слишком велика, так что нарушается равномерность пропитки ПУ матрикса по объему.

Пропитку ПУ каркасов вели следующим образом: ПУ каркас заданной формы полностью погружали в керамический шликер, деформировали (сжатием) каркас на 50%, после чего за счет проникновения шликера в каркас он восстанавливал свой объем. Операцию повторяли не менее 5 раз.

По данным термического анализа при нагревании (рис 1) установлены температуры изотермических выдержек.

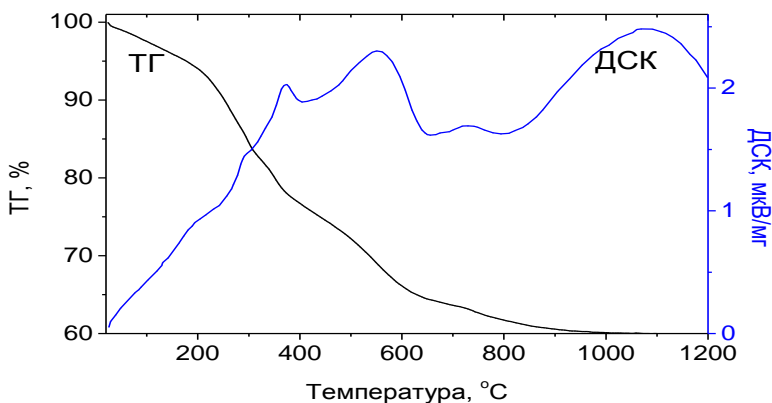


Рис. 1. Кривые ТГ и ДТА ПУ-темплата, пропитанного шликером ГА на основе полиакриламида.

Изотермические выдержки при 230, 390 и 570 °C позволяют избежать образования в керамических матриксах дефектов, вызванных резким выделением летучих компонентов, образующихся при разложении ПУ и полиакриламида, с нарушением целостности керамического каркаса. Скорость нагрева 5 град/мин является достаточной, чтобы пары воды уходили без нарушения сплошности керамического каркаса. Изотермическая выдержка при температуре 1200°C обеспечивает протекание всех необходимых процессов при спекании, как ГА, так и ТКФ.

На рис. 2 приведена технологическая схема пористых композиционных матриксов с керамическим каркасом. В 10%-ный

раствор полиакриламида вводили частицы фосфатов кальция и перемешивали до гомогенного состояния. Затем пропитывали ячеистую ПУ подложку керамическим шликером и сушили заготовку при 80<sup>0</sup>С. На следующем этапе проводили обжиг ГА и ТКФ заготовок по выше установленному режиму с изотермическими выдержками при 230, 390 и 570 °С и конечной температуре 1200<sup>0</sup>С.

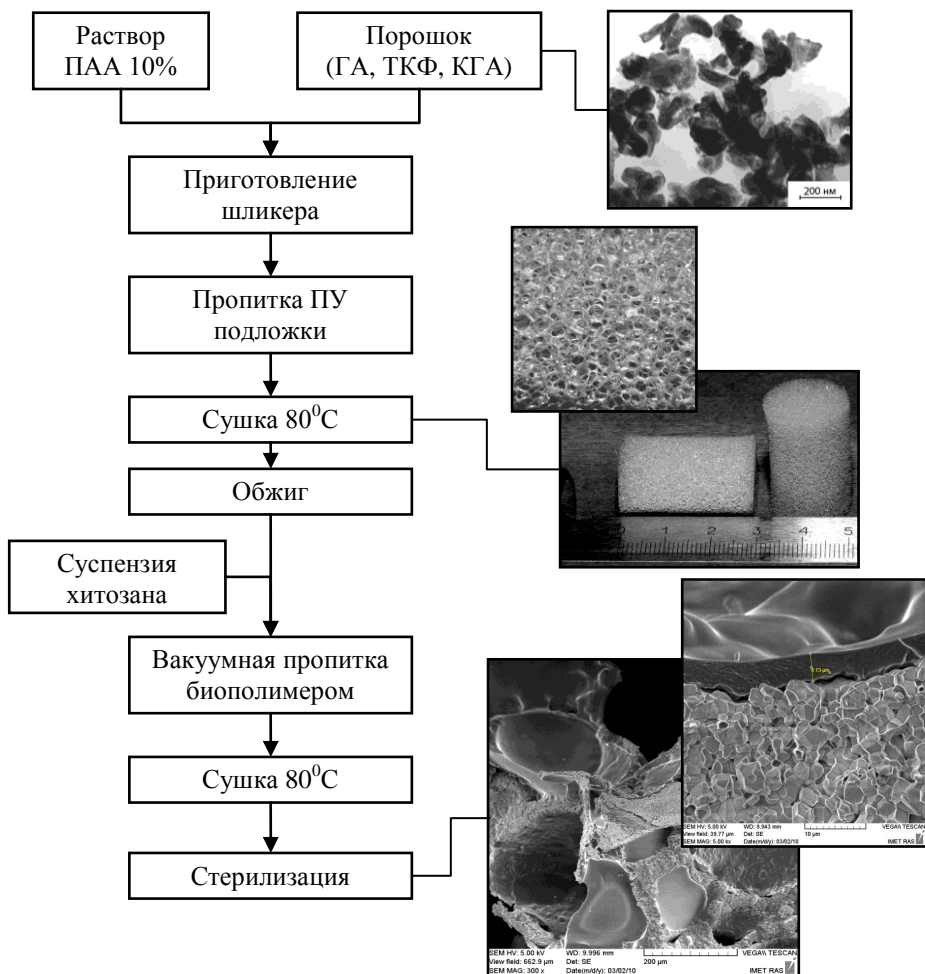


Рис. 2. Технологическая схема пористых композиционных матриц с керамическим каркасом.

После этого керамический каркас пропитывали под вакуумом суспензиями хитозана разной концентрации. Использовали хитозан молекулярной массой 300 кДа и 500 кДа, поскольку он биологически совместим, является биологически резорбируемым и его запасы в биосфере практически не ограничены. Суспензии хитозана готовили на основе 8%-ного раствора уксусной кислоты. Затем матрицы сушили и стерилизовали жестким  $\gamma$ -излучением. Содержание хитозана в конечном ПКМ составляет от 0 до 25 об.%.

Изучение растворимости полученных матриц проводили в 0.1М растворе NaCl в течение до 28 дней при постоянном объеме жидкой фазы (замкнутая система); такую методику обоснованно применяют при исследованиях биоматериалов. Установлено, что на 7 сутки концентрация ионов кальция в физиологическом растворе с образцами ГА и ТКФ составляла 0,53 и 0,92 мг/л, соответственно, вследствие более высокой растворимости ТКФ. При дальнейшей выдержке ПКМ в физиологическом растворе концентрация ионов кальция изменялась незначительно.

На рис. 3 а,б представлена микроструктура ГА-матриц с пористостью 65%. Пористость матриц всех составов является связанной и многоуровневой. Матрицы содержат крупные взаимообщающиеся округлые поры со средним размером 200-500 мкм (около 80% от общего объема пор), унаследованные от ПУ темплата. На стыке керамических полусфер образуется сложная система полостей размером около 50 мкм связанных между собой, формирующаяся при выгорании полиуретановой губки.

Также в стенках керамического матрикса присутствуют микропоры неправильной округлой формы размером менее 2 мкм, которые являются следствием процессов спекания и выгорания полимера-связки (полиакриламид). Содержание таких пор составляет около 6% от общего объема пор. Толщина стенок, из которых состоит матрикс, составляет от 50 до 150 мкм. Стенки матрикса состоят из равномерно распределенных по всему объему зерен ГА с ярко выраженными границами, что обеспечивает высокую шероховатость поверхности. Зерна имеют гексагональную форму с размером от 1 до 4 мкм в поперечном сечении.

На рис. 3 (в, г) приведена микроструктура ГА-матриц с пористостью 65%, пропитанного 5%-ным раствором хитозана. Вся внутренняя поверхность матрикса покрыта пленкой полимера. Хитозан

образует пленку на поверхности керамического каркаса, заполняет дефекты керамической структуры вследствие хорошего смачивания керамики.

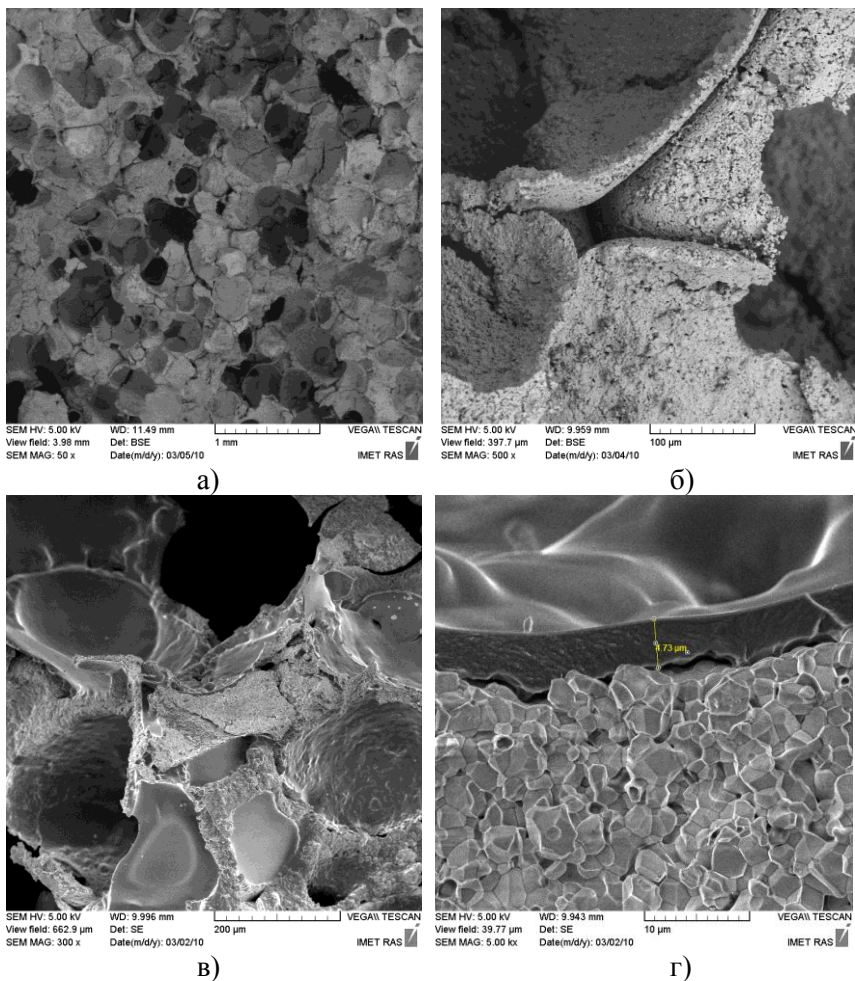


Рис.3. Микрофотографии матриц с керамическим каркасом:  
 а, б- матрикс на основе ГА; в, г- матрикс на основе ГА, пропитанного 5% раствором средне-молекулярного хитозана.

Структура ТКФ-матриков схожа со структурой ГА-матриков. Однако, основное отличие заключается в том, что увеличивается размер зерна до 2 – 6 мкм.

С ростом пористости прочность керамических матриков, как исходного, так и пропитанных растворами средне- и высокомолекулярного хитозана различных концентраций, снижается. Прочность керамических ГА-матриков выше прочности ТКФ-матриков. Например, максимальная прочность ГА и ТКФ матриков с пористостью 65% при нагружении со скоростью 0,5 мм/мин достигает 0,84 и 0,59 МПа соответственно, что согласуется с литературными данными для соответствующих керамических материалов.

Прочность матриков на основе ТКФ с пористостью 53% составляет 1,2 МПа и при увеличении пористости до 75,5 % падает до 0,28 МПа. Изменение прочности от пористости имеет экспоненциальный характер, что согласуется с известными экспериментальными зависимостями Рышкевича и М.Ю. Бальшина

$$\sigma = \sigma_0 \exp(-q \cdot P) \quad (4)$$

$$\sigma = \sigma_0 (1-P)^m \quad (5)$$

где:  $\sigma$  – прочность материала,  $\sigma_0$  – прочность материала без пор,  $P$  – пористость. Величины коэффициентов  $q$  и  $m$  характеризуют степень влияния пор на прочность.

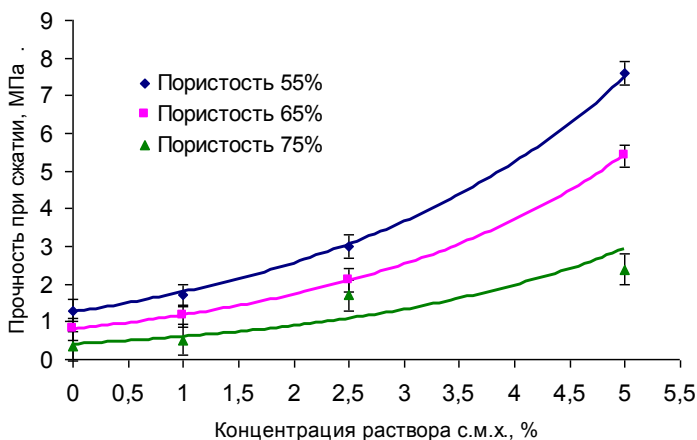


Рис. 4. Зависимость прочности при сжатии от концентрации матриков на основе ГА, пропитанных с.м.х.

В результате инфильтрации ГА-матриц хитозаном происходит упрочнение материала (рис. 4). При низких концентрациях полимеров (1%) происходит незначительное упрочнение образцов. Наибольшее упрочнение достигается при больших концентрациях растворов полимера. Так, например, при пропитке ГА-матриц (с пористостью 55%) 5%-ной суспензией с.м.х. прочность изменяется от 1,3 до 7,6 МПа (возрастает в 6 раз). При инфильтрации матриц ГА (с пористостью 75%) 5%-ной суспензией с.м.х. прочность изменяется от 0,35 до 2,39 МПа (возрастает в 7 раз).

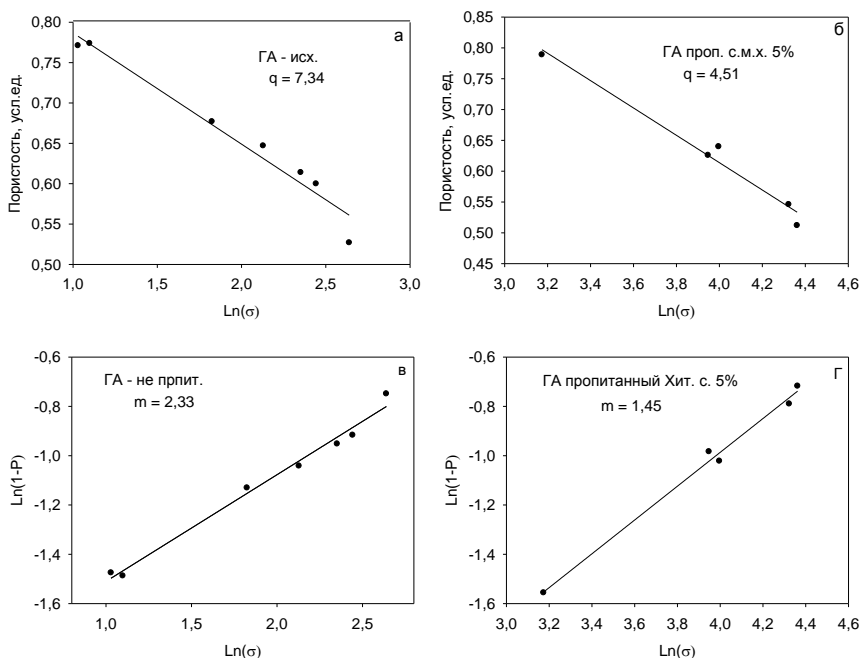


Рис. 5. Соотношение между прочностью и пористостью (а,б – по формуле Рышкевича (4) и в, г – по формуле М.Ю. Бальшина (5)) матриц на основе ГА, инфильтрованных с.м.х.: а, в – исх. б, г – 5%-ной суспензией.

Изменение прочности при инфильтрации обусловлено залечиванием дефектов структуры (трещин Гриффитса). С ростом количества полимера, остающегося в матрице, поры становятся более ровной, округлой формы, создающую пониженную концентрацию напряжений у пор и дефектов.

На рис.5 приведены графики зависимостей прочности ГА-матриц (исходных и пропитанных) от пористости, построенные согласно уравнениям 4 и 5. Коэффициенты  $q$  и  $m$ , рассчитанные по результатам механических испытаний, представлены в табл. 1. Коэффициент  $q$  снижается с ростом концентрации растворов с.м.х. и в.м.х. Так исходные ГА-матрицы имеют  $q = 7,34$  и при инфильтрации, с ростом концентрации с.м.х. до 5%, постепенно снижается до 4,51. Аналогично происходит уменьшение значения коэффициента  $m$  с ростом концентрации полимера.

Таблица 1. Значения показателей  $q$  и  $m$  функций Рышкевича и М.Ю. Бальшина для композиционных матриц.

Состав	Коэфф.	с.м.х.				в.м.х.		
		0%	1%	2,5%	5%	0,5%	1%	2%
ГА	$q$	7,34	7,16	5,47	4,51	7,21	5,1	4
	$m$	2,33	2,2	1,7	1,45	2,34	1,62	1,32
ТКФ	$q$	9,5	7,52	6,07	5,95	6,31	5,99	3,93
	$m$	3,31	2,71	2,2	2,1	2,47	2,1	1,51

Таким образом, разработаны основы формирования микроструктуры и свойств ПКМ пропитанных с.м.х. и в.м.х. в количестве 25 об.%. Установлены закономерности влияния пропитки на прочность. Показано, что пропитка ГА и ТКФ позволяет снизить чувствительность прочности к пористости до 2-х раз. Выявлено, что при пропитке керамического каркаса хитозанами прочность керамики возрастает до 12 раз.

В четвертой главе приведены результаты и изучение микроструктуры и свойств ПКМ с полимерным каркасом.

Для получения полимерных матриц была выбрана технология вспенивания с последующей сублимационной сушкой. Данная технология позволяет получить материал с высокой пористостью (до 98%) и взаимосвязанными порами. В качестве биополимеров использовали среднемолекулярный (300 кДа) хитозан и желатин. Пористые биополимерные матрицы готовили, смешивая 5%-



ный раствор хитозана в уксусной кислоте и водный 10%-ный раствор желатины в массовом соотношении хитозан к желатину: 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90, 0/100 до образования гомогенной смеси. Для получения полимерных матриксов хитозан растворяли в 8%-ном растворе уксусной кислоты. При меньшем содержании уксусной кислоты хитозан растворялся не полностью, в большем содержании уксусной кислоты нет необходимости, поскольку рН конечного матрикса должно быть около 7. Концентрация раствора хитозана 5 % является оптимальной, поскольку при большей концентрации резко возрастает вязкость и при вспенивании не удается получить равномерную структуру.

Вспенивание проводили введением карбоната аммония в суспензию хитозана при интенсивном перемешивании. В результате взаимодействия уксусной кислоты с карбонатом аммония выделяется  $\text{CO}_2$ . Полученную густую пену помещали в полиэтиленовую цилиндрическую форму (диаметр 14 мм, высота 20 мм) и фиксировали структуру (замораживали). Заморозку вели до образования кристаллов льда по всему объему материала при температуре  $-18$ ,  $-45$  и  $-180^\circ\text{C}$ . Затем проводили сублимационную сушку материалов. Полученные матриксы отмывали от остатков уксусной кислоты и продуктов реакции ее с карбонатом аммония в этаноле. Образцы сушили при температуре  $60^\circ\text{C}$  до полного удаления жидкой фазы.

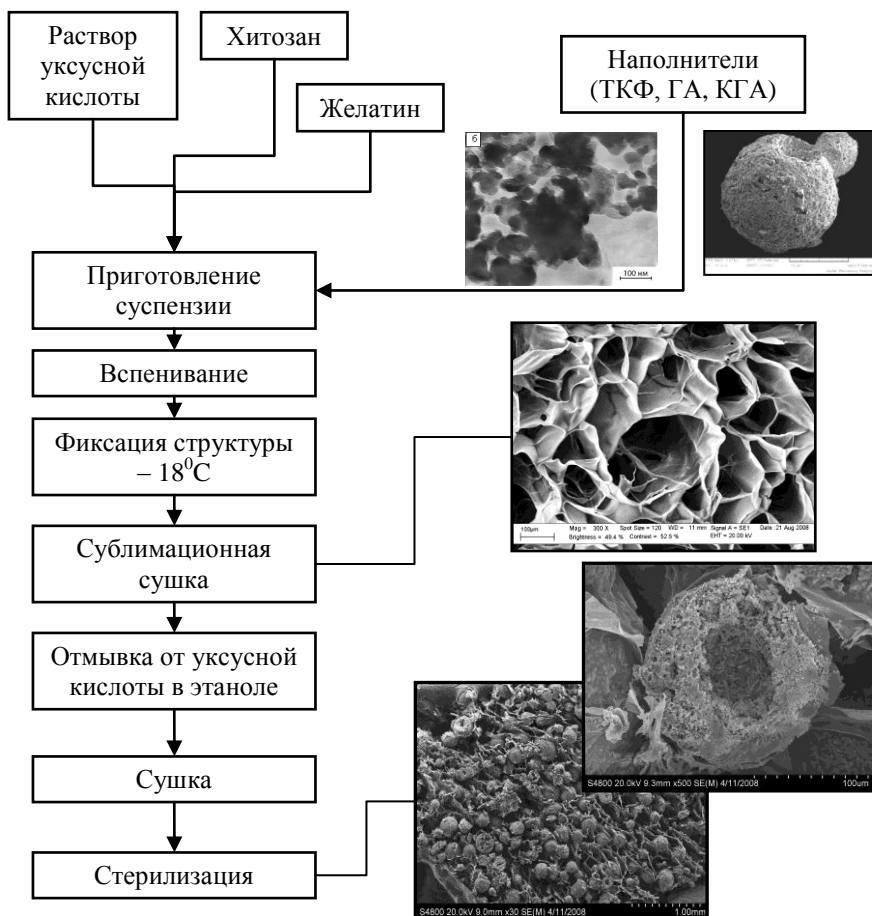
Для получения ПКМ, армированных частицами или гранулами ГА, ТКФ и КГА, в смесь растворов биополимеров перед добавлением вспенивающего агента вводили порошки или гранулы этих фосфатов в количестве до 85 об.% и подвергали интенсивному перемешиванию (рис. 7). Размер частиц составлял 20-200 нм, а гранул 200 – 400 мкм.

Отработаны технологические режимы получения пористых гранул из КГА. Температура обжига понижена до  $700^\circ\text{C}$ , что необходимо для сохранения карбонат групп в составе гранул. Содержание карбонат групп в керамики было 6%. Пористость гранул достигала 60%.

Установлено что, снижение температуры фиксации полимерной пены с  $-18$  до  $-180^\circ\text{C}$  приводит к снижению размера пор до 5 раз и толщины стенок в 10 раз, что обусловлено изменением морфологии и размеров кристаллов льда, образующихся при замерзании пены.

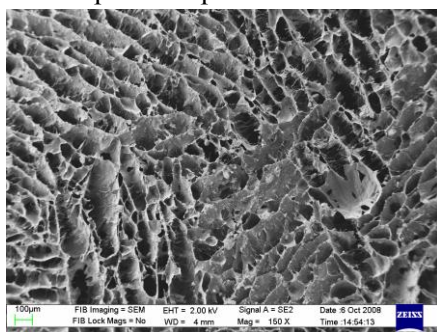
Растворимость хитозановых-матриксов на 28 сутки составляет 3-4 %. При увеличении содержания желатина в материале до 50 масс. %

растворимость становится около 14%. Введение в хитозан желатина в количестве 50 масс.% увеличивает растворимость в 4 раза. Эластичность полимерных матриц достигает 95 %.

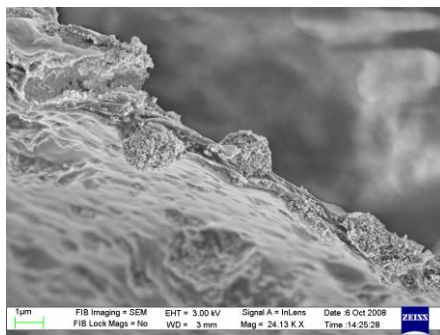


Получены ПКМ с пористостью до 95%, содержащие до 85 масс.% наполнителя. ПКМ имеют равномерную микроструктуру, размер и форма пор зависит от количества и вида наполнителя.

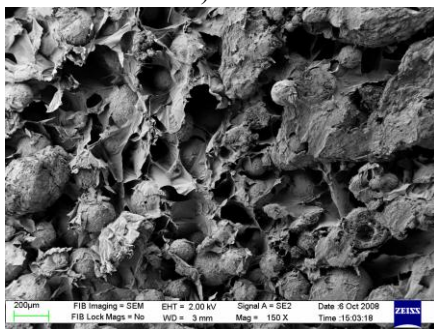
Микроструктура матриц, армированных частицами и гранулами КГА, приведена на рис. 8. Матрицы, армированные 60.% КГА, характеризуются равномерной структурой. Пористость матриц также снижается до 93%. Наблюдаются как округлые поры с размером от 10 до 50 мкм, так и вытянутые размером 50-100 мкм (ширина) 100-300 мкм (длина). Количество крупных составляет около 70% от общей пористости. Частицы размером 50-100 нм образуют агломераты размером до 0,5 мкм которые равномерно распределены в стенках полимерного каркаса.



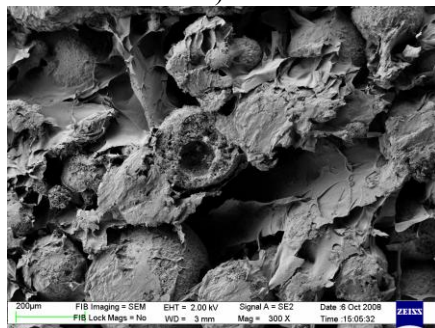
а)



б)



в)



г)

Рис. 8 Микрофотографии матриц на основе биополимеров:  
 а, б- матрикс, армированный наночастицами КГА-60%;  
 в, г- матрикс, армированный гранулами КГА-60%.

При армировании гранулами КГА наблюдается уменьшение пористости до 80%, за счет того, что гранулы частично занимают объем пор. Гранулы покрыты полимерной пленкой толщиной 1-2 мкм. За счет высокой открытой пористости и развитой поверхности гранул, а также

плотного прилегания полимера к поверхности керамических гранул достигается надежная фиксация гранул в полимерном каркасе. Размер пор составляет от 10 до 50 мкм. Размер гранул изменяется в пределах от 100 до 300 мкм.

Анализ данных СЭМ показал, что на структуру материала оказывает влияние количество и вид наполнителя. Установлено, что увеличение содержания наночастиц фосфатов кальция до 30 об. % ведет к округлению пор и снижению размера пор до 100 -200 мкм. Дальнейшее увеличение содержания частиц фосфатов кальция до 75 об. % ведет к увеличению размера пор до 400 мкм.

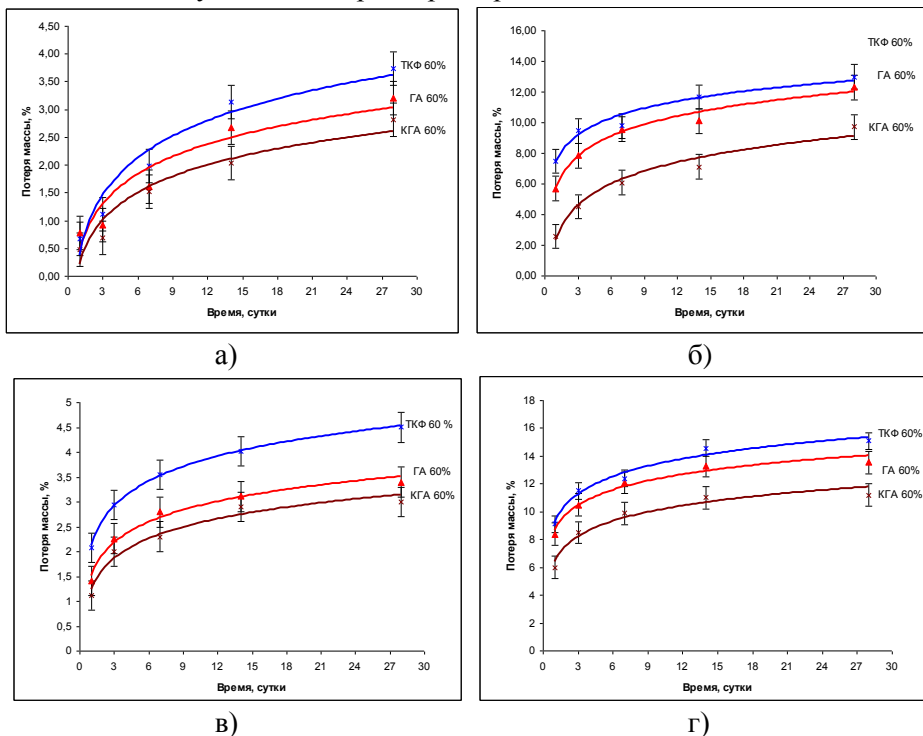


Рис.9. Растворимость ПКМ: а, б – армированных частицами ортофосфатов кальция; в, г - армированных гранула ортофосфатов кальция.

Частицы фосфатов кальция имеют размер от 50 до 100 нм и равномерно распределены по всему объему материала. При армировании ПКМ гранулами наблюдается уменьшение пористости до 80%, за счет того, что гранулы частично занимают объем пор.

Изучение растворимости композиционных матриц проводили в физиологическом растворе (0,1 М NaCl), моделирующим внеклеточную жидкость организма, в течении 28 суток при температуре 37<sup>0</sup>С при постоянном объеме жидкой фазы.

При армировании полимерного матрикса наночастицами либо ноноструктурированными гранулами ортофосфатов кальция выявлены следующие закономерности (рис. 9): с увеличением содержания армирующего компонента растворимость композиционного матрикса снижается; на растворение оказывает влияние вид наполнителя, растворимость ПКМ снижается в ряду ТКФ>ГА>КГА, что можно объяснить значениями рН этих фосфатов кальция, которые изменяются от нейтрального к щелочному. Согласно данным рН-метрии, порошки ТКФ и ГА создают нейтральную реакцию с рН около 7 и 7,5, тогда как порошки КГА при их выдержке в воде создают среду с рН около 9.

Переход от хитозана к смеси хитозан/желатин 50/50 повышает растворимость ПКМ. Так что, введение в хитозан желатина в количестве 50 масс.% увеличивает растворимость 3-5 раз.

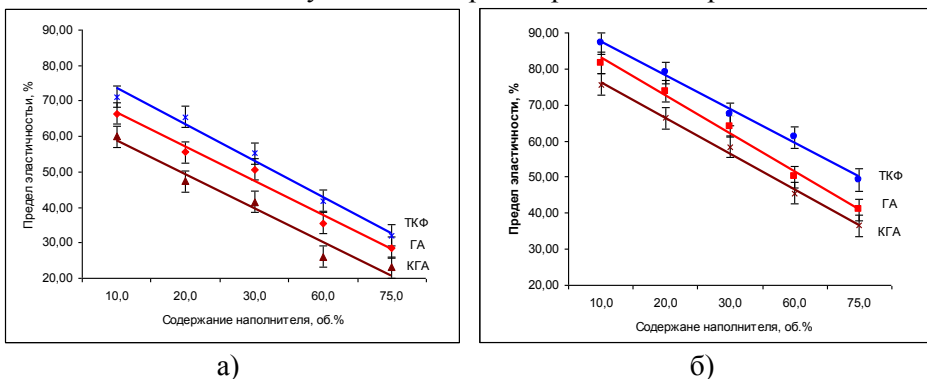


Рис.10 Эластичность ПКМ, армированных частицами (а) и гранулами (б) ортофосфатов кальция.

На рис. 10 показана зависимость предельной деформации  $e_{np}$  при испытаниях на эластичность от содержания наполнителя. Предельная деформация линейно снижается с увеличением количества наполнителя.

На механические свойства ПКМ оказывает влияние вид фосфата кальция. Введение КГА понижает  $e_{np}$  больше, чем введение ГА, наибольшая эластичность наблюдается при использовании ТКФ.

Например,  $e_{np}$  матриц армированных 60 об. % гранулами ТКФ, ГА и КГА составляет 59%, 48%, 40% (рис. 48 в). Снижение  $e_{np}$  происходит из-за щелочной реакции, приводящей к повышению жесткости хитозановой матрицы. Переход от хитозана к смеси хитозан/желатина 50/50 повышает предельную деформацию почти в 2 раза, за счет того, что желатин по своей природе эластичней хитозана.

Биологические испытания *in vivo* выполнены совместно с ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» и с ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Росмедтехнологий».

Гранулы ГА при имплантации в костный дефект остаются «замурованными» в костной ткани *de novo* из-за слишком медленной кинетики их резорбции, тогда как гранулы КГА деградируют более интенсивно, постепенно замещаясь новой костной тканью. ПКМ при замещении костных дефектов исследовали морфологически на модели ограниченного костного дефекта у крыс-самок линии Wistar.

Установлено, что ПКМ не претерпевал значительной биодegradации в динамике эксперимента сроком до 6 месяцев. На ранних стадиях (до 9 недель) отмечалось разрыхление структуры гранул, а на более поздних сроках гранулы оказывались «вмурованными» во вновь образованную костную ткань. Важно, что использование ПКМ в качестве остеозамещающего материала процесс закрытия костного дефекта у животных протекал значительно интенсивнее, чем без него. Уже через 3 недели наблюдалась гипертрофия надкостницы, по краям формирующихся костномозговых лакун появлялись цепочки остеобластов с внеклеточным матриксом, включающим остециты. Наблюдалась тенденция к образованию балок губчатой кости. Процесс костной регенерации приводил к почти полному закрытию дефекта к 9 неделе наблюдения.

Проведённые биологические испытания продемонстрировали высокую биологическую совместимость, отсутствие воспалительных реакций, резорбцию матриц, формирование новой костной ткани на месте ПКМ, а также показали перспективность клинического применения ПКМ для регенерации костной ткани.

## ВЫВОДЫ

Выполнены исследования технологии и свойств пористых композиционных материалов двух типов в системе фосфат кальция – биополимер, предназначенных для применения в тканевой инженерии. На основании полученных данных сделаны следующие выводы:

1) Разработаны основы формирования микроструктуры и свойств ПКМ с керамическим каркасом из ГА и ТКФ, пропитанных хитозаном различной молекулярной массы. Матрицы имеют взаимосвязанные поры, пористость от 50 до 75%, размер крупных пор до 500 мкм и мелких до 2 мкм, содержат до 25 об. % биополимера.

2) Прочность ПКМ снижается с увеличением их пористости согласно соотношениям М.Ю. Бальшина или Рышкевича. Инфильтрация хитозаном позволяет увеличить прочность при сжатии материала до 12 раз и снизить чувствительность прочности к пористости до 2 раз в результате залечивания дефектов и снижения концентрации напряжения у пор.

3) Разработаны основы технологии высокопористых композиционных материалов с матрицей из биополимер(ов) – хитозана и желатина - армированных наночастицами и гранулами фосфатов кальция: ГА, КГА и ТКФ. Технология основана на вспенивании суспензии биополимера и последующей лиофильной сушке. Применение добавок двойных карбоксидов щелочных металлов позволяет снизить температуру спекания КГА-гранул до 700 °С. Матрицы имеют пористость до 95% и содержат до 85 об. % наполнителя. Снижение температуры фиксации полимерной пены с -18°С до -180°С приводит к снижению размера пор в среднем в 5 раз и толщины стенок в 10 раз, что обусловлено изменением морфологии и размеров кристаллов льда, образующихся при замерзании пены.

4) Изучено влияние состава ПКМ с биополимерной матрицей на кинетику их растворения. Установлено, что с увеличением содержания желатина увеличивается растворимость композиционных матриц. Введение желатина 50 масс.% увеличивает растворимость матриц в 4 раза. Растворимость уменьшается в ряду ТКФ>ГА>КГА вследствие изменения рН от 7 до 9.

5) Эластичность ПКМ с биополимерной матрицей линейно снижается с увеличением содержания наполнителя. Для матриц без наполнителя эластичность составляет 95%, в случае армирования

гранулами КГА (85 об.%) эластичность снижается до 22 %. На эластичность ПКМ оказывает влияние вид наполнителя. Наименьшей эластичностью обладают ПКМ, армированные КГА, обладающего наибольшим значением рН.

8) На основе выявленных оптимальных технологических параметров изготовлены лабораторные партии ПКМ. Проведённые биологические испытания *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали высокую биологическую совместимость, отсутствие воспалительных реакций, резорбцию матриксов, а также формирование новой костной ткани вместо ПКМ. Результаты биологических испытаний показали перспективность клинического применения ПКМ в имплантологии и реконструктивно-восстановительной хирургии.

#### ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Федотов А.Ю.** Пористые матрицы на основе хитозана и гидроксиапатита для замещения костных дефектов // Перспективные материалы. 2007. Специальный выпуск. С. 160.
2. В. В. Смирнов, **А. Ю. Федотов**, В. С. Комлев, С. М. Баринов. Цементные и керамические пористые материалы на основе гидроксиапатита // Перспективные материалы. 2008. №5. с. 1-5.
3. В. В. Смирнов, С. М. Баринов, В. М. Иевлев, Д. Ферро, **А. Ю. Федотов**. Кальций-фосфатный костный цемент // Перспективные материалы. 2008. №1. с. 26-30.
4. **А.Ю. Федотов**, В.В. Смирнов, А.С. Фомин, И.В. Фадеева и С.М. Баринов. Пористые хитозановые матрицы, армированные биоактивными соединениями кальция. // Доклады Академии Наук. 2008. том 423. №6. с. 771-773.
5. **Федотов А.Ю.** Высокопористые композиционные материалы для замещения костных дефектов в онкологической хирургии и ортопедии // Перспективные материалы. 2008. №5. с. 363-366.
6. Bakunova N.V., Komlev V.S., **Fedotov A.Yu.**, Shvorneva L.I., Fadeeva I.V., Smirnov V.V., Shvorneva L.I., Gurin A.N., Barinov S.M. A method to fabricate porous carbonated hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering // Powder Metallurgy Progress. 2008. Vol.8 №4. P.336–342.
7. **A.Yu. Fedotov**, V.V. Smirnov, A.S. Fomin, I.V. Fadeeva, N.S. Sergeeva, I.K. Sviridova, V.A. Kirsanova, S.A. Achmedova, S.M. Barinov. Porous composite materials chitosan - calcium compound



- particulate for bone defect filling and repair. International conference: «Deformation and fracture in structural PM materials DF PM 2008» Slovak Republic. Stara Lesna. 2008. P. 353-357.
8. Bakunova N.V., Komlev V.S., **Fedotov A.Yu.**, Shvorneva L.I., Fadeeva I.V., Smirnov V.V., Shvorneva L.I., Gurin A.N., Barinov S.M. A method to fabricate porous carbonated hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering International conference: «Deformation and fracture in structural PM materials DF PM 2008» Slovak Republic. Stara Lesna. 2008. P. 41.
  9. **A.Yu. Fedotov**, V.S. Komlev, V.V. Smirnov, A.S. Fomin, I.V. Fadeeva, N.S. Sergeeva, I.K. Sviridova, V.A. Kirsanova and S.M. Barinov. Porous composite materials chitosan – bioactive calcium compound particulate for bone tissue engineering. «3rd Congress on Regenerative Biology and Medicine and 3rd Congress of the German Society for Stem Cell Research» Germany. Stuttgart. 2008. P. 191.
  10. Gurin A.N, Komlev V.S, **Fedotov A.Yu**, Sergeeva N.S., Sviridova I.K., Kirsanova V.A., Fadeeva I.V., Smirnov V.V., Barinov S.M. Characterization and in vitro evaluation of chitosan-carbonate apatite-citric acid nanocomposite scaffolds // Tissue Engineering. Part A. 2009. V. 15. P. O-11.
  11. **Fedotov A.Y.**, Komlev V.S., Smirnov V.V., Fomin A.S., Fadeeva I.V., Sergeeva N.S., Sviridova I.K., Kirsanova V.A., Barinov S.M. Porous composite materials chitosan – bioactive calcium compound particulate for bone tissue engineering // Tissue Engineering. Part A. 2009. V. 15. P. 727.
  12. Бакунова Н.В., Комлев В.С., Шворнева Л.И., Костюченко А.В., **Федотов А.Ю.**, Фомин А.С., Иевлев В.М., Баринов С.М. Влияние термообработки на характеристики нанопорошков гидроксипатита // Материаловедение. 2010. №4. С. 21-26.
  13. **Федотов А.Ю.**, Бакунова Н.В., Смирнов В.В., Комлев В.С., Фомин А.С., Баринов С.М. Пористые композиционные нанокристаллические керамические и минерал-полимерные материалы для восстановления костной ткани // Международный форум по нанотехнологиям 2009. Сб. тез. докладов участников второго международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий. Москва. 2009. С.367.
  14. **Федотов А.Ю.**, Бакунова Н.В., Комлев В.С., Фадеева И.В., Фомин А.С., Баринов С.М., Сергеева Н.С., Свиридова И.К.,

- Кирсанова В.А., Ахмедова С.А. Высокопористые композиционные минерал-полимерные наноматериалы для восстановления костной ткани // Журнал "Oncology.ru". Информедиа Паблишерз. 2009. с. 26.
15. Generosi A., Rau J.V., Komlev V.S., Rossi Albertini V., **Fedotov A.Yu.**, Barinov S.M. Anomalous hardening behavior of a calcium phosphate bone cement // The Journal of Physical Chemistry. 2009. V. 114. P. 973-979.
  16. Патент РФ №236019 Баринов С.М., Смирнов В.В., **Федотов А.Ю.**, Комлев В.С., Фадеева И.В., Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова, С.А. «Пористые композиционные материалы на основе хитозана для заполнения костных дефектов». 2007 г.
  17. Патент РФ №2356581 Смирнов В.В., **Федотов А.Ю.**, Баринов С.М., Комлев В.С., Фадеева И.В., Тютюкова Ю.Б. «Способ получения пористых губок на основе хитозана для заполнения костных дефектов». 2007 г.