

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Тихонов Андрей Александрович**

**Композиционные материалы для костной пластики на основе  
гидрогелей, наполненных слоистыми фосфатами кальция**

1.4.15 – ХИМИЯ ТВЕРДОГО ТЕЛА

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук

Путляев Валерий Иванович

Москва – 2023

## Термины и сокращения

A@ОКФ – октакальциевый фосфат, замещенный на карбоксилат-ион (A = Adi - остаток адипиновой кислоты, Suc - остаток янтарной кислоты, Cit - остаток лимонной кислоты)

DLP – digital light processing

SLA – стереолитография

АФК – аморфный фосфат кальция

ГАП – гидроксиапатит  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

ДКФД – дикальциевый фосфат дигидрат, брушит  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ДТА – дифференциальный термический анализ

ИК – инфракрасная спектроскопия

кГАП – карбонат замещенный гидроксиапатит

КТИ – конструкции тканевой инженерии

МКЭ – метод конечных элементов

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

ОКФ – октакальциевый фосфат  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

ПААм – полиакриламид

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ПФК – пирофосфат кальция  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭГ-ДА (PEGDA) – полиэтиленгликоль диакрилат

ПЭО – полиэтиленоксид

РСВ – равновесное содержание воды

РСМА – рентгеноспектральный микроанализ

РФА – рентгенофазовый анализ

РЭМ – растровая (сканирующая) электронная микроскопия

СН – степень набухания

СТА – синхронный термический анализ

ТГА (ТГ) – термогравиметрический анализ

ТКФ – трехкальцийфосфат  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

ТПМП – трехмерные периодические минимальные поверхности

УФ – ультрафиолет

ФИ – фотоинициатор

ФК – фосфаты кальция

ФП – фотополимеризация

Обозначение составов гидрогелей и композитов на их основе: Р-«молекулярная масса мономера»\_{массовая доля мономера}/{массовая доля фотоинициатора отн. мономера}\_[(концентрация/массовая доля красителя\_тип красителя)]\_[(концентрация соли/массовая доля добавки)] – например, Р-700\_50/0,1\_(1E-4M\_E100)\_(1M\_CaCl2/50%\_брушит).

# Содержание

ТЕРМИНЫ И СОКРАЩЕНИЯ .....	2
<b>1 ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>7</b>
<b>2 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....</b>	<b>15</b>
2.1 СОСТАВ И СТРОЕНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ .....	15
2.2 СВОЙСТВА БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ .....	18
2.3 ГИДРОГЕЛИ.....	19
2.3.1 Синтез гидрогелей .....	22
2.3.2 Структура гидрогелей.....	24
2.3.3 Механические свойства гидрогелей .....	25
2.3.3.1 Релаксация напряжения и ползучесть (релаксация деформации) .....	25
2.3.3.2 Осцилляционные (циклические, периодические) испытания .....	27
2.3.4 Набухание.....	29
2.3.5 Дегградация гидрогелей .....	31
2.4 ФОТОПОЛИМЕРИЗАЦИЯ .....	33
2.4.1 Кинетика фотополимеризации .....	34
2.4.2 Усадка при фотополимеризации.....	36
2.4.3 Выбор функционального мономера .....	37
2.4.4 Фотоинициаторы .....	37
2.4.5 Поглотители излучения .....	41
2.4.6 Влияние наполнителя на фотополимеризацию .....	42
2.5 СЛОИСТЫЕ ФОСФАТЫ КАЛЬЦИЯ .....	43
2.5.1 Брушит.....	44
2.5.2 Октакальциевый фосфат .....	45
2.5.3 Замещенные слоистые фосфаты кальция.....	47
2.5.4 Алкилфосфаты кальция.....	49
2.6 БИФАЗНАЯ КЕРАМИКА НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ.....	50
2.7 КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕЙ, НАПОЛНЕННЫХ ФОСФАТАМИ КАЛЬЦИЯ .....	52
2.7.1 Диффузия солей в гидрогелях .....	53
2.8 СПОСОБЫ СОЗДАНИЯ МАКРОПОРИСТЫХ МАТЕРИАЛОВ.....	54
2.8.1 Аддитивные технологии .....	54
2.8.2 Стереолитография.....	55
2.8.3 Выбор архитектуры материала .....	57
2.9 ВЫВОДЫ ИЗ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ.....	59
<b>3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....</b>	<b>62</b>

3.1	ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ .....	62
3.1.1	Синтез брушита .....	62
3.1.2	Синтез ОКФ.....	62
3.1.3	Синтез «интеркалированного» ОКФ.....	63
3.1.4	Синтез алкилфосфорных кислот и алкилфосфатов кальция .....	64
3.1.5	Синтез керамики на основе фосфатов кальция .....	65
3.1.6	Приготовление фотоотверждаемых суспензий на основе ПЭГ-ДА.....	65
3.1.7	Получение плотных и макропористых гидрогелей и композитов на их основе методом стереолитографической 3D-печати в варианте DLP.....	66
3.1.8	Исследование стабильности порошков фосфата кальция в гидрогелях.....	68
3.2	МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ.....	68
3.2.1	Качественный рентгенофазовый анализ (РФА) .....	68
3.2.2	Растровая электронная микроскопия (РЭМ) и рентгеноспектральный микроанализ (РСМА) .	69
3.2.3	Инфракрасная спектроскопия (ИК).....	69
3.2.4	Термогравиметрический (ТГ) и дифференциальный термический анализ (ДТА) .....	70
3.2.5	Спектроскопия поглощения в УФ и видимом диапазоне .....	70
3.2.6	Определение распределения частиц порошка по размерам.....	70
3.2.7	Титриметрические исследования условий синтеза порошков ОКФ .....	70
3.2.8	Расчет ионных равновесий .....	71
3.2.9	Моделирование протекания жидкостей и нагружения макропористых тел.....	71
3.2.10	Определение критической энергии полимеризации и глубины полимеризации.....	72
3.2.11	Измерения твердости.....	72
3.2.12	Механические испытания при сжатии .....	73
3.2.13	Исследование вязкоупругих свойств гидрогелей и вязкости суспензий методом ротационной реометрии.....	73
3.2.14	Определение степени набухания .....	73
3.2.15	Исследование биологической деградации гидрогелей <i>in vitro</i> .....	74
3.2.16	Магнитно-резонансная томография гидрогелей и композитов.....	74
3.2.17	Измерение геометрической плотности образцов.....	74
3.2.18	Исследование вытяжек из материалов на цитотоксичность (МТТ-тест) .....	75
3.2.19	Исследование имплантации композитов <i>in vivo</i> .....	75
<b>4</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>78</b>
4.1	СИНТЕЗ ПОРОШКОВ СЛОИСТЫХ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ.....	78
4.1.1	Анализ условий получения замещенных октакальциевых фосфатов.....	78
4.1.1.1	Адипинатзамещенный ОКФ.....	81
4.1.1.2	Цитратзамещенный ОКФ.....	82

4.1.1.3	Сопоставление с экспериментальными кривыми титрованием и теоретическими расчетами ионных равновесий.....	84
4.1.2	<i>Синтез алкилфосфатов кальция</i> .....	86
4.1.3	<i>Синтез брушита</i> .....	88
4.1.4	<i>Синтез ОКФ</i> .....	91
4.1.5	<i>Синтез ОКФ, замещенного сукцинат-ионом</i> .....	92
4.1.6	<i>Зависимость среднего размера частиц от условий синтеза</i> .....	93
4.2	ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ СЛОИСТЫХ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ .....	94
4.2.1	<i>Термическая обработка замещенных фосфатов кальция</i> .....	95
4.2.2	<i>Термическая обработка алкилфосфатов кальция</i> .....	99
4.3	ПОЛУЧЕНИЕ КЕРАМИКИ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ.....	101
4.4	СИНТЕЗ ГИДРОГЕЛЕЙ .....	103
4.4.1	<i>Выбор компонентов для синтеза гидрогелей</i> .....	104
4.4.2	<i>Выбор фотоинициатора</i> .....	104
4.4.3	<i>Выбор красителя</i> .....	111
4.5	АПРОБАЦИЯ СПОСОБОВ НАПОЛНЕНИЯ ГИДРОГЕЛЕЙ ФОСФАТАМИ КАЛЬЦИЯ .....	114
4.5.1	<i>Оценка стабильности порошков фосфата кальция в гидрогелях</i> .....	114
4.5.2	<i>Выращивание кристаллов брушита диффузией ионов <math>\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-</math> или <math>\text{Ca}^{2+}</math></i> .....	116
4.5.3	<i>Конверсия фосфатов в объеме гидрогеля</i> .....	121
4.5.4	<i>Наполнение фотосуспензии готовыми кристаллами фосфатов кальция</i> .....	123
4.6	ПРОЕКТИРОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ АРХИТЕКТУРЫ КОСТНОГО ИМПЛАНТАТА .....	127
4.7	СВОЙСТВА ПОЛУЧЕННЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ И КОМПОЗИТОВ .....	132
4.7.1	<i>Набухание</i> .....	132
4.7.2	<i>Реологическое поведение</i> .....	137
4.7.3	<i>Механические характеристики</i> .....	140
4.7.4	<i>Дегградация гидрогелей в модельной среде</i> .....	142
4.7.5	<i>Медико-биологические испытания композитов с гидрогелевой матрицей</i> .....	144
4.7.5.1	<i>In vitro</i> испытания .....	144
4.7.5.2	<i>In vivo</i> испытания .....	146
<b>5</b>	<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	<b>150</b>
<b>6</b>	<b>ВЫВОДЫ</b> .....	<b>150</b>
<b>7</b>	<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	<b>153</b>
<b>8</b>	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ. СВОЙСТВА ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ</b> .....	<b>164</b>
<b>9</b>	<b>ПРИЛОЖЕНИЕ. АНАЛИЗ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПОРОШКОВ СЛОИСТЫХ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ</b> .....	<b>165</b>

10	ПРИЛОЖЕНИЕ. ОСОБЕННОСТИ ИОННЫХ И ГЕТЕРОГЕННЫХ РАВНОВЕСИЙ В РАСТВОРАХ, СОДЕРЖАЩИХ ФАЗЫ ОКФ, БРУШИТА И А-ТКФ .....	167
11	ПРИЛОЖЕНИЕ. РЕНТГЕНСПЕКТРАЛЬНЫЙ МИКРОАНАЛИЗ И СТАБИЛЬНОСТЬ АЛКИЛФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ.....	171
12	ПРИЛОЖЕНИЕ. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ГИДРОГЕЛЕЙ И КОМПОЗИТОВ .....	174
13	ПРИЛОЖЕНИЕ. IN VITRO ИСПЫТАНИЯ АЛКИЛФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ.....	177
14	БЛАГОДАРНОСТИ.....	179

# 1 Введение

В современном мире улучшение качества жизнедеятельности и увеличение продолжительности жизни являются основными приоритетами развития медицины. Заболевания и повреждения костной ткани находятся в числе главных причин временной нетрудоспособности, развития инвалидности и смертности населения. С возрастом костная масса человека уменьшается, при этом современные продукты питания и образ жизни зачастую ускоряют этот процесс, что приводит к повышенному риску переломов, возникновению костных заболеваний и ослаблению скелета. При восстановлении функций поврежденных костных тканей и соответствующих органов или замене утраченной кости необходимо использовать имплантаты из различных материалов. При создании конструкций тканевой инженерии (КТИ) определенный акцент делается на регенеративном подходе, поскольку организм человека самостоятельно обновляет костную ткань в процессе жизнедеятельности и способен восстанавливать незначительные поврежденные участки. Имплантируемый материал в таком случае должен не столько оказывать механическую поддержку, сколько стимулировать процесс заживления за счёт свойств самого материала. Он должен обладать в первую очередь химической совместимостью с костной тканью организма (отсутствием реакций с тканями и межтканевыми жидкостями, отсутствием коррозии имплантатов, подобием фазового состава) и биологической совместимостью (срастанием с костной тканью, сохранением иммунитета системы, стимулированием остеосинтеза), и первоначальной механической совместимостью (приемлемой прочностью, трещиностойкостью, износостойкостью).

На текущий момент помимо традиционно используемых металлов и металлических сплавов разрабатываются биокерамические материалы на основе фосфатов кальция (гидроксиапатит кальция ГАП -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  и др.) – основной неорганической составляющей костной ткани. Такие материалы обладают высокой биосовместимостью и приемлемой прочностью при сжатии и изгибе. Среди всего многообразия фосфатов кальция, которые в настоящее время рассматриваются в качестве одной из составляющих композиционного материала для создания костнозамещающих имплантатов, особого внимания заслуживают слоистые фосфаты кальция: брушит  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и октакальциевый фосфат  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (ОКФ). По сравнению с традиционно используемыми ГАП и трехкальциевым фосфатом  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (ТКФ) данные фосфаты обладают более высокой скоростью растворения (резорбируемостью) в среде организма за счёт меньшего соотношения Ca/P в их составе, составляющего 1 для брушита и 1,33 для ОКФ, что в то же время ограничивает их применение при использовании в качестве единственной фазы костного имплантата. Данные фосфаты относятся к классу гидрофосфатов и при резорбции создают в

окружающей растворной среде слабокислые значения pH, вследствие чего происходит частичное растворение (подтравливание) кристаллов ГАП нативной костной ткани с высвобождением адсорбированных на них специальных морфогенетических белков, инициирующих процессы остеосинтеза, что позволяет реализовать регенеративный подход при восстановлении кости. Кроме того, слоистое строение таких фосфатов позволяет проводить замещение в их структуре на биологически активные и значимые молекулы и ионы. Представленные в литературе замещенные на карбоксилат-ионы ОКФ и алкильные производные фосфатов (алкилфосфаты кальция) могут выступать в качестве модельных соединений, по которым можно оценивать влияние молекул, внедряемых в структуру фосфатов, на процессы деградации материала и его биологического действия при помещении в среду организма. Впоследствии аналогичным образом в структуру слоистых фосфатов можно внедрять сложные соединения, например, антибиотики и факторы роста, которые в перспективе могут контролировать процессы костеобразования. Помимо прямого использования замещенных слоистых фосфатов и алкилфосфатов кальция в качестве целевых материалов для адресной доставки и пролонгированного высвобождения лекарств возможно их применение в качестве прекурсоров бифазных биокерамик на основе ТКФ, ГАП и пирофосфата кальция  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (ПФК), а, возможно, и полифосфатов с  $\text{Ca/P} < 1$ , которые получают в различных соотношениях (в зависимости от полученной степени замещения) при термическом разложении замещенных ОКФ и алкилфосфатов. В литературе приведено достаточно примеров карбоксилатов и других органических молекул, встроенных в структуру ОКФ или брусита, однако, практически не затронут вопрос дальнейшего получения керамик на основе продуктов термоллиза таких соединений.

Бесспорными недостатками биокерамических материалов являются их хрупкость и низкая эластичность, в результате чего во время операции требуется доступ ко всему костному дефекту без возможности механической деформации имплантируемого материала. В связи с этим особый интерес представляют материалы с вязкоупругими механическими свойствами, способные к большим обратимым деформациям. Такие материалы можно сжать при введении в поврежденный участок через узкий канал, поместить на место дефекта и отпустить. За счет обратимой деформации материал будет плотно прилегать к краям костного дефекта. Вышесказанное предполагает использование в качестве основы упругой фазы, например, гидрогеля, функции которого можно разнообразить введением неорганической составляющей. Такое описание материала для костной имплантации во многом напоминает нативную костную ткань, органической составляющей которой является коллаген. Помимо подобия фазового и химического состава, макроструктура материала должна способствовать протеканию биологических потоков, прорастанию нативной костной ткани



и определять необходимые механические характеристики (прочность/жесткость), при этом стоит отметить, что оптимальной структуры материала с точки зрения остеокондуктивных свойств на настоящий момент не описано. Сложные архитектуры и материалы любой формы на сегодняшний день практически безальтернативно создаются с помощью трехмерной (3D) печати. Данная технология позволяет точно воспроизводить цифровые модели, снятые в том числе непосредственно в ходе томографического обследования конкретного пациента. Наибольшие точность и пространственное разрешение достигаются с помощью метода стереолитографии, основанного на послойной фотополимеризации жидкой фотосуспензии. В отличие от керамических материалов, получаемых с помощью стереолитографии, композиты с гидрогелевой матрицей невозможно подвергнуть пост-обработке с целью удаления токсичных составляющих фотосуспензии, в связи с чем к составу суспензии для 3D-печати (мономер и его полимер, фотоинициатор, краситель и, при необходимости, ПАВ) предъявляются жесткие требования биосовместимости.

С учетом вышесказанного, перспективными материалами выглядят гидрогели на основе полиэтиленгликольных производных диакрилата (ПЭГ-ДА), которые зарекомендовали себя как материалы для регенерации различных тканей организма, чаще всего, мягких. Одним из важнейших свойств гидрогелей является возможность обратимо поглощать воду и увеличивать свои размеры (набухать), что позволяет решать проблему плотного заполнения дефекта. Армирование геля неорганической фазой (биосовместимыми фосфатами кальция) и контроль за степенью полимеризации мономера позволяет изменять механические (вязкоупругие) характеристики такого материала в достаточно широких пределах. Учитывая высокую адсорбционную емкость фосфатов кальция по отношению к белкам, наполнение геля фосфатами кальция — это дополнительный инструмент для инкорпорирования физиологически активных белков в материал имплантата.

Таким образом, **целью данной работы** является разработка и установление закономерностей формирования композиционных материалов на основе наполненных слоистыми фосфатами кальция гидрогелей и биокерамики на основе продуктов термоллиза слоистых фосфатов для использования при реконструкции костной ткани. Наполненные гидрогели должны обладать а) достаточной эластичностью (вязкоупругостью) для плотного заполнения костного дефекта сложной формы и прочностными характеристиками, допускающими различные механические воздействия на материал в ходе предоперационной подготовки; б) архитектурой, обеспечивающей остеокондуктивность — прорастание костной ткани внутрь имплантата, в) способностью к биодеградации — растворению в среде организма и замещению нативной костной тканью. К биокерамике предъявляются требования б) остеокондуктивности и в) резорбируемости.

В этой связи в рамках сформулированной выше цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка методов синтеза слоистых фосфатов кальция (ОКФ, брушита) с заданной гранулометрией в контролируемых условиях (рН, температура, концентрация реагентов/буферных растворов); синтез алкилфосфатов кальция с различной длиной алкильной цепи; синтез слоистых фосфатов кальция, замещенных остатками ди- и трикарбоновых кислот (на примере адипиновой и лимонной кислот).

2. Изучение термоллиза замещенных слоистых фосфатов и алкилфосфатов; использование термолизованных порошков для изготовления резорбируемой керамики.

3. Разработка способов равномерного наполнения гидрогелей фосфатами кальция для создания биокompозитов гидрогель/фосфат кальция.

4. Определение основных параметров стереолитографической трехмерной печати (на основе оценки характеристик фоточувствительности полимеризуемой фотосуспензии - глубины и критической энергии полимеризации) и состава фотосуспензии с мономером ПЭГ-ДА (тип и концентрация фотоинициатора, степень разбавления мономера, степень наполнения порошком) для получения макропористых osteoconductive биокompозитов гидрогель/фосфат кальция с заданной архитектурой.

5. Проведение реологических и механических испытаний (при сжатии) полученных материалов для определения влияния армирования гидрогелей фосфатами кальция на прочностные и вязкоупругие характеристики композитов; изучение набухания полученных гидрогелевых композитов

6. Моделирование нагружения и протекания жидкости через пористые тела с упорядоченной архитектурой пор для оценки проницаемости и податливости подобных материалов с целью выбора оптимальной архитектуры для создания макропористых osteoconductive композитов.

7. Проведение медико-биологических исследований полученных материалов на предмет цитосовместимости; исследование поведения композитных имплантатов в организме на модели малого лабораторного животного.

**Научная новизна работы** заключается в следующих пунктах:

1. Разработаны способы синтеза кристаллов брушита и ОКФ с размерами в плоскости 1–10 мкм, а также слоистых алкилфосфатов кальция с различной длиной углеводородной цепи в качестве наполнителей гидрогелей для создания макропористых костных имплантатов с

вязкоупругим механическим поведением. Показано, что определяющее влияние на латеральный размер кристаллов брушита и ОКФ оказывают такие параметры синтеза, как pH и температура, а также их смешанное действие.

2. Впервые изучена термическая эволюция морфологии и фазового состава адипинат- и цитрат-замещенных октакальциевых фосфатов, а также алкилфосфатов кальция с различной длиной алкильной цепи.

3. В рамках впервые предложенного в работе априорного эвристического подхода к анализу архитектуры остеокондуктивных композитных имплантатов показано, что наиболее проницаемые и податливые варианты имплантатов с пористостью 70% реализуются в случае архитектур Кельвина и типа «гиرويد».

4. Изучена зависимость фотохимических свойств (критическая энергия полимеризации, фоточувствительность) фотоотверждаемых растворов и суспензий на основе полиэтиленгликоль диакрилата от состава (концентрации фотоинициатора, красителя, доли и типа наполнителя) для выявления условий стереолитографической 3D печати макропористых композитов заданной архитектуры.

5. Впервые в качестве имплантата с вязкоупругим поведением предложен гидрогель на основе ПЭГ-ДА, наполненный резорбируемыми фосфатами кальция с Ca/P <1,5 (брушитом и ОКФ) с морфологической архитектурой Кельвина и типа «гиرويد», созданный при помощи стереолитографической 3D-печати и способный к плотному прилеганию к краям костного дефекта произвольной формы для реализации персонализированного подхода к регенерации костной ткани.

***Практическая значимость работы*** заключается в следующих пунктах:

1. Полученные в рамках двухуровневого трехфакторного эксперимента ( $2^3$ ) аналитические зависимости среднего латерального размера ( $d_{50}$ ) от параметров синтеза (концентрация раствора солей/буферного раствора, температура, pH) позволяют синтезировать кристаллы брушита, ОКФ, а также ОКФ, замещенного сукцинат-ионом, с заданными размерами в диапазоне 1-10 мкм, приемлемыми для наполнения ими фотополимеризуемых гидрогелей и использования в качестве прекурсоров для создания биокерамики.

2. Установлены условия термолиза октакальциевых фосфатов, замещенных адипинат-ионом, для получения плотной биокерамики на основе  $\beta$ -ТКФ и условия термолиза алкилфосфатов кальция с различной длиной алкильной цепи для получения бифазной биокерамики на основе трехкальциевого фосфата и пирофосфата кальция.

3. Определены составы фотоотверждаемых суспензий (тип и доля мономера, фотоинициатора, красителя, воды и наполнителя) и основные параметры стереолитографической печати (фоточувствительность, критическая энергия полимеризации) для формирования композитных имплантатов с различной макропористой архитектурой с разрешением до 100 мкм.

4. Изготовлены образцы-прототипы композитных имплантатов на основе ПЭГ-ДА-гидрогелей, наполненных брушитом и ОКФ, в форме цилиндров (диаметр 6 мм, высота 10–12 мм) с архитектурами Кельвина и типа «гиرويد», прошедших предварительные *in vivo* медико-биологические испытания на малых лабораторных животных для замещения монокортикального дефекта бедренной кости.

#### ***Основные положения, выносимые на защиту:***

1. Способы и условия синтеза слоистых кальцийфосфатных наполнителей гидрогелей; способы наполнения гидрогелей на основе ПЭГ-ДА кальцийфосфатными кристаллами.

2. Эволюция фазового состава и морфологии порошков слоистых фосфатов кальция в процессе их термолиза.

3. Априорный метод оценки макропористой архитектуры имплантата, обеспечивающей osteoconductive и упругие свойства, с точки зрения проницаемости и механической податливости при сжатии.

4. Выбор условий стереолитографической 3D печати макропористых композитов на основе гидрогелей ПЭГ-ДА, наполненных слоистыми фосфатами кальция.

5. Результаты предварительных реологических, механических и медико-биологических испытаний разработанных osteoconductive композитов на основе наполненных гидрогелей.

***Апробация работы*** была проведена на международных конференциях Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018», «Ломоносов-2021» и «Ломоносов-2022» (Москва, Россия), XII Конференция молодых ученых по общей и неорганической химии (Москва, Россия, 2022), «The 2nd Global Forum on Advanced Materials and Technologies for Sustainable Development (GFMAT-2) and the 4th International Conference on Innovations in Biomaterials, Biomanufacturing, and Biotechnologies (Bio-4)» (Toronto, Canada, 2019), young Ceramists Additive Manufacturing Forum (Mons, Belgium, 2019), XVI conference and exhibition of the European Ceramic Society (Torino, Italy, 2019), IV Национальный Конгресс по Регенеративной Медицине (Москва, Россия, 2019), Scandinavian Society for Biomaterials (ScSB) 2019 Conference (Kirkkonummi, Finland, 2019), young Ceramists Additive Manufacturing Forum (Padova, Italy, 2018), Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах (ФАГРАН-

2018), (Воронеж, Россия, 2018), Открытая школа-конференция стран СНГ "Ультрамелкозернистые и наноструктурные материалы (УМЗНМ)-2018", (Уфа, Россия, 2018) «Biomaterials and Novel Technologies for Healthcare, 2nd International Biennial Conference BioMaH» (Frascati, Italy, 2018), Всероссийское совещание "Биоматериалы в медицине" (Москва, 2017).

### ***Личный вклад автора.***

В основу работы положены результаты научных исследований, проведенных автором в период с 2017 по 2022 гг. в лаборатории неорганического материаловедения кафедры неорганической химии химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова. Автором осуществлен критический анализ литературных источников по тематике работы с последующими выводами, проведен синтез всех указанных в работе составов и их подготовка к проведению исследований, также самостоятельно проведены исследования методами электронной и оптической микроскопии, ИК-спектроскопии, термического анализа (дифференциально-термическом анализаторе, дифференциально-сканирующем калориметре, дилатометре), компьютерного моделирования протекания и одноосного одностороннего нагружения 3D-моделей, механических испытаний при сжатии, исследований полученных композитов на цитотоксичность, адгезию и рост клеток на их поверхности. Досконально проведены анализ, обработка и систематизация полученных результатов, написаны публикации по теме диссертации. Ряд исследований был проведен совместно с коллегами из других лабораторий и организаций: проведение РФА (Филлипова Т.В., кафедра неорганической химии Химического факультета МГУ), проведение УФ-видимой спектроскопии (Насриддинов А.Ф., кафедра неорганической химии Химического факультета МГУ), проведение реологических испытаний (к.ф.-м.н. Карпушкин Е.А., кафедра высокомолекулярной химии Химического факультета МГУ, к.ф.-м.н. Шибаетов А.В., Физический факультет МГУ), прочностные испытания при сжатии (к.т.н. Просвирнин Д.В., ИМЕТ РАН), медико-биологические испытания *in vitro* (к.ф.-м.н. Селезнева И.И., ИТЭБ РАН), медико-биологические испытания *in vivo* (Щербаков И.М., д.м.н., проф. Дубров В.Э., факультет фундаментальной медицины МГУ), ЯМР и МРТ исследования гидрогелей и композитов (к.ф.-м.н. Морозов Е.В., Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН).

***Достоверность*** полученных результатов обеспечивается воспроизводимостью экспериментальных данных, использованием комплекса методов физико-химического, механического и медико-биологического анализа, а также их согласованностью с имеющимися литературными данными.

Основные результаты работы изложены в 22 научных публикациях, в том числе 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.15 – Химия твердого тела.

В работу вошли результаты исследований, выполненных при поддержке Российского научного фонда 17-79-20427 и Российского фонда фундаментальных исследований 20-33-90303. При выполнении работы было использовано оборудование, приобретенное за счет средств программы развития Московского университета.

***Объем и структура работы.*** Работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 179 печатных страницах и содержит 132 рисунка, 29 таблиц, 7 приложений, список литературы содержит 184 наименования.

## 2 Литературный обзор

### 2.1 Состав и строение костной ткани

Костная ткань представляет собой минерализованную соединительную метаболически активную ткань, которая обладает сложным составом и структурой, способна к передвижению, поддержке и защите мягких тканей, запасанию в организме неорганических солей, содержащих кальций и фосфор (в составе фосфатов), а также обеспечивает хранение костного мозга. Существует три типа клеток, которые способствуют гомеостазу кости: остеобласты, остеокласты и остециты. Остеобласты вырабатывают органический костный матрикс и способствуют его минерализации. Остеокласты, являясь одним из типов экзокринных клеток, растворяют кость и ферментативно разрушают белки внеклеточного матрикса, т. е. инициируют резорбцию костной ткани. Остециты, постмитотические клетки, происходящие из остеобластов в костном матриксе, действуют как механосенсоры и эндокринные клетки [1,2]. Равновесие между остеобластами и остеокластами поддерживает жизнедеятельности костной ткани.

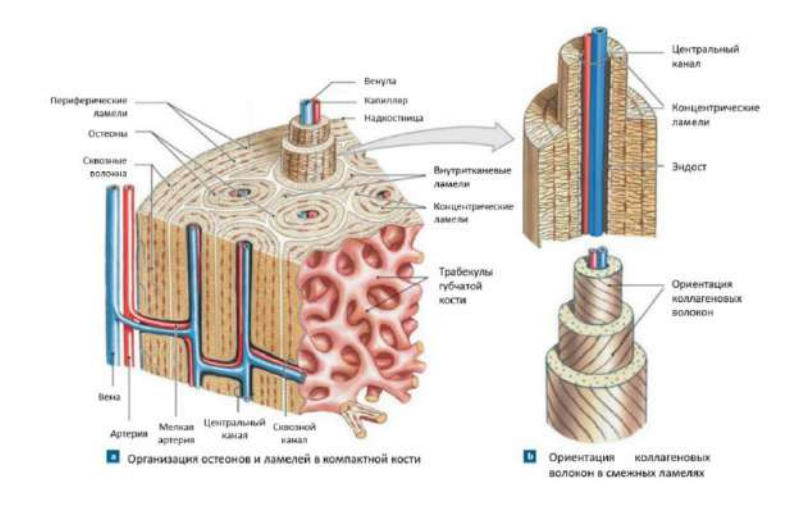


Рис. 2.1. Строение компактной костной ткани

Остеон является основной структурно-функциональной единицей компактного вещества кости, состоит из концентрических цилиндрических пластинчатых элементов (ламелей) длиной несколько миллиметров и диаметром 0,2–0,3 мм (Рис. 2.1). Остеоны имеют слегка спиралевидный ход, ориентированный вдоль оси кости. В их центре находится канал (гаверсов или остеонический канал), содержащий один или несколько мелких кровеносных сосудов и нервов, а по их внешним краям находится пограничный слой, который служит как средство фиксации новой кости, отложенной на старой поверхности, так и в качестве диффузионного барьера. Именно остеон определяет прочность кости. Волокна коллагена, которые окружены кристаллами гидроксиапатита

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , составляют остеон [3]. Эластичность кости обеспечивается наличием высокомолекулярного фибриллярного белка коллагена (Рис. 2.2).

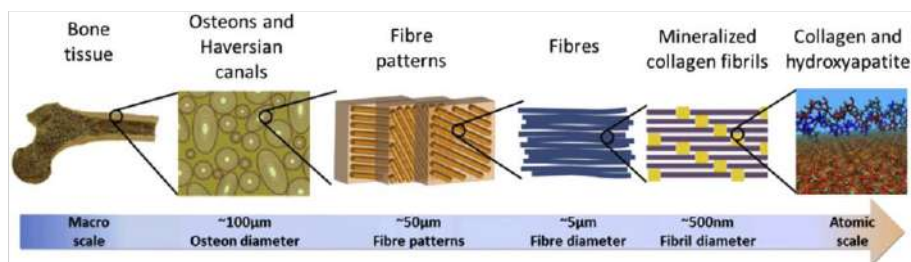


Рис. 2.2. Иерархическая структура кости от макромасштабного скелета до наноразмерного коллагена и гидроксиапатита [3]

Снаружи кость покрыта надкостницей (периостом или периостальными клетками) и прочно крепится к ней толстыми пучками коллагеновых волокон, проникающих и вплетающихся в слой наружных общих пластинок кости [4,5]. Молекулы коллагена состоят из трех скрученных спирально полипептидных нитей. Они способны собираться в фибриллы диаметром 100–2000 нм и имеют молекулярную массу до 300 кДа.

Различают два типа костной ткани: компактную и губчатую (трабекулярную). Названия подразумевают, что эти два типа различаются по плотности или по плотности упаковки ткани. Компактная кость состоит из плотно упакованных остеонов или гаверсовых систем, образующих твердую массу. Остеонические каналы содержат кровеносные сосуды, расположенные параллельно длинной оси кости. Эти кровеносные сосуды соединяются посредством перфорирующих каналов с сосудами на поверхности кости. Губчатая кость легче и менее плотная, чем компактная кость. Она состоит из пластинок (трабекул) и костных перемычек, примыкающих к небольшим полостям неправильной формы, которые содержат красный костный мозг. Канальцы соединяются с соседними полостями вместо центрального гаверсова канала для кровоснабжения. Трабекулы губчатой кости следуют линиям напряжения и могут перестраиваться при изменении направления напряжения.

Минеральный состав кости в общем виде можно описать формулой  $(\text{Ca}, \text{Na})_{10-x-y}(\text{HPO}_4)_x(\text{CO}_3)_y(\text{PO}_4)_{6-x-y}(\text{OH})_{2-x-y-z}(\text{Cl}, \text{F})_z$ , где в молодом организме  $x+y \sim 1.7$ , с возрастом  $x$  уменьшается наряду с увеличением  $y$  [6]. Поверхность частиц кости представляет собой аморфный фосфата кальция, который можно описать формулой  $\text{Ca}_{7,5}(\text{PO}_4)_{2,8}(\text{HPO}_4)_{2,6}(\text{CO}_3)_{0,6}(\text{OH})_{0,2}$  [7]. Органическая составляющая костной ткани представлена приблизительно 90% коллагена типа I, 5%



неколлагеновых белков и 2% жиров [8]. Средний химический состав кости представлен в Табл. 2.1. Состав компактной и губчатой кости отличается: в *компактной* кости содержится около 20% органического матрикса, 70% неорганических веществ и 10% воды; в *губчатой* кости 50–57% органических компонентов, 33–40% неорганических соединений и 10% воды.

Табл. 2.1. Состав кости [9].

Неорганическая составляющая	Органическая составляющая
ГАП $\approx$ 60 масс. %	Коллаген $\approx$ 20 масс. %
Карбонат-ион $\approx$ 4 масс. %	H <sub>2</sub> O $\approx$ 9 масс. %
Цитрат-ион $\approx$ 0.9 масс. %	Неколлагеновые белки (остеокальцин, остеонектин, остеопонтин, тромбоспондин, морфогенетические белки, сиалопротеин, белки сыворотки) $\approx$ 3 масс. %
Na <sup>+</sup> $\approx$ 0.7 масс. %	Полисахариды, липиды, цитокины – следовые количества масс. %
Mg <sup>2+</sup> $\approx$ 0.5 масс. %	
Cl <sup>-</sup> $\approx$ 0.13 масс. %	
K <sup>+</sup> , F <sup>-</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> - следовые количества	

Подводя итог, кость можно описать как сложноорганизованный композиционный материал на основе минерала и биополимера, обладающий высокой прочностью, вязкоупругими механическими свойствами, большой трещиностойкостью и при этом низкой плотностью  $\sim 1,8$  г/см<sup>3</sup> [10]. Характеристики костной ткани зависят от типа кости, характера нагрузок и возраста человека [5,8]. Например, прочность при сжатии бедренной кости здорового человека в возрасте 20–39 лет составляет 120 МПа, предельная деформация – 1,85%, а модуль упругости – десятки ГПа.

В процессе жизнедеятельности костная ткань человека сперва растёт, происходит постепенное увеличение её объема и уменьшение общего числа костей. В процессе всего жизненного цикла костная ткань непрерывно обновляется (ремоделируется): происходит резорбция старого и образование нового костного вещества за счёт работы остеокластов, остеоцитов и остеобластов. Вследствие перестройки и адаптации к изменяющемуся окружению становится возможным внедрение в кость некоторых искусственных биоматериалов, которые впоследствии могут быть замещены нативной тканью [11].

На текущий день аддитивные технологии (3D-печать и т.п.) позволяют максимально точно воссоздать сложную структуру костной ткани [12], а многообразие биосовместимых (полимерных и керамических) материалов позволяет получать близкий по составу и свойствам к нативной кости материал, который будет успешно применяться для имплантации в клинике.

## **2.2 Свойства биоматериалов для регенеративной медицины**

Для восстановления костной ткани и заполнения образовавшихся дефектов используют различные материалы, подобные по химическому составу и структуре нативной кости. Такой подход позволяет организму принимать чужеродный материал без видимых отторжений. Поскольку в ходе жизнедеятельности человека кости постоянно обновляются, то идеальным сценарием лечения костного дефекта предположительно может стать имплантация материала, который на первом этапе устраняет/замещает костный дефект, а затем постепенно деградирует, являясь источником фосфора, кальция и других составляющих кости. К таким материалам предъявляются следующие требования, которые описывают отдельные аспекты взаимодействия остеозамещающего материала и окружающих его тканей организма, и позволяющие реализовать регенеративный подход к лечению.

**Биосовместимость:** это способность материала имплантата функционировать *in vivo*, не вызывая неблагоприятных локальных или системных реакций при внедрении синтетического материала в организм; материал должен быть нетоксичным, т.е. не вызывать отрицательных иммунных и других реакций со стороны организма, способствовать клеточному/тканевому росту [13]; биосовместимость как правило определяется химическим составом материала.

**Биоактивность:** это способность материала образовывать непосредственную связь с биологической системой за счёт формирования на нем или замещением его костной тканью и, желательного, стимулировать образование костной ткани [14]. Имплантат должен сохранять свои функции на протяжении определенного периода времени, не изменяя существенно свою структуру и механические свойства. Данная характеристика является комплексной и часто включает в себя остекондуктивность и остеоиндуктивность.

**Биодеградируемость (биорезорбируемость):** это способность материала полностью или частично нарушать структуру и свойства, разрушаться под действием внутритканевых жидкостей [15]. В отличие от биорезистивности, т.е. устойчивости имплантата к воздействию среды организма, биорезорбируемость, наоборот, характеризует способность имплантата растворяться в условиях, имитирующих живой организм, что крайне важно для имплантатов, которые планируется полностью заменить на нативную костную ткань в ходе лечения. Чаще всего термин

биodeградируемость используют для полимерных материалов, а в случае неорганических (например, фосфатов кальция) говорят о биорезорбции или биорезорбируемости.

**Остеокондуктивность:** это свойство материала являться основой для роста новообразующейся (*de novo*) кости, в ходе которого остеобласты с края костного дефекта распространяются на имплантат [7]. Материал должен быть способен к адгезии и связыванию остеогенных клеток, обеспечивать протекание биологических потоков и поддерживать процессы пролиферации и дифференцировки клеток из окружающей живой ткани с образованием непосредственной связи с костной тканью, или быть постепенно замещаемым тканью *de novo*. Остеокондуктивные свойства определяются архитектурой материала, а именно, его пористостью, размером пор и их распределением. Предпочтительно, чтобы распределение пор по размерам имело мультимодальный характер. Наиболее крупные поры (100–1000 мкм и связывающие их перешейки диаметром не менее 50 мкм) определяют эффективность врастания костной ткани *de novo* в пористый имплантат. Доля таких макроскопических пор должна составлять от 60 до 90 % объема имплантата [12].

**Остеоиндуктивность:** это способность физиологически активных элементов имплантата (костных белков, стволовых клеток) посредством серии биохимических реакций влиять на трансформацию малодифференцированных клеток в остеобласты или хондроциты из окружающих некостных тканей на его поверхности с формированием кости *de novo*.

**Механическая совместимость:** механические свойства материала (жесткость, трещиностойкость, предел прочности, предел пластической деформации) должны коррелировать с характеристиками залечиваемой кости. Низкая прочность материала может привести к его быстрому разрушению в процессе лечения или самой операции, а высокая прочность – к истиранию соседних костей в районе контактов с имплантатом. Высокая жесткость приводит к экранированию нагрузки имплантатом и резорбции приконтактной области. Вне зависимости от типа замещаемой кости материал должен выдерживать нагрузки, оказываемые на него в ходе хирургической операции.

### 2.3 Гидрогели

Гидрогелями называют трехмерные гидрофильные полимерные сетки, которые способны поглощать и удерживать большое количество воды или биологических жидкостей [16]. Главное отличие гидрогелей от водных гелей заключается в способности последних растворяться в воде при добавлении избыточного относительно равновесного количества жидкости. Гидрогели способны поглощать определенное количество воды и набухать, при этом сохраняя свою структуру (Рис. 2.3)

[17]. Содержание воды в гидрогелях варьируется от нескольких процентов до более чем 99%, при этом они сохраняют свойства, присущие твердому телу. Гидрогели могут представлять собой гомополимеры (полимеры, состоящие из одинаковых по составу и строению повторяющихся мономерных звеньев) и сополимеры (полимеры, цепочки молекул которых состоят из двух или более различных структурных звеньев) [18].

Структура и свойства гидрогелей зависят от их состава, который обычно представлен мономером/олигомером, сшивателем и инициатором полимеризации. Их можно классифицировать по следующим свойствам:

- По химическому составу: сетки гидрофильного мономера (гомополимер), сополимерные гидрогели (два типа мономеров, из которых хотя бы один – гидрофильный), мультиполимерные гидрогели (три и более мономеров), взаимопроникающие сетки (*англ.* IPN – interpenetrating networks).

- По заряду: анионные, катионные, амфолитные, нейтральные.

- По физическим свойствам и молекулярной структуре: аморфные (произвольное расположение цепей), «полукристаллические» (*англ.* semi-crystalline, наличие областей упорядочения макромолекул), гидрогели с водородными связями, супермолекулярные сетки и гидроколлоидные агрегаты.

- По типу сшивки: химические (сшивка посредством ковалентного связывания между мономерами), физические (Ван-дер-ваальсовы связи, электростатические взаимодействия, водородные связи).

- По типу реакции полимеризации (Рис. 2.4): под действием излучения (с различной длиной волны – электронный пучок, гамма лучи, рентгеновские лучи, УФ-излучение) [19], изменения или контроля pH, температуры [20] в результате химической реакции (клик-химия,

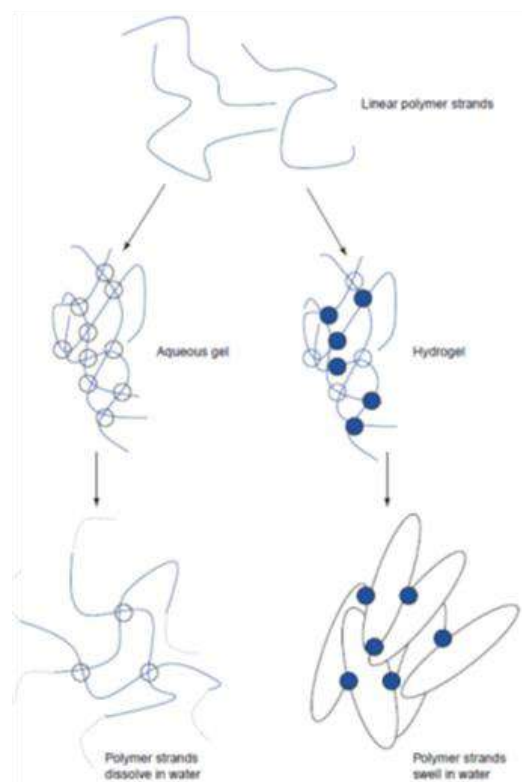


Рис. 2.3. Иллюстрация различного поведения цепочек мономеров, формирующих водный гель и гидрогель

дисульфидное сшивание, фермент-опосредованное сшивание, сопряженное присоединение по Михаэлю, сшивание с основаниями Шиффа, ионное сшивание, самосборка) [16].

- По природе происхождения: природные (коллаген и гиалуроновая кислота), синтетические (полиэтиленгликоль и его производные – PEG, полиакриламид) и полусинтетические (например, смесь ПЭГ и холестерол содержащего полисахарида) [22].

Первые упоминания о гидрогелях датируются концом XIX века в Германии [23], а о возможности их биомедицинского употребления заявили в Чехословакии в конце 1950-х годов после публикации работ профессоров Вихтерле и Лима [24]. Предметом их исследования были материалы на основе синтезированного поли-2-гидроксиэтилметакрилата (polyHEMA), которые в дальнейшем использовались в производстве контактных линз. Сочетание уникальных физико-химических, медико-биологических и механических свойств позволило гидрогелям получить широкое распространение среди материалов биомедицинского назначения: контролируемые средства доставки лекарственных препаратов [25], самовосстанавливающиеся материалы, тканевая инженерия (хрящевая и костная ткани), биосенсоры [26], матрицы для клеточных культур, дифференцировка стволовых клеток [27], сердечные клапаны, мембраны для гемодиализа. Гидрогели на основе полимеров природного происхождения содержатся во внеклеточных матриксах

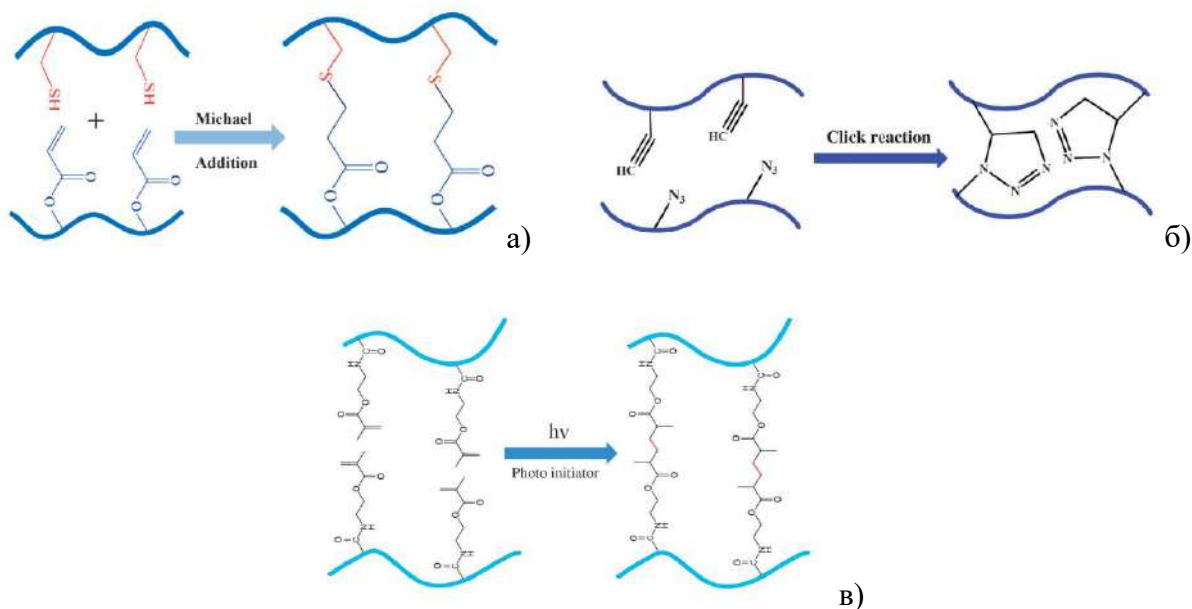


Рис. 2.4. Схема типов реакций полимеризации гидрогелей: а) сопряженное присоединение по Михаэлю; б) клик-реакция; в) под действием светового излучения [21].

млекопитающих, например, коллаген, гиалуроновая кислота и фибрин [28]. Помимо этого, применение нашли гидрогели на основе альгината натрия, желатина, агарозы, хитозана [29]. Основным преимуществом таких материалов является их высокая биосовместимость и низкая

цитотоксичность, а также способность к биodeградации, которой способствуют ферменты *in vivo*. При этом их основным недостатком является невозможность управления механическими свойствами и набуханием.

В свою очередь, использование синтетических мономеров позволяет контролировать механическую прочность и жесткость/эластичность гидрогелей, биodeградацию, биологическое и химическое поведение в среде организма. Главной проблемой при этом является выбор биосовместимых и нетоксичных

мономеров, их полимеров, а также инициаторов полимеризации. Среди таких полимеров (Рис. 2.5) можно выделить ранее упомянутый

полигидроксиэтилметакрилат (polyHEMA), поливиниловый спирт (PVA), полиэтиленгликоль (полиэтиленоксид) и его производные акрилаты (PEG, PEGDA – диакрилат, PEGDMA – диметакрилат),

полиакриловую кислоту (PAA), полиакриламид (PAAm) и т.д. Примечательно, что все вышеперечисленные полимеры синтезируются из соответствующих мономеров, содержащих двойную связь C=C, или являются производными акриловой кислоты (CH<sub>2</sub>=CH-COOH).

### 2.3.1 Синтез гидрогелей

В основе синтеза гидрогелей лежат реакции полимеризации, которые можно подразделить на реакции цепной и ступенчатой полимеризации (или поликонденсации). Реакции ступенчатой полимеризации обычно происходят между мономерами с различными функциональными группами или мономером с двумя и более различными функциональными группами [31] и характеризуются быстрым расходом мономера на начальных стадиях полимеризации и широким распределением полимеров по молярной массе на конечных стадиях. Таким образом получают множество полимеров, например, полиэферы, полиамиды, полиуретаны и т. д.

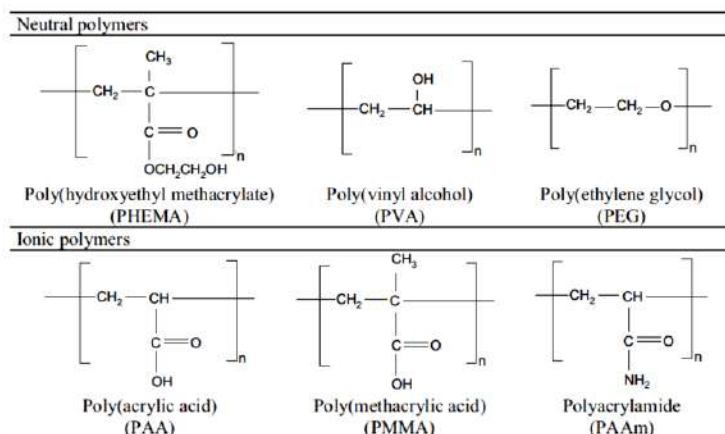


Рис. 2.5. Химическая структура нейтральных и ионных полимеров синтетического происхождения [30].

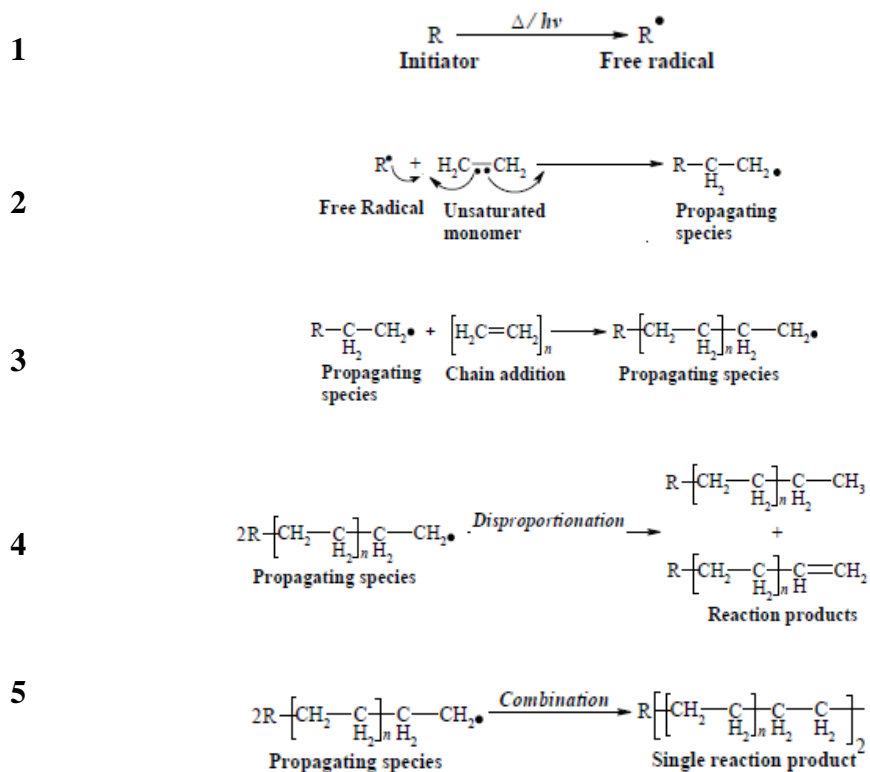


Рис. 2.6. Стадии цепной реакции полимеризации: 1) образование свободных радикалов; 2) инициирование цепи; 3) рост цепи; 4 и 5) обрыв цепи [31]

Цепная полимеризация, напротив, включает в себя три стадии: инициирование, рост цепи и обрыв цепи. При этом в ходе протекания реакции концентрация мономера постоянно уменьшается, а смесь на любой стадии содержит как мономер, так и синтезированный высокомолекулярный полимер. Для запуска роста цепи необходимо наличие инициатора в реакционной смеси, который возбуждается под внешним воздействием (излучение, температура и т.п.) и распадается на свободные радикалы (Рис. 2.6- 1). Они в свою очередь реагируют с ненасыщенными мономерами (зачастую с винилами), образуя новый радикал, содержащий в себе единичный фрагмент мономера (Рис. 2.6- 2), который в дальнейшем продолжает разрастаться. Эффективность инициатора определяется соотношением числа радикалов к числу сформированных полимерных цепочек, а его количество может варьироваться в зависимости от количества исходного мономера. В случае термо- и фотополимеризации большое количество инициатора не обязательно усиливает полимеризацию, а наоборот может привести к её ингибированию за счёт рекомбинации свободных радикалов. На Рис. 2.6 – 3 приведен рост цепи, который осуществляется путем быстрого последовательного присоединения мономера к активному центру. В конце после израсходования всех молекул исходного мономера происходит обрыв цепи, а полимерные цепи, находящиеся в реакционной смеси, диспропорционируют (Рис. 2.6- 4) либо соединяются друг с другом (Рис. 2.6 - 5).

### 2.3.2 Структура гидрогелей

Как было сказано ранее, гидрогели — это гидрофильные полимерные сетки, т.е. их структура определяется типом используемого(-ых) мономера(-ов) и водой. В гидрогелях выделяют 3–4 различных типа воды: связанную, полусвязанную, внутреннюю и свободную (Рис. 2.7) [32]. Связанная вода образуется при гидратации функциональных групп или ионов и является неотъемлемой частью гидрогеля и может быть удалена только при нагреве до высоких температур. Внутренняя и свободная вода практически не связаны с полимерной сеткой, из-за чего могут быть легко удалены центрифугированием или механическим воздействием (сжатием). Полусвязанная вода представляет собой нечто среднее. Для определения содержания различных типов воды в гидрогеле пользуются методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Основные свойства гидрогелей, о которых речь пойдет дальше, определяются соотношением вода-полимер в их составе.

Структура гидрогеля определяется следующими параметрами [33]:

- объемной долей полимера в набухшем состоянии  $v_2$ ;
- средней молекулярной массой между сшивками  $M_c$ ;
- параметром свободного объема полимера (размер порового пространства сетки - network mesh (pore) size)  $\xi$ .

$M_c$  определяется как:

$$M_c = \frac{M_r}{2n}, \quad (2.1)$$

где  $M_r$  – молекулярная масса повторяющегося фрагмента (для ПЭГ = 44 г/моль),  $n$  – степень сшивки.

По теории Флори-Ренера  $M_c$  определяется:

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{\tilde{v}_1(\ln(1-v_2)+v_2+\chi_1 v_2^2)}{v_2^{1/3} \frac{v_2}{2}}, \quad (2.2)$$

где  $M_n$  - молекулярный вес несшитого полимера,  $V_1$  - молярный объем растворителя (18 см<sup>3</sup>/моль для воды),  $v_2$  - объемная доля полимера в набухшем геле,  $\tilde{v}$  - характерный объем полимера (0,833 см<sup>3</sup>/г для ПЭО),  $\chi_1$  параметр взаимодействия полимер-растворитель (0,426).



Размер пор сетки определяется как расстояние между жесткими точками – точками сшивки:

$$\xi = v_2^{-\frac{1}{3}} (\bar{r}_0^2)^{1/2}, \quad (2.3)$$

$$\bar{r}_0 = l C_n^{1/2} n^{1/2}, \quad (2.4)$$

где  $\bar{r}_0$  – длина фрагмента полимера в состоянии релаксации,  $l$  – средняя длина связи (1,54Å для ПЭГ),

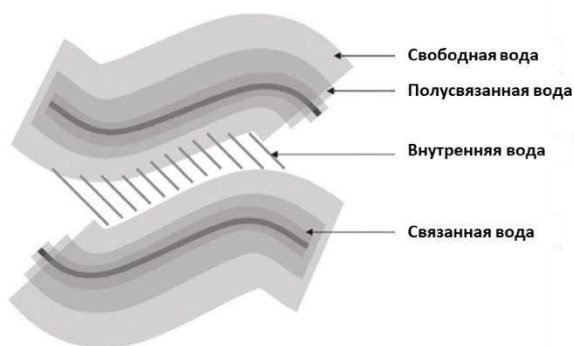


Рис. 2.7. Различные типы воды в гидрогелях [32].

$C_n$  – характеристическое соотношение для полимера (4,1).

### 2.3.3 Механические свойства гидрогелей

Механические свойства материалов зачастую указывают на их практическое применение. Использование некоторых теорий позволяет описать механическое поведение гидрогелей, которое позволяет определять их структуру, эффективную

молекулярную массу между сшивками, число эластически активных цепей и т. п.

Классически механика материалов определяется силой  $F$ , действующей на образец, или напряжением  $\sigma = F/S$  (или  $\tau$ ) и вызванной при этом деформацией  $\varepsilon$  (или  $\gamma$ ). В приближении абсолютно упругого тела при небольших деформациях связь между этими величинами линейная и выражается законом Гука:

$$\sigma = E\varepsilon, \quad (2.5)$$

$$\tau = G\gamma. \quad (2.6)$$

В случае гидрогелей за упругие свойства отвечает полимерная сетка, которая препятствует течению образца, а наличие воды определяет их вязкие свойства.

#### 2.3.3.1 Релаксация напряжения и ползучесть (релаксация деформации)

Для описания поведения вязкоупругого материала используют модель Максвелла: последовательно соединенные пружина и вязкий элемент (Рис. 2.8) – это тело, испытывающее упругую деформацию под действием напряжения и в то же время способное течь [34]. Модель Максвелла описывается следующей системой уравнений:

$$\begin{cases} \sigma = \sigma_E = \sigma_\eta \\ \dot{\varepsilon} = \frac{\dot{\sigma}}{E} + \frac{\sigma}{\eta} \end{cases} \quad (2.7)$$

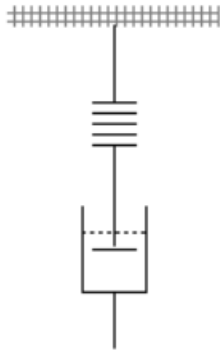


Рис. 2.8. Вязкоупругое тело Максвелла.

В ответ на вызванную деформацию пружина растягивается и начинает действовать на вязкий элемент, который, в свою очередь, приходит в движение и постепенно возвращает пружину в исходное состояние. По мере того, как пружина сжимается, действующая на вязкий элемент сила снижается, и скорость перемещения вязкого элемента падает, что и приводит к экспоненциальному падению регистрируемого напряжения [35]:

$$\sigma = \sigma_0 e^{-\frac{E}{\eta}t} \quad (2.8)$$

Уменьшение напряжения при постоянной нагрузке (деформации) называют релаксацией напряжения. Начальное напряжение  $\sigma = \sigma_0 = \sigma_{\text{упр}} = \varepsilon E$ , вызванное упругостью элемента  $E$ , постепенно исчезает из-за необратимой деформации в вязком элементе  $\eta$ . Время, в течение которого напряжение уменьшается в  $e$  раз (до  $\approx 0,37\sigma_0$ ), называется временем релаксации  $\tau$ . Если время воздействия на систему  $t$  много меньше времени релаксации, то система проявляет только упругие свойства. Времена релаксации жидкостей малы ( $\sim 10^{-3}$  с для воды), а для твердых материалов характерны большие времена релаксации. Время релаксации вязкоупругих гидрогелей варьируется в широком диапазоне, обычно от  $10^{-1}$  до  $10^6$  с [36], что является промежуточным вариантом между жидкостями и твердыми телами.

Если к вязкоупругому материалу прикладывается постоянное напряжение и фиксируется изменение деформации во времени, то в простейшем случае ползучесть (медленная деформация под действием нагрузки) может быть описана моделью Кельвина (параллельные пружина и вязкий элемент) (Рис. 2.9).

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{E} \left(1 - e^{-\frac{1}{\tau}}\right), \quad (2.9)$$

где  $\tau = \frac{\eta}{E}$  - время запаздывания (ползучести).

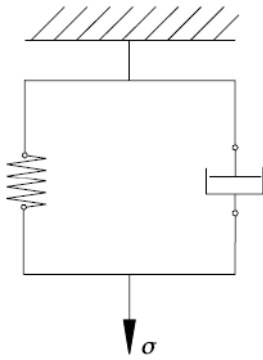


Рис. 2.9. Модель Кельвина вязкоупругого тела.

При приложении напряжения к образцу деформация постепенно нарастает, при этом скорость деформации уменьшается со временем. В модели Кельвина скорость деформации ограничена вязким элементом, а предельная деформация определяется жесткостью пружины. После снятия постоянного напряжения образец будет медленно возвращаться к своей первоначальной форме, также следуя экспоненциальной кривой (восстановление) [36].

### 2.3.3.2 Осцилляционные (циклические, периодические) испытания

Проведение экспериментов в осцилляционном режиме позволяет одновременно измерять вязкие и упругие свойства материала [36]. При правильно подобранной амплитуде колебаний образец может быть подвержен синусоидальному напряжению без разрушения структуры образца, в этом случае деформация равна

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t). \quad (2.10)$$

Для идеальной жидкости напряжение отстает от деформации на  $90^\circ$ , а в случае упругого материала сдвиг фаз нулевой. Для вязкоупругих материалов угол сдвига фаз лежит в диапазоне от  $0$  до  $90^\circ$ . Описанные случаи показаны на Рис. 2.10.

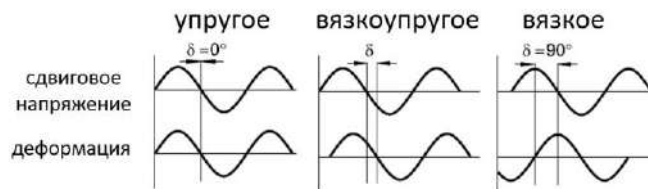


Рис. 2.10. Вынужденные колебания для идеального упругого, реального вязкоупругого и идеального вязкого и тел.

Измерение вынужденных колебаний образца при изменяющейся амплитуде дает информацию об области линейной вязкоупругости, где  $\sigma = G\gamma$ , необходимой для корректных дальнейших измерений, а при изменяющейся частоте – о вязких и упругих свойствах материала на различных масштабах времени.

Используя комплексный модуль сдвига  $G^*$ , вязкие и упругие свойства материала выражаются измеряемым сдвигом фаз  $\delta$ :

$$G^* = G' + iG'' \quad (2.11)$$

где  $G'$  – эластическая компонента модуля (модуль накопления),  $G''$  – вязкая компонента модуля (модуль потерь). Тогда сдвиг фаз можно выразить следующим образом:

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}, \quad (2.12)$$

где  $\delta$  так же называют углом потерь.

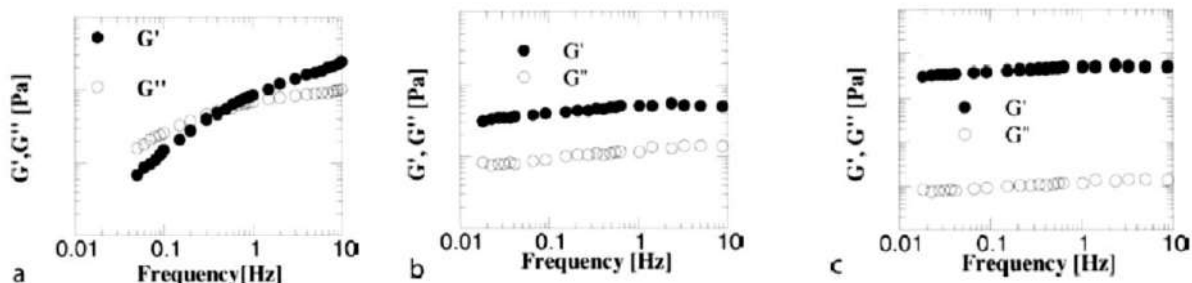


Рис. 2.11. Частотная развертка различных видов материалов: а) концентрированный раствор полимера; б) малопрочный гель; в) прочный гель [16].

Сдвиг фаз (или тангенс угла потерь) характеризует соотношение энергии, рассеиваемой в виде тепла, к запасенной энергии во время деформации. В случае идеально упругого тела его значение стремится к нулю, а для гидрогелей широко варьируется в зависимости их состава мономера и соответствующего полимера, количества воды (растворителя) от нескольких сотых до десятков единиц.

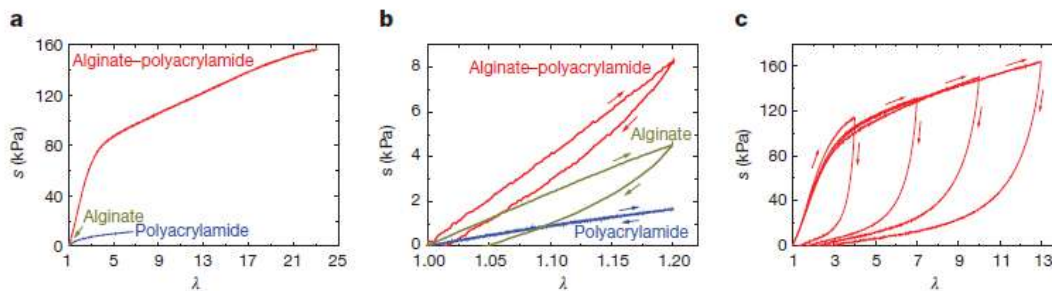


Рис. 2.12. Кривые нагрузки-разгрузки высокоэластичных гидрогелей на основе ПААм и альгината [37].

При испытании концентрированного раствора полимера наблюдается вязкое поведение при низких частотах, что связано со способностью восстановления исходной структуры полимерных цепей благодаря Броуновскому движению, и упругое при высоких частотах, что обуславливается образованием временно сшитой сетки и невозможностью её распутывания за короткое время, в результате чего происходит деформация сетки (Рис. 2.11 а). Соотношение между вязкой и упругой компонентой может составлять от нескольких десятых долей (малопрочный гидрогель на основе

белков и полисахаридов) до нескольких сотых и тысячных (прочный гель) (Рис. 2.11 b-c), при этом модули практически не зависят от частоты сдвига.

Большинство гидрогелей не проявляют высокую эластичность, являются хрупкими (энергия разрушения –  $10 \text{ Дж/м}^2$ ) и чувствительными к царапинам и надрезам. Хрящи и природные каучуки имеют на 2-3 порядка большие энергии разрушения. Попытки улучшить механические свойства гидрогелей обычно сводятся к увеличению содержанию воды (свыше 90% от общей массы), использованию высокомолекулярных мономеров, а также использованию двух типов мономеров, один из которых будет создавать сеть с длинными звеньями, а другой – с короткими, которые будут разрушаться и способствовать диссипации энергии. В статье [37] рассматриваются гидрогели на

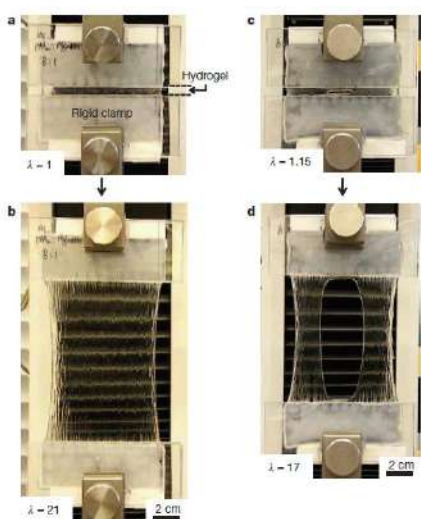


Рис. 2.13. Внешний вид высокоэластичного и устойчивого к дефектам гибридного гидрогеля.

основе альгината и акриламида в соотношении 1 к 8 с добавлением ионного  $\text{CaSO}_4$  и ковалентного МВАА сшивателей, соответственно. На Рис. 2.12 представлены кривые нагружения/разгрузки данных композитов с пределом деформации на растяжение в 21 раз. При этом добавление дефекта в композит (царапины) незначительно снижает предел деформации (до 17 раз) (Рис. 2.13).

Учитывая достаточно высокую мягкость гидрогелей, для определения механических свойств проводятся эксперименты по индентированию и наноиндентированию [38,39]. Значения упругого модуля в данных экспериментах могут быть завышены из-за возникающих на интерфейсе индентора и гидрогеля сил адгезии.

### 2.3.4 Набухание

Важнейшим отличительным свойством гидрогелей является способность к набуханию (*англ. swelling*) в присутствии водной среды и усадка при её отсутствии. В процессе набухания происходит внедрение молекул  $\text{H}_2\text{O}$  между фрагментами сетки полимера, в результате чего сетка растягивается.

При физиологических условиях (температура, pH и ионная сила раствора) набухание широко варьируется в зависимости от гидрофильности/гидрофобности полимерных звеньев, плотности сшивки, степени конверсии  $\text{C}=\text{C}$  (Рис. 2.15). Способность поглощать воду характеризуют двумя параметрами:

- Равновесное содержание воды (англ. *EWC equilibrium water content*):

$$PCB = \frac{m_n - m_c}{m_n} \times 100\%, \quad (2.13)$$

- Степень набухания (англ. *swelling ratio*):

$$CH = \frac{m_n - m_c}{m_c}, \quad (2.14)$$

где  $m_n$  – масса набухшего образца, а  $m_c$  – масса сухого образца.

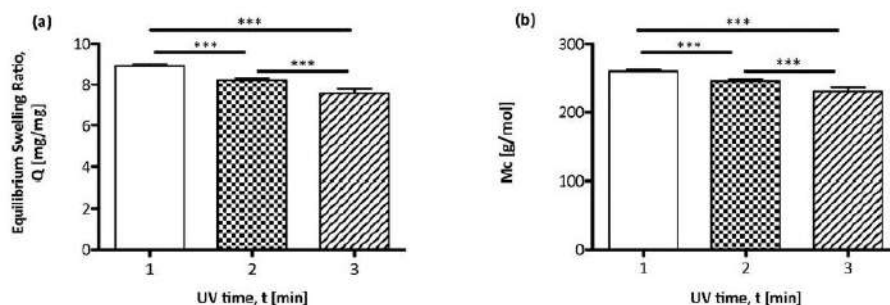


Рис. 2.15. Зависимость степени набухания (слева) и средней молекулярной массы между сшивками (справа) гидрогеля на основе ПЭГ-ДА ( $M_w=700$  Да) от времени УФ-воздействия на образец [41].

Для оценки указанных характеристик существуют разные методики. После реакции полимеризации образцы промывают дистиллированной водой для удаления непрореагировавшего мономера, фотоинициатора и других компонентов суспензии, после чего на одни-несколько суток помещают в вакуумный сушильный шкаф при 60–80 °С для удаления воды. Затем сухой гидрогель помещают в среду набухания, измеряют массу образца в определенные промежутки времени до установления постоянной массы, которую характеризуют как массу набухшего образца. Для

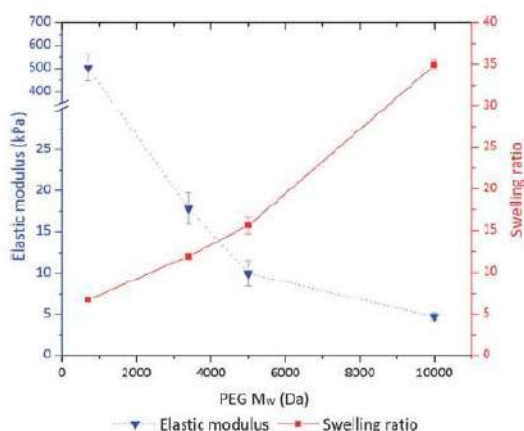


Рис. 2.14. Упругий модуль (слева) и степень набухания (справа) гидрогелей на основе ПЭГ-ДА (20% мономера/0,5% фотоинициатора) в зависимости от молекулярной массы мономера ( $M_w=700, 3400, 5000$  и  $10000$  Да) [40].

определения массы сухого образца повторяют процедуру сушки для набухшего гидрогеля. В некоторых случаях сушку проводят на воздухе при комнатной температуре, а набухший образец после вымачивания промокивают фильтровальной бумагой.

В статье [40] исследовались гидрогели на основе ПЭГ-ДА различной молекулярной массы, которые применяются для создания модельных трехмерных клеточных систем для воссоздания тканей организма. Помимо явной зависимости степени набухания от

молекулярной массы, наблюдается уменьшение упругого модуля гидрогелей при увеличении молекулярной массы мономера (Рис. 2.14), что позволяет моделировать различные типы тканей, при этом не изменяя биосовместимость и токсичность материала.

Из-за неидеального термодинамического поведения полимерных сетей в водных растворах теоретическое описание набухания гидрогелей затруднено. В приближении нейтральных тетрафункциональных связанных сетей гидрогели можно рассматривать согласно теории Флори-Ренера [42,43]. По данной теории набухание гидрогелей объясняется термодинамической совместимостью мономера и воды. Равновесное состояние наблюдается в том случае, когда силы набухания уравновешиваются силами растяжения, вызванными сшивками гидрогеля. Химический потенциал воды в процессе набухания при постоянных температуре и давлении изменяется согласно уравнению:

$$\mu_1 - \mu_{1,0} = \Delta\mu_{\text{смешивания}} + \Delta\mu_{\text{упр}}, \quad (2.15)$$

где  $\mu_1$  – хим. потенциал воды в системе,  $\mu_{1,0}$  – хим. потенциал чисто среды набухания (воды),  $\Delta\mu_{\text{смешивания}}$  и  $\Delta\mu_{\text{упр}}$  – вклады смешивания и упругости сетки в общее изменение химического потенциала системы. При наличии свободных заряженных групп в гидрогеле силы, способствующие набуханию, могут значительно возрастать. Ионные взаимодействия учитываются введением дополнительного слагаемого  $\Delta\mu_{\text{ион}}$ . Изменение потенциала смешивания определяется термодинамикой взаимодействия полимера с водой:

$$\Delta\mu_{\text{смешивания}} = RT \ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi v_{2,s}, \quad (2.16)$$

где  $\chi$  – параметр взаимодействия полимер-вода по Флори-Хаггинсу,  $v_{2,s}$  – объемная доля полимера в набухом гидрогеле. Изменение потенциала упругости определяется теорией упругости резины и резиноподобных материалов [43]:

$$\Delta\mu_{\text{упр}} = \left( \frac{RTV_1}{\bar{v}M_c} \right) \left( 1 - \frac{2M_c}{M_n} \right) \left( v_{2,s}^{\frac{1}{3}} - \frac{v_{2,s}}{2} \right), \quad (2.17)$$

где  $\bar{v}$  – удельный объем воды,  $V_1$  – мольный объем воды,  $M_c$  – средняя молекулярная масса полимерной цепи между сшивками,  $M_n$  – молекулярная масса исходного мономера.

### 2.3.5 Дегградация гидрогелей

Дегградация *in vivo* является необходимым свойством материалов, используемых в регенеративном подходе к лечению. Гидрогели, способные к дегградации, находят применение в

биологии, медицине и имитируют нативные ткани [44]. Материалы со свойством деградации или резорбируемости могут быть однократно введены в ходе хирургического вмешательства при лечении пациента, после чего нет необходимости в повторной операции по извлечению и замене «отработавшего» материала [21,45].

Среди вариантов создания деградируемого гидрогеля встречаются: включение деградируемых сшивающих агентов и варьирование их концентрации [46–48], использование многоблочных сополимеров [49], в которых скорость деградации зависит от молекулярной массы (длины) отдельных фрагментов.

Механизмы деградации гидрогелей разделяют на гидролитический и ферментативный. В первом случае характер деградации определяется взаимодействием воды с полимером, а во втором случае клетки либо ферменты способствуют расщеплению сшитых сеток. Кроме того, при имплантации любого тела *in vivo*, в том числе и гидрогелей, возникает реакция чужеродного тела в организме, которая приводит к адсорбции неспецифических белков. Возникающие при этом воспалительные клетки, которые секретируют цитокины, хемотаксические факторы и активные формы кислорода [50], оказывают влияние на деградацию материала.

Гидрогели на основе ПЭГ (в частности, эфиры акриловой кислоты или акрилатные производные) расщепляются путем гидролиза фрагмента сложного эфира (Рис. 2.16), при этом образуются акриловая кислота и полиэтиленгликоль. Выделение кислоты может негативно сказываться на жизнеспособности клеток из-за затруднения её транспорта в организме и локальном уменьшении кислотности среды. Высокая биологическая устойчивость гидрогелей на основе ПЭГ-ДА [51] может быть скомпенсирована их наполнением высокорезорбируемыми добавками, например, фосфатами кальция: брушитом и октакальциевым фосфатом (ОКФ).



Рис. 2.16. Эфирный фрагмент ПЭГ-ДА восприимчив к окислению, а концевые группы гидролитически лабильны [52].

Деградация *in vitro* обычно измеряется гравиметрическим методом и определяется потерей массы гидрогеля от времени выдерживания в различных средах, например, фосфатном буфере (pH=7,4) или растворе лимонной кислоты. Для этого измеряется масса гидрогеля в сухом релаксированном состоянии, а также масса сухого полимера в выбранный момент.

При этом необходимо разделять процесс набухания и деградации гидрогелей, которые



происходят одновременно. Поскольку деградация напрямую связана с расщеплением сшивок гидрогеля, её скорость можно оценивать, сравнивая значения модулей сдвига материалов и наличием характерных полос поглощения на ИК-спектрах.

## 2.4 Фотополимеризация

Гидрогели могут быть сшиты *in vivo* и *in vitro* в присутствии фотоинициатора под действием излучения светом видимого и УФ диапазона. Фотополимеризация (ФП) имеет несколько преимуществ перед другими методами полимеризации: пространственный и временной контроль, малое время процесса отверждения, низкие энергетические и экономические затраты, возможность выбора растворителя, использование при комнатной температуре, осуществление процесса *in situ*, минимизация инвазивности при хирургических операциях. Фотополимеризация широко используется в производстве электроники, оптических материалов, мембран, покрытий, объектов тканевой инженерии (кости, хрящи, печень, инкапсуляция клеток), биосенсорике, систем доставки лекарственных препаратов, стоматологии [53,54]. Процесс фотополимеризации обычно представляет собой цепную полимеризацию жидкой суспензии или пастообразного материала (раствор мономера/макромера и фотоинициатор) в полимер (в нашем случае гидрогель) в контролируемых условиях при определенной температуре (комнатной, физиологической и т.п.) [55]. Поскольку данный процесс происходит под действием свободных радикалов, то в состав исходной суспензии обязательно должен входить фотоинициатор, который под действием излучения формирует необходимые для протекания цепной реакции радикалы. Такие параметры как тип используемого мономера, тип и концентрация фотоинициатора и длина волны излучения определяют эффективность фотополимеризации. Главным недостатком ФП является ингибирование реакции под действием кислорода, который является радикальным поглотителем и прерывает этапы инициирования и роста полимерной цепи [47]. Данная проблема обычно решается проведением ФП в потоке инертного газа, например, азота, либо простым покрыванием свободной поверхности системы стеклом, либо добавлением в состав фотоотверждаемой смеси ингибитора полимеризации (для предотвращения спонтанной полимеризации в коммерческие мономеры добавляют гидрохинон, 4-метоксихинон). Однако, в случае проведения ФП суспензии, содержащей клеточные культуры, полное отсутствие растворенного в суспензии кислорода может привести к гибели клеток. Реакции радикальной фотополимеризации обычно характеризуются объемной усадкой, неполной степенью полимеризации (или степенью конверсии двойной связи C=C) и невозможностью отверждения оптически толстых образцов.

Для создания материалов биомедицинского назначения в качестве исходных соединений ФП используют макромолекулярные мономеры, содержащие одну, две или более винильных групп ( $\text{CH}_2=\text{CH}-$ ). Их использование во многом связано с низкой цитотоксичностью по сравнению с предшествующими им мономерами, а конкретный выбор зависит от необходимых свойств конечного материала. Наконец, процесс радикальной фотополимеризации лежит в основе 3D-печати, а именно стереолитографии и двухфотонной литографии, что позволяет придавать материалам разнообразную форму и моделировать архитектуру под каждый индивидуальный случай лечения.

#### 2.4.1 Кинетика фотополимеризации

Изучение скорости реакций фотополимеризации суспензий, используемых для получения гидрогелей, является важным аспектом для определения плотности сшивки получаемого полимера (степени полимеризации) и основных функциональных параметров гидрогелей: набухания и механических свойств.

Общая энергия  $E$ , затраченная в процессе ФП, зависит от интенсивности источника излучения  $W$  и времени воздействия  $t$ :

$$E = W \cdot t. \quad (2.18)$$

Поскольку излучение воздействует на фотоотверждаемую композицию, распространяется на определенную глубину и поглощается фотоинициатором, то его интенсивность можно описать законом Бугера-Ламберта-Бера [56]:

$$W = W_0 \cdot e^{\left(-\frac{x}{D_p}\right)}, \quad (2.19)$$

где  $W_0$  – исходная интенсивность излучения,  $D_p$  – или фоточувствительность полимера, определяемая как расстояние, на котором интенсивность излучения падает в  $e$  раз. Поскольку реакция сшивки полимера является экзотермической, необходимо контролировать температуру при полимеризации образцов *in situ* и при инкапсуляции клеток для обеспечения максимального уровня выживаемости клеток [57].

Расстояние  $S_d$ , называемое глубиной полимеризации, характеризует глубину проникновения фотонов в объем реакционной суспензии при определенной дозе излучения  $E$  и является важным свойством процесса ФП. Соотношение между глубиной полимеризации и дозой излучения

определяется уравнением Джейкобса и является ключевым для технической реализации процесса ФП [58,59]:

$$C_d = D_p \ln \left( \frac{E}{E_c} \right), \quad (2.20)$$

где  $D_p$  – фоточувствительность,  $E_c$  – критическая энергия полимеризации.

Скорость фотоиницирования зависит от квантового выхода  $\Omega$ , определяемого числом радикалов, которые образуются при поглощении одного кванта света, эффективности фотоинициатора  $f$  (долей радикалов, которые инициируют полимеризацию), молярного коэффициента поглощения  $\varepsilon$  фотоотверждаемой суспензии или её компонентов при используемой длине волны  $\lambda$ , интенсивности излучения, концентрации фотоинициатора  $C_p$  и выражается следующим уравнением:

$$R_i = \frac{2\Omega f(2,303\varepsilon)W_0\lambda C_p}{N_A h c}. \quad (2.21)$$

Интенсивность излучения варьируется от единиц мВт/см<sup>2</sup> до единиц Вт/см<sup>2</sup> в зависимости от используемого источника: ртутные и ксеноновые дуговые лампы, УФ- и видимые лазеры, светоизлучающие диоды (LED). Выбор длины волны влияет как на энергию излучения, так и на область применения получаемого материала: так для создания объектов тканевой инженерии предпочитают использовать длинноволновое УФ-излучение или видимый свет, которые менее фототоксичны и имеют меньший мутагенный эффект по сравнению с обычным УФ-излучением [53].

Скорость полимеризации  $R_p$  выражается как:

$$R_p = k_p [DB] \left( \frac{R_i}{2k_t} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2.22)$$

где  $k_p$  – константа скорости роста цепи,  $[DB]$  – концентрация двойных связей С=C,  $k_t$  – константа скорости обрыва цепи. Кривые зависимости скорости полимеризации от времени представлены на Рис. 2.17 и Рис. 2.18. Параметры  $k_p$  и  $k_t$  в случае реакций сшивания не являются константами, а зависят от ограничений массопереноса в процессе полимеризации. Преобразование раствора мономера в растущую полимерную сетку резко повышает вязкость системы, что снижает мобильность радикалов. Из-за этого уменьшается  $k_t$  и увеличивается концентрация радикалов, происходит увеличение скорости полимеризации при непрерывно уменьшающейся концентрации двойных связей – происходит самоускорение (*англ. auto-acceleration*). Вблизи максимума зависимости подвижность двойных связей становится диффузионно-контролируемой, при этом

продолжает возрастать плотность сшивки полимера. В результате уменьшается константа скорости роста цепи и уменьшается скорость полимеризации – происходит самозамедление (англ. *auto-deceleration*) (Рис. 2.17).

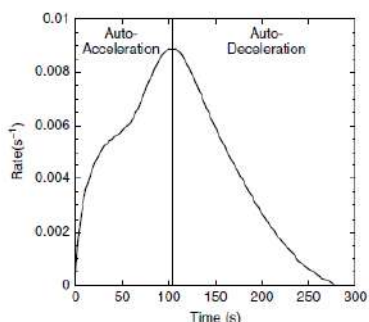


Рис. 2.17. Кривая зависимости скорости полимеризации гидрогеля на основе ПЭГ от времени [47] с участками самоускорения и самозамедления.

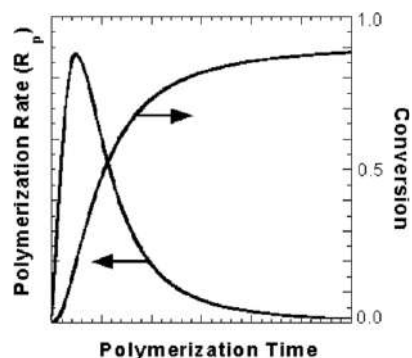


Рис. 2.18. Графики зависимости скорости полимеризации  $R_p$  и степени полимеризации (Conversion) от времени для случая радикальной полимеризации многофункциональных мономеров [60]

Среди способов изучения кинетики фотополимеризации выделяют дифференциальную фотокалориметрию [61], позволяющую регистрировать тепловой поток от образца при воздействии излучения, ИК-[62] или Раман-спектроскопии [63–65], по которым анализируют изменение интенсивности полос поглощения, соответствующих связям C=C, C=O или C-O-C, *in situ* инфракрасной (NIR/MIR) фотореометрии (Рис. 2.19) [66], которая позволяет одновременно получать информацию как о степени полимеризации из ИК-спектров, так и наблюдать за изменением механических свойств объекта.

#### 2.4.2 Усадка при фотополимеризации

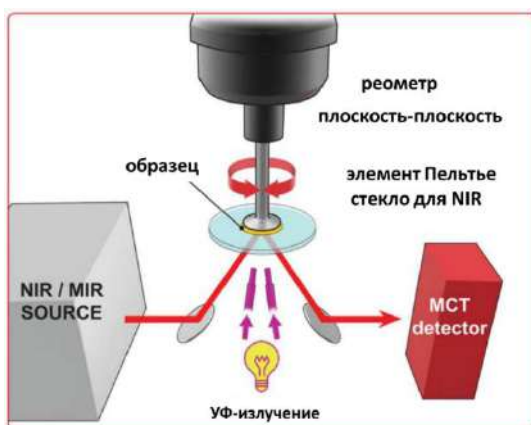


Рис. 2.19. Схема исследования фотополимеров методом ИК-фотореометрии [66].

Процесс ФП сопровождается явлением усадки в УФ-отверждаемых системах, которая происходит в результате смены Ван-дер-Ваальсова (межмолекулярные расстояния  $\sim 10^4$  Å) взаимодействия между полимером и мономером на ковалентные связи (характерные расстояния  $\sim 1$  Å). В ходе данного процесса происходит изменение плотности системы вследствие образования полимерной сетки и мольного объема акрилатных групп (или C=C),

экспериментально составляет  $\Delta V_{C=C} = 22,5 \text{ см}^3/\text{моль}$ . Объемная усадка при этом выражается как:

$$\frac{\Delta V}{V} = \frac{\Delta V_{C=C}}{M_m/\rho_m}, \quad (2.23)$$

где  $M_m$  – молярная масса мономера,  $\rho_m$  – плотность мономера. При введении наполнителя в систему мономер-растворитель или при использовании полиакрилатов объемная усадка зависит от доли наполнителя, функциональности мономера(-ов) и их мольной доли [67].

### 2.4.3 Выбор функционального мономера

Выбор исходного мономера для синтеза гидрогелей с помощью реакции фотополимеризации должен быть обоснован с точки зрения состава. Так, мономер должен содержать определенные функциональные группы: акрилатные, метакрилатные, винилэфирные, акриламидные, малеимидные, фумаратные, винилкарбаматные [68]. Основной каркас мономера должен состоять из нетоксичного водорастворимого соединения, к которому можно присоединить данные функциональные группы. Большой популярностью при создании гидрогелей биомедицинского назначения пользуется полиэтиленгликоль (ПЭГ), который также известен как полиэтиленоксид (ПЭО) или полиоксиэтилен (ПОЭ). ПЭГ является полимером или олигомером этиленоксида. Его диакрилатные производные (ПЭГ-ДА) зарекомендовали себя в качестве средств доставки лекарств [69,70], скаффолдов в тканевой инженерии [64,71,72], в области микрофлюидики [73,74], биоанализа и биосенсоров [26]. Такие соединения широко доступны на рынке химических соединений (среди недостатков – высокая стоимость соединений с молекулярной массой выше тысячи Да), а в литературе описана возможность органического синтеза из раствора ПЭГ, акрилоил хлорида и триэтиламина [63]. Возможность широкого варьирования молекулярной массы мономера (от сотен до десятков-сотен тысяч Да) позволяет управлять механическими свойствами и процессом набухания получаемых гидрогелей.

### 2.4.4 Фотоинициаторы

Критическим компонентом фотоотверждаемых суспензий является фотоинициатор (ФИ), реализующий протекание реакции полимеризации. При выборе фотоинициатора для синтеза гидрогелей во внимание берется несколько моментов: а) ФИ должен в определенной мере быть водорастворимым; б) ФИ должен быть цитосовместимым при используемой концентрации; и в) ФИ должен распадаться на радикалы с достаточной эффективностью при выбранной длине волны излучения.

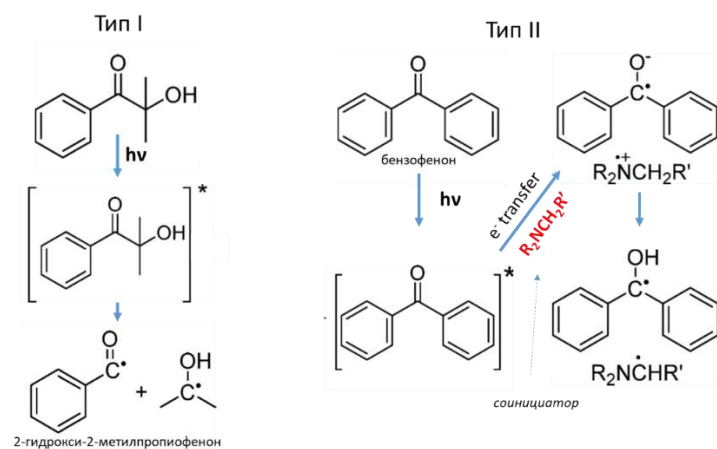
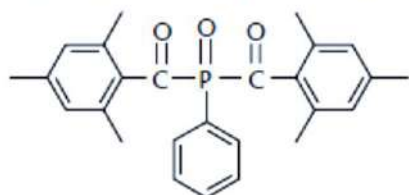
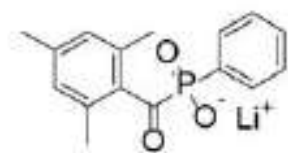
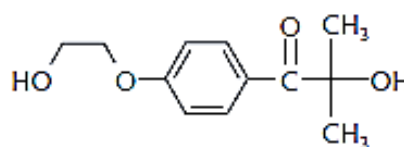


Рис. 2.20. Типы используемых фотоинициаторов.

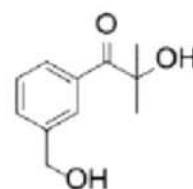
IRGACURE 819 and IRGACURE 819 DW



IRGACURE 2959

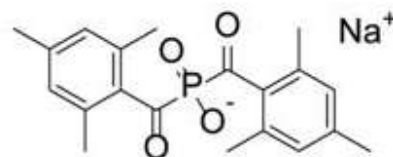
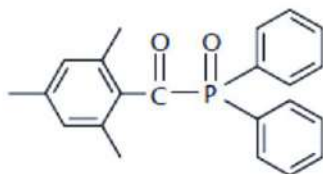


Li-TPO



APi-180

DAROCUR TPO



BAPO-ONa

Рис. 2.21. Коммерчески доступные фотоинициаторы (Irgacure®819(DW)/2959, Darocur TPO) и новый класс водорастворимых фотоинициаторов [75].

Существует два типа фотоинициаторов [76,77] (Рис. 2.20):

- первого I типа – подвергаются расщеплению при воздействии излучения; включают в составе ароматические карбонильные соединения, такие как производные бензоина, бензилкетали, производные ацетофенона и гидроксикалфеноны;
- второго II типа – подвергаются бимолекулярной реакции, в которой для образования свободных радикалов фотоинициатор в возбужденном состоянии взаимодействует с молекулой соинициатора.

В коммерческом доступе (Рис. 2.21) представлены в основном органорастворимые фотоинициаторы, а число водорастворимых инициаторов невелико. Так, наиболее используемым при создании водных фотоотверждаемых материалов является фотоинициатор Irgacure<sup>®</sup>2959 (в настоящее время выпускаемый под маркой Omnirad) на основе 2-гидрокси-1-[4-(2-гидроксиэтокси)фенил]-2-метил-1-пропанона, растворимость которого в воде составляет от 0,5 до 1 масс. %. Его применение во многом ограничено поглощением (Рис. 2.23) при длинах волн ниже 370 нм. Более водорастворимыми фотоинициаторами являются соединения солей натрия и лития на основе BAPO бисаилфосфиноксида (BAPO-ONa и BAPO-OLi) и MAPO моноаилфосфиноксида (Na-TPO и Li-TPO) (Рис. 2.22) [75].

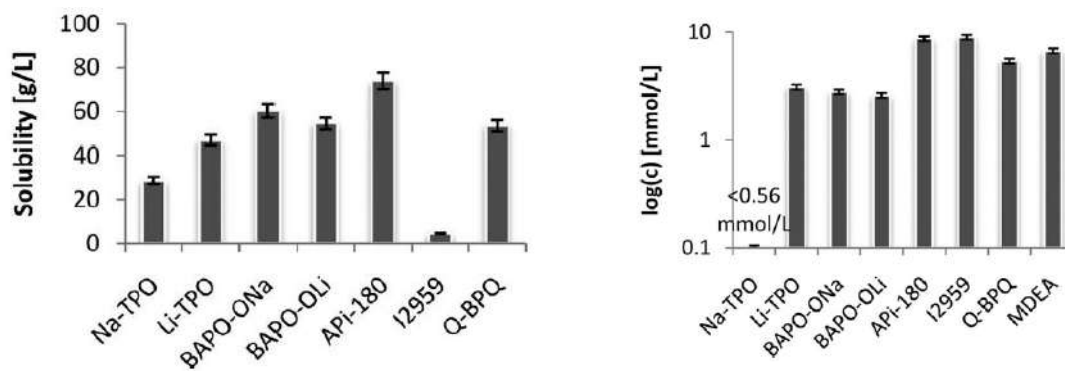


Рис. 2.22. Растворимость (справа) и полурасщепленная концентрация (слева) некоторых фотоинициаторов [75].

В статье [78] авторы предлагают увеличивать водорастворимость фотоинициатора TPO 2,4,6-триметилбензоил-дифенилфосфин оксида (коммерческий аналог – DAROCUR TPO) путем приготовления микроэмульсий, содержащих растворители (бутилацетат и изопропанол), ограничитель роста частиц (поливинилпиролон) и ПАВ (додецилсульфат натрия). Помимо использования чисто водных суспензий большинство исследователей используют 70% раствор этанола для полного растворения фотоинициатора, к примеру Irgacure<sup>®</sup>819 на основе фенилбис(2,4,6-триметилбензоил)фосфин оксида, который является одним из наиболее

эффективных коммерчески доступных фотоинициаторов (Рис. 2.23), но при этом обладает весьма низкой растворимостью в воде ( $<0,1$  мг/л).

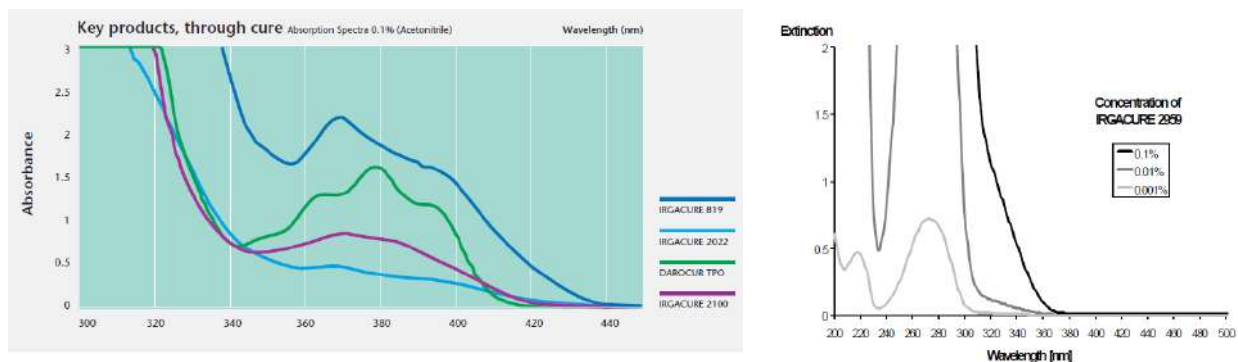


Рис. 2.23. Спектры поглощения ФИ Irgacure<sup>®</sup>819, 2959, Darocur TPO в ацетонитриле по данным производителя (Ciba AG, Швейцария).

Концентрация фотоинициатора является важным параметром для конечных характеристик получаемых гидрогелей [79,80]. Увеличение концентрации ФИ приводит к уменьшению степени набухания, увеличению скорости, степени (Рис. 2.24) и глубины полимеризации, что связано с увеличением плотности сшивки полимера и образованием более жесткой и плотной полимерной сетки. Помимо этого, с увеличением концентрации инициатора возрастает предел прочности гидрогелей (в частности, на основе ПЭГ-ДА) и обратимая деформация [81].

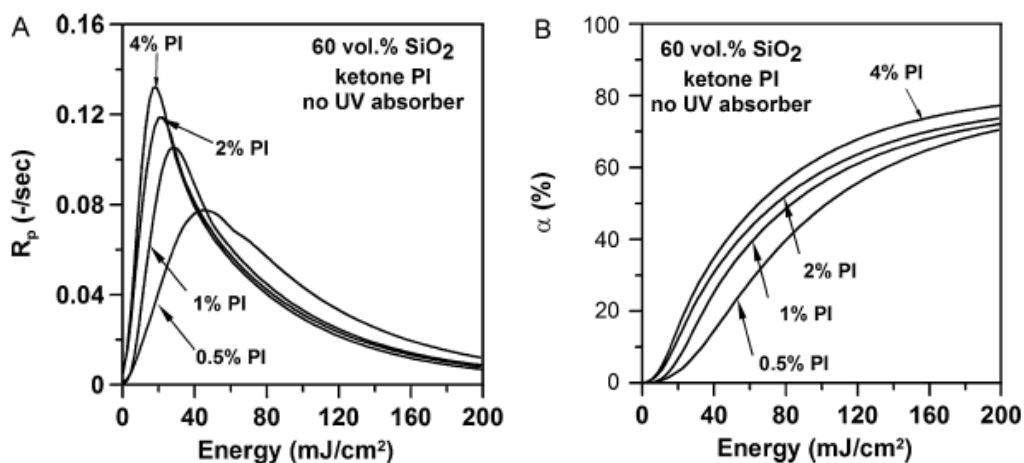


Рис. 2.24. Графики зависимостей скорости (A) и степени полимеризации (B), построенные в результате фото-ДСК, суспензии SiO<sub>2</sub> с различным содержанием ФИ Irgacure<sup>®</sup>184 [59].



#### 2.4.5 Поглощители излучения

При определении состава фотоотверждаемой суспензии (или раствора) важное внимание уделяют необходимости добавления красителя и УФ-поглопителя (ингибитора полимеризации) [82]. Принцип действия красителей заключается в поглощении излучения без образования свободных радикалов, а ингибиторов – в связывании образующихся в результате распада фотоинициатора свободных радикалов. Основная функция поглощителей – управление кинетикой полимеризации и пространственным разрешением процесса. Потенциально и те, и другие соединения могут проявлять токсичные свойства вследствие синтетической природы происхождения. Более того, для образования однородного водного раствора для синтеза гидрогелей необходимо использовать вещества, растворимые в воде. Среди красителей применение могут найти пищевые добавки, используемые в пищевой промышленности [83,84]: они маркируются как E100 - E130. Все добавки представляют собой окрашенные порошки от кисло-желтого до оранжевого и красного цвета.

Краситель E102 представляет собой вещество тартразин  $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$  (Рис. 2.25) (тринатриевая соль 5-Окси-1-(п-сульфофенил)-4-[(п-сульфофенил)-азо]-пиразол-3-карбоновой кислоты), растворимость в воде – 20 г/л, нерастворим в этаноле,  $M_w=534,36$  г/моль.

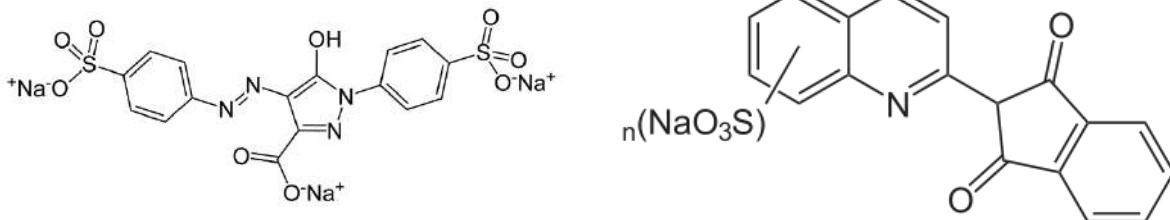


Рис. 2.25. Тартразин E102 (слева) и Хинолиновый желтый E104 (справа).

Краситель E104 –хинолиновый желтый  $C_{18}H_9NO_8S_2Na_2$  (Рис. 2.25) (динатриевая соль 2-(2-Хинолил)-1,3-индандиондисульфоновой кислоты), растворимость в воде – 22,5 г/л, растворим в этаноле,  $M_w=477,38$  г/моль.

Представленные красители имеют широкие полосы поглощения в диапазоне от 350 до 500 нм (Рис. 2.26). Существует множество споров касательно вреда искусственных пищевых красителей здоровью человека, однако, большинство из них разрешены и широко используются в России, Евросоюзе и США при производстве кондитерских изделий, напитков желтых цветов всех оттенков, консервированных овощей и фруктов, горчицы, кисломолочных изделий. Наиболее безопасными

являются пищевые добавки натурального происхождения Е100 куркумин и Е101 рибофлавин, который является эффективным инициатором типа II [85].

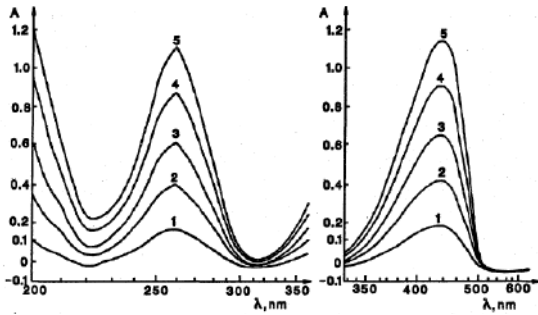


Рис. 2.26. Спектры поглощения водных растворов тартразина при концентрациях: 1 –  $10^{-5}$  М, 2 –  $2 \cdot 10^{-5}$  М, 3 –  $3 \cdot 10^{-5}$  М, 4 –  $4 \cdot 10^{-5}$  М, 5 –  $5 \cdot 10^{-5}$  М [83].

#### 2.4.6 Влияние наполнителя на фотополимеризацию

Описанные в предыдущих разделах компоненты являются фотоактивными при получении однородного оптически прозрачного фотоотверждаемого раствора. При его наполнении различными добавками (керамическими частицами, порошками и т. д.) и получении фотоотверждаемой суспензии (или пасты) изменяется не только реология

системы [86], но и оказывается большое влияние на транспорт фотонов за счёт рассеяния добавленными частицами. Зависимость глубины полимеризации от дозы излучения становится более сложной, включает длину рассеяния  $l_{sc}$  и долю наполнителя  $\Phi$  [59]:

$$C_d(E) = \frac{1}{1/l_{sc} + (1-\Phi)(C_p \varepsilon_p + C_D \varepsilon_D)} \left( \ln E - \ln \left[ (1-\Phi) \frac{h\nu}{\Omega} (\gamma_Q Q + \gamma_D C_D) \frac{1}{\varepsilon_p C_p} \right] \right), \quad (2.24)$$

где  $C_p$ ,  $C_D$ ,  $Q$  – концентрация фотоинициатора, красителя и ингибитора, соответственно;  $\varepsilon_p$ ,  $\varepsilon_D$  – молярные коэффициенты экстинкции фотоинициатора и красителя;  $\gamma_Q$  – эффективность ингибитора, определяемая как число радикалов, поглощаемых ингибитором;  $\gamma_D$  – число необразовавшихся радикалов из-за поглощения фотона красителем;  $\Omega$  – квантовый выход фотогенерации. Подобная зависимость существует и для ширины полимеризации [87,88], которая становится избыточной при увеличении доли наполнителя.

Обычно fotocувствительность и критическую энергию полимеризации определяют аппроксимацией зависимости толщины отвержденного полимера от натурального логарифма дозы излучения. Однако, существует теоретическая модель оценки критической энергии полимеризации в зависимости от состава суспензии (доли наполнителя, концентрации фотоинициатора, красителя и ингибитора) [89].

При малых концентрациях фотоинициатора она имеет вид:

$$E_c = (1-\Phi) \frac{h\nu}{\Omega} (\gamma_Q Q + \gamma_O O + \gamma_D C_D) \frac{1}{\varepsilon_p C_p}, \quad (2.25)$$

где  $\gamma_0$  – эффективность кислородного ингибитора и  $O$  – его концентрация.

Как видно на Рис. 2.27, рассчитанная в результате построения аппроксимационных кривых

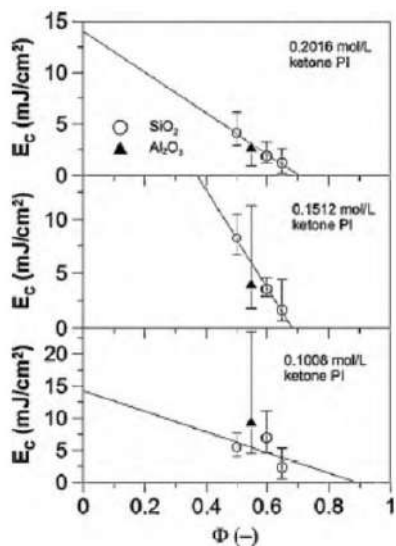


Рис. 2.27. Зависимость критической энергии полимеризации от доли оксида кремния и оксида алюминия в фотосуспензии [89].

критическая энергия полимеризации линейно уменьшается с увеличением доли наполнителя и имеет нелинейный характер зависимости от концентрации ФИ.

## 2.5 Слоистые фосфаты кальция

Кальций-фосфатные материалы представляют особый интерес из-за их сходства с твердыми тканями внутри организма, из-за чего обладают высокой биосовместимостью по своей природе. Существует много различных фаз фосфатов кальция [90], которые сравнивают по соотношению кальция и фосфора в их составе. Чем ниже молярное соотношение кальция и фосфора, тем более кислым и водорастворимым

является фосфат кальция [91]. Гидроксиапатит кальция  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  ГАП является классическим и наиболее используемым компонентом при создании биоимплантатов как в качестве основной фазы [92], так и в качестве покрытий или дополнительной биорезистивной фазы [93]. Из-за низкой резорбируемости ГАП ( $\text{Ca/P}=1,67$ ) его применение при регенеративном подходе ограничено, что вынуждает искать альтернативные материалы, например, фосфаты кальция с меньшим соотношением  $\text{Ca/P}$  или их смеси: монетит  $\text{CaHPO}_4$  и пирофосфат кальция ( $\text{Ca/P}=1$ ), трикальциевый фосфат ТКФ и аморфный фосфат кальция АФК ( $\text{Ca/P}=1,5$ ), нестехиометрический ГАП ( $\text{Ca/P}<1,67$ ), а также слоистые фосфаты кальция: брушит, октакальциевый фосфат ОКФ ( $\text{Ca/P}=1,33$ ), алкилфосфаты кальция. Данные фосфаты относятся к классу кислых фосфатов (гидрофосфатов). При резорбции они локально создают слабокислые значения рН, вследствие чего происходит частичное растворение (подтравливание) кристаллов ГАП нативной костной ткани. При адсорбции на их поверхности морфогенетических костных белков и других факторов [94], возможен их переход в раствор, где локально создается повышенная концентрация и запускается цепочка биохимических реакций, приводящих к образованию костной ткани в данном месте.

### 2.5.1 Брушит

Состав минерала «брушит» соответствует формуле  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (двухкальциевый фосфат дигидрат – ДКФД). Брушит совместим с костной тканью и способствует процессам ее роста [95,96].  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  был обнаружен в области костной мозоли, в зубном налете, почечных камнях, холестериновых бляшках, используется при доставке лекарств, раковой терапии и разработке биосенсоров, а также в качестве компонента цементов и покрытий для восстановления костной ткани [97,98]. Также были выдвинуты предположения, что ДКФД является промежуточным продуктом минерализации костного матрикса, а также ответственен за развитие кариеса зубов [95,99].



Рис. 2.28. Структура элементарной ячейки брушита [100]

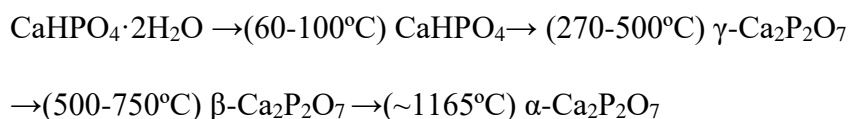
Брушит кристаллизуется в моноклинной сингонии пространственной группы  $Ia$  ( $a = 5,812$ ;  $b = 15,18$  и  $c = 6,239$  Å;  $\beta = 116,417^\circ$ ,  $Z=4$ ,  $\rho = 2,319$  г/см<sup>3</sup>) и является структурным аналогом гипса  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [101,102] (Рис. 2.28). Различие в их структуре связано с асимметрией протонированного аниона в брушите. Кристаллизационная вода в составе гидрофосфата кальция удерживается водородными связями с протонами гидрофосфатных групп, связанных в цепи. Это приводит к тому, что в раствор экспонирована поверхность, состоящая из гидратированных гидрофосфатных групп. Структура брушита состоит из цепочек  $\text{Ca-PO}_4$ , расположенных параллельно друг другу, и молекул воды, заполняющих слои между ними. Важным свойством брушита является его кристаллизация в форме стержневидных или пластинчатых кристаллов, физическое зацепление или переплетение которых придает определенную прочность твердому осадку.

При околофизиологических значениях  $\text{pH} = 6-8$  в водной среде брушит является метастабильной фазой по отношению к другим ортофосфатам кальция [103]. Брушит быстро резорбируется (растворяется) *in vivo*, при этом растущая нативная костная ткань не успевает заполнять образующиеся полости, с связи с этим брушит не находит применения в медицине в

качестве основного компонента имплантатов, однако, может использоваться в них как резорбируемый компонент [95].

ДКФД можно быть получен осаждением из водных растворов солей гидрофосфатов и кальция, например,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{CaCl}_2$ , сливанием разбавленной  $\text{H}_3\text{PO}_4$  и сахара кальция с осаждением при температуре ниже  $10^\circ\text{C}$ . В качестве побочных продуктов при этом образуется хлорид натрия, чье присутствие не оказывает токсического действия на клетки и ткани. Смешение растворов тетрагидрата нитрата кальция  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  и гидрофосфата аммония  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  с дальнейшим осаждением позволяет получать ДКФД с высоким выходом без какого-либо контроля за короткое время [13], однако, в качестве побочного продукта образуется цитотоксичный нитрат аммония, который обычно удаляется многократным промыванием осадка.

При  $60\text{--}100^\circ\text{C}$  брушит необратимо превращается в монетит, который при дальнейшем нагревании на воздухе преобразуется в ПФК [105]:



### 2.5.2 Октакальцевый фосфат

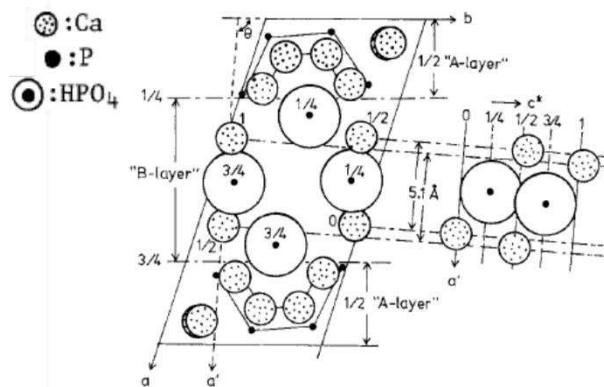


Рис. 2.29. Структура октакальцевого фосфата, проекция вдоль оси  $c$ , атомы кислорода в А-слое и молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  опущены [104].

два типа гидрофосфатных групп  $\text{HPO}_4^{2-}$ : одна из них соединена со слоем А, а другая расположена между слоями А (Рис. 2.29) [104,107].

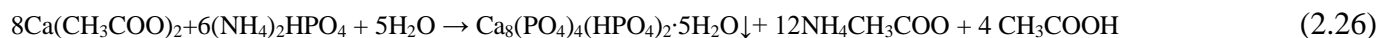
ОКФ достаточно легко гидролизуется до термодинамически более стабильного ГАП и часто рассматривается как прекурсор ГАП при биоминерализации тканей [106]. Октакальцевый фосфат

является метастабильной фазой, в кислых растворах распадается до брушита и гидролизуется до ГАП в нейтральной и щелочной средах.

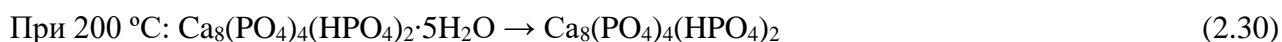
ОКФ кристаллизуется в виде тонких пластин, что придает ему большую удельную площадь поверхности, так при типичных размерах в плоскости 10 мкм и толщине пластины в 10 нм, удельная площадь поверхности  $S_{уд} \approx 75 \text{ м}^2/\text{г}$ . По-видимому, возникающая из-за этого адсорбционная емкость ОКФ способна усиливать его остеоиндуктивные свойства.

В работе [108] представлена обзорная таблица методик синтеза ОКФ, которые определяют состав продукта и его морфологию. Так, ОКФ осаждают из раствора солей  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{HPO}_4^{2-}$ , используя в качестве растворимых солей  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , некоторые другие соли кальция [106], а в качестве растворимых фосфатов смесь  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  [109,110], гидролизом брушита в различных буферных растворах в соответствии с диаграммой областей существования фосфатов кальция (Рис. 2.30) при различных температурах и pH [104,111].

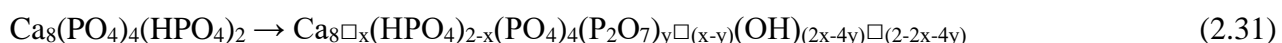
Получение ОКФ можно представить следующими реакциями:



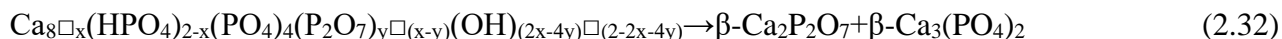
Термические превращения ОКФ описываются следующей последовательностью стадий [111]:



В интервале 350–550 °C:



В интервале 600–700 °C:



при  $2x-4y < 2$ ,  $y \leq x/2$ , где  $\square$  – вакансия.

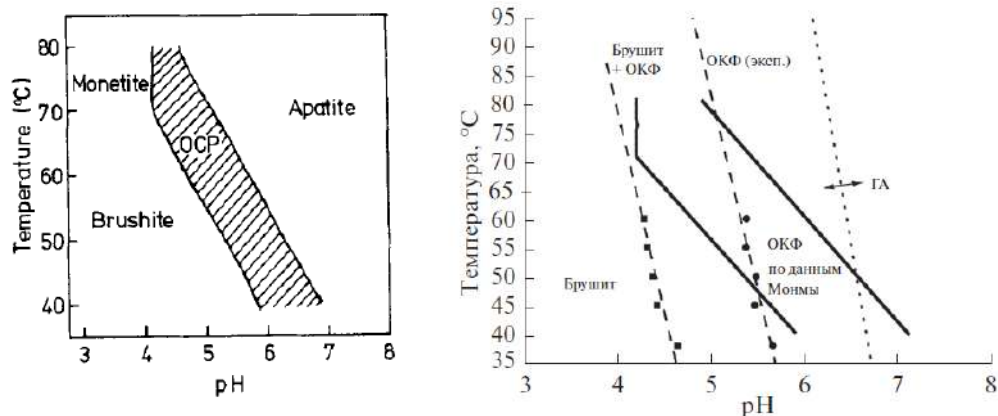


Рис. 2.30. Диаграмма областей существования ОКФ по данным гидролиза  $\alpha$ -ТКФ [104,112]: *Monetite* - монетит, *Brushite* - брушит, *ОСР* - ОКФ, *Apatite* – гидроксиапатит.

### 2.5.3 Замещенные слоистые фосфаты кальция

Из-за слоистой структуры ОКФ и наличия мостиковых групп  $\text{HPO}_4^{2-}$  возможно их замещение на радикалы органических кислот, в результате чего удается варьировать соотношение Ca/P в образующемся соединении. Его формулу можно представить как  $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4\text{R}_x(\text{HPO}_4)_{2-x} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , где R – остаток органической кислоты. В отношении замещенных ОКФ сложилась традиция называть такие соединения «интеркалированными». При этом интеркаляция в слоистых соединениях с ван-дер-ваальсовыми или водородными связями между слоями предполагает обратимое включение новой группы в межслоевое пространство.

ОКФ, «интеркалированный» ионами органических кислот (карбоксилатами), синтезируют путем гидролиза  $\alpha$ -ТКФ в присутствии растворимых в воде солей дикарбоновых кислот в виде буферных растворов, которые поддерживают заданное значение pH раствора [104]:



Обширная работа по замещению в структуре ОКФ на карбоксилаты проводилась в цикле работ [113] (Табл. 2.2), в результате чего были получены замещенные малонат-, адипинат-, сукцинат-, суберат-, себацинат- фумарат-ОКФ. Кроме того, встречаются примеры замещения на цитрат-ион [114] и анион четырехосновной пиромеллитовой кислоты [115]. Во всех случаях замещение приводит к образованию изоструктурных чистому ОКФ соединений с увеличенным межплоскостным расстоянием  $d_{(100)}$ .

«Интеркалирование» различных органических кислот может использоваться в случае необходимости доставки определенных веществ в организм, например, цитрат-ионов, которые играют важную роль в метаболизме, участвуя в цикле Кребса [116]. Данный продукт достаточно

важен в процессах жизнедеятельности организма, поскольку цитраты содержатся в костях, дентине и почках. Благодаря цитратам происходит растворение костной ткани во время ее ремоделирования и образование новой ткани. Кроме того, из работы [117] следует возможность взаимодействия между бруситом и такими кислотами, как глицин, лизин и пролин, с образованием подобного “интеркалята”.

Табл. 2.2. Условия синтеза и состав полученных замещенных фосфатов кальция в работе [113].

Карбоксильная кислота	Условия синтеза			Методы определения состава твердого продукта				
	pH		Время ч	ИК-спектроскопия		РФА		
	Начальный	Конечный		Фосфат кальция	-COO группа	Примесь	Основной продукт	d <sub>(100)</sub> , нм
Уксусная CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	5,32	5,51	24	ДКФД	нет	нет	ДКФД	-
	6,11	6,42		ОКФ	нет	нет	ОКФ	1,86
Янтарная	5,21	5,52	72	ДКФД, @ОКФ	да	ДКФД	Suc@ОКФ	2,15
	5,90	6,37	24	@ОКФ	да	нет	Suc@ОКФ	2,14
	5,90	6,26	48	@ОКФ	да	нет	Suc@ОКФ	2,14
	6,28	6,94	24	@ОКФ	да	нет	Suc@ОКФ	2,14
	6,28	6,92	48	@ОКФ	да	нет	Suc@ОКФ	2,13
	6,60	6,73	24	@ОКФ	да	нет	Suc@ОКФ	2,12
	6,69	7,39	48	@ОКФ	да	нет	Suc@ОКФ	2,09
Адипиновая	6,13	7,05	24	@ОКФ	Да	нет	Adi@ОКФ	2,37
	6,34	6,87	120	@ОКФ	Да	ГАП	Adi@ОКФ	2,37
Цитрат	6,45	6,95	96	@ОКФ	Да	нет	Cit@ОКФ	2,10
	6,64	7,28	120	@ОКФ	Да	нет	Cit@ОКФ	2,05
	6,53	7,54	340	@ОКФ	Да	нет	Cit@ОКФ	2,06

В предыдущих работах нами подробно изучались особенности синтеза замещенного сукцинат@ОКФ [112] и использования таких материалов в качестве прекурсора бифазной керамики. За счёт варьирования условий синтеза (температура, pH, время) предполагалось контролируемо изменять количество «интеркалируемого» карбоксилат-иона, однако, в случае сукцинат-иона такая зависимость не была установлена, а получался точечный состав Ca<sub>8</sub>(HPO<sub>4</sub>)<sub>2-x</sub>Suc<sub>x</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O с x = 0,85±0.05.

Среди особенностей термического поведения замещенных карбоксилатами ОКФ стоит отметить замедление разложения пластинчатых кристаллов фосфата до более высоких температур,



при этом образуются окрашенные порошки частично разложенных ОКФ за счет пиролиза карбоксилатов до углерода. Термолиз замещенных ОКФ практически не исследован, за исключением сукцинат@ОКФ [112].

#### 2.5.4 Алкилфосфаты кальция

Нуклеиновые кислоты, фосфолипиды и другие органические фосфаты играют важную роль в жизнедеятельности организма. В последние 50 лет алкилфосфатные производные, такие как диалкилфосфаты, моноалкилфосфатидилэтанол амины и моноалкилфосфохолины стали важными соединениями, применяемыми в пищевой химии, медицинской химии, супрамолекулярной химии и геохимии [119]. Алкилфосфаты образуют клеточные стенки, например, везикулярную мембрану фосфолипидов, и являются важными источниками твердых тканей [118]. По своей структуре алкилфосфаты кальция очень напоминают ОКФ, т.е. состоят из чередующихся гидратированных и алкилсодержащих слоев (Рис. 2.31) [118]. За счет слоистой структуры их частицы имеют пластинчатую морфологию, что приводит к высоким значениям удельной площади поверхности и сорбционной емкости. Одним из интересных аспектов использования моноалкилфосфатов является модификация поверхности неорганических материалов, таких как ГАП [120,121] или титановых имплантатов [122]. Было показано, что увеличение длины цепи (от пропилфосфата до гексадецилфосфата) способствует лучшей кристаллизации ГАП на модифицированной поверхности

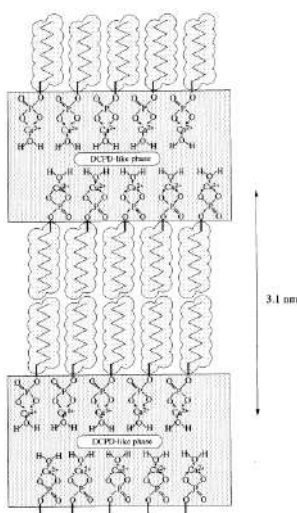


Рис. 2.31. Предполагаемая структура децилфосфата кальция [118].

титанового имплантата за счёт большей плотности  $\text{Ca}^{2+}$ -фильных карбоновых кислот. Помимо этого, стоит отметить, что алкилфосфаты, в том числе и разветвленные, используются в качестве поверхностно-активных веществ (ПАВ) [123], а также самосборных монослоев [124].

Алкилфосфаты кальция изучаются с 60-х годов XX века, при этом их кристаллическая структура не определена из-за сложности получения монокристаллов. Фрагментарные данные по порошковым дифрактограммам октил- и додецилфосфатов кальция можно найти в статьях [118] (Рис. 2.32, слева) и [120] (Рис. 2.32, справа), соответственно. Кроме того, алкилфосфаты кальция могут использоваться в качестве единого прекурсора биокерамики, поскольку при термическом разложении основных алкилфосфатов кальция образуется фаза  $\beta$ -ПФК [118], при этом не рассматривается синтез кислых алкилфосфатов кальция, в которых депротонируется только одна ОН-группа.

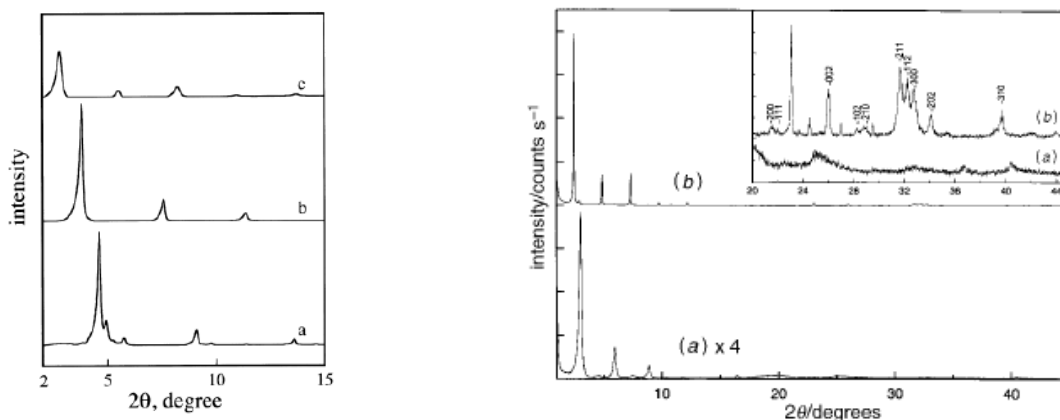


Рис. 2.32. Дифрактограммы порошков октилфосфата кальция (слева, график b) и додецилфосфата кальция (справа, график a).

Среди способов синтеза алкилфосфатов с длиной алкильной цепи от  $C_4$  до  $C_{12}$  можно выделить следующие: взаимодействие пирофосфорной кислоты и соответствующего спирта в бензоле [125]; взаимодействие спирта с оксихлоридом фосфора в присутствии диметиланилина и последующим взаимодействием с метилатом натрия [126]; взаимодействие оксида фосфора  $P_2O_5$  со спиртом [127], в случае которого получается смесь моно- и диалкилфосфата; взаимодействие ацетилфосфата, полученного из смеси ортофосфорной кислоты с уксусным ангидридом в присутствии пиридина и триэаноламина, со спиртом [128]; взаимодействие спирта с дифенилфосфорхлоридом и др. [119].

## 2.6 Бифазная керамика на основе фосфатов кальция

Ввиду того, что материалы на основе одного фосфата кальция обладают рядом функциональных ограничений (прочностные характеристики, резорбируемость и т.п.), в последнее время зачастую используются композиционные материалы на основе двух, трёх, а иногда и большего числа фаз – двухфазную, трёхфазную и мультифазную керамику [9]. Комбинирование двух и более фосфатов кальция позволяет контролировать пористость, механические свойства и скорость растворения материала в среде организма. В литературе под термином кальцийфосфатная бифазная керамика подразумевают смесь ГАП и  $\beta$ -ТКФ, которые получают либо путем твердофазного спекания, например, монетита и карбоната кальция, либо путем термообработки единого прекурсора, которым как правило является осажденный кальцийдефицитный ГАП [129]. К двухфазным системам можно отнести: ТКФ/ПФК ( $Ca/P = 1-1,5$ ), ТКФ/ГАП ( $Ca/P = 1,5-1,67$ ), и реже ПФК/ГАП ( $Ca/P = 1-1,67$ ). На Рис. 2.33 представлен участок фазовой диаграммы  $CaO-P_2O_5$ , на котором показаны области существования вышеописанных смесей.

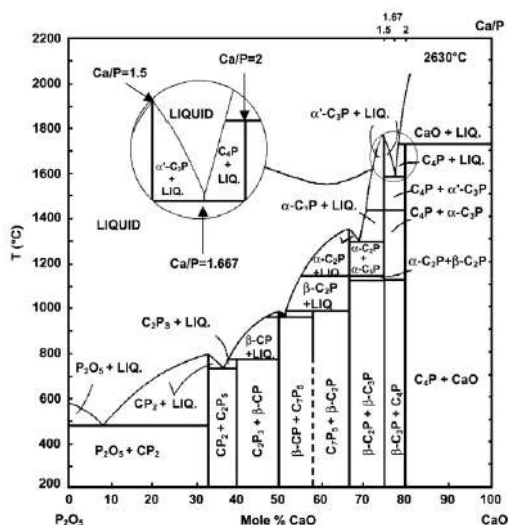
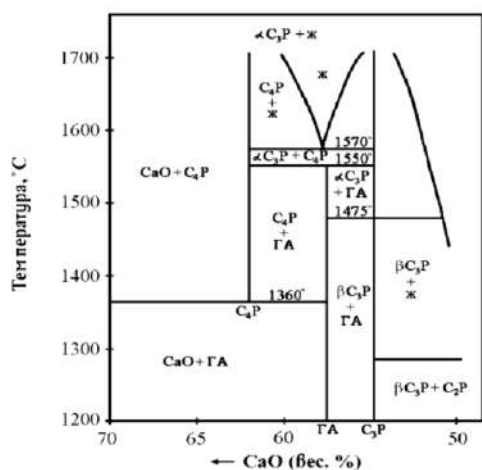


Рис. 2.33. Участок фазовой диаграммы  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  (в присутствии паров воды): C –  $\text{CaO}$ , P –  $\text{P}_2\text{O}_5$ , ГА – гидроксипатит [90].

Присутствие ТКФ в материале можно обеспечить различными методами, но непосредственное спекание механически смешанных ГАП и ТКФ используется редко. В некоторых случаях целесообразно синтезировать ГАП с заданным содержанием ТКФ путем проведения твердофазных реакций [130]. В большинстве же случаев осуществляется химическая обработка ГАП, либо его частичное термическое разложение. Термохимическая обработка позволяет получать двухфазные композиции, не превышая температуры 1000 °С, что позволяет сохранить биологическую активность фосфатов кальция. Появление низкотемпературной модификации ТКФ фиксируется уже при температуре 700 °С в случае обработки раствором фосфорной кислоты. Однако получение двухфазного продукта, состоящего только из ГАП и β-ТКФ, при указанных условиях возможно в узком интервале температур 850 – 900 °С. За верхним пределом этого интервала существует только β-ТКФ, который при 1400 °С переходит в высокотемпературную α-форму [131].

Главной проблемой при получении композиционных материалов являются различные скорости спекания β-ТКФ и ГАП. Это означает наличие механических напряжений в процессе спекания, препятствующих уплотнению и получению однородной микроструктуры, следовательно, для получения качественной композитной керамики должен быть отрегулирован ее номинальный (фазовый) состав.

Материалы на основе смеси ТКФ и ПФК мало исследованы. Во многом это связано с отсутствием ГАП в данной системе и паров воды, что затрудняет спекание этих фаз (в особенности ПФК) и, возможно, требует добавления спекающих добавок в порошковые смеси. Небольшое количество (0,5–3 масс. %) ПФК позволяет снизить температуру фазового перехода β→α-ТКФ и

получать бифазную керамику большей плотности [132]. В работе [133] представлено сравнение керамик ТКФ/ПФК с соотношением Ca/P=1,33, полученных механическим смешением этих фаз и термолизом ОКФ. Так, механическая смесь демонстрирует наименьшую плотность при спекании, поскольку при проведении твердофазного спекания сильно затруднен массоперенос крупного пирофосфат-аниона. Наилучшее уплотнение и прочностные характеристики демонстрируют плотные керамики на основе ОКФ, предварительно обработанного при T=450 °C, которые обжигали при 1100 °C в течение 3 часов, за счет наибольших значений сырой плотности прессовок. При увеличении времени спекания плотность некоторых образцов понижается. Возможно, наблюдается процесс вторичной рекристаллизации, при которой начинается аномальный рост зерна, происходит коалесценция, укрупнение и перераспределение пор, а уплотнения практически не наблюдается.

## **2.7 Композиты на основе гидрогелей, наполненных фосфатами кальция**

Композит на основе гидрогеля и фосфата кальция по своему химическому составу во многом напоминает нативную костную ткань. В случае гидрогелей на основе ПЭГ-ДА фосфаты могут улучшать механические характеристики материала, например, до 15% наночастиц ГАП увеличивают модуль упругости, предельную деформацию и прочность композита по сравнению с «пустым» гидрогелем [134]. Помимо этого, фосфаты способствуют остеогенезу. Существует несколько вариантов наполнения гидрогелей: замешивание порошков в суспензию перед ФП; включение в суспензию компоненты, которая под действием диффузии ионов из среды, в которую помещается гидрогель, преобразуется в необходимый наполнитель. В литературе представлены разработки гидрогелевых композитов: на основе альгината и брушита [135], хитозана и  $\beta$ -ТКФ [136], бактериальной целлюлозы и  $\beta$ -ТКФ/ГАП [137]. Композиты ПЭГ-ДА, наполненные частицами ГАП и изготовленные с помощью стереолитографии, использовали в качестве точной физиологической модели при инвазии раковых клеток молочной железы в кость *in vitro* [138]. Композиты на основе хитозана и ГАП показали более высокие модули упругости и лучшую экспрессию маркера остеогенной дифференцировки по сравнению с композитом без наполнителя [139]. В качестве наполнителя гидрогеля на основе восьмилучевого ПЭГ, функционализированного малеимидом, использовался АФК (Рис. 2.34), который конвертировался в более кислые фосфаты при помещении в модельный буферный раствор и стабилизировался при добавлении ионов Zn, что позволяет использовать такой материал при воспалениях, которые обычно встречаются в случае образования дефектов костей [140].

### 2.7.1 Диффузия солей в гидрогелях

Рост кристаллов в объеме геля (гель-опосредованный рост) часто встречается в природе при образовании таких неорганических материалов как кости, зубы, ракушки, основной неорганической составляющей которых являются фосфаты кальция. Гидрогели, как реакционная среда для их образования, рассматривались во многих работах: ГАП, ОКФ и брушит в силикагеле [141], в полиакриламиде [142,143]. Морфология выращенных кристаллов в основном задается степенью перенасыщения и характером взаимодействия молекул гидрогеля с кристаллами или ионами.

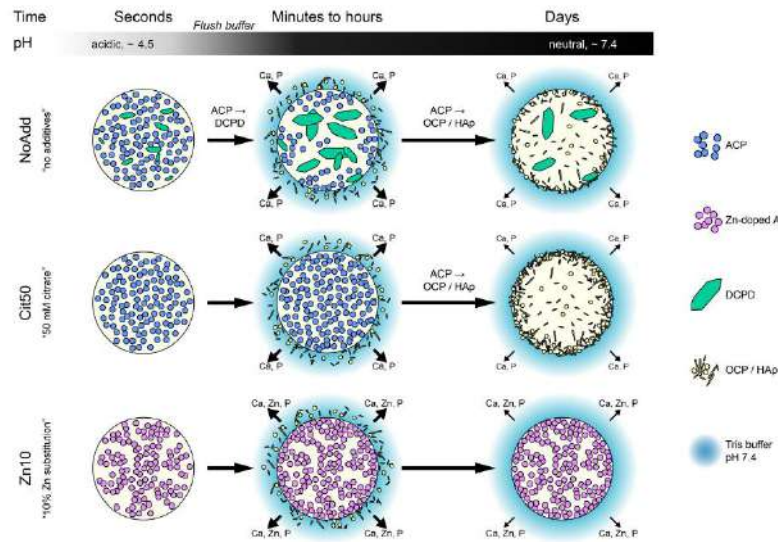


Рис. 2.34 Схематическое представление предполагаемых фазовых превращений в композитах ПЭГ-АФК.

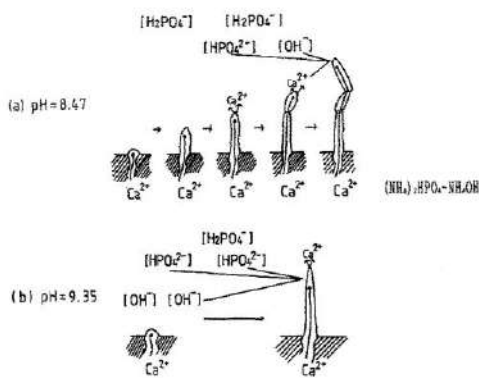


Рис. 2.35. Схема роста волокон ГАП из геля в раствор  $(NH_4)_2HPO_4$  при различных pH [144]

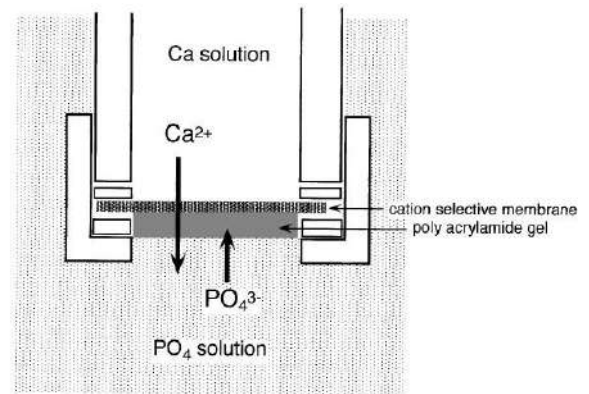


Рис. 2.36. Схема установки для выращивания кристаллов в гидрогеле посредством двойной диффузии [142]

Для синтеза фосфатов кальция существует возможность наполнения гидрогеля солью кальция с дальнейшим вымачиванием в фосфатной соли или фосфатном буфере или наоборот. Ионы  $Ca^{2+}$  склонны к вытягиванию из гидрогеля из-за высокой скорости диффузии, а также под действием осмотического давления и капиллярных сил (Рис. 2.35). Для предотвращения этого явления ионы

$\text{Ca}^{2+}$  связывают хелатирующими агентами, например, карбоксилатными группами или этилендиаминтетрауксусной кислотой ЭДТА [145], либо реализуют вариант двойной диффузии (Рис. 2.36), при этом используя ионселективные мембраны на интерфейсе гидрогель–раствор соли.

## 2.8 Способы создания макропористых материалов

Одним из наиболее используемых способов создания пористых тел считается метод реплик (Рис. 2.37). В качестве преформы зачастую используются высокопористые ячеистые материалы - полимерные «губки» на основе пенополиуретана с взаимосвязанной открытой системой пор требуемых размеров, которая пропитывается суспензией на основе целевого материала. Другими методами создания случайно упорядоченной пористости являются метод жертвенных добавок, которые либо контролируемо вымываются, либо выжигаются, а также метод вспенивания. Шликерное литье [146] в пористые формы является индивидуальным методом формования, что связано с различным характером физико-химического взаимодействия материалов форм с жидкой средой, выбранной для литья. Как и в упомянутых ранее случаях, такие методы требуют удаления одной из фаз в ходе изготовления, а точный контроль формы и размеров пор возможен только в случае метода шликерного литья. Макропористые тела с точным воспроизведением внешней формы и пористой структуры в настоящее время создаются с использованием аддитивных технологий (или 3D-печати) [147].

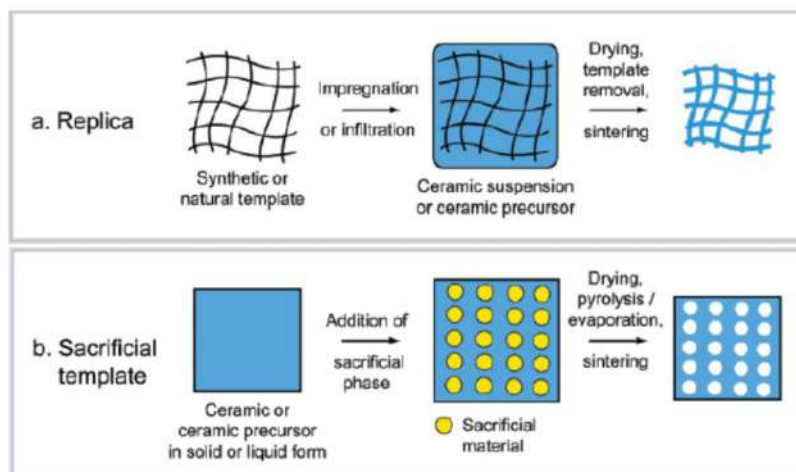


Рис. 2.37. Способы создания пористых тел: метод реплик (сверху) и метод жертвенных добавок (снизу) [148]

### 2.8.1 Аддитивные технологии

Для прорастания костной ткани внутри имплантата и прохождения питательных веществ и кровеносных сосудов через материал необходима система связанных между собой открытых пор размером не менее 100 мкм (макропоры), т.е. материал должен обладать остеокондуктивными

свойствами. Современные методы аддитивных технологий позволяют воспроизводить изделия любой форм, с некоторым ограничением по размерам (наиболее распространены настольные установки, позволяющие изготавливать изделия до 0,5 метров во всех 3 измерениях) и из широкого спектра материалов.

Среди методов аддитивных технологий различают [149,150]:

- термоэкструзионную печать (*англ. FDM – fused deposition modelling*), в ходе которой материал (в классическом варианте – термопластичный полимер) при температуре, близкой к температуре плавления, продавливается через сопло и дорожками послойно выстраивает заданную 3D-модель; в качестве основы используется термопластичный полимер, который может модифицироваться различными наполнителями;

- стереолитографическую печать (*англ. SLA – stereolithography laser apparatus* [151] или более общее название *vat polymerisation*), в ходе которой жидкий раствор или суспензия отверждается под действием источника излучения; в качестве основы используется мономер или олигомер с фотоинициатором, которые могут быть наполнены различными материалами;

- группу методов по селективному лазерному спеканию, наплавке или плавлению, которая в основном используется для печати металлическими порошками и некоторыми пластиками за счет припекания частиц друг к другу под действием лазерного излучения;

- робокастинг (*англ. robocasting*), в ходе которого пастообразный материал подается через фильеру, используя все технические особенности метода FDM;

- группу методов струйной печати (*англ. binder jetting, ink jetting*), в котором происходит локальное отверждение материала в слое за счёт взаимодействия подаваемого через сопло «чернила» и, как правило, порошка (гипса или полимера);

- группу гибридных методов, например, биопринтинг (*англ. bioprinting*), в котором комбинируются несколько методов, например, робокастинг или FDM, который позволяет создавать матрицу, и стереолитографии, с помощью которой матрица функционализируется клеточными культурами [152].

### 2.8.2 Стереолитография

Одним из наиболее популярных и доступных как с экономической, так и с технической точек зрения технологий аддитивного производства прототипов высокого разрешения в настоящее время является лазерная стереолитография (SLA). Её принцип действия заключается в фотополимеризации

и затвердевании суспензии под действием лазера в определенных точках, формирующих изображение/слой заданной цифровой модели. Главным недостатком данного метода является высокая цена 3D-принтеров ввиду использования лазерных излучателей. При их замене на цифровой светодиодный проектор реализуется альтернативный метод, называемый DLP (*англ. digital light processing*), для которого в русской литературе нет адекватного перевода. В отличие от лазерных установок, сканирующих поверхность материала одним или несколькими лазерными головками, DLP принтеры проецируют изображение целого слоя, которое и способствует затвердеванию полимерной смолы, после чего проецируется изображение нового слоя цифровой модели (Рис. 2.38). Цифровая модель может обладать любой архитектурой и иметь любую внешнюю форму, в том числе форму костного дефекта в соответствии с томограммой последнего.

Главное преимущество DLP-печати – относительно высокое латеральное разрешение в сочетании с высокой производительностью. Механическое оснащение устройства определяет толщину печатаемого слоя – разрешение по глубине (от 5 мкм), а латеральное разрешение определяется размером пикселя проецируемого изображения (для чипов с микрозеркалами типа DMD™ – не хуже 50 мкм) [153].

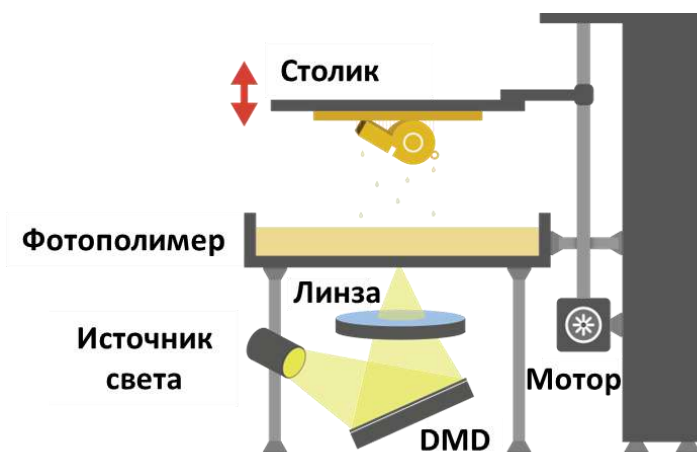


Рис. 2.38. Принцип действия DLP-принтера в варианте upside-down.

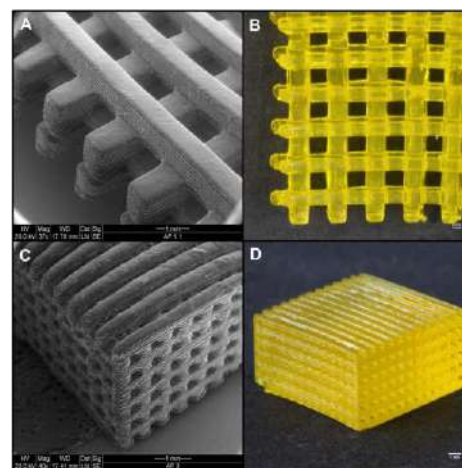


Рис. 2.39. Трехмерные гидрогели, полученные стереолитографией.

Для создания гидрогелей с определенной трехмерной архитектурой в основном применяется 3D-биопринтинг [154] и другие методы, в том числе DLP-печать, однако, большинство исследователей рассматривают только решётчатые структуры (Рис. 2.39) [155] из-за простоты их воспроизведения.



### 2.8.3 Выбор архитектуры материала

Архитектура материалов влияет на различные характеристики костных скаффолдов, таких как прочность, пористость, проницаемость, а также биологическую активность в условиях *in vitro* и *in vivo*. Наиболее удобным способом создания материалов с заданной архитектурой является 3D-печать, позволяющая получать любые конструкции на основе компьютерной модели. Создавая пористые материалы в виде каркасов различной архитектуры, можно добиться компромисса между проницаемостью материала и его прочностью.

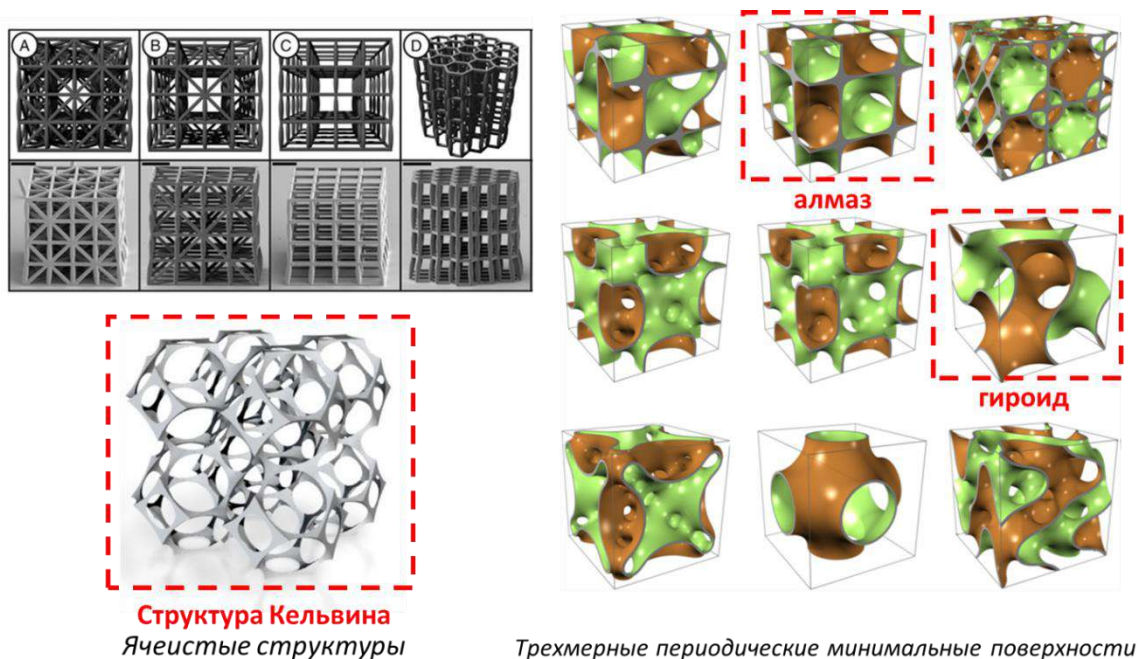


Рис. 2.40. Примеры пористых структур [156,157].

В связи с некоторыми особенностями топологической оптимизации различных объектов в качестве исходных структур для поиска оптимальной геометрии выбираются либо ячеистые пористые структуры [156], либо трехмерные периодические минимальные поверхности (ТПМП) [157] (Рис. 2.40). Первые структуры имеют простую геометрию и повышенную прочность при малой плотности из-за схождения нескольких балок каркаса в одной точке, а основным преимуществом ТПМП является открытая структура, которая способствует миграции и адгезии клеток, сохраняя при этом высокую структурную жесткость, при этом фрагменты таких структур были найдены *in vivo* в панцирях жуков, чешуйках крыльев бабочек и скелетах ракообразных.

Выделяют четыре основных уровня архитектуры материала (Рис. 2.41), влияющих на биологический отклик имплантата при росте костной ткани [158,159]:

- топография поверхности,

- размер и форма пор,
- взаимосвязанность пор,
- макроскопическое расположение пор.

Топография поверхности определяется её шероховатостью и микропористостью (наличие пор менее 10 мкм). Так, шероховатость повышает адгезию белков, их пролиферацию и прочность на отрыв, активирует остеокласты, отвечающие за резорбцию костной ткани [160], но при этом задерживает экспрессию щелочной фосфатазы : фермента, отщепляющего фосфат-группы от многих типов молекул. Наличие микропористости увеличивает прорастание кости через материал и вызывает остеиндукцию (т. е. активирует факторы роста в зоне дефекта). Топография поверхности контролируется варьированием условий формования и полировкой имплантата.

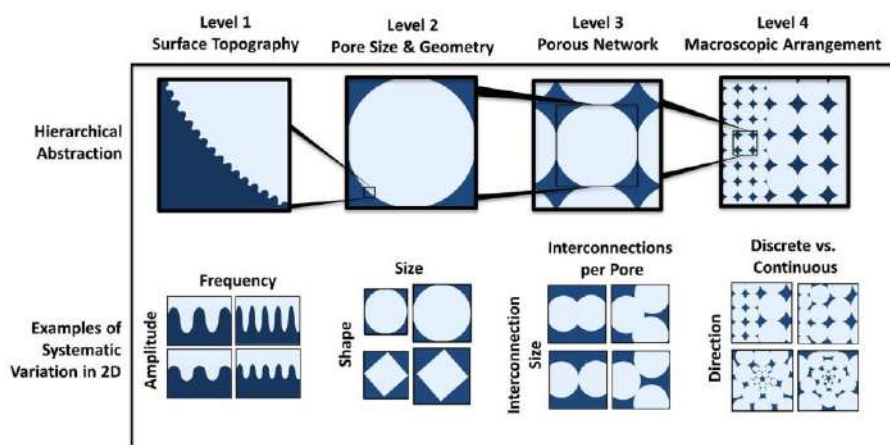


Рис. 2.41. Теоретическая основа для проектирования пористых архитектур [158]

Размер, форма, кривизна пор и общая пористость играют ключевую роль в формировании костной ткани внутри имплантата. Было обнаружено, что остеогенез преимущественно происходит в порах более 300 мкм, регенерация ткани происходит на вогнутых поверхностях, при этом скорость роста ткани увеличивается линейно с ростом кривизны поры. Пористость материала в экспериментах *in vitro* и *in vivo* по-разному влияет на регенерацию костной ткани: *in vivo* более эффективны имплантаты с большей пористостью, тогда как *in vitro* – с меньшей [161]. В статье [162] исследовались скаффолды на основе полимеров PLLA и PLGA (полилактид и поли-лактид-гликолид, соответственно) в виде цилиндров с различным размером пор (Рис. 2.42), которые не оказывали существенного влияния на прорастание костной ткани в экспериментах *in vivo*.

Касательно макроскопического упорядочения пор, важным фактом является анизотропное строение костной ткани (ориентация остеонов, трабекул, коллагена – основных структурных единиц кости), которое получается в результате механочувствительности клеток. Так, остеоны

выстраиваются вдоль оси с наибольшей нагрузкой [158]. Подобной анизотропией пор должны обладать и имплантаты для наибольшего функционального сходства с нативной костью.

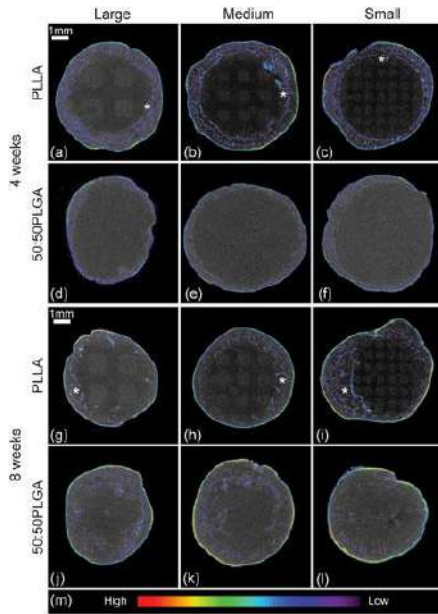


Рис. 2.42. Изображения срезов скаффолдов PLLA и PLGA, полученные с помощью компьютерной томографии, после 4 и 8 недель имплантации в кость мыши [162].

Обычно, пористые материалы обладают osteoconductive свойствами из-за наличия пространства для прорастания биологических объектов. Существует определенный консенсус в отношении размера пор, и предпочтительно их мультимодальное распределение по размерам. Наиболее крупные поры (100–1000 мкм и окна между ними диаметром не менее 50 мкм) определяют степень прорастания новообразованной костной ткани в пористый материал [163] или osteoconductivity. Процент макроскопических пор должен варьироваться от 60 до 90% объема имплантата. Расположение пор и материала имплантируемого каркаса,

окружающего макропоры, т. е. архитектура каркаса в пространстве, зависит как от внешних ограничений (формы имплантата), так и от требований достижения необходимых механических характеристик (прочности и/или модулей упругости) при заданном виде нагрузки и максимальной osteoconductivity в заданном направлении. Наиболее популярным способом дизайна архитектуры материала и её дальнейшей оптимизации является компьютерное моделирование, позволяющее варьировать 4 приведенных выше фактора, влияющих на взаимодействие клеток с имплантатом.

## 2.9 Выводы из обзора литературы

Задача создания материалов для замещения утраченной или поврежденной костной ткани широко освещается в литературе. Из-за разнообразия человеческого организма и различного функционала отдельных его органов и тканей создание универсального имплантата кажется нереализуемым. При этом композиционные материалы на основе гидрогелевых макропористых каркасов, наполненных частицами фосфатов кальция и различными биологическими объектами, видятся ближайшим структурным аналогом нативной губчатой костной ткани. Проведенный анализ литературы позволяет сделать следующие выводы:

1. Гидрогели на основе синтетических и природных мономеров и полимеров широко представлены и используются в современной медицине, в том числе в тканевой инженерии для создания искусственных заменителей костной и хрящевой ткани, при этом в качестве наполнителя используются традиционные фосфаты кальция: ГАП и ТКФ. Использование более кислых фосфатов кальция (ОКФ и брушита) потенциально позволит изменить механические характеристики в широких пределах за счёт пластинчатой морфологии частиц, компенсировать степень набухания и увеличить скорость и степень деградации гидрогеля; этот вопрос слабо освещен в доступных публикациях. Кроме того, в литературе отсутствуют примеры наполнения гидрогелей ОКФ, в котором проведено замещение части гидрофосфат-ионов на карбоксилаты, например, сукцинат и цитрат, которые занимают важное место в метаболизме организма, и алкилфосфатов кальция.
2. В литературе имеется ряд работ, посвященных синтезу замещенных аналогов октакальциевого фосфата, однако, для ряда карбоксилатов (в частности, цитрата) условия синтеза, приведенные в различных публикациях, значительно разнятся (по диапазонам pH, температуре, составу буферного раствора, типу исходного субстрата). Имеющиеся данные по областям существования ОКФ в координатах интенсивных переменных pH-температура (диаграмма Монны) представлены только для незамещенного ОКФ и сукцинат-замещенного ОКФ. В целом, можно отметить слабое понимание авторами ионных и гетерогенных равновесий в соответствующих растворах и их взаимосвязи с условиями синтеза слоистых фосфатов. Поскольку слоистые фосфаты рассматриваются в качестве наполнителей гидрогелевых каркасов, то важной характеристикой видится размер частиц фосфатных наполнителей, который потенциально изменяется при варьировании указанных выше условий синтеза. Направленный синтез слоистых фосфатов с заданной гранулометрией не затронут в доступной литературе. Кроме того, такие замещенные фосфаты, как и их алкилфосфатные аналоги, не рассматриваются как единые прекурсоры синтеза биокерамики сложного состава (бифазной), состав которой потенциально может варьироваться за счёт контроля степени замещения в структуре ОКФ и в этой связи следует отметить практически полное отсутствие сведений о термоллизе таких фосфатов, в особенности замещенных ОКФ и алкилфосфатов.
3. Метод радикальной полимеризации гидрогелей под действием светового излучения видится практически безальтернативным с точки зрения возможности создания композитов сложной архитектуры методом стереолитографии, которая позволяет создавать прототипы композитных имплантатов с пространственным разрешением не хуже 50 мкм и с требуемым соотношением

проницаемости/жесткости(прочности) материала. Для этого в качестве мономера гидрогеля могут выступать биосовместимые акрилатные производные ПЭГ – полиэтиленгликоль диакрилат ПЭГ-ДА, молекулярная масса которых варьируется в широком диапазоне и в значительной степени влияет на конечные характеристики гидрогеля.

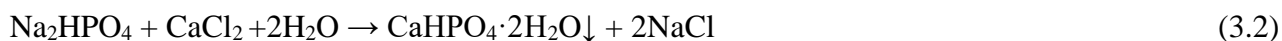
4. В литературе приведены работы по росту кристаллов ГАП, ОКФ и брушита в некоторых гидрогелях (главным образом, природного происхождения) посредством диффузии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{HPO}_4^{2-}$  (в том числе и двойной), однако, отсутствуют примеры принципиальной возможности выращивания частиц данных фосфатов в гидрогелях на основе ПЭГ-ДА как возможного метода равномерного наполнения гелевой матрицы с целью создания биокompозита.
5. Гидрогелевые композиты с трехмерной архитектурой порового пространства получают различными методами, в том числе 3D-печатью, однако, до сих пор не ясны критерии выбора архитектуры макропористого имплантата для достижения высокого уровня остеокондуктивных и прочностных свойств; в этой связи не вполне ясно, как можно смоделировать остеокондуктивные явления, связанные с прорастанием кости в пористый имплантат.

## 3 Экспериментальная часть

### 3.1 Подготовка образцов

#### 3.1.1 Синтез брушита

Двухводный гидрофосфат кальция получали методом осаждения из водных растворов солей по следующим реакциям:



Для получения 10 г брушита использовали 200 мл водного раствора  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (х.ч.) или  $\text{CaCl}_2$  (х.ч.) и 200 мл водного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (х.ч.) или  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (х.ч.). К раствору соли кальция при непрерывном перемешивании быстро добавляли раствор гидрофосфата аммония. Полученную суспензию оставляли на магнитной мешалке в течение 10 минут. Условия синтеза (рН после сливания растворов двух солей, Т и исходная концентрация солей) варьировались по двум уровням. Соотношение Са к Р не изменялось и составляло 1. По истечении этого времени перемешивание прекращали и проводили фильтрование осажденного брушита на воронке Бюхнера, промывая продукт дистиллированной водой для удаления побочных продуктов реакции. Полученный осадок распределяли тонким слоем и сушили в сушильном шкафу при 30 °С в течение 12 часов или при комнатной температуре в течение 24 часов. Выход полученного продукта был близок к 100%.

#### 3.1.2 Синтез ОКФ

Синтез октакальциевого фосфата проводился гидролизом свежесажженного брушита в буферном растворе уксусной кислоты и ацетата натрия  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ . Для этого готовили 500 мл раствора  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (х.ч.) и разбавленный раствор ледяной уксусной кислоты  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , который с помощью пипетки по каплям добавляли к исходному раствору (до требуемого значения рН). Количество добавляемой уксусной кислоты рассчитывалось согласно уравнению Хендерсона-Хассельбаха:

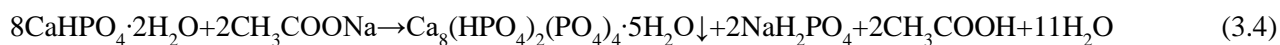
$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}, \quad (3.3)$$

где  $[\text{HA}]$  – концентрация кислоты, а  $[\text{A}^-]$  – концентрация сопряженного основания.

Логарифм константы диссоциации уксусной кислоты  $\text{pK}_a$  составляет 4,76. Для контроля рН использовали стеклянный электрод (ЭКС-10601(2)), который предварительно калибровали с

использованием стандартных буферных растворов. Приготовленный ацетатный буфер нагревали, сохраняя при этом pH, для попадания в область существования ОКФ на диаграмме в координатах pH-T [112]. Температуру измеряли с помощью термопары ИКА® ETS-D6. В полученный раствор, который непрерывно перемешивался на магнитной мешалке, засыпали порошок брусита из расчета 10 граммов порошка на 500 мл буферного раствора. Итоговая суспензия перемешивалась при заданных условиях в течение часа.

Синтез можно представить следующим уравнением реакции:



По прошествии часа перемешивание прекращалось, и наблюдалось быстрое выпадение мелких белых хлопьев. Полученный ОКФ многократно промывали декантацией, отфильтровывали на воронке Бюхнера и оставляли сушиться в сушильном шкафу при 60 °С в течение 24 часов или при комнатной температуре в течение нескольких суток.

### 3.1.3 Синтез «интеркалированного» ОКФ

Получение «интеркалированного» ОКФ проводилось гидролизом брусита и α-ТКФ в буферных растворах адипиновой кислоты и адипината натрия H<sub>2</sub>Adi/Na<sub>2</sub>Adi (где Adi = OOC(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COO<sup>2-</sup>) и лимонной кислоты и цитрата натрия H<sub>3</sub>Cit/Na<sub>3</sub>Cit (где Cit = C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub><sup>3-</sup>). Синтез α-ТКФ проводили твердофазным методом с предварительным смешением компонентов в планетарной мельнице (соотношение порошок : ацетон : шары=1:1:3) типа Pulverisette (Fritsch, Германия) при температуре 1400 °С в течение 1 часа по следующей реакции:



Навески порошков фосфатов засыпались в соответствующий буферный раствор при контролируемом pH (в диапазоне 4,5–6,5) и различных температурах (20, 37 и 60 °С). Масса порошка бралась из расчета 0,5 г на 50 мл H<sub>2</sub>O. Полученная суспензия перемешивалась на магнитной мешалке. Время синтеза варьировалось от 1 до 24 часов в случае адипинатного буфера и от 3 часов до 14 суток в случае цитратного буфера. Контроль pH и температуры осуществлялся аналогично синтезу чистого ОКФ. Полученный продукт выпадал в виде хлопьев, отмывался декантацией, фильтровался на воронке Бюхнера и сушился в сушильном шкафу при 60 °С в течение суток.

### 3.1.4 Синтез алкилфосфорных кислот и алкилфосфатов кальция

В ходе синтеза использовались следующие реактивы: бутанол-1 (SigmaAldrich, 99.9%), октанол-1 (SigmaAldrich, for synthesis), додеканол-1 (SigmaAldrich, for synthesis), бензол (SigmaAldrich,  $\geq 99.0\%$ ), пирофосфорная кислота (синтезированная или SigmaAldrich, тех.), диэтиловый эфир (чда), гидроксид натрия (Лабтех, чда), соляная кислота (СигмаТек, осч), дистиллированная вода. К пирофосфорной кислоте добавляли спирты в эквимольном соотношении, либо использовали небольшой избыток кислоты. Поскольку додециловый спирт имеет околокомнатную температуру плавления (24–27 °С), в ходе синтеза использовали инертный растворитель бензол  $C_6H_6$ , в то время как для жидких спиртов (бутанол-1 и октанол-1) его использование необязательно. Все приготовления проводили при комнатной температуре, т. к. более высокие температуры могут привести к небольшой степени дегидратации спирта до алкена и плавлению пирофосфорной кислоты. Реакция происходила при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение не менее 48 часов. Поскольку невозможно дождаться завершения реакции, которая, вероятно, имеет второй порядок, было необходимо отделить продукт от непрореагировавшего спирта и пирофосфорной кислоты, в дополнение к сопутствующему продукту - ортофосфорной кислоте. После растворения реакционного раствора в эфире и одной или двух водных экстракций для удаления неорганических кислот моноалкилфосфат экстрагировали в водный раствор гидроксида натрия NaOH при pH 12 путем превращения в водорастворимый моноалкилдинатрийфосфат, что позволяло извлекать непрореагировавший спирт из его эфирного раствора. pH водной среды затем доводили до 1 с помощью концентрированной соляной кислоты. При pH 1 моноалкилфосфат извлекали экстракцией в эфир. pH контролировали с использованием индикаторной бумаги. Эфир испаряли на воздухе в течение 1 суток, после чего продукт дополнительно сушили в вакуумном эксикаторе в течение 30 минут. Реакции протекали по следующей схеме:



где R = бутил (But), октил (Oct), додецил (Dod).

Синтез алкилфосфатов кальция осуществляли путем осаждения из водных растворов, содержащих анионы алкилфосфатов и соли кальция. Соль кальция представляла собой 4-водный раствор нитрата кальция.  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  (SigmaAldrich, Германия,  $\geq 99.0\%$ ). При синтезе алкилфосфатов кальция к водному раствору алкилфосфорной кислоты добавляли водный раствор нитрата кальция. В качестве реагента, кроме синтезированных алкилфосфатов, использовали



коммерческий дибутилфосфат (SigmaAldrich, Германия, 97%). Смесь перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре. После перемешивания раствор упаривали в сушильном шкафу при 100 °С в течение 24 часов. Реакция протекала по следующей схеме:



или



### 3.1.5 Синтез керамики на основе фосфатов кальция

Образцы, полученные термолизом при 400, 450 и 600 °С «интеркалированного» ОКФ, использовались для дальнейшего получения плотных образцов керамики. Для этого полученные порошки помещали в барабаны из стабилизированного оксида циркония, заливали ацетоном до кашеобразного состояния, помещали в полученную смесь набор шаров для помола из оксида циркония (соотношение порошок : ацетон : шары=1:1:3) и затем дезагрегировали в планетарной мельнице в течение 10 минут. После этого смесь оставляли сохнуть на воздухе до полного удаления ацетона. Каждый из порошков просеивали через полиэфирное сито с размером ячеек 400 мкм.

Полученные образцы использовались для одноосного одностороннего прессования на ручном прессе типа Carver C. Для этого брали порошки массой 0,1 г. Давление прессования — 400 МПа, время прессования — 1 минута. Полученные прессовки (диаметр — 8 мм, высота — 1 мм, масса — 0,1 г) обжигали при температуре 1000–1200 °С, скорость нагрева — 5 °С/мин, в течение 3 часов.

### 3.1.6 Приготовление фотоотверждаемых суспензий на основе ПЭГ-ДА

Для синтеза гидрогелей на основе полиэтиленгликоль диакрилата (ПЭГ-ДА) приготавливались суспензии на основе ПЭГ-ДА  $M_w=250, 575, 700$  Да (Sigma Aldrich, Германия), дистиллированной воды, фотоинициатора Irgacure®819 (BASF, Германия) на основе фенилбис(2,4,6-триметилбензоил) фосфин оксида или ТРО (Sigma Aldrich, Германия) на основе дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфин оксида, пищевого красителя, а также функционализирующей добавки: соли  $\text{Ca}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-}$  или свежесажженного порошка брушита/ОКФ. Из-за использования небольших количеств фотоинициатора и красителя их предварительно растворяли в ПЭГ-ДА и воде, соответственно. После добавления всех компонентов суспензии перемешивались в лабораторном планетарном миксере SpeedMixer DAC 150.1 FV (Германия) при 3000 об/мин. Для предотвращения случайной полимеризации при дневном свете и искусственном освещении фотосуспензии

готовились и хранились в тёмных полипропиленовых стаканах. Выбор компонентов фотосуспензии определялся исходя из соображений получения биосовместимого продукта (гидрогеля или композита гидрогель/фосфат кальция), обладающего вязкоупругими механическими свойствами. Концентрация фотоинициатора, а также наличие и концентрация красителя были важны для достижения высокого разрешения в ходе стереолитографической 3D-печати за минимальное время (дозу излучения).

Для обозначения состава гидрогеля использовались следующие обозначения:

**P-«молекулярная масса мономера»\_{массовая доля мономера}/{массовая доля**



Рис. 3.1. Устройство и внешний вид стереолитографического принтера Ember (Autodesk, США).

**фотоинициатора отн. мономера}\_{(концентрация/массовая доля красителя\_тип красителя)}\_{[(концентрация соли/массовая доля добавки)]}**

Пример: **P-700\_50/0,1\_(1E-4M\_E100)\_(1M\_CaCl<sub>2</sub>/50%\_брушит).**

Указание содержания какого-либо из компонентов в единицах массовых долей было удобно при взвешивании отдельных соединений, а использование единиц концентрации – при проведении расчетов.

### 3.1.7 Получение плотных и макропористых гидрогелей и композитов на их основе методом стереолитографической 3D-печати в варианте DLP

Процесс фотополимеризации подготовленных растворов и суспензий проводили двумя способами: а) в хозяйственной УФ-лампе мощностью 36 Вт (4 лампы по 9 Вт) при длине волны 365

нм для получения плотных образцов (фотоотверждаемый раствор или суспензия заливались в силиконовые формы, которые помещали на предметное стекло или в стеклянную чашку Петри для предотвращения подтекания суспензии) и б) посредством DLP-проектора стереолитографического 3D-принтера Ember (Autodesk, США) (Рис. 3.1). Спектр излучения определялся светодиодами СВТ-39-UV LEDs, используемыми в принтере. Их спектр имеет нормальное распределение с максимумом при 405 нм. Мощность излучения светодиодов задавалась в единицах LED от 0 до 255 (LED-units) в настройках конфигурации принтера. Для перевода данных единиц в привычные единицы дозы излучения ( $\text{мДж}/\text{см}^2$ ) и мощности излучения ( $\text{мВт}/\text{см}^2$ ) использовался радиометр G&R Labs Model 222 (США) с УФ-зондом на 405 нм (погрешность измерения –  $0,01 \text{ мВт}/\text{см}^2$ ). Поскольку в коммерческом варианте использования принтера Ember предполагается использование фирменных ванночек, минимальный объем суспензии для которых составляет 50 мл, была проведена модификация ванночки и детали для её крепления в основании принтера (Рис. 3.2), а также размеров столика и его поверхности. Для получения плотных образцов в виде таблеток проецировался круг ( $d = 6 \text{ мм}$ ), при необходимости задания определенной толщины таблетки (для минимизации разности в степени конверсии  $S=C$  нижней и верхней поверхности образца) создавалась компьютерная модель цилиндра ( $d = 6 \text{ мм}$ ,  $h = 1 \text{ мм}$ ) в программе Fusion 360 (Autodesk, США), которая послойно разбивалась в программе Print Studio (Autodesk, США). Помимо этого, в программе Print Studio

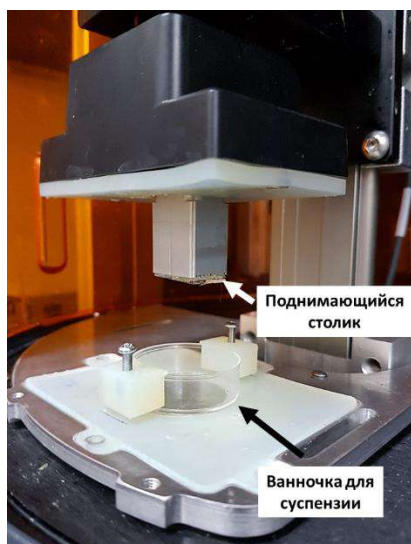


Рис. 3.2. Оптимизация размеров ванночки для фотосуспензии и столика принтера Ember.

задавались следующие параметры засветки единичного слоя и всего процесса 3D-печати: толщина слоя, время засветки единичного слоя, скорость отрыва столика от ванночки, высота подъема столика между засветкой слоев, угол вращения ванночки. Макропористые композиты создавались подобным образом на основе соответствующих компьютерных моделей, о создании которых см. раздел 3.2.9. По окончании процесса фотополимеризации образцы промывались водой и просушивались в потоке воздуха для удаления непрореагировавших компонентов суспензии.

Композиты гидрогелей с фосфатами кальция создавались путём непосредственного наполнения суспензий порошками брусита и ОКФ и посредством диффузии солей  $\text{Ca}^{2+}/\text{HPO}_4^{2-}$  в запolyмеризованный гидрогель, содержащий раствор соответствующей соли, т.е. проводилось осаждение брусита в объеме гидрогеля. Диффузия проводилась в течение нескольких суток путём вымачивания

заполимеризованных образцов в водных растворах стехиометрического количества солей или их избытка (Табл. 3.1).

Апробация синтеза порошков ОКФ и брушита внутри гидрогелей проводилась гидролизом гидрогелей, предварительно наполненных  $\alpha$ -ТКФ. Для конверсии  $\alpha$ -ТКФ в объеме гидрогелей готовились 0.1 М буферные растворы сукцината натрия  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$  (х.ч.) и янтарной кислоты  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$  (х.ч.), которую добавляли для получения нужных значений pH. Образцы гидрогелей, наполненные  $\alpha$ -ТКФ выдерживались в течение суток в соответствующих буферах (для брушита  $\text{pH} < 5$  и для ОКФ  $\text{pH} = 5,5\text{--}6$ ) при постоянном перемешивании.

Табл. 3.1. Оценка степени наполнения гидрогеля брушитом на основании растворимости солей.

	$\text{CaCl}_2$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Растворимость (при 20°C), г/л	745	77	218	100	138
Концентрация насыщения, М	6,71	0,54	0,62	0,83	1,00
Максимальное теоретическое наполнение гидрогеля брушитом при 50% доле мономера (при условии полной нерастворимости солей в ПЭГ-ДА), %	57,72	4,66	5,34	7,17	8,60

### 3.1.8 Исследование стабильности порошков фосфата кальция в гидрогелях

Для исследования стабильности ОКФ в геле и в воде было произведено выдерживание порошка в воде, мономере, гидрогеле с водой при постоянном перемешивании. Через определённые сроки исследовался состав порошка методами РФА и РСМА (производилась оценка соотношения Са/Р). Гидрогели перетирали в ступке или вырезали таблетки для последующего анализа.

## 3.2 Методы исследования образцов

### 3.2.1 Качественный рентгенофазовый анализ (РФА)

Рентгеновские исследования проводили на дифрактометре Rigaku D/Max-2500 с вращающимся анодом. Съёмку проводили в режиме на отражение в стандартной геометрии Брегга-Брентано с использованием  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,54183 \text{ \AA}$ ). Были выбраны следующие параметры съёмки: интервал углов по  $2\theta = 2\text{--}60^\circ$ , шаг по  $2\theta=0,02^\circ$ , скорость регистрации спектров —  $5^\circ/\text{мин}$ . Для закрепления образцов порошков использовались растворители, при исследовании гидрогелей съёмка производилась с поверхности твердых образцов. Качественный анализ полученных рентгенограмм проводился с помощью программы WinXPow при использовании файлов из базы данных ICDD PDF-2.

### 3.2.2 Растровая электронная микроскопия (РЭМ) и рентгеноспектральный микроанализ (РСМА)

Исследование синтезированных порошков, а также микроструктуры гидрогелей и композитов проводили на растровом электронном микроскопе с автоэмиссионным источником LEO SUPRA 50VP (Carl Zeiss, Германия). С помощью статистической обработки микрофотографии в программе ImageJ оценивалась толщина пластинчатых частиц слоистых фосфатов кальция. Образцы наклеивали на медную подложку при помощи проводящего углеродного клея с напылением 10 нм слоя хрома с использованием напылительной установки Quorum Technologies, QT-150T ES, Великобритания. Ускоряющее напряжение электронной пушки составляло 2–21 кВ. Изображения получали во вторичных электронах при увеличениях до 50000 при использовании детектора типа SE2.

Рентгеноспектральный микроанализ полученных образцов проводился на микроскопе SUPRA 50VP, снабженном системой энергодисперсионного микроанализа INCA Energy 300 (Oxford Instruments, Великобритания). Проводилось построение карт распределения элементов (картирование) на участках поверхности размером 15x15 мкм, построение прямых распределения элементов размером до 10 мкм и анализировалось распределение элементов в отдельных точках. Анализ проводился при различных ускоряющих напряжениях в диапазоне 4–20 кВ для варьирования размера области генерации рентгеновского излучения.

### 3.2.3 Инфракрасная спектроскопия (ИК)

ИК-спектры поглощения образцов регистрировали на ИК-спектрофотометре Spectrum One (Perkin-Elmer, США) в диапазоне 580–4000 см<sup>-1</sup> с шагом сканирования 1 см<sup>-1</sup> в режиме нарушенного полного внутреннего отражения. Образцы представляли собой порошки фосфатов кальция, твердые образцы гидрогелей и их композитов, а также жидкости: мономер, растворители, фотосуспензии. Анализ спектров проводили на основании литературных данных [164]. Обработку спектров проводили в программе Spectrum и Origin. Для построения кривых полимеризации фотосуспензий различных составов определяли степень конверсии двойной связи C=C, анализируя отношение интегральных интенсивностей полос поглощения C=O при 1725 см<sup>-1</sup> и C=C при 1636 и 1619 см<sup>-1</sup>.

Степень конверсии C=C  $\alpha$  определялась как:

$$\alpha = 1 - \frac{[S(C=C)/S(C=O)]_E}{[S(C=C)/S(C=O)]_{E=E_c}} \cdot 100\%. \quad (3.9)$$

### 3.2.4 Термогравиметрический (ТГ) и дифференциальный термический анализ (ДТА)

Термогравиметрический (ТГ) и дифференциально-термический (ДТА) анализ образцов проводился на синхронном термоанализаторе с вертикальной загрузкой образцов STA 409 PC Luxx (Netzsch, Германия). Измерения проводили в воздушной атмосфере или атмосфере аргона в интервале температур от 40 до 1400 °С со скоростью нагрева 5 °С/мин. Навески образцов не превышали 20 мг. Исследуемые порошки во время эксперимента помещались в алундовые тигли. Для изучения состава отходящих газов при нагреве использовался квадрупольный масс-спектрометр Aeolos QMS 403 C (Netzsch, Германия) с нагревом капиллярной системы входного отверстия до 300 °С.

### 3.2.5 Спектроскопия поглощения в УФ и видимом диапазоне

Метод электронной спектроскопии поглощения был использован для определения областей поглощения фотоинициаторов и пищевых красителей в ультрафиолетовом и видимом диапазоне спектра. Спектры поглощения были получены на спектрометре Varian Cary 50 в диапазоне 200–800 нм с шагом 1 нм, используя кварцевую кювету с длиной оптического пути 10 мм. Концентрация исследуемых веществ составляла от 10<sup>-3</sup> М и ниже и подбиралась эмпирически для получения физических величин поглощения. Перед съемкой образцов вычитался спектр поглощения дисперсионной среды (вода, этанол). Молярные коэффициенты экстинкции  $\varepsilon$  рассчитывались как:

$$\varepsilon = \frac{A}{C \cdot l}, \quad (3.10)$$

где  $A$  – поглощение,  $C$  – концентрация вещества,  $l$  – длина пути (размер кюветы).

### 3.2.6 Определение распределения частиц порошка по размерам

Распределение частиц по размерам проводили методом статического рассеяния света на лазерном анализаторе частице Analysette-22 (Fritsch, Германия) в диапазоне 0,1 мкм – 302,58 мкм. Небольшую навеску порошка помещали в измерительную ячейку и диспергировали ультразвуком. Распределение частиц по размеру рассчитывали при помощи программы MaSControl (Fritsch, Германия) из частотного распределения доплеровского смещения лазерного луча.

### 3.2.7 Титриметрические исследования условий синтеза порошков ОКФ

Для оценки областей существования фосфатов кальция и выбранных условий синтеза ОКФ проводились титриметрические измерения на автоматическом титраторе Titration Excellence T-50 (Mettler-Toledo). Для этого навеску 0,3 г  $\alpha$ -ТКФ растворяли в 50 мл деионизированной воды (рН-титрование). Скорость добавления кислот варьировалась от 1 мкл/мин до 1 мл/мин. Температура

исследований варьировалась от 25 °С до 60 °С и поддерживалась постоянной с помощью термостата и двухстенного стакана, в котором и происходил эксперимент.

### 3.2.8 Расчет ионных равновесий

Первоначальные расчеты ионных равновесий в растворах соответствующих кислот и/или солей, содержащих твердые фазы брусита и  $\alpha$ -ТКФ, при 25 °С проводились с помощью программного обеспечения Hydra-Medusa [165]. Аналогичные результаты, но при различных температурах (25, 40, 50, 60 °С) были получены в программе VisualMINTEQ v.3.1. В частности, было рассчитано изменение рН при титровании – добавлении к суспензии 0,4 моль  $\alpha$ -ТКФ или брусита в 0,5 л раствора по 0,02 л 0,8 М NaHSuc (или Na<sub>2</sub>Suc) на каждом шаге титрования.

### 3.2.9 Моделирование протекания жидкостей и нагружения макропористых тел

Для оценки влияния архитектуры на проницаемость, а также необходимость и возможности топологической оптимизации порового пространства было проведено моделирование нагружения архитектур (при сжатии) и протекание сквозь поровую структуру жидкостей (вода, кровь) с картированием поля скоростей потока для понимания osteoconductive свойств таких матриц. В данной работе рассматривались модели имплантатов со структурой Кельвина, типа «гироид» и типа «алмаз» с общей долей пор 50 и 70% в двух различных направлениях каналов пор с размерами 750 мкм и 1,5 мм (Рис. 3.3).

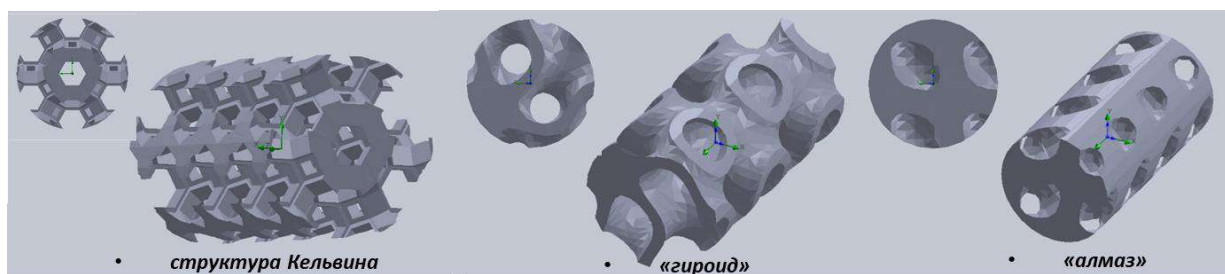


Рис. 3.3. Вид сверху и общий вид исследуемых моделей имплантатов.

Создание компьютерных моделей проводилось в пакетах K3DSurf и Autodesk Netfabb. Выбранная архитектура накладывалась на цилиндры размером 3–6 мм (диаметр-высота), что соответствует размерам реальных цилиндрических имплантатов для малых лабораторных животных (крыс). Моделирование протекания жидкостей и нагружения архитектур проводилось в программном пакете SolidWorks 2013 (дополнительные модули Flow Simulation и Simulation, соответственно). Проницаемость структур рассчитывалась по закону Дарси:

$$Q = k \cdot \frac{\Delta P \cdot A}{\mu \cdot h}, \quad (3.11)$$

где  $Q$  – объемный поток жидкости ( $\text{м}^3/\text{с}$ ),  $\Delta P$  – перепад давлений (Па),  $A$  – площадь поперечного сечения ( $\text{м}^2$ ),  $\mu$  – коэффициент динамической вязкости (Па·с),  $h$  – длина цилиндрического образца (м),  $k$  – проницаемость ( $\text{м}^2 = 10^{12}$  Дарси). Перепад давлений на входе и выходе модели составлял 40 мм. рт. ст. ( $\approx 5332$  Па), что соответствует разнице между нормальным верхним и нижним артериальным давлением у человека. Скорость входящего потока жидкости составляла 1 мм/месяц для имитации врастания кости в имплантат (по этим же соображениям в качестве жидкости выбиралась более вязкая по сравнению с водой кровь). Для ограничения пространства (в том числе и для ускорения расчётов) заданная модель помещалась в модель цилиндрической трубы с крышками. Жесткость структур  $E/E_0$  оценивалась по данным моделирования одноосного нагружения различных архитектур (материал – сталь) методом конечных элементов из закона Гука:

$$\sigma = E\varepsilon, \quad (3.12)$$

где  $\sigma$  – распределенное давление на структуру (300 МПа),  $\varepsilon$  – деформация структуры,  $E$  – модуль упругости структуры (МПа),  $E_0$  – модуль упругости стали. Для упрощения расчетов исследуемые 3D-модели помещались между двух плотных шайб, на верхнюю поверхность оказывалась необходимая нагрузка.

### ***3.2.10 Определение критической энергии полимеризации и глубины полимеризации***

Для определения критической энергии полимеризации и ее глубины (фоточувствительности суспензии) строили калибровочную зависимость глубины полимеризации от дозы облучения согласно уравнению Джейкобса (2.20) в соответствующих координатах. Толщину запolyмеризованного образца определяли с помощью оптической микроскопии (настольный микроскоп Levenhuk) и микрометра (погрешность 5 мкм). Дозу излучения задавали в панели настроек 3D-принтера Ember (см. раздел 3.1.7).

### ***3.2.11 Измерения твердости***

Твёрдость измерялась с помощью твердомера Метротест ИТВ-1-АМ путём вдавливания в испытуемый материал правильной четырёхгранной алмазной пирамиды с углом  $136^\circ$  между противоположными гранями. Расчёт получаемых значений велся по методу Виккерса при нагрузке 0,5 кгс (4,8 Н) и времени выдержки 10 сек. Условия измерений подбирались эмпирическим путем (исходя из получения отпечатка, помещающегося в поле зрения оптического микроскопа).



### 3.2.12 Механические испытания при сжатии

Испытания при сжатии образцов при комнатной температуре проводили со скоростью испытания 0,5, 1 и 2 мм/мин, из расчета 3–5 образцов на точку. Разрывная испытательная электромеханическая машина Instron 5848 (Instron, Великобритания) соответствовала требованиям ГОСТ 28840. Из полученных кривых нагружение-деформация определяли прочность материалов при сжатии, модуль упругости и величину обратимой деформации.

### 3.2.13 Исследование вязкоупругих свойств гидрогелей и вязкости суспензий методом ротационной реометрии



Рис. 3.4. Схема измерительной ячейки с образцом гидрогеля.

Реологические измерения выполняли с использованием ротационного реометра Thermo Scientific HAAKE RheoStress RS600 в геометрии плоскость-плоскость на цилиндрических образцах  $d=20$  мм и различной толщиной. Образцы измеряли при комнатной ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) и физиологической ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) температурах в сухом состоянии, а также в набухшем, добавляя в измерительную ячейку среду набухания. Измерительный зазор подбирался в каждом конкретном измерении опытным путем (Рис. 3.4), исходя

из размеров образца и значений нормальной силы, действующей со стороны образца на сенсор при его зажимании. Значение угла потерь  $\delta$  определялось по формуле 2.12.

Измерения вязкости стереолитографических суспензий проводили с помощью ротационного реометра Physica MCR 501 (Anton Paar GmbH, Австрия), используя измерительную ячейку плоскость-плоскость PP25/TG. Скорость вращения ротора составляла от  $0,01$  до  $10\text{ с}^{-1}$ . Измерения проводили в постоянном интервале скорости сдвига, чтобы обеспечить одинаковые условия измерений и сдвиговую предысторию.

### 3.2.14 Определение степени набухания

Исследование полученных образцов на набухание и равновесное содержание воды проводили гравиметрическим методом: после фотополимеризации образец высушивали на воздухе в течение суток, после чего помещали в среду набухания (дистиллированную воду и раствор соли) на определенные промежутки времени (от 30 минут до нескольких суток). За массу набухшего образца ( $m_n$ ) принимали массу образца, с которого после изъятия из среды набухания удалялись следы влаги с помощью фильтровальной бумаги. Степень набухания и равновесное содержание воды определяли по формулам:

$$PCB = \frac{m_n - m_c}{m_n} \times 100\%, \quad (2.13)$$

и

$$CH = \frac{m_n - m_c}{m_c}, \quad (2.14)$$

### 3.2.15 Исследование биологической деградации гидрогелей *in vitro*

Для исследования биодegradации готовились гидрогели на основе ПЭГ-ДА ( $M_w=700$  Да), наполненные алкилфосфатами кальция, октакальциевым фосфатом или брушитом в количестве 10% от массы мономера. Полученные гидрогели помещались в приготовленный 0,1 М раствор лимонной кислоты, и после определенных промежутков времени (от 1 дня до 5 месяцев) измерялась масса образцов, избыток влаги с поверхности образца удаляли фильтровальной бумагой. Параллельно проводилось измерение набухания гидрогелей в дистиллированной воде для корректировки изменения массы. В качестве начальной массы считалась масса гидрогеля в максимально набухом состоянии, после чего измерялось изменение массы.

### 3.2.16 Магнитно-резонансная томография гидрогелей и композитов

Исследования набухания гидрогелей и композитов проводились на ЯМР спектрометре Bruker Avance DPX 200, укомплектованном сверхпроводящим криосоленоидом с диаметром теплового отверстия 89 мм и величиной постоянного магнитного поля 4.7 Тл, градиентной системой GREAT 3/60 с датчиком РН MICRO 2.5 и радиочастотной катушкой по типу «птичья клетка» диаметром 25 мм. Регистрация томографических изображений осуществлялась на частоте протонного резонанса 200 МГц при максимальной амплитуде градиента магнитного поля 100 Гс/см с помощью методики градиентного эхо с параметрами: TR=200 мс, TE=1.8 мс, FA=30 deg, толщина среза 1 мм, матрица 128x128 пикселей, поле обзора 40 мм. Образцы представляли собой плотные цилиндры диаметром 10 мм и высотой 15 мм. Для каждого исследуемого состава (пустой гидрогель P-700/100\_1, P-700/100\_1\_10%\_брушит, P-700/100\_1\_10%\_ОКФ) измерения усреднялись по 5 образцам.

### 3.2.17 Измерение геометрической плотности образцов

Для расчета геометрической плотности полученных после полимеризации и набухания образцов измерялась их масса (с точностью  $10^{-3}$  г) и линейные размеры: диаметр таблетки и её толщина (с точностью 0,1 мм). Плотность высчитывалась по следующей формуле:

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{m}{\pi \cdot r^2 \cdot h}, \quad (3.13)$$

где  $r$  — радиус цилиндра,  $h$  — толщина цилиндра,  $m$  — масса цилиндра.

Относительную ошибку измерения оценивали как сумму относительных ошибок измеряемых величин:

$$\varepsilon_{\rho} = \left( \frac{\Delta m}{m} + \frac{\Delta a}{a} + \frac{\Delta b}{b} + \frac{\Delta c}{c} \right) \times 100\%, \quad (3.14)$$

где  $a$ ,  $b$  и  $c$  – внешние размеры измеряемого образца.

### **3.2.18 Исследование вытяжек из материалов на цитотоксичность (МТТ-тест)**

Оценку биологического действия гидрогелей и композитов проводили по ГОСТ Р ИСО 10993.5-99 (Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5.). В качестве модельной среды для приготовления вытяжек была использована культуральная среда ДМЕМ/F12 с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина (антибиотик, предотвращающий загрязнение поверхности бактериями) и 10% нистатина (противогрибковое лекарство). Приготовление вытяжек проводилось с соблюдением асептики в течение 3 суток при 37°C, на каждый материал делали три пробы. Соотношение площади поверхности экстрагируемых материалов в см<sup>2</sup> и объема модельной среды в миллилитрах составляло 2,14. Вытяжки вносили в лунки планшета полной заменой культуральной среды по четыре лунки на каждую пробу с последующим культивированием при 37°C в течение 1 суток. В эксперименте использовали мышинные фибробласты линии NCTC L929. Посевная концентрация 30 тыс/см<sup>2</sup>. Количество восстановленного формазана определялось по оптической плотности растворов на спектрофотометре BIO-RAD Model 680 microplate reader (BIO-RAD, США) при длине волны 540 нм. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Origin, за ошибку принимали среднеквадратичное отклонение от среднего значения, за достоверные принимали различия по U-критерию Манна – Уитни (статистического критерия, используемого для оценки различий между двумя независимыми выборками по уровню какого-либо признака, измеренного количественно) при  $p < 0,05$  относительно образцов контроля (пустые лунки).

### **3.2.19 Исследование имплантации композитов in vivo**

В асептических условиях операционной в положении крысы на правом боку производили разрез кожи в проекции бедренной кости длиной 4,0 см. После выполнения доступа в средней трети диафиза бедренной кости по дорсальной поверхности конической фрезой с алмазным напылением диаметром 2,3 мм производили монокортикальный дефект диафизарной кости полуцилиндрической формы длиной 7 мм и радиусом 4 мм. Крыс распределяли случайным образом в четыре группы по 12 особей в каждой. У животных группы Контроль дефект не заполняли. У животных группы

Кельвин - исследуемым материалом с архитектурой Кельвина, у животных группы Гироид – исследуемым материалом с архитектурой типа «гиرويد». Тестируемые материалы-гидрогели перед имплантацией стерилизовали оксидом этилена. Кость фиксировалась пластиной из полиэфиркетона размерами 30x4x4,5 мм (самостоятельное производство) и 6 титановыми винтами диаметром 1,2 мм, длиной 10 мм (фирма “Конмет”, Россия). Пластина размещалась по тыльнолатеральной поверхности бедренной кости, при этом с каждой стороны от дефекта размещали по 3 винта. Пластина укрывалась мышцами, которые сшивались узловыми швами. На кожу накладывали узловые швы. Повязки не накладывались. Средняя длительность операции составила 39±8 мин (от 23 мин до 54 мин). Объем кровопотери составлял не более 1,0 мл. Иллюстрация процесса имплантации представлена в разделе 4.7.5.2 (Рис. 4.74).

Для введения животных в состояние наркоза внутрибрюшинно вводили препараты «Золетил 50» (Франция) и «Ксила» (Нидерланды) в дозах 6,25 и 4 мг/кг, соответственно.

Исследование получило одобрение Комиссии по биоэтике МГУ им. М. В. Ломоносова (одобрено на заседании 25.10.2018 г., регистрационный номер 82-ж). Исследование выполнено на 53 самцах крыс *Rattus norvegicus* линии Wistar в возрасте 25–30 недель. Содержание проводилось в виварии в клетках по 3 животных в каждой. Кормление осуществлялось стандартным гранулированным кормом для грызунов (энергетическая ценность не менее 13000 ккал/кг, сырой протеин не менее 19%). Доступ к воде и корму был *ad libitum*.

После выхода животных из наркоза они содержались до вывода из эксперимента по три особи в каждой клетке. Через 3 и 6 недель после выполнения операции животных выводили из эксперимента по стандартной методике с использованием CO<sub>2</sub>-камеры с последующим забором материала (участок бедренной кости, на котором выполнялся дефект) для гистологического исследования.

Материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формальдегида в течение 24 ч, после чего образцы декальцинировали в 25% растворе трилона Б при pH 7,0 и комнатной температуре на Orbital Shaker OS20 biosan. После декальцинации промывали в дистиллированной воде, гистологическую проводку и заливку проводили по стандартной методике. Срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Для оценки результатов проводился слепой гистометрический анализ. Изображения гистологических препаратов получали с помощью светового микроскопа Leica DM LB2 (Carl Zeiss) и цифровой камеры AxioCam ICc3 (Carl Zeiss). Оцифрованные изображения переводили в формат JPEG. Гистометрическую оценку проводили с помощью программы Fiji на увеличении 20 раз.

Проводилось измерение площади новообразованной костной ткани в лакунах материалов в квадратных мм. Для каждого образца проводили вычисление на 3 препаратах, всего для каждой группы получалось 18 значений (только для группы Контроль 6 недель – 15 значений).

Результаты каждой группы представляли в виде значений среднего значения, максимального и минимального значений. Для установления статистической достоверности различий использовали вычисление непараметрического критерия Kruskal-Wallis с помощью программы Statistica 6.0 отдельно для групп со сроком вывода 3 недели и со сроком вывода 6 недель.

## 4 Результаты и обсуждение

### 4.1 Синтез порошков слоистых фосфатов кальция.

При подготовке данной главы использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М. В. Ломоносова, частично отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

**Тихонов А.А.**, Климашина Е.С., Евдокимов П.В., Кукуева Е.В., Бирюков А.С., Путляев В.И., Щербаков И.М., Дубров В.Э. Дикарбоксилатзамещенные октакальциевые фосфаты для наполнения гидрогелей и изготовления резорбируемой керамики // Перспективные материалы. 2020. Т. 12. С. 27–41. doi:10.30791/1028-978x-2020-12-27-41.

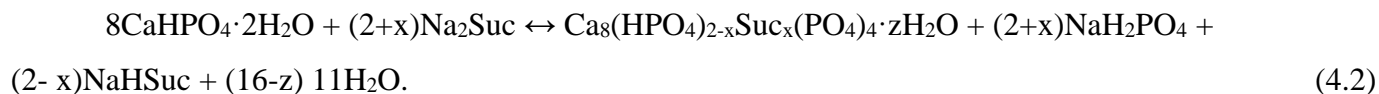
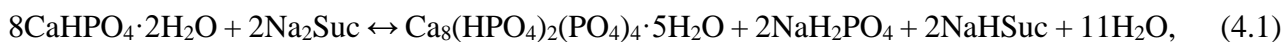
**Tikhonov A.**, Putlayev V. Synthesis and Thermal Behaviour of Calcium Alkyl Phosphates as Bioceramic Precursors // Ceramics. 2022. Т. 5. № 3. С. 362–371. doi: 10.3390/ceramics5030028.

Кроме того, результаты, приведенные в данной главе, являются частью отчета по грантам РФФ №17-79-20427 и РФФИ №20-33-90303.

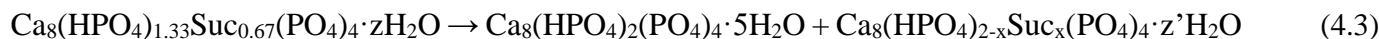
#### 4.1.1 Анализ условий получения замещенных октакальциевых фосфатов

В ходе работы изучение замещения гидрофосфат-аниона в структуре ОКФ проводилось на примере адипиновой и лимонной кислот, которые сравнивались с изученной в предыдущих работах группы янтарной кислотой. Запись уравнений химических реакций образования ОКФ и @ОКФ при гидролизе брушита и  $\alpha$ -ТКФ в буферных растворах требует знания деталей ионных равновесий в соответствующих растворах, поэтому не всегда приводятся в литературе корректно и в полном виде (не схематически). Соответствующие уравнения, отражающие достаточно сложный баланс между реагентами и продуктами ((4.1)–(4.6); 10 Приложение), позволяют понять нижеследующие факты химии ОКФ и @ОКФ.

1) Сдвиг рН границы (равновесия) между брушитом и ОКФ при понижении  $T$  в сторону щелочных значений. Это можно понять, исходя из знака  $\Delta H_T^\circ(4.1), \Delta H_T^\circ(4.2) > 0$  в выражениях (4.1, 4.2). Поскольку положение границы брушит/ОКФ в координатах диаграммы Монма (Рис. 2.30) рН –  $T$  практически не меняется при переходе от ОКФ к @ОКФ (в частности,  $\text{Suc@ОКФ}$  и  $\text{Adi@ОКФ}$ ), энтальпия реакции синтеза  $\text{Suc@ОКФ}$   $\Delta H_T^\circ(4.2)$  больше таковой для чистого ОКФ,  $\Delta H_T^\circ(4.1)$ , отсюда можно понять лучшую растворимость  $\text{Suc@ОКФ}$  (и, по-видимому, других @ОКФ) по сравнению с ОКФ.

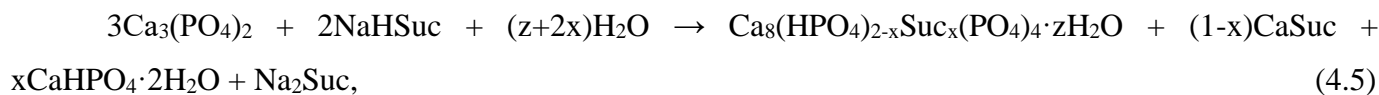
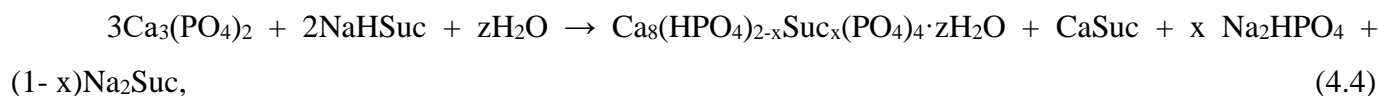


2) Весь возможный диапазон степеней замещения  $x$  разбивается на два интервала:  $x=0 \dots 2/3$  ( $\text{Ca/P}=1.33 \dots 1.5$ ) и  $x=2/3 \dots 6/5$  ( $\text{Ca/P}=1.5 \dots 1.67$ ). При синтезе  $\text{Suc@OKФ}$  гидролизом  $\alpha$ -ТКФ для любого состава из первого интервала требуется одно и то же стехиометрическое отношение  $[\text{Suc}]/[\text{PO}_4]=1/3$  (выражения 4.4, 4.5), следовательно, выпадает наиболее устойчивая (наименее растворимая) фаза чистого ОКФ. В то же время для второго интервала  $[\text{Suc}]/[\text{PO}_4]=3x/16$  (выражение 4.6). Это выглядит так, что состав с  $x=2/3$  имеет тенденцию к «расслаиванию» по схеме:

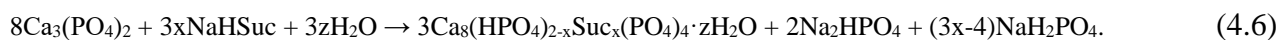


Видимо, именно это явление лежит в основе довольно часто наблюдаемого явления образования «смеси» ОКФ – замещенного ОКФ (@ОКФ) и чистого ОКФ, а также трудности фиксации  $\text{Suc@OKФ}$  и  $\text{Adi@OKФ}$  при попытке его синтеза гидролизом брусита в соответствующем буфере (если представить путь синтеза как «продвижение»  $\text{Ca/P}$  от значения, равного 1, к значениям 1,5 и более). Представленные здесь соображения можно обобщить на любые дикарбоксилат-замещенные ОКФ.

для  $x < 2/3$



для  $x > 2/3$



При обсуждении замещения гидрофосфатного аниона на равнозарядный дикарбоксилат  $\text{A}^{2-}$  следует иметь в виду два равновесия:



которые отражают сравнение нуклеофильных (4.9) и основных (4.10) свойств соответствующего дикарбоксилатного аниона.



С ростом размера аниона  $\text{A}^{2-}$  (т.е. с ростом  $n$  в  $(\text{CH}_2)_n(\text{COO})_2$  от  $n=0$  – анион щавелевой кислоты до  $n=8$  – анион себаценовой кислоты) его основность (по  $\text{pK}_1 = -\lg K_1$ ,  $\text{pK}_2 = -\lg K_2$ , где  $K_1$  и  $K_2$  – соответствующие константы диссоциации кислоты  $\text{H}_2\text{A}$ , например,  $K_2$  – константа равновесия, обратного (4.10)) и нуклеофильность ( $\text{pK}_{\text{CaA}} = -\lg K_{\text{CaA}}$ , константа равновесия (4.9) закономерно падают. Начиная с малоновой кислоты ( $n=3$ ), значения констант меняются слабо (Рис. 4.1).

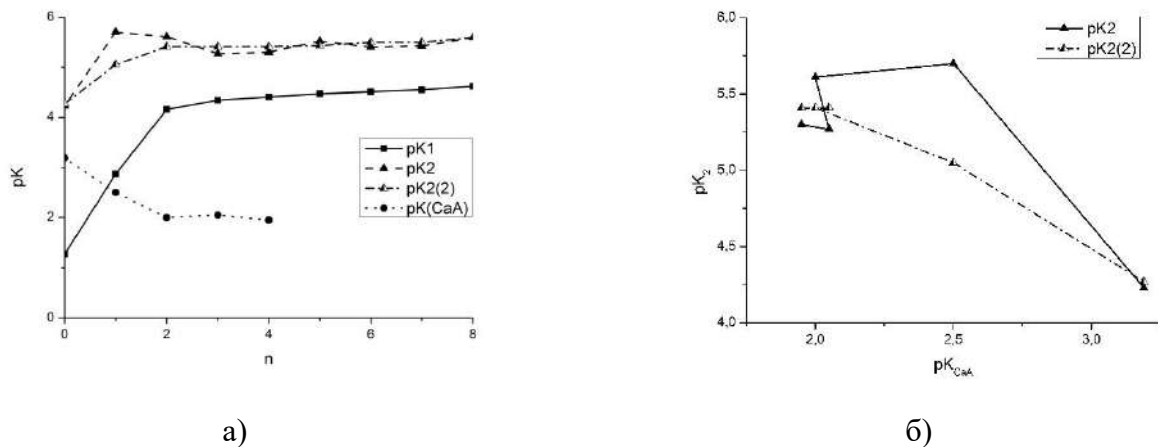


Рис. 4.1. а) Зависимость отрицательных логарифмов констант диссоциации  $(\text{CH}_2)_n(\text{COOH})_2$   $\text{pK}_1$ ,  $\text{pK}_2$  и другого ряда данных  $\text{pK}_2(2)$  [166], а также нуклеофильности  $\text{pK}_{\text{CaA}}$  ( $\text{Ca}^{2+} + \text{A}^{2-} \leftrightarrow \text{CaA}^0$ ) [167,168] от числа углеродных атомов  $n$ ; б) корреляция между  $\text{pK}_{\text{CaA}}$  и  $\text{pK}_2$ .

Исходя из представленных закономерностей для аниона адипиновой кислоты, было выбрано значение для недостающей константы равновесия (4.9)  $\text{pK}_{\text{CaA}} = 1.95 \pm 0.05$ . Известно, что @ОКФ образуются только для четных  $n$ , предположительно вследствие соответствия конформационной симметрии  $\text{A}^{2-}$  и позиционной симметрии в решетке ОКФ [169]. Таким образом, с точки зрения изменения кислотно-основных свойств дикарбоксилатных анионов имеет смысл рассматривать только  $\text{Suc}@ОКФ$  и  $\text{Adi}@ОКФ$ , поскольку свойства более крупных анионов практически не меняются.



#### 4.1.1.1 Адипинатзамещенный ОКФ

Для синтеза «интеркалятов» (замещенных ОКФ) в качестве кальцийфосфатного прекурсора использовали ТКФ, как и в работе [170], а также брушит, как, например, в [171]. Для внедрения остатков адипиновой кислоты в структуру ОКФ время синтеза было увеличено от 1 ч при 60 °С до 24 ч при 37 °С. Температура 60 °С была выбрана по аналогии с синтезом чистого ОКФ, а T=37 °С – исходя из разумного времени протекания реакции, поскольку по литературным данным при 25 °С процесс «интеркаляции» ещё более затруднен и требует длительного времени синтеза. Кроме того, такие температурные условия синтеза в некотором роде имитируют условия в человеческом организме.

В случае гидролиза α-ТКФ в адипиновом буфере в каждом случае получался замещенный ОКФ, так называемый адипинат@ОКФ (Adi@ОКФ)  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_{2-x}\text{Adi}_x(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , где  $\text{Adi} = \text{OOC}(\text{CH}_2)_4\text{COO}^{2-}$ , об образовании которого можно судить по смещению пика (100) в сторону меньших углов  $2\theta$  на рентгенограмме (Рис. 4.2б).

В Табл. 4.1 представлены условия синтеза «интеркалированного» ОКФ.

Табл. 4.1. Экспериментальные условия синтеза замещенных ОКФ

Исходный реагент	Используемый буферный раствор	Условия	Полученный продукт
Брушит	Адипиновый	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH=5,5; 5,75; 6</li> <li>• T=37°C; <b>60°C</b></li> <li>• T=1-24 ч</li> <li>• C<sub>буфера</sub>=0,25M</li> </ul>	адипинат@ОКФ; брушит
α-ТКФ	Адипиновый	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH=5,5; 5,75; 6</li> <li>• T=37°C; 60°C</li> <li>• t=1-24 ч</li> <li>• C<sub>буфера</sub>=0,25M</li> </ul>	адипинат@ОКФ
α-ТКФ	Цитратный	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH=<b>5,75; 6; 6,5</b></li> <li>• T=<b>25°C; 37°C; 60°C</b></li> <li>• t=1-14 дней</li> <li>• C<sub>буфера</sub>=0,25M</li> </ul>	ГАП; α-ТКФ; смесь α-ТКФ и цитрат@ОКФ

При гидролизе брушита в адипиновом буфере замещенный продукт в смеси с монетитом получался только при 60 °С, при 37 °С продуктом реакции становился незамещенный брушит, что может быть связано с чрезмерной кислотностью среды (pH=5,5; Рис. 4.2а) при относительно низкой температуре (T=37 °С), т.к. данная точка попадает в область преимущественного существования брушита на pH-T диаграмме (Рис. 2.30).

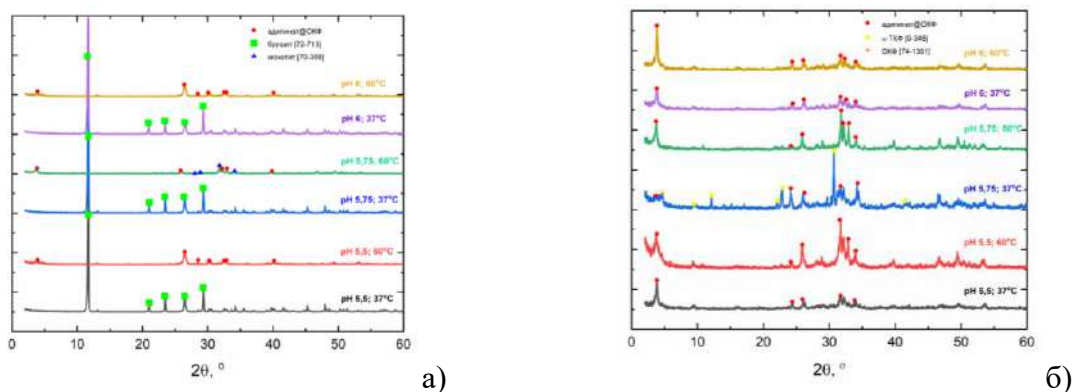
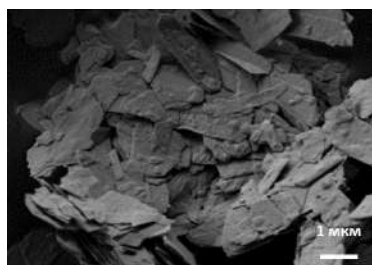
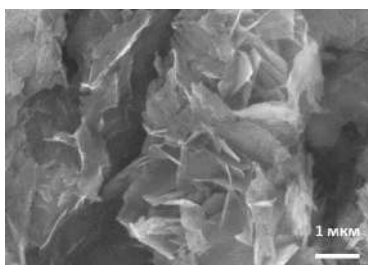


Рис. 4.2. Рентгенограммы продуктов факторного эксперимента по «интеркаляции» адипинат-аниона в структуру ОКФ при использовании в качестве прекурсора брушита(а) и  $\alpha$ -ТКФ (б) (время синтеза – 3 часа).

Варьирование времени синтеза от 1 до 24 ч в случае использования брушита в качестве прекурсора не повлияло на состав продукта при 37 °С. При 60 °С при всех значениях рН наблюдалось образование замещенного продукта с положением рефлекса  $2\theta(100) = 3,78^\circ$  ( $d(100)=23,3542 \text{ \AA}$ ) вплоть до 6 ч гидролиза при возрастающей интенсивности данного рефлекса и его полное отсутствие при 24 ч с образованием однофазного продукта ГАП. При гидролизе  $\alpha$ -ТКФ в адипинатном буферном растворе при рН 6 замещенный продукт образовывался и после 24 ч.



а)



б)

Рис. 4.3. Морфология порошков а)  $Suc@OKF$  и б)  $Adi@OKF$

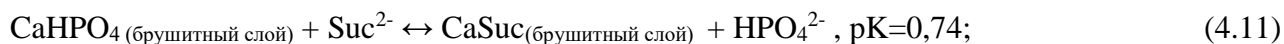
Морфология @ОКФ с различными дикарбоновыми кислотами достаточно схожа (Рис. 4.3). Кристаллы представляют собой тонкие пластины или ленты, причем и размеры в плоскости, и правильность формы снижаются при переходе от ОКФ к замещенным

@ОКФ.

#### 4.1.1.2 Цитратзамещенный ОКФ

Следует сразу отметить, что нам не удалось синтезировать однофазный цитрат-замещенный @ОКФ гидролизом в цитратном буфере брушита и  $\alpha$ -ТКФ, несмотря на имеющиеся в литературе утверждения [113,114], в интервале температур 20–60 °С, рН=5,75–6,5, длительность 1–14 дней. Длительные синтезы при низких температурах приводят к образованию фазы ГАП с примесью  $\beta$ -ТКФ, а при высоких – к одному из цитратов кальция (также с примесью  $\beta$ -ТКФ), рентгенограмма которого отдаленно напоминает ОКФ (Рис. 4.4). Рассматривая образование @ОКФ как процесс нуклеофильного замещения в брушитных слоях  $CaA$  (брушитный слой) ( $A=HPO_4^{2-}$ ,  $Suc^{2-}$ ,  $Cit^{3-}$ )

кристаллической решетки ОКФ для случаев сукцинат@ОКФ и цитрат@ОКФ и оценивая термодинамическую устойчивость брушитных слоев, исходя из устойчивости одноименных ионных пар в растворе, из соответствующих констант образования ионных пар имеем:



Видно, что равновесие (4.12) сдвинуто вправо за счет того, что  $\Delta G_T^0(4.12) < 0$  (константа равновесия больше единицы). Полагая, что реакции (4.11) и (4.12) проводятся при невысоких температурах и, следовательно, максимальный вклад энтальпийного фактора, можно считать, что и  $\Delta H_T^0(4.12) < 0$ , в отличие от реакции (4.11), которая, напротив, эндотермическая. Однако сдвиг равновесия экзотермической реакции (4.12) вправо требует понижения температуры. Расчеты (см. 10 Приложение) согласуются с таким заключением. Таким образом, внедрение цитрата требует использования комнатных, или даже пониженных температур, и здесь, по-видимому, скорость реакции будет низка (в литературе сообщается о синтезах длительностью несколько недель [113,114]. В условиях длительных синтезов встает вопрос о том, насколько за время синтеза не распадется фаза ОКФ, которая является метастабильной [172].

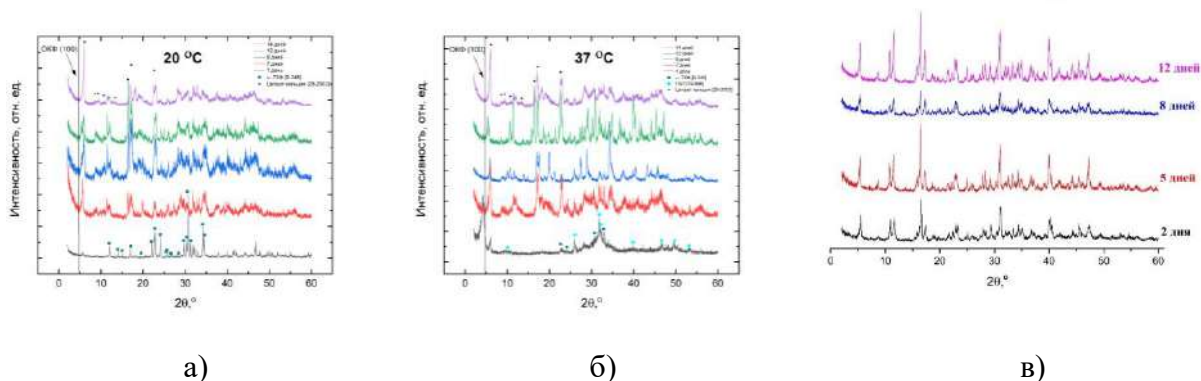


Рис. 4.4. Дифрактограммы продуктов гидролиза  $\alpha$ -ТКФ в цитратном буфере в следующих условиях (концентрация буферного раствора – 0,25 М для всех случаев): а) при 20 °С и рН=6,5 - цитрат Са; б) при 37 °С и рН=6,5 - фазовый состав цитрат Са и ГАП; в) при 60 °С и рН=5,75 – фазовый состав цитрат Са и  $\beta$ -ТКФ.

Морфология полученных продуктов гидролиза ТКФ в цитратном буфере (Рис. 4.5) свидетельствует о: 1) неполной конверсии частиц  $\alpha$ -ТКФ произвольной формы после 1 суток синтеза в лентоподобные частицы при 20 °С и мелкодисперсные произвольные частицы при 37 °С ; 2) увеличении доли лентоподобных частиц и их ширины и уменьшении их длины при 20 °С вплоть до 14 суток; 3) образовании пластинчатых частиц после 7 суток и их вытягивании к 14 суткам при 37

°С. Подобные наблюдения подтверждают результаты РФА о неполной конверсии ТКФ в цитратзамещенный ОКФ.

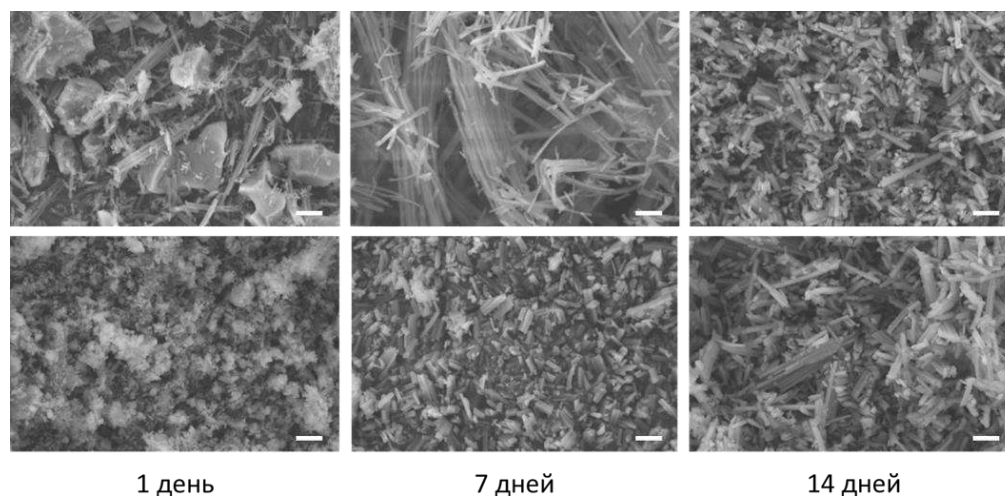


Рис. 4.5. Морфология продуктов замещения ОКФ лимонной кислотой. Условия синтеза: pH = 6,5; T = 20 °C; C(H<sub>3</sub>Cit) = 0,25 M (сверху); pH = 6,5; T = 37 °C; C(H<sub>3</sub>Cit) = 0,25 M (снизу)

#### 4.1.1.3 Сопоставление с экспериментальными кривыми титрования и теоретическими расчетами ионных равновесий

Для анализа рН-Т условий образования цитратзамещенного ОКФ было использовано титрование суспензии α-ТКФ раствором лимонной кислоты. Экспериментальные титриметрические кривые были сопоставлены с расчетами ионных и гетерогенных равновесий в растворе (см. 10 Приложение). На расчетной кривой для суспензии α-ТКФ, в которой общее содержание кальция C(Ca<sup>2+</sup>) = 60 мМ видно два скачка рН; горизонтальный участок при рН≈6 соответствует гетерогенной 3-фазной системе: две твердые фазы – гидроцитрат кальция и брушит, а также фаза раствора (для 3-х компонентной системы это соответствует неинвариантному равновесию, отсюда понятно постоянство рН в этой области). Последующие стадии связаны с растворением брушита, затем оттитровывается дигидрофосфатный анион.

На экспериментальных кривых эти стадии «растянуты» вследствие 1) небыстрой кинетики соответствующих гетерогенных реакций; 2) система не является, строго говоря, 3-компонентной: для варьирования рН используется не фосфорная, а иная кислота, в данном случае – лимонная. Исходя из эксперимента, можно примерно оценить ожидаемую рН-Т область существования цитрат замещенного ОКФ. Так, при титровании суспензии α-ТКФ лимонной кислотой первое быстрое снижение рН из щелочной области (результат гидролиза перешедших в раствор ортофосфатных анионов до гидрофосфата) замедляется после рН≈6,5, что связано со связыванием добавляемых в

раствор  $H^+$  и продолжается вплоть до  $pH \approx 5$  (Рис. 4.6а). Действительно, в системе присутствуют три твердых фазы: ТКФ (который растворяется), ОКФ и брусит, образующийся после  $pH \approx 5$  (вследствие того, что образование ОКФ идет медленнее изменения  $pH$ ).

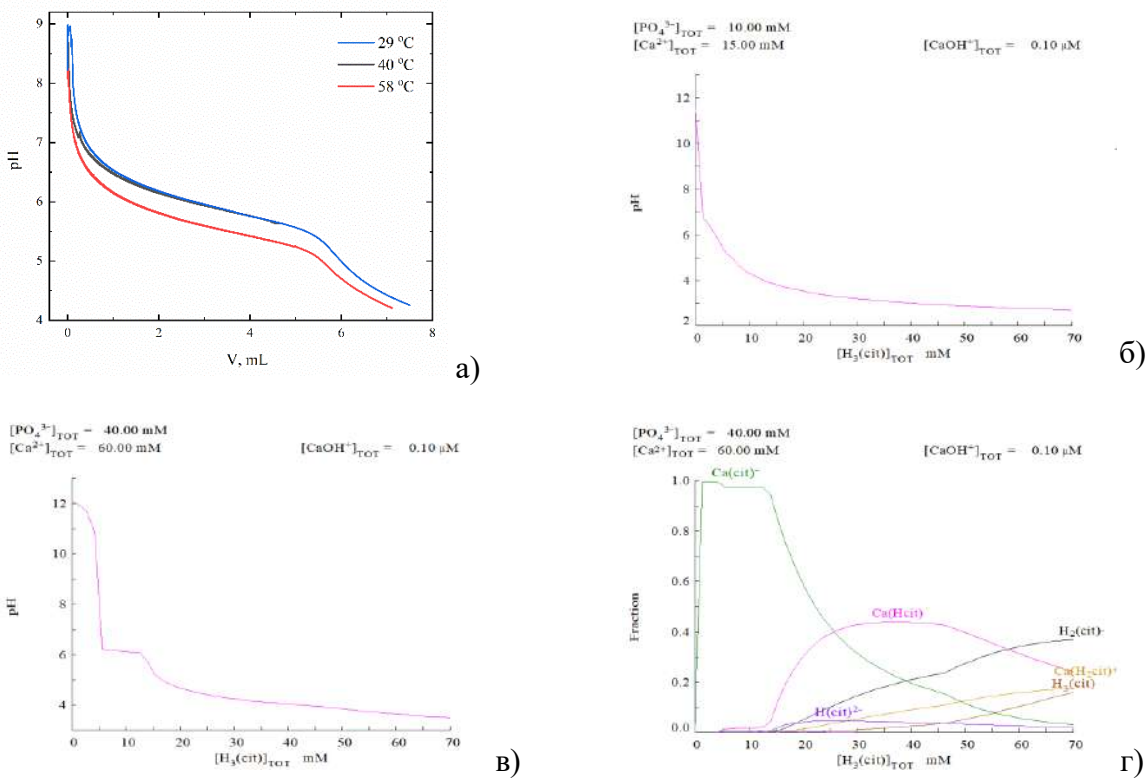


Рис. 4.6. а) Кривая рН-титрования  $\alpha$ -ТКФ (в количестве  $[Ca^{2+}] = 15$  mM) 0,1 М лимонной кислотой при  $T = 29, 40$  и  $58$  °C; б) расчетная кривая рН-титрования, построенная в программе Hydra-Medusa ( $T = 25$  °C,  $C(Ca^{2+}) = 15$  mM); в) расчетная кривая рН-титрования, построенная в программе Hydra-Medusa ( $T = 25$  °C,  $C(Ca^{2+}) = 60$  mM); г) расчетная диаграмма зависимости доли кальций-цитрат содержащих форм в растворе от концентрации добавляемой лимонной кислоты (Hydra-Medusa).

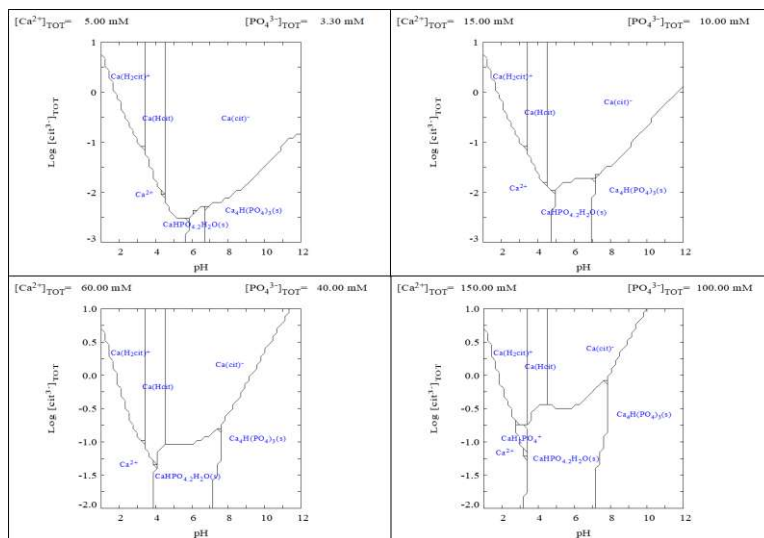


Рис. 4.7. Области преобладания фаз в системе  $Ca^{2+}$ - $PO_4^{3-}$  -  $Cit^{3-}$  при переменной концентрации  $H^+$  (pH) и  $Cit^{3-}$ .

Поскольку цитратный анион является сильным комплексообразователем, положение границы брушит/ОКФ на рН-Т плоскости диаграммы Монны должно зависеть и от общего содержания кальция (т. е. количества твердого кальцийфосфатного субстрата – ТКФ), и от концентрации лиганда. Построение диаграмм преимущественных ионных форм кальция в системе  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{PO}_4^{3-}$ - $\text{Cit}^{3-}$  в координатах логарифма общей концентрации цитрат-ионов от рН (Рис. 4.7) показывает, что при увеличении концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в системе происходит: 1) существенное расширение области существования фазы брушита ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}(\text{s})$ ) в обеих координатах; 2) небольшой сдвиг границы перехода брушит-ОКФ вплоть до рН 7,1-7,2 при  $[\text{Ca}^{2+}] = 150 \text{ мМ}$ , где устойчивой фазой становится гидроксиапатит. Таким образом, цитратзамещенный ОКФ может существовать в узкой области рН около значения 7 и невысоких температурах, где с ОКФ конкурирует ГАП, особенно при длительной кристаллизации.

#### 4.1.2 Синтез алкилфосфатов кальция

Среди критериев выбора методики синтеза алкилфосфатов были: а) доступность реагентов с сохранением высокой чистоты; б) возможность синтеза в простых условиях (без использования инертной среды или высоких температур); в) число упоминаний методики в литературе. Таким образом, использовалась методика синтеза из пиррофосфорной кислоты и спирта в среде бензола.

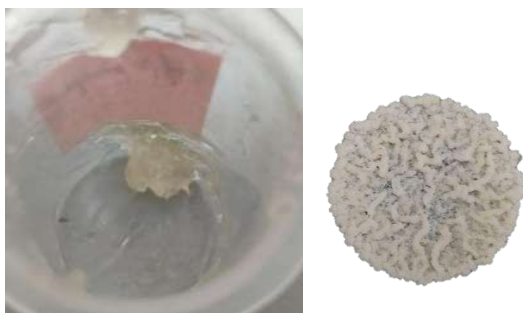


Рис. 4.8. Фотографии полученных октилфосфата (слева) и додецилфосфата (справа) после сушки в вакуумном эксикаторе.

Поскольку в литературе нет данных о создании композитов на основе гидрогелей и алкилфосфатов кальция и влиянии длины алкильной цепи на свойства таких композитов, то было решено апробировать синтез трех алкилфосфатов со следующими углеводородными радикалами бутил- ( $\text{C}_4$ ), октил- ( $\text{C}_8$ ) и додецил- ( $\text{C}_{12}$ ).

В случае использования бутанола-1 получали желтоватый жидкий продукт, октанола-1 – гелеобразный продукт слабозеленого оттенка, додеканола-1 – твердый белый кристаллический продукт (Рис. 4.8).

Полученные продукты бутил-, дибутил-, октил- и додецилфосфата кальция представляли собой белые порошки. Методом рентгенофазового анализа были получены дифрактограммы полученных соединений, которые не удалось идентифицировать по существующим кристаллографическим базам данных (Рис. 4.9). Положения рефлексов синтезированных в данной работе порошков отличаются от литературных данных, это может быть связано с недостаточной надежностью экспериментальных данных по таким соединениям. Стоит отметить, что наличие

рефлексов в низкоугловой области  $2\theta$  схоже с дифрактограммой ОКФ (ICDD PDF-2 [74-1301]  $2\theta(100) = 4,701$ ,  $d(100) = 18,7805\text{\AA}$ ). Межплоскостное расстояние, соответствующее трём первым рефлексам на дифрактограммах полученных алкилфосфатов кальция, линейно зависит от числа атомов углерода в алкильной цепи, и соотносится как 3:2:1 (Рис. 4.10), что говорит о параллельности кристаллографических плоскостей и, по-видимому, соответствует рефлексам  $(00l)$ , где  $l=1, 2, 3$  (или 2, 4, 6 и т.п.).

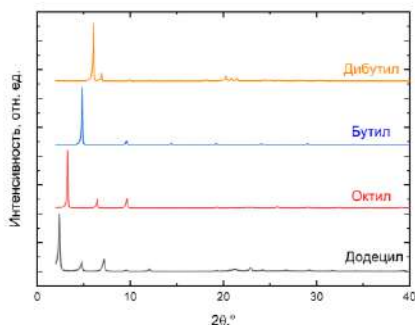


Рис. 4.9. Дифрактограммы порошков бутил-, октил- и додецилфосфатов кальция.

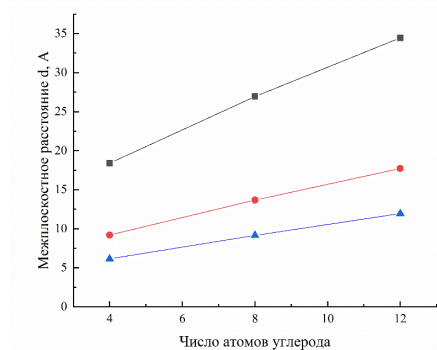


Рис. 4.10. Зависимость межплоскостного расстояния первых 3 рефлексов на дифрактограммах алкилфосфатов кальция (от бутила к додецилу снизу вверх)

В ИК-спектрах полученных алкилфосфатов кальция (Рис. 4.11) наблюдается широкая полоса поглощения при  $3460\text{ см}^{-1}$ , связанная с колебанием кристаллизационной воды. Три полосы в диапазоне  $2850\text{-}2960\text{ см}^{-1}$  соответствуют валентным колебаниям групп С-Н. Две полосы (или одна широкая полоса в случае дибутилфосфата кальция (CaDBP)) в диапазоне  $1410\text{-}1450\text{ см}^{-1}$  могут быть связаны с колебаниями группы С-О, а множество полос ниже  $1200\text{ см}^{-1}$  относятся к валентным и деформационным колебаниям групп Р-О, Р=О и Р-О-С.

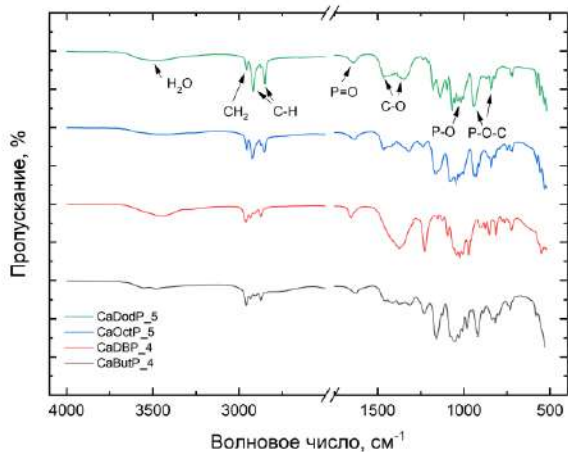
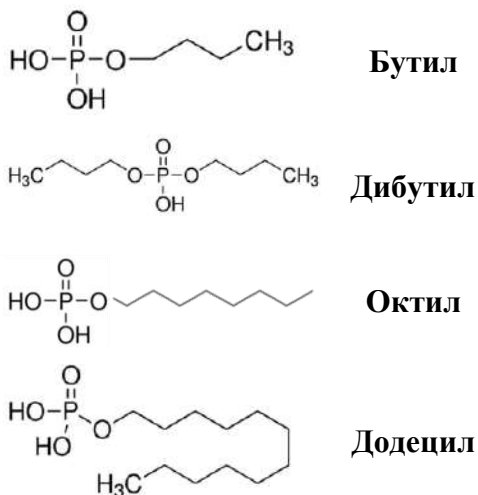


Рис. 4.11. ИК-спектры (в режиме НПВО) порошков алкилфосфатов кальция.

Методом электронной микроскопии было установлено, что порошки всех алкилфосфатов кальция имеют пластинчатую морфологию (Рис. 4.12), схожую с морфологией слоистого ОКФ. При этом порошки бутил- и додецилфосфатов кальция склонны к агломерации. По тактильным ощущениям порошки полученных алкилфосфатов и их солей кальция мылоподобные, что может быть соотнесено с использованием алкилфосфатов в качестве поверхностно-активных веществ (ПАВ). По данным энергодисперсионного анализа (Табл. 4.2, Рис. 11.1) были установлены атомные соотношения Са к Р (близкие 1 к 2), что говорит, по-видимому, об образовании кристаллогидратов кислых солей алкилфосфатов кальция  $\text{Ca}(\text{ROPO}_3\text{H})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (избыток кислорода по данным РСМА может быть связан именно с образованием кристаллогидратов; на это же указывают и данные термического анализа, см. далее).

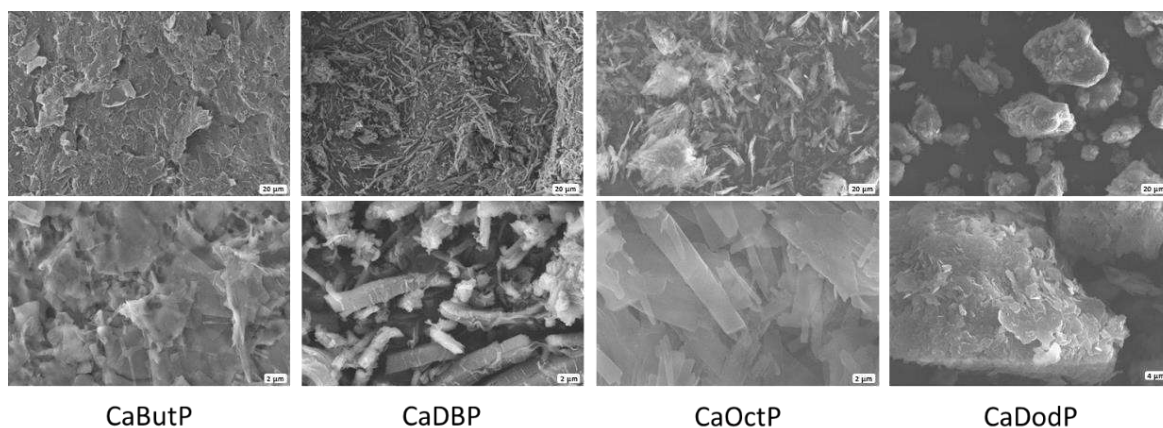


Рис. 4.12. Микроморфология полученных алкилфосфатов кальция.

Табл. 4.2. Соотношение элементов в алкилфосфатах кальция по данным энергодисперсионного анализа.

Алкильный фрагмент	Соотношение Са:Р:О (атомные доли)
Бутил	1:1,9:10,3
Октил	1:2,7:16,7
Додецил	1:2,4:14,1

#### 4.1.3 Синтез брушита

Эффективным способом синтеза слоистых фосфатов является осаждение из водных растворов солей. При синтезе брушита из растворов тетрагидрата нитрата кальция и гидрофосфата аммония выход реакции близок к 100%. При сливании растворов кристаллы брушита выпадают мгновенно при комнатной температуре без контроля pH. В случае синтеза из нитрата кальция и гидрофосфата аммония, побочный продукт синтеза нитрат аммония дополнительно стабилизирует кислое значение pH за счет гидролиза катиона. Однако, побочный продукт данного синтеза -  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , является цитотоксичным как из-за катиона аммония, так и из-за нитрат-аниона. В связи с этим, предполагая вариант наполнения гидрогелей свежесаженными частицами брушита,



необходимо тщательно промывать порошок фосфата после фильтрования. Избежать токсичного побочного продукта также можно, используя другие исходные реагенты, например, хлорид кальция и гидрофосфат натрия. Рентгенофазовый анализ показал (Рис. 4.13а), что при быстром сливании растворов этих солей образуется однофазный продукт брушита.

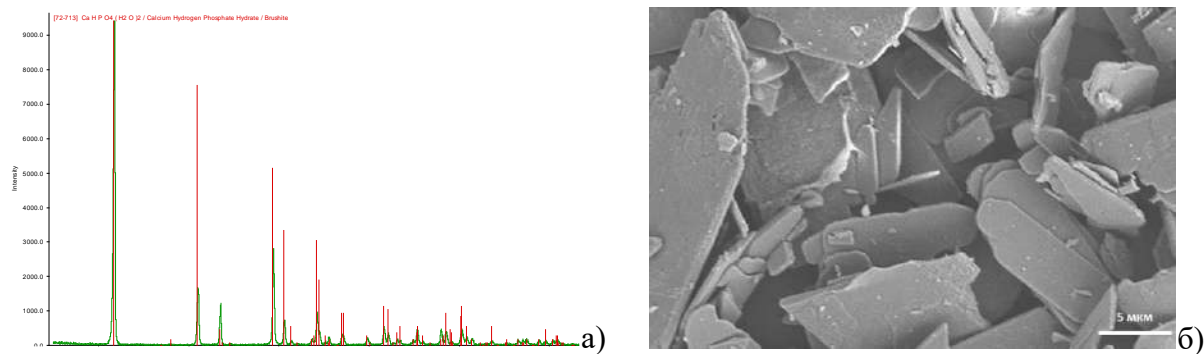


Рис. 4.13. а) Рентгенограмма порошка брушита, полученного из хлорида кальция и гидрофосфата натрия (синтез №1, Табл. 9.1, 9 Приложение), штрих-диаграмма соответствует карточке [72-713] базы ICDD PDF-2; б) микрофотография порошка брушита.

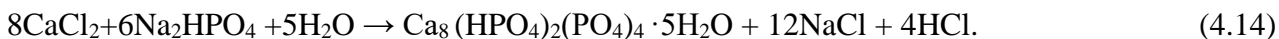
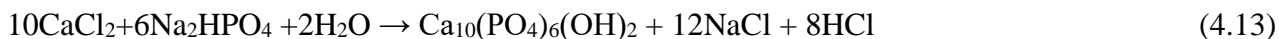
Побочным продуктом при этом является хлорид натрия NaCl, который не оказывает токсического действия на клетки и ткани. NaCl легко удаляется промыванием осадка при фильтровании (что видно по отсутствию соответствующих рефлексов на рентгенограмме).

При выращивании кристаллов брушита в объеме гидрогеля наличие токсичного побочного продукта может быть критично для общей биологической совместимости композита гидрогель/фосфат кальция. Наличие же хорошо растворимого NaCl при дальнейшем вымачивании композита в воде может придать материалу дополнительную пористость в местах сосредоточения кристаллов NaCl.

Для синтеза брушита и ОКФ различной гранулометрии/микроморфологии в водных растворах изменялись условия синтеза (рН, Т,  $C_{\text{реаг/буф}}$ ) при фиксированном времени 10 мин (для брушита) и 1 ч (для ОКФ). План факторного эксперимента типа  $2^3$  для исследования осаждения брушита представлен в Табл. 9.1 (9 Приложение). Синтез брушита проводился по реакции 3.2, побочным продуктом которой является биосовместимый хлорид натрия.

Для эксперимента были выбраны два значения рН. Значение рН=4 согласно диаграмме областей существования фосфатов кальция является оптимальным значением, при котором образуется чистая фаза брушита. Для достижения этого значения в раствор по каплям добавлялась ледяная уксусная кислота. Второе значение рН устанавливалось самопроизвольно после сливания растворов хлорида кальция и гидрофосфата натрия и варьировалось от 5,36 до 6,51. Снижение рН в

кислую область связано с первоначальным выпадением небольшого количества ГАП (или ОКФ) вследствие реакций (4.13–4.14):



Это доказывают расчеты ионных равновесий при добавлении 0,1М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> к 0,1М раствору CaCl<sub>2</sub> (Рис. 4.14).

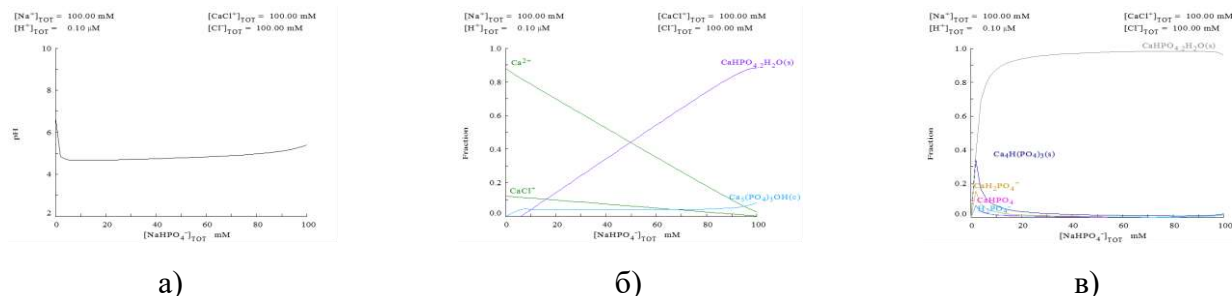


Рис. 4.14. Расчетные изменения а) рН, б) накопление брусита и ГАП (разрешено осаждение ГАП), в) брусита и ОКФ (запрещено осаждение ГАП) при добавлении 0,1М раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> к 0,1М раствору CaCl<sub>2</sub> (25°C, MEDUSA/HYDRA).

На Рис. 9.1 (9 Приложение) представлены графики распределения среднего размера частиц брусита в ходе факторного эксперимента. Наблюдается сложный характер изменения гранулометрии кристаллов брусита и кривых распределения по размерам (которые асимметричны и/или многомодальны). Наиболее крупные кристаллы получены в концентрированном растворе, при рН близком к 6 и невысокой температуре. Уменьшение рН способствует уменьшению размера кристаллов, поскольку в этом случае с учетом падения рН за счет реакций (4.13-4.14) при быстром сливании растворов может быть достигнута граница стабильности брусита, и его кристаллы начнут растворяться (см. эксперимент №4 в Табл. 9.1, 9 Приложение). В этой связи важным фактором (который не варьировали в данной серии опытов) является скорость добавления раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> к раствору CaCl<sub>2</sub>. В рамках же проведенной серии экспериментов наиболее приемлемо выглядят условия опыта №5: быстрое приливание 0,3М раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> с рН=9,24 к 0,3М раствору CaCl<sub>2</sub> при 40 °С; при этом рН не падает ниже 6,5, а в продуктах методом РФА фиксируется только брусит (но не ГАП и/или ОКФ, т.е. их количество не превышает 5 масс.%). Брусит, со средним размером кристаллов примерно 10 мкм, полученный в данных условиях, использовался для наполнения ПЭГ-ДА гидрогелей.

#### 4.1.4 Синтез ОКФ

Синтез ОКФ проводился гидролизом свежееосажденного брушита в ацетатном буферном растворе при определенных условиях ( $T$ ,  $pH$ ). Так, чистый продукт ОКФ получается при гидролизе брушита в течение 1 ч при  $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $pH=5,75$  (Рис. 4.15). Присутствующие в растворе ацетат-ионы могут адсорбироваться на поверхности получаемых частиц, в связи с чем необходима либо промывка осадка, либо поиск более биосовместимого буферного раствора. В фосфатном буфере [173] брушит не гидролизуеться, а в янтарном (сукцинатном) буфере образуется замещенный («интеркалированный») ОКФ (мостиковые гидрофосфат-анионы замещаются на двухзарядные сукцинат-анионы).

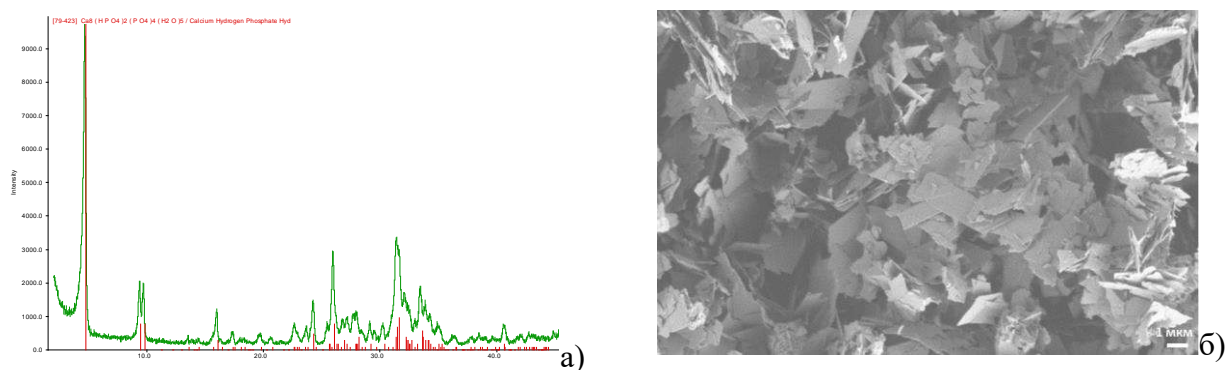


Рис. 4.15. а) Рентгенограмма порошка ОКФ (ацетатный буфер,  $pH\ 5,75$ ,  $T=60^{\circ}\text{C}$ ,  $t=1$  ч. – синтез №1, Табл. 9.2), штрих-диаграмма соответствует карточке [79-423] базы ICDD PDF-2; б) микрофотография порошка ОКФ, полученного гидролизом брушита в ацетатном буфере.

В случае синтеза ОКФ гидролизом брушита в ацетатном буфере  $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$  факторный план представлен в Табл. 9.2, а распределение кристаллов по размерам представлено на Рис. 9.2 (9 Приложение). Условия синтеза выбирались согласно ранее уточненным данным [112] по областям существования ОКФ в координатах  $pH$ - $T$ . Полученные кривые распределения среднего размера частиц многомодальны, поскольку синтез ОКФ достаточно продолжителен, за это время успевают пройти процессы перекристаллизации, которые значительно увеличивают разброс кристаллов по размерам. Видно, что при  $pH$ , близких к 6, т. е. границе между ОКФ и ГАП, размеру кристаллов ОКФ становятся меньше (эксперименты №№ 5–8), появляется довольно интенсивная мода с малыми (не более 0,7  $\mu\text{m}$ ) кристаллами. С учетом трудности регистрации методом РФА малого количества ГАП на фоне ОКФ, можно полагать, что в этих условиях происходит частичная конверсия ОКФ в ГАП. Важно также отметить, что во всех случаях, кроме опыта №5, присутствует остаточный брушит. Следовательно, для наполнения гидрогелей был выбран порошок, полученный

в условиях №5, со средним размером кристаллов примерно в 7 мкм: при 60 °С при рН=6 в 0,1М ацетатном буферном растворе.

Табл. 4.3. Средний размер частиц слоистых фосфатов по данным РЭМ.

	Брушит	ОКФ
Длина, мкм	10,9±2,8	3,7±1,3
Ширина, мкм	4,5±1,1	1,8±0,6
Толщина, мкм	0,5±0,1	0,01-0,1
$V_{\text{эсп}}$ , мкм <sup>3</sup>	25,4	0,7
$S_{\text{пов}}$ , мкм <sup>2</sup>	114,6	14,8
$\rho_{\text{теор}}$ , Г/см <sup>3</sup>	2,3	2,6
$S_{\text{уд}}$ , м <sup>2</sup> /Г	1,9	8,3-76,8

На Рис. 4.13 б и Рис. 4.15 б видно, что получаемые кристаллы брушита и ОКФ имеют пластинчатую морфологию, при этом размер пластинок в плоскости достигает нескольких единиц-десятков мкм, а толщина составляет около 100 – 500 нм. По результатам статистической обработки микрофотографий (Табл. 4.3) пластинки брушита имеют больший размер в плоскости и по толщине (до 13 мкм и 0,6 мкм, соответственно), при этом частицы ОКФ имеют большую удельную площадь поверхности за счёт образования более тонких пластинок ( $\approx$ 10-100 нм). Погрешность измерения толщины пластинок ОКФ по данным РЭМ достаточно велика, поэтому при оценке толщин кристаллов брались типичные значения удельной поверхности, известные из литературных данных [108].

#### 4.1.5 Синтез ОКФ, замещенного сукцинат-ионом

Для проведения подобного эксперимента с замещенным аналогом ОКФ был выбран полученный в предыдущих работах группы [112] ОКФ, замещенный сукцинат-ионом. Факторный план синтеза «интеркалированного»  $\text{Suc}@\text{ОКФ}$  гидролизом  $\alpha$ -ТКФ в янтарном буфере представлен в Табл. 9.3 (9 Приложение), а распределение кристаллов по размерам приведено на Рис. 9.3 (9 Приложение). Качественно ситуация выглядит сходно в сравнении со случаем чистого ОКФ, синтезированного гидролизом брушита в ацетатном буфере, но размеры кристаллов в среднем больше (и по данным РЭМ, они тоньше), что понятно, исходя из того, что для «интеркалированного» ОКФ наблюдается увеличение параметра ячейки  $c$ . С точки зрения максимального содержания целевой фазы, а также сопоставимого размера кристаллов с предыдущими экспериментами (порядка 10 мкм), разумными условиями выглядят опыты №1 и 5 (Табл. 9.3, 9 Приложение): рН, близкое к 6, 60 °С при использовании 0,1 М янтарного буфера и 0,25 М буфера при 40 °С. В первом случае получается ожидаемо широкое распределение кристаллов по размерам, во втором – присутствует

мода мелких (менее 5 мкм) кристаллов, среди которых могут быть и кристаллы ГАП вследствие вероятной конверсии ОКФ→ГАП.

#### 4.1.6 Зависимость среднего размера частиц от условий синтеза

На основе полученных результатов двухуровневого трехфакторного эксперимента  $2^3$  методом ортогонального регрессионного анализа были построены полные полиномиальные зависимости среднего размера частиц фаз фосфатов кальция  $d_{50}$  от условий синтеза pH, T и концентрации реагентов (в случае брусита) и буферного раствора (в случае ОКФ и Suc@ОКФ), учитывающие как одиночное, так и смешанное действие параметров (переменная со звездочкой – приведенная величина, переменная без звездочки – натуральная величина):

$$d_{50}(\text{брусит}) = 13.025 + 4.85pH^* - 2.225T^* + 3.4C^* - 5.25pH^*T^* - 0.175pH^*C^* - 2.85T^*C^* - 1.275pH^*T^*C^*, \quad (4.15)$$

$$\text{где } pH^* = \frac{pH-5.25}{1.25}, T^* = \frac{T-32.5}{7.5}, C^* = \frac{C-0.2}{0.1}.$$

$$d_{50}(\text{ОКФ}) = 6.3375 - 1.7375pH^{**} + 0.8625T^{**} - 0.9375C^{**} - 1.3625pH^{**}T^{**} - 1.5125pH^{**}C^{**} - 0.6625T^{**}C^{**} + 0.5125pH^{**}T^{**}C^{**}, \quad (4.16)$$

$$\text{где } pH^{**} = \frac{pH-5.875}{0.125}, T^{**} = \frac{T-50}{10}, C^{**} = \frac{C-0.2}{0.1}.$$

$$d_{50}(\text{Suc@ОКФ}) = 18.075 + 2.575pH^{***} + 7.525T^{***} + 1.525C^{***} - 7.975pH^{***}T^{***} + 1.625pH^{***}C^{***} + 3.075T^{***}C^{***} + 3.175pH^{***}T^{***}C^{***}, \quad (4.17)$$

$$\text{где } pH^{***} = \frac{pH-5.75}{0.25}, T^{***} = \frac{T-50}{10}, C^{***} = \frac{C-0.175}{0.075}.$$

Можно отметить, что сильный, но при этом противоположный эффект оказывает pH смеси в случаях брусита и ОКФ. Вероятно, уменьшение размера кристаллов с ростом pH в случае ОКФ связано с тем, что в области повышенных значений pH преимущественно кристаллизуется ГАП, то же самое можно сказать и про смешанный эффект pH·T. Для Suc@ОКФ рост pH и температуры компенсируются их парным действием в случае Suc@ОКФ. Взаимосвязь условий синтеза представлена в виде проекций поверхностей полученных функций в двумерных координатах исследуемых условий синтеза при фиксированном третьем (Рис. 4.16 - Рис. 4.17 белым цветом на диаграммах обозначены области, соответствующие отрицательным значениям функций). Представленные диаграммы не учитывают фазовой однородности полученных порошков, поскольку некоторые диапазоны параметров синтеза лежат вне области существования однофазных ОКФ и брусита (Табл. 9.2, 8 Приложение).

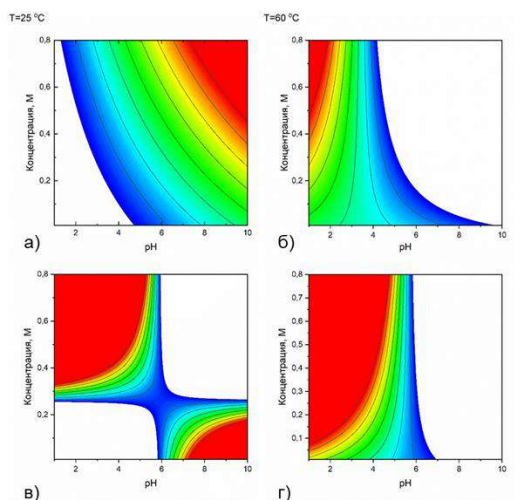


Рис. 4.16. Диаграммы зависимости среднего размера частиц от условий синтеза: брусита (а, б) и ОКФ (в, г) при различных температурах (25 (а, в) и 60 (б, г) °С).

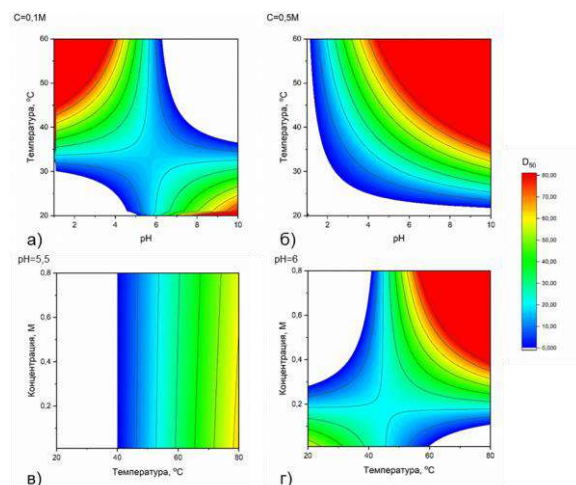


Рис. 4.17. Диаграммы зависимости среднего размера частиц Suc@ОКФ от условий синтеза: а) при  $C_{буф}=0,1$  М; б) при  $C_{буф}=0,5$  М; в) при pH=5,5; г) при pH=6.

Оперируя тремя факторами – концентрацией раствора солей (буферного раствора), температурой, pH (причем последние два фактора, как и ожидалось, являются важными в плане получения однофазного продукта и значимо влияют на гранулометрию слоистых фосфатов) удалось синтезировать кристаллы брусита и ОКФ со средними размерами кристаллов порядка 10 мкм, что приемлемо для наполнения ими фотополимерируемых гидрогелей. Следует отметить, тем не менее, что в случае брусита, по-видимому, еще одним фактором является также скорость добавления растворов, определяющая начальное снижение pH; в случае сукцинатзамещенного ОКФ получаются более крупные кристаллы.

## 4.2 Изучение термического поведения слоистых фосфатов кальция

При подготовке данной главы использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М. В. Ломоносова, частично отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

**Тихонов А.А.**, Климашина Е.С., Евдокимов П.В., Кукуева Е.В., Бирюков А.С., Путляев В.И., Щербаков И.М., Дубров В.Э. Дикарбоксилатзамещенные октакальциевые фосфаты для наполнения гидрогелей и изготовления резорбируемой керамики // Перспективные материалы. 2020. Т. 12. С. 27–41. doi:10.30791/1028-978x-2020-12-27-41.

**Tikhonov A.**, Putlayev V. Synthesis and Thermal Behaviour of Calcium Alkyl Phosphates as Bioceramic Precursors // Ceramics. 2022. Т. 5. № 3. С. 362–371. doi: 10.3390/ceramics5030028.

Кроме того, результаты, приведенные в данной главе, являются частью отчета по грантам РФФИ №17-79-20427 и РФФИ №20-33-90303.

#### 4.2.1 Термическая обработка замещенных фосфатов кальция

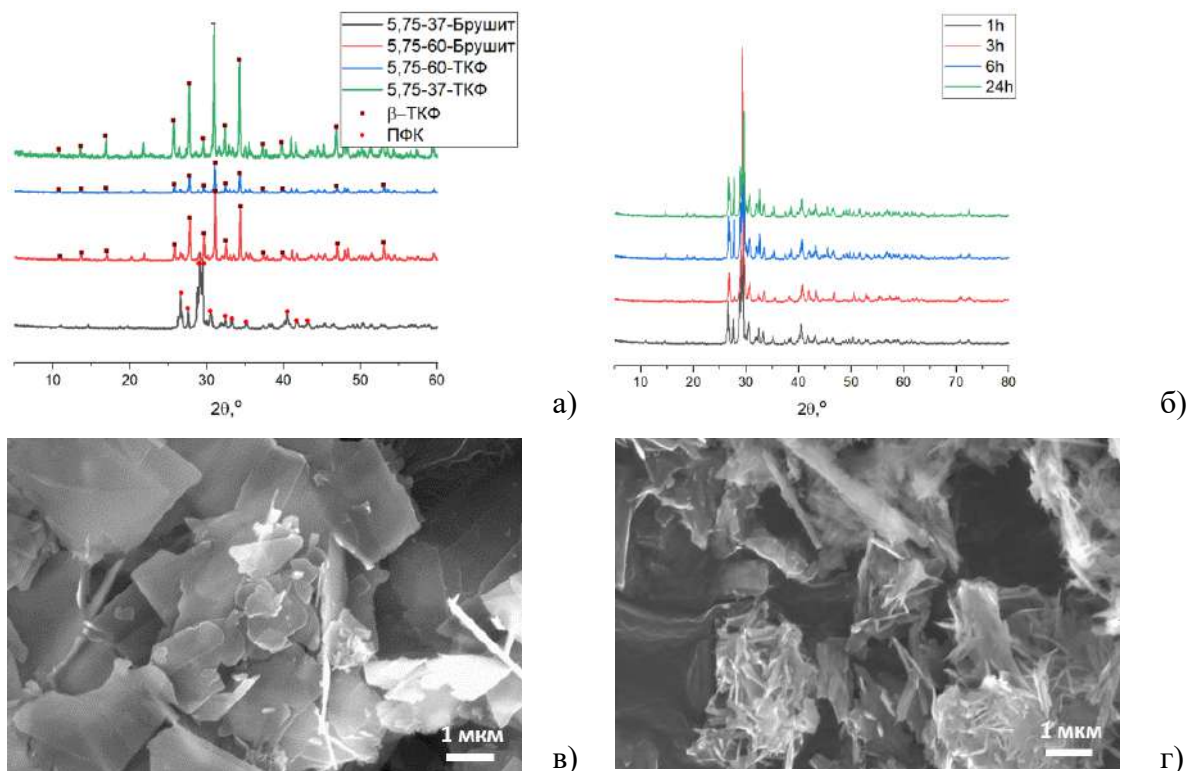


Рис. 4.18. Рентгенограммы отжига продуктов факторного эксперимента по «интеркаляции» адипинат-аниона при 800 °С (а) рН – 5,75; прекурсор – брушит;  $T_{\text{синтеза}}=37-60$  °С б) рН – 5,75; прекурсор –  $\alpha$ -ТКФ;  $T_{\text{синтеза}}=60$  °С). Микрофотографии адипинат замещённого продукта: в) время синтеза – 3 часа, г) время синтеза – 24 часа.

Изучение термического поведения слоистых фосфатов кальция позволяет определить как условия получения керамик на их основе (в частности, температуру спекания), так и косвенно получить информацию об исходном составе таких соединений. Для определения степени замещения  $x$  полученные адипинат-замещенные фосфаты подверглись обжигу при  $T=800$  °С,  $t=3$  ч. РФА полученных смесей показал, что продукты отжига «интеркалированных» образцов представляют собой  $\beta$ -ТКФ (Рис. 4.18 а), в то время как продуктом отжига незамещившегося брушита стал ПФК. Соотношение Са к Р в  $\beta$ -ТКФ составляет 1,5, что соответствует степени замещения  $x=0,67$  ( $\text{Ca}/\text{P}=8/(6-x)$ ) исходя из состава @ОКФ).  $\beta$ -ТКФ является продуктом отжига как образцов, приготовленных в течение 1 ч, так и в течение 24 ч (Рис. 4.18 б), что, наряду с предыдущими результатами позволяет выдвинуть предположение о том, что выбранные условия гидролиза практически не влияют на фазовый состав адипинат@ОКФ и, следовательно, на состав получаемой при его термоллизе керамики. Однако, при рассмотрении изменения морфологии порошков,

полученных при выдержке в 24 ч (Рис. 4.18 в, г), можно обратить внимание на появление игольчатых частиц, характерных для ГАП, что, впрочем, не регистрируется РФА.

По данным [174] для адипинат-замещенного ОКФ степень замещения  $x=0,87$  ( $Ca/P=1,56$ ), что ближе к значениям  $x=0,85(\pm 0,05)$  ( $Ca/P=1,55\pm 0,02$ ) для сукцинат-замещенного ОКФ. Мы полагаем, что с ростом  $n$  в формуле дикарбоновых кислот и размера аниона, степень замещения должна падать в силу стерических затруднений размещения анионного остатка в гидратном слое структуры ОКФ, а потому  $x$  должен двигаться в сторону меньших значений. Как было указано выше при теоретическом анализе синтеза замещенных ОКФ, состав с  $x=0,67$  является граничным. По этой причине мы полагаем, что степень замещения для адипинатзамещенного ОКФ выглядит, по меньшей мере, правдоподобно.

Термолиз адипинат@ОКФ состоит из следующих стадий, диагностируемых по кривым термогравиметрии (Рис. 4.19а):

1. выделение влаги и кристаллизационной воды из структуры ОКФ (до 240°C) - образование «коллапсированного» ОКФ  $Ca_8(HPO_4)_{1.33}Adi_{0.67}(PO_4)_4$ ;
2. выделение продуктов сгорания адипинат-аниона в диапазоне 240–460 °C и 710–770 °C – образование порошков с характерной черной окраской из-за наличия остаточного углерода;
3. выделение воды из гидрофосфат-аниона, образование пирофосфат-анионов (410–470°C) – образование апатитоподобного прекурсора  $Ca_8(HPO_4)_{1.33-y}(P_2O_7)_{y/2}(Adi)_{0.67-z}(PO_4)_4(OH)_{2z}$  который может обладать высокой дефектностью и сохраняет пластинчатую исходную морфологию по аналогии с промежуточным апатитоподобным продуктом при термолизе незамещенного ОКФ и сукцинат@ОКФ [111];
4. образование β-ТКФ (выше 770 °C) и выход кривой на постоянную массу.

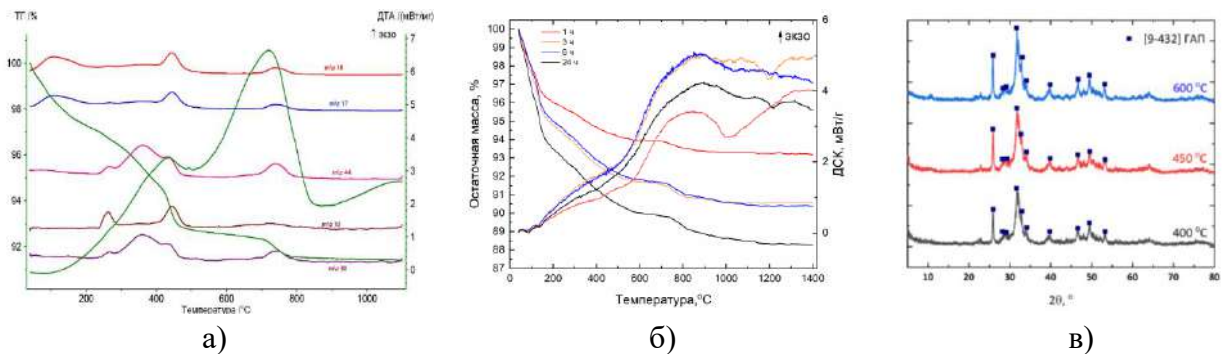


Рис. 4.19. Кривая потери массы, ДСК и масс-спектры порошка адипинат@ОКФ (а); кривые потери массы и ДСК для порошков адипинат@ОКФ, синтезированных в течение 1, 3, 6 и 24 часов ( $pH$  5,5,  $T=37$  °C, прекурсор –  $\alpha$ -ТКФ)(б); рентгенограмма порошка  $Adi@ОКФ$  ( $pH$  5,75,  $T=60$  °C,  $t=3$  ч.), после отжига (400 – 600 °C, выдержка 3 часа) и трих-диаграмма соответствует карточке [9-432] базы ICDD PDF-2;(в).



Увеличение времени гидролиза от 1 до 24 ч приводит к росту потери массы образцов от 6,7 до 11,7 масс. %, при этом основное различие кривых наблюдается в диапазоне до 150 °С, что, по-видимому, говорит об увеличении количества кристаллизационной воды. РФА продуктов термолитиза адипинат@ОКФ (Рис. 4.19в) показывают, что при температурах 600–700 °С наблюдается образование апатитоподобной фазы с малой долей β-ТКФ. С ростом температуры пики, характерные для фазы β-ТКФ, увеличиваются, и при 800 °С образуется β-ТКФ. В целом, @ОКФ характеризуются лучшей термической устойчивостью, чем чистый ОКФ. Однако, сравнение кривых ТГ (Рис. 4.19 а и г) для Suc@ОКФ и Adi@ОКФ показывает на большую термическую устойчивость сукцинат-замещенного ОКФ. Это может быть связано как с большим замещением в сукцинатном производном, так и с большей устойчивостью янтарной кислоты к окислительному пиролизу.

Микрофотографии полупродуктов термолитиза адипинат@ОКФ (Рис. 4.20) указывают на сохранение анизотропной формы частиц (пластин), как и в исходных ОКФ. При этом частицы сохраняют монолитность несмотря на выделение воды из структуры гидрофосфат-аниона и разложения адипинат-аниона. Это похоже на порошки термолитизованного Suc@ОКФ, но отличается от термолитиза чистого ОКФ, где при 400 °С образуются множественные поры в исходных кристаллах [111].

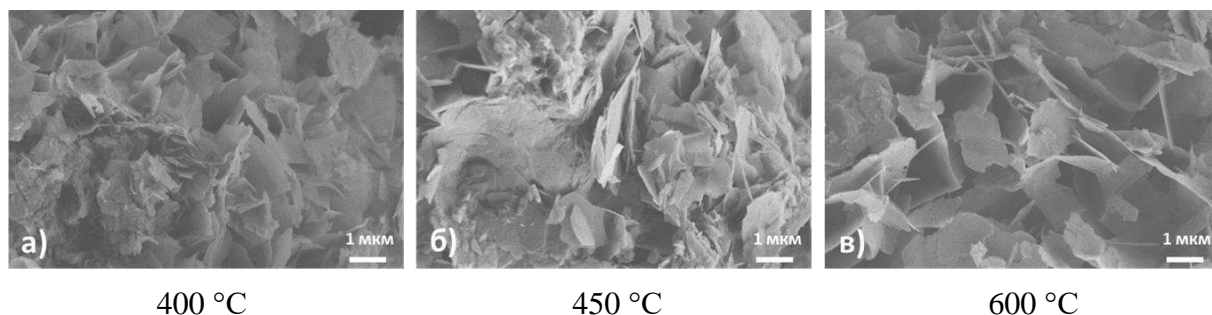
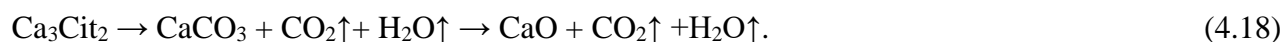


Рис. 4.20. Микроморфология термолитизованных порошков адипинатзамещенного ОКФ.

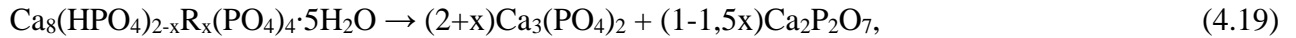
Данные термического анализа ОКФ, замещенного остатком лимонной кислоты, подтверждают гипотезу образования фазы цитрата кальция после 14 дней гидролиза из-за совпадения остаточной массы после нагрева с теоретической (остаток массы при термолитизе цитрата кальция до оксида кальция – 29,5%) и четко выраженных ступеней при 420-700 °С и выше 750-770 °С (Рис. 4.4 а,в):



После 1 дня гидролиза кривая потери массы сглаживается, остаточная масса составляет 68,3%, что согласуется с данными фазового анализа (Рис. 4.4 б) об образовании смеси замещенного

ОКФ/апатитоподобной фазы и цитрата кальция. Теоретическое описание конечных продуктов термолитза замещенных фосфатов сводится к двум следующим схемам реакции:

при  $x < 0,67$



при  $1,2 > x > 0,67$

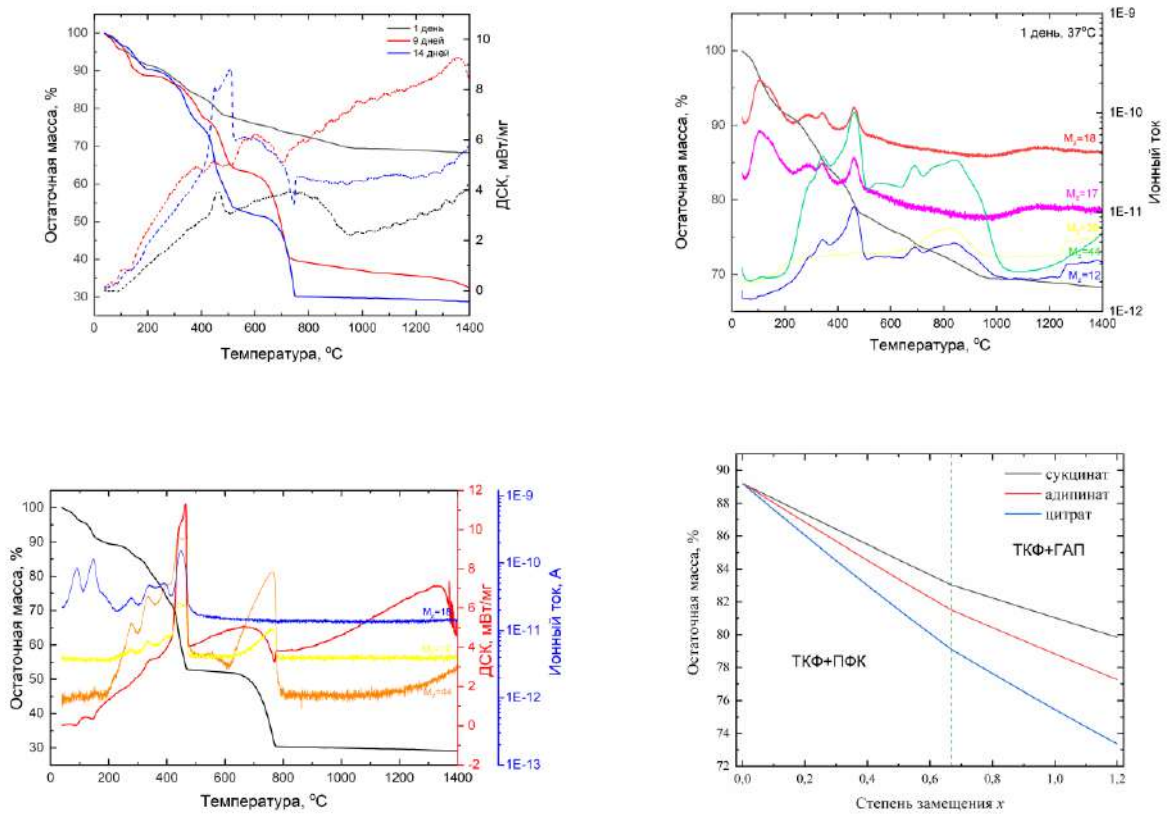
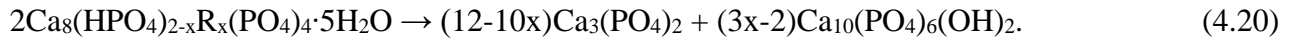


Рис. 4.21. Данные термического анализа синтезированных образцов  $\text{Cit}@\text{ОКФ}$  при: а) pH 6,5 и  $T$  37 °C в течение 1, 9 и 14 суток; б) pH 6,5 и  $T$  37 °C в течение 1 суток с масс-спектрами; в) pH 6,5 и  $T$  20 °C в течение 9 суток с масс-спектрами; г) зависимость остаточной массы  $\text{@ОКФ}$  при термолитзе от степени замещения  $x$  для различных карбоксилатов.

При степени замещения  $x=0,67$  наблюдается перегиб в зависимости остаточной массы продуктов термолитза  $\text{@ОКФ}$  от степени замещения  $x$ . Допуская, что в результате гидролиза образуются 5-ти водные замещенные ОКФ (подобно составу незамещенного ОКФ), остаточная масса не опускается ниже 73% (Рис. 4.21 г).

#### 4.2.2 Термическая обработка алкилфосфатов кальция

В случае алкилфосфатов кальция синхронный термический анализ показал, что разложение происходит в 2 стадии для октилфосфата кальция и додецил, и в 3 стадии для бутилфосфата (Рис. 4.22). Остаточная масса и наличие эндоэффекта чуть ниже 1000 °С соответствует образованию метафосфата кальция, что говорит об образовании кристаллогидратов кислых алкилфосфатов кальция в ходе синтеза (Табл. 4.4).

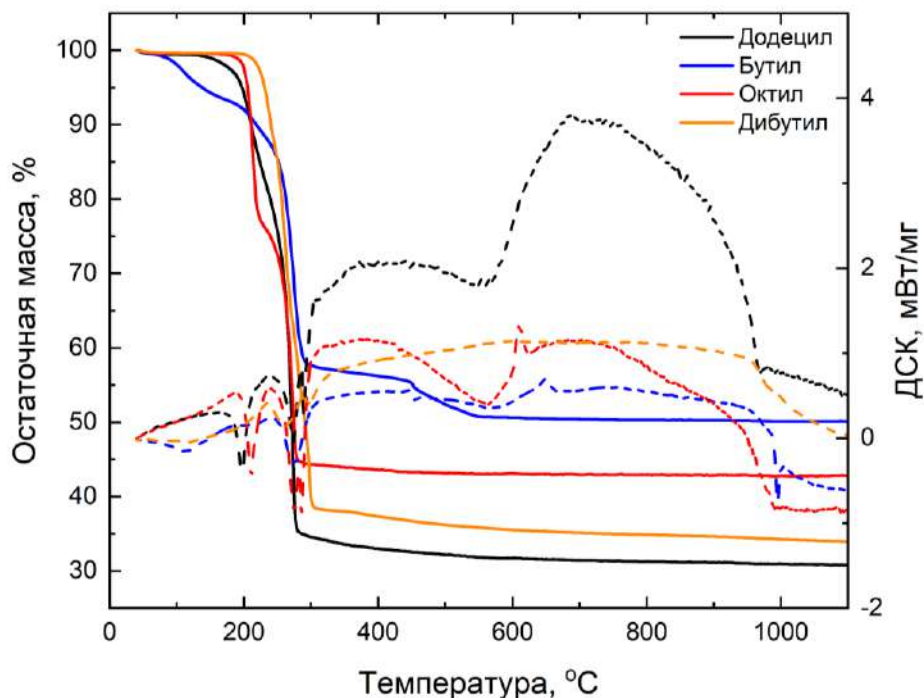
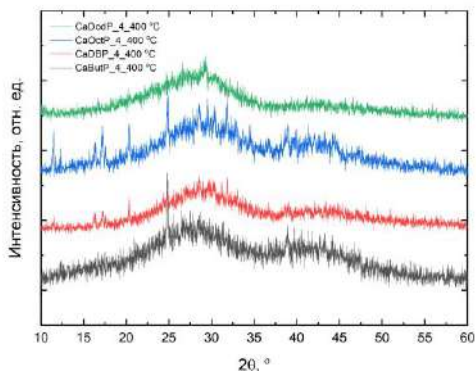


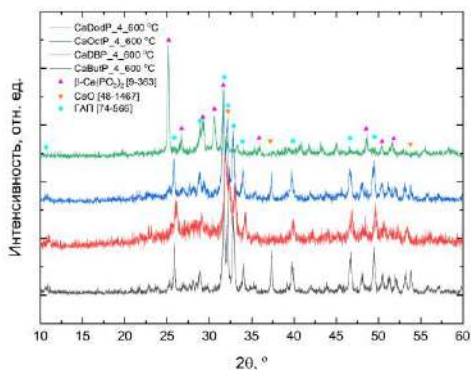
Рис. 4.22. Кривые потери массы и ДСК для порошков алкилфосфатов кальция.

Табл. 4.4. Анализ потери массы при термическом разложении алкилфосфатов кальция.

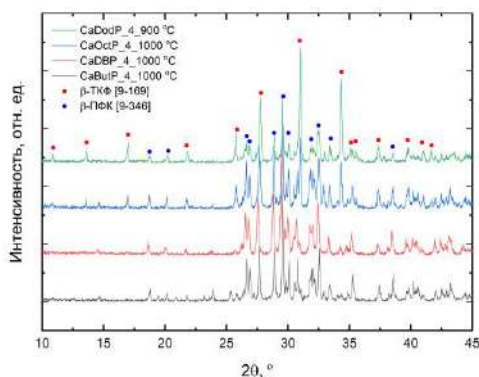
Тип соли	Алкил	Формула соли	Предполагаемые продукты термолиза	Остаточная масса, %		Количество молекул кристаллизационной воды $xH_2O$
				Расч.	Экс.	
Кислая	Додецил	$(C_{12}H_{26}O_4P)_2Ca$	$Ca(PO_3)_2$	34,70	30,83	3,98
	Октил	$(C_8H_{18}O_4P)_2Ca$		43,23	42,84	0,23
	Бутил	$(C_4H_{10}O_4P)_2Ca$		58,75	50,14	3,22
Основная	Додецил	$C_{12}H_{25}O_4PCa$	$0,5 Ca_2P_2O_7$	41,78	30,83	6,00
	Октил	$C_8H_{17}O_4PCa$		51,21	42,84	2,69
	Бутил	$C_4H_9O_4PCa$		66,15	50,14	3,41



400 °C – рентгеноаморфные продукты



600 °C – смесь  $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2 + \text{CaO} + \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$



1000 °C – смесь  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$

Рис. 4.23. Рентгенограммы алкилфосфатов кальция после термического разложения при: (а) 400 °C; (б) 600 °C (с  $\beta\text{-Ca}(\text{PO}_3)_2$  [9-163],  $\text{CaO}$  [48-1467] и ГАП [71-566] карточками ICDD PDF-2); (в) 1000 °C (с  $\beta\text{-ТКФ}$  [9-169] и  $\beta\text{-ПФК}$  [9-346] карточками ICDD PDF-2).

субмикронного размера. Додecilфосфат кальция, который плавится при 1000 °C в корундовом тигле (и при 969 °C при СТА – Рис. 4.22), обжигался при 900 °C и имеет наименьший размер частиц (порядка 300-400 нм). Фазовую эволюцию образующихся фосфатов кальция, особенно после 400 °C,

Для уточнения состава полученных алкилфосфатов кальция исследовали фазовый состав продуктов термолита. После 400 °C (Рис. 4.23а) были получены рентгеноаморфные продукты с широким гало при  $2\theta = 25 - 30^\circ$  за счет образования стеклообразного фосфата кальция и остаточного углерода. Морфология термолитованных порошков унаследована от исходных (Рис. 4.24) без каких-либо признаков испарения воды и выделения углекислого газа из его состава, за исключением бутилфосфата кальция, у которого пластинчатые частицы разрушены и предположительно гомогенно перемешаны с образовавшимся углеродом. Наличие остаточного углерода и соответствующий темный цвет таких порошков могут быть использованы для формирования состава материалов для стереолитографической 3D-печати, где такие порошки могут выступать как в качестве функционального наполнителя, так и в качестве фотопоглощающей добавки (красителя) для компенсации светорассеяния. При 600 °C (Рис. 4.23 б) происходило образование смеси ГАП ( $\text{Ca}/\text{P}=1,67$ ) и метафосфата кальция  $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$  ( $\text{Ca}/\text{P}=0,5$ ) с небольшим количеством оксида кальция. При 1000 °C (Рис. 4.23 в) эта смесь превращается в смесь  $\beta\text{-ТКФ}$  ( $\text{Ca}/\text{P}=1,5$ ) и  $\beta\text{-ПФК}$  ( $\text{Ca}/\text{P}=1$ ). Морфология порошков при 1000 °C представлена частицами произвольной формы

когда масса всех исследованных порошков практически постоянна по данным ТГА, можно объяснить пиролизом фосфатов и вероятным выделением паров фосфорной кислоты из алкилфосфатов при высоких температурах или твердофазным взаимодействием ГАП и метафосфата кальция, сопровождающимся наблюдаемыми экзотермическими эффектами на Рис. 4.22 (на кривых ДСК).

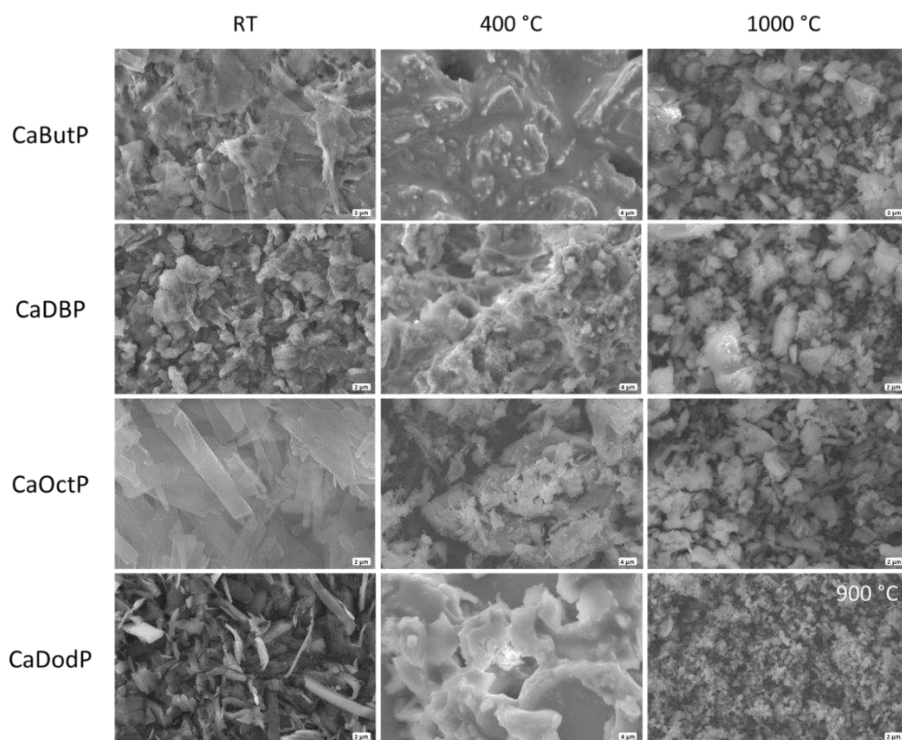


Рис. 4.24. Микрофотографии порошков алкилфосфата кальция (после синтеза) и после термолитза (при 400 и 1000°C).

### 4.3 Получение керамики на основе замещенных фосфатов кальция

Характер кривой термического разложения как незамещенного ОКФ, так и замещенных аналогов диктует стратегию получения керамики на основе таких соединений. Формование керамических заготовок целесообразно проводить после предварительной термической обработки порошков октакальциевых фосфатов из-за:

а) сложности спекания плотных бездефектных керамик при наличии сопутствующих процессов разложения исходного соединения и фазовых превращений;

б) упрощения процесса формования (в частности, в случае одноосного одностороннего прессования) предварительно разложенных соединений.

Для синтеза керамики на основе замещенных фосфатов кальция был выбран адипинат@ОКФ, который не содержал примесей образовавшихся соединений (ГАП) или остатков неподвергнувшихся гидролизу исходных частиц  $\alpha$ -ТКФ по данным рентгенофазового анализа. Из-за описанных в предыдущем разделе (см. раздел 4.2.1) особенностей термического разложения замещенных ОКФ, для получения плотной модельной керамики предпочтительно предварительное разложение таких соединений, в ходе которого выделяются вода и углекислый газ (за счет разложения карбоксилат-иона и удаления химически связанной воды).

Табл. 4.5. Плотности прессовок и образцов керамики на основе полупродуктов разложения  $Adi@OKF$ .

Образец керамики	$\rho_{таб},$ г/см <sup>3</sup>	$\rho_{кер},$ г/см <sup>3</sup>	$\rho_{таб}/\rho_{теор},$ %	$\rho_{кер}/\rho_{теор},$ %	$\Delta V/V_0,$ %	Твёрдость, HV (0,5/10) // ГПа
Adi-600-1000	1,5	1,7	50,8	58,7	7,9 ± 0,5	-
Adi-600-1100	1,5	2,1	50,7	71,7	21,0 ± 1,2	159 // 1,56
Adi-600-1200	1,5	1,9	52,1	67,5	15,4 ± 0,9	151 // 1,48
Adi-600-DT	1,5	2,3	50,7	80,8	30,2 ± 2,1	155 // 1,52
Adi-450-1000	1,5	1,7	51,2	57,5	6,2 ± 0,4	-
Adi-450-1100	1,4	2,0	49,9	70,8	20,9 ± 1,2	138 // 1,35
Adi-450-1200	1,5	1,9	50,6	67,1	16,5 ± 1,0	94 // 0,92
Adi-450-DT	1,5	2,2	50,8	76,5	25,7 ± 1,7	100 // 0,98
Adi-400-1000	1,4	1,7	50,2	58,1	7,9 ± 0,5	-
Adi-400-1100	1,4	2,0	49,6	69,9	20,3 ± 1,2	141 // 1,38
Adi-400-1200	1,5	2,0	52,1	69,0	16,9 ± 1,0	128 // 1,26
Adi-400-DT	1,4	2,3	49,6	79,6	30,0 ± 2,1	190 // 1,86

Для адипинат@ОКФ были выбраны температуры разложения 400, 450 и 600 °С. Такой выбор температур позволяет сравнить керамики при частичном (400-450 °С с различным остаточным содержанием углерода в составе) и полном разложении (600 °С) без начала конверсии замещенного ОКФ в высокотемпературные кальцийфосфатные фазы (ГАП, ТКФ, ПФК). Были приготовлены образцы плотной керамики  $\beta$ -ТКФ. Повышение температуры предварительной обработки ОКФ (400–600 °С) практически не влияет на усадку сформованной таблетки при обжиге (Табл. 4.5). Наибольшую усадку демонстрируют керамические образцы, получаемые при 1100 °С. С вышеописанными результатами согласуются измерения твёрдости полученной керамики – наибольшую твёрдость имеют образцы, спекаемые при 1100 °С и с предварительной обработкой прекурсора при 600 °С. Наименьшую плотность и твердость демонстрируют образцы, полученных из прекурсора, предварительно обожженного при 450 °С.

Погрешность измерения плотности прессовок и образцов керамики после обжига при 1000–1200 °С (время – 3 ч) составила  $\Delta\rho=0,10\div0,14$  г/см<sup>3</sup> ( $\rho_{теор}\approx 3,067$  г/см<sup>3</sup>). Погрешность измерения твёрдости образцов керамики составила 12÷18 HV.

Дилатометрические кривые показывают, что линейная усадка таблеток при 1200 °С

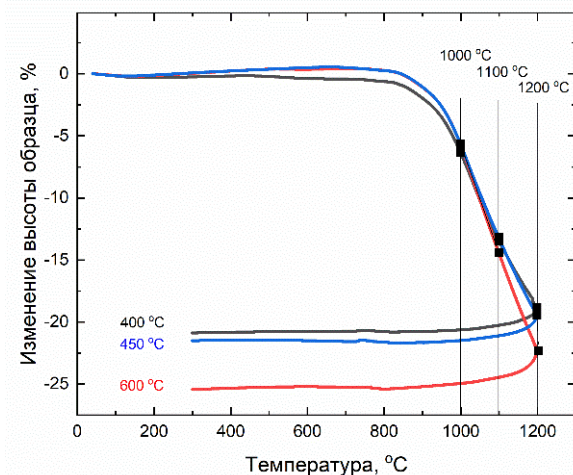


Рис. 4.25. Дилатометрические кривые полупродуктов термического разложения адипинат@ОКФ при 400–600 °С.

составляет от 20 (Adi-400) до 24 % (Adi-450) (Рис. 4.25), в то время как объёмная усадка достигала 30%. По данным РЭМ (Рис. 4.26) полученная керамика демонстрирует заметную пористость и однородность размеров зёрен (2–5 мкм). При подготовке сколов образцы оказывали высокое сопротивление излому. С ростом температуры спекания наблюдается увеличение размера зёрен и уменьшение общего числа и размера пор. Однородность микроструктуры позволяет судить об

отсутствии в системе кристаллов ГАП. Можно заметить, что при спекании в условиях дилатометрического эксперимента (Табл. 4.5, маркировка образцов DT) получается существенно повысить плотность до 80,8% (из порошка, предварительно обожженного при 600 °С по сравнению с обжигом в обычных условиях, что можно связать как с влиянием давления на образец (прижатие образца керамическим стержнем с усилием 30 мН во время дилатометрического эксперимента), так и с политермическим режимом спекания. И тот, и другой фактор могут влиять на дополнительное уплотнение образца при удалении остаточных газообразных продуктов (вследствие неполноты термолиза).

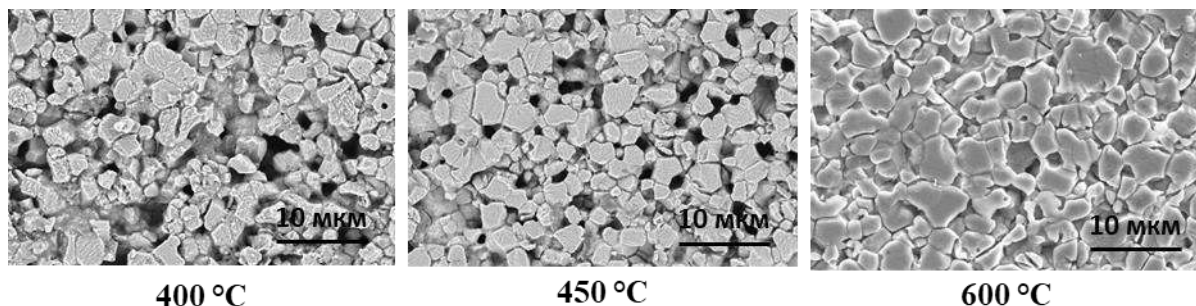


Рис. 4.26. Микроструктура шлифов плотных образцов керамик на основе адипинат@ОКФ, полученных после дилатометрии.

#### 4.4 Синтез гидрогелей

При подготовке данной главы использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М. В. Ломоносова, частично отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

**Tikhonov A.**, Evdokimov P., Klimashina E., Tikhonova S., Karpushkin E., Scherbackov I., Dubrov V., Putlayev V. Stereolithographic fabrication of three-dimensional permeable scaffolds from CaP/PEGDA hydrogel biocomposites for use as bone grafts // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 2020. Т. 110. С. 103922. doi:10.1016/j.jmbbm.2020.103922.

Кроме того, результаты, приведенные в данной главе, являются частью отчета по гранту РФФИ №17-79-20427, а также магистерской диссертации автора «Остеокондуктивные биоматериалы для костной пластики на основе гидрогелей, наполненных фосфатами кальция».

#### **4.4.1 Выбор компонентов для синтеза гидрогелей**

При создании костных имплантатов на основе гидрогелей особое внимание следует уделять цитосовместимости компонентов, используемых в процессе радикальной фотополимеризации: мономера, фотоинициатора, а также при необходимости красителя и добавок, модифицирующих реологию и стабильность раствора или суспензии. Помимо этого, сам полимеризованный гидрогель должен обладать биологической совместимостью. (Ди-)акрилатные производные ПЭГ являются коммерчески доступными соединениями с широким варьированием молекулярной массы. В данной работе исследовались ПЭГ-ДА с  $M_w=250$ , 575 и 700 Да. При комнатной температуре данные мономеры представляют собой жидкости. ПЭГ-ДА-250 имеет наименьшую длину цепочки и не смешивается с водой. Реакция фотополимеризации ПЭГ-ДА-250 носит выраженный экзотермический характер (вплоть до взрыва реакционной суспензии), а полученный продукт напоминает стекло, которое при помещении в воду не набухает. ПЭГ-ДА-575 и 700 хорошо смешиваются с водой. Наличие воды в гидрогелях обуславливает их вязкоупругие механические свойства, поэтому при введении в состав фотосуспензии большого количества воды получают гидрогели с большим вкладом вязкой компоненты. В ходе работы исследовались следующие составы суспензий (масса мономера/масса воды): 100/0, 50/50 и 25/75.

#### **4.4.2 Выбор фотоинициатора**

При выборе фотоинициатора было необходимо учитывать спектр источника излучения для полимеризации. Так, излучение светодиодов СВТ-39-UV LEDs, установленных в принтере Ember, который используется в работе для стереолитографической печати гидрогелей, наблюдается при 390–440 нм и имеет максимум при 405 нм (Рис. 4.27).



## Стереолитографический принтер Ember

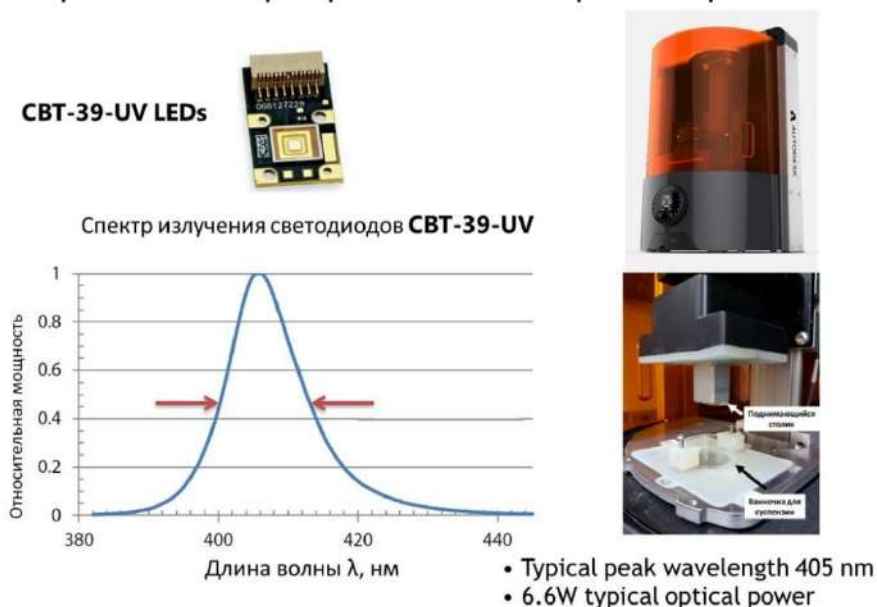

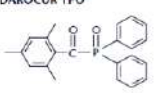
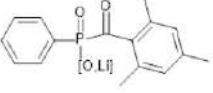
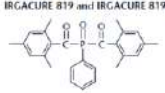


Рис. 4.27. Спектр светодиодов CBT-39-UV LEDs принтера Ember (по данным производителя).

Среди коммерчески доступных инициаторов можно выделить Irgacure®819 (I819) (Фенилбис(2,4,6-триметилбензоил)фосфин оксид) и ТРО (Дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфин оксид), представляющие фосфин оксиды (Рис. 2.20). На Рис. 4.28 представлены зависимости молярных коэффициентов экстинкции  $\epsilon$ . При  $C=10^{-3}$ М при длине волны 405 нм  $\epsilon(I819) = 345,8 \text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ , а  $\epsilon(\text{ТРО}) = 194,4 \text{ М}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ . Поскольку в состав фотосuspензии входит вода, то для получения однородной фотосuspензии необходимо подобрать водорастворимый ФИ. Так, широко используется ФИ Irgacure®2959, растворимость которого составляет около 10 г/л (1 масс. %). Однако, спектр поглощения сдвинут в УФ-область, и ФИ начинает работать при длинах волн меньше 380 нм, что требует дополнительной модификации источника излучения 3D-принтера Ember. Кроме того, были рассмотрены фотоинициаторы Irgacure®819 DW (Omnirad), ТРО-Li (США), а также APi-180 (Китай).

С учетом растворимости Irgacure®819 в воде (3,06 г/л – по экспериментальным данным, 0,1 мг/л – по литературным данным) и в этиловом спирте – 43,2 г/л; растворимости ТРО в воде – 11,6 мг/л; чуть большей экстинкции Irgacure®819 и примерно одинаковой токсичности (полулетальная доза составляет около 2 г ФИ на 1 кг массы здоровой крысы: при стандартном весе крысы в 300 г полулетальная доза составляет 0,6 г ФИ), предпочтение отдавалось первому инициатору. Помимо этого, была определена растворимость I819 в ПЭГ-ДА-700 – 50,7 г/л (5 масс. %).

Табл. 4.6. Свойства коммерчески доступных фотоинициаторов.

	Irgacure®819	TPO	API-180	TPO-Li	Irgacure®819 DW
Название	Фенилбис(2,4,6-триметилбензоил)фосфин оксид	Дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфин оксид	2-гидрокси-1-[3-(гидроксиметил)фенил] 2-метил-1-пропанон	Дифенил(2,4,6-триметилбензоил)фосфин оксид (соль лития)	Фенилбис(2,4,6-триметилбензоил)фосфин оксид (45% водная суспензия)
Структурная формула					
Растворимость в воде, г/л	3,1	0,012	74	47	-
$\epsilon$ при $\lambda=405$ нм, $M^{-1}\cdot cm^{-1}$	345,8	194,4	6,5	210,7	234,9

Концентрация фотоинициатора оказывает влияние на скорость и глубину полимеризации, а также на степень конверсии мономера, что позволяет управлять плотностью сшивки гидрогелей, их механическими свойствами и пределом набухания. На Рис. 4.29 и в Табл. 4.7 приведены зависимости глубины полимеризации от дозы излучения (логарифмическая координата). Для гидрогелей, не содержащих воды в исходном составе, значения фоточувствительности составляли  $0,46 \div 0,6$  мм (для 700 Да) и  $0,7$  мм (для 575 Да).

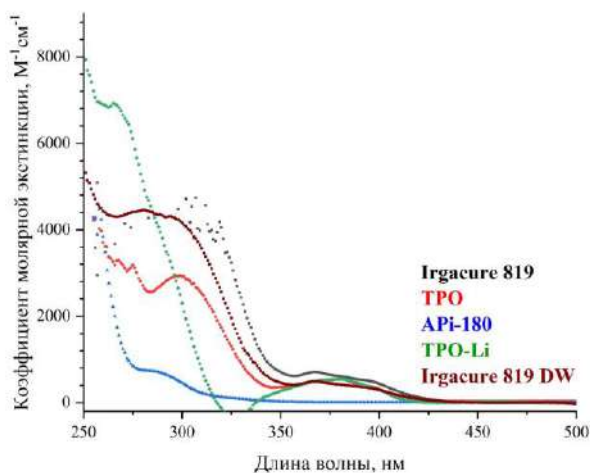


Рис. 4.28. Экспериментальные УФ-видимые спектры поглощения коммерческих фотоинициаторов ( $C=10^{-3}M$ ).

При введении в состав суспензии воды (50% по массе) фоточувствительность и критическая энергия полимеризации значительно возрастали, вероятно из-за изменения показателя преломления среды ( $n_D^{20}(P-575, P-700) = 1,47$  и  $n_D^{20}(H_2O) = 1,33$ ). При большем разбавлении ПЭГДА водой (до

состава P-700\_25) критическая энергия полимеризации возрастает до нескольких сотен мДж/см<sup>2</sup>, при этом для получения оптически однородной суспензии необходимо добавлять этанол, который растворяет ФИ.

Поскольку полученные суспензии являются оптически прозрачными и имеют высокие показатели фоточувствительности, то даже небольшое превышение дозы облучения над критической сразу полимеризует мономер на глубину более 1 мм, что даже при хорошем латеральном разрешении в 50 мкм (по данным РЭМ (Рис. 4.30) на поверхности гидрогеля можно увидеть отпечатки от отдельных микрозеркал DMD-чипа проектора) при послойной разбивке печати менее 1 мм будет происходить полимеризация неэкспонированного участка предыдущего слоя, т.е. разрешение по оси z будет в разы хуже.

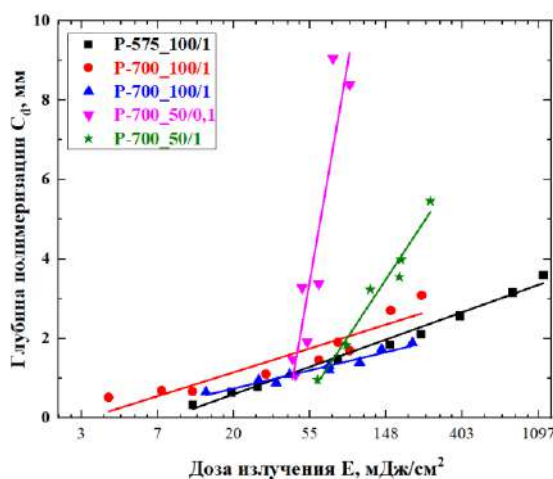


Рис. 4.29. Зависимость глубины полимеризации от дозы излучения гидрогеля P-575 и 700 с различным содержанием фотоинициатора 1819 (0,1 и 1 масс. % от мономера) и воды.

Табл. 4.7. Значения фоточувствительности суспензий  $D_p$  и критической энергии полимеризации  $E_c$ .

Обозначение	$C_d = C_d(E)$	$D_p$ , мм	$E_c$ , мДж/см <sup>2</sup>
<b>P-575_100/1</b>	$0,69\ln E - 1,46$	$0,69 \pm 0,03$	$8,37 \pm 1,19$
<b>P-700_100/1</b>	$0,60\ln E - 0,65$	$0,6 \pm 0,09$	$2,95 \pm 1,94$
<b>P-700_100/1</b>	$0,46\ln E - 0,632$	$0,46 \pm 0,04$	$3,97 \pm 1,32$
<b>P-700_50/0,1</b>	$10,96\ln E - 40,38$	$10,96 \pm 2,12$	$39,76 \pm 16,19$
<b>P-700_50/1</b>	$2,90\ln E - 11,03$	$2,90 \pm 0,27$	$44,58 \pm 9,62$

Для определения степени конверсии двойных связей C=C при полимеризации гидрогелей использовалась ИК-спектроскопия. На Рис. 4.31 представлены спектры пропускания (НПВО)

приготовленной суспензии (до УФ воздействия) и твердого гидрогеля (после УФ воздействия, при  $\lambda=365$  нм и  $W \approx 5$  мВт/см<sup>2</sup>). До УФ полимеризации можно наблюдать полосы, соответствующие валентным колебаниям  $\nu$  ОН-групп (3600-3100 см<sup>-1</sup>),  $\nu_s$  и  $\nu_{as}$  С-Н связей (2860 см<sup>-1</sup>),  $\nu$  (С=О) (1720 см<sup>-1</sup>),  $\nu$  (С=C) (1640 и 1625 см<sup>-1</sup>, 1410 см<sup>-1</sup>), деформационным колебаниям  $\delta$  ОН-групп (1640 см<sup>-1</sup>) и  $\nu$  (С-О-С) (1100 см<sup>-1</sup>). После УФ-полимеризации и хранения образца на воздухе в течение нескольких суток происходило осушение гидрогеля, в результате чего на спектрах исчезали полосы поглощения, относящиеся к колебаниям ОН-групп. Наличие большого числа полос поглощения в диапазоне 1400–800 см<sup>-1</sup> затрудняет проведение как качественного анализа, так и количественного.

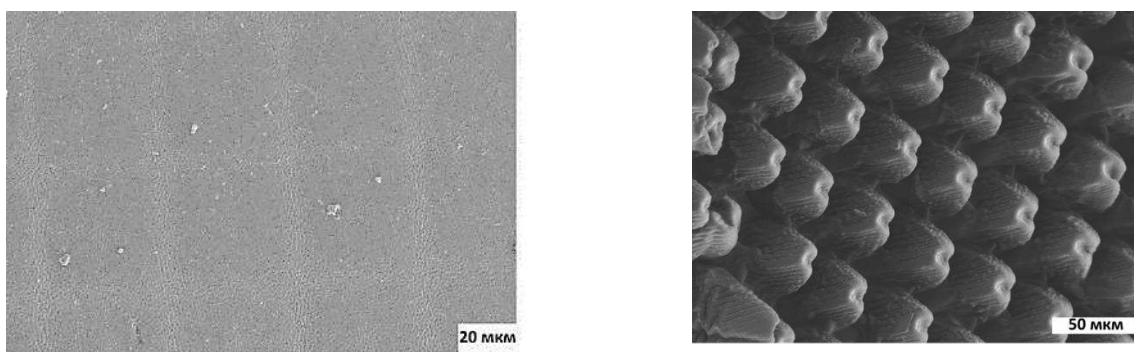


Рис. 4.30. Морфология поверхности образцов P-575\_100/0,1, демонстрирующая отпечатки микрзеркал DMD-чипа (слева – с ограничением толщины слоя при полимеризации, справа – без ограничения).

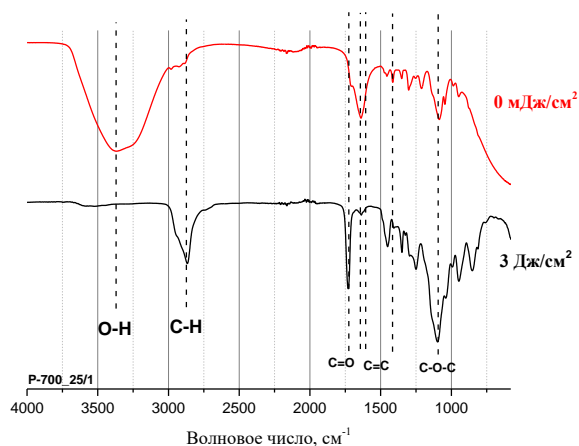


Рис. 4.31. Спектры пропускания P-700\_25/1 до и после фотополимеризации.

Поскольку в ходе полимеризации происходит уменьшение числа связей С=C, а число связей С=О остается неизменным, то логичным видится проведение количественного анализа площадей полос поглощения, соответствующих колебаниям связи С=C (при 1640 и 1625 см<sup>-1</sup>) и С=О (1720 см<sup>-1</sup>). В ходе полимеризации происходит раскрытие двойных связей винильных групп под действием свободных радикалов фотоинициатора, вследствие чего происходит линейный или разветвленный рост цепи ПЭГ-ДА (Рис. 4.32).

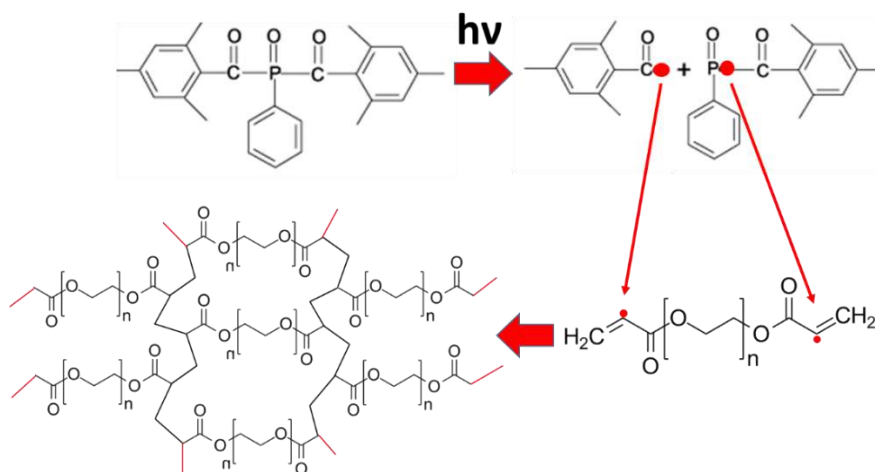


Рис. 4.32. Схема фотополимеризации ПЭГ-ДА под действием фотоинициатора Irgacure®819.

На Рис. 4.33 представлены спектры пропускания исходных суспензий и заполимеризованных гидрогелей с различным содержанием фотоинициатора при одинаковой дозе излучения. Интенсивность полосы поглощения C=C меньше в случае большего содержания фотоинициатора при неизменной интенсивности полосы поглощения C=O.

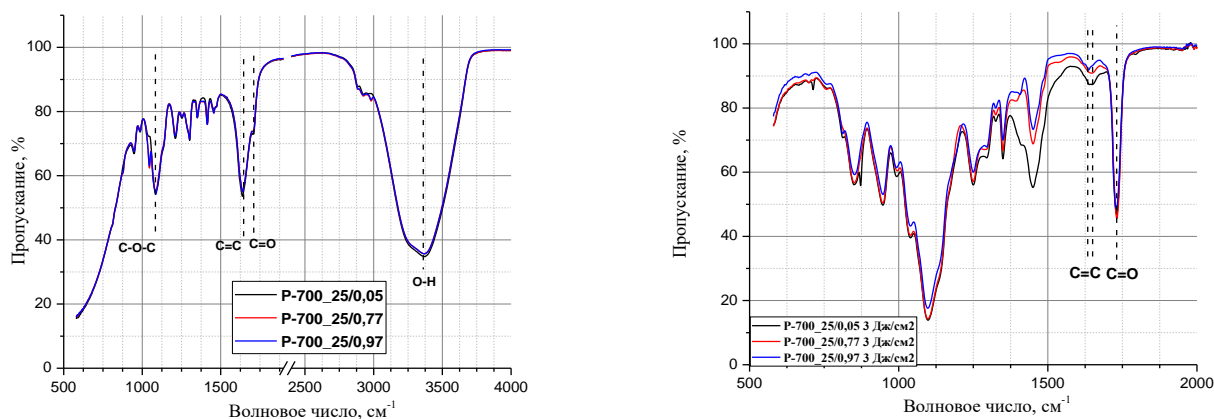
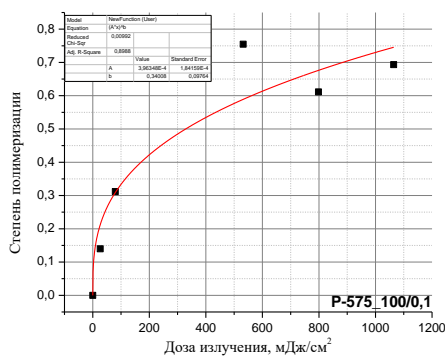


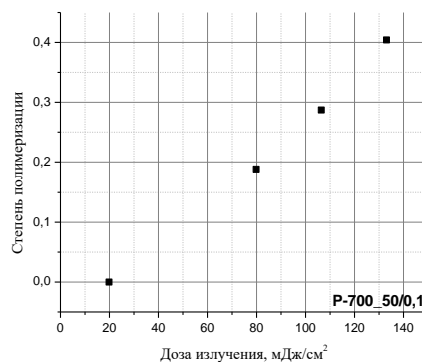
Рис. 4.33. Спектры пропускания P-700\_25 с различной концентрацией фотоинициатора Irgacure®819 до полимеризации (слева) и после полимеризации в УФ-лампе при  $\lambda=365$  нм (доза излучения  $\approx 3$  Дж/см<sup>2</sup>) (справа).

На Рис. 4.34 представлены кривые зависимостей рассчитанных степеней конверсии C=C суспензий от дозы излучения. Так, при дозе, равной 1,2 Дж/см<sup>2</sup> степень конверсии C=C составляет порядка  $0,7 \pm 0,8$ . По приведенным зависимостям сложно говорить о том, что увеличение концентрации ФИ приводит к большей степени конверсии C=C, однако, при 0,1 масс.% ФИ при дозе 1 Дж/см<sup>2</sup> зависимость стремится выйти на постоянные значения ( $\alpha=0,70 \pm 0,05$ ), в отличие от

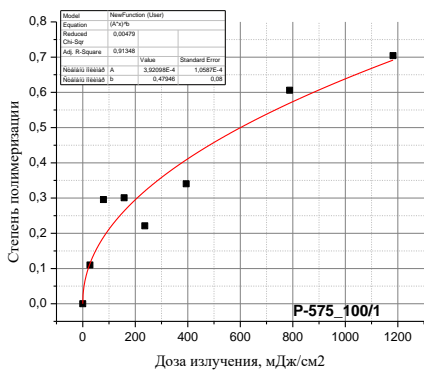
1 масс. % ФИ, при котором зависимость продолжает расти. При одностороннем облучении фотосуспензии интенсивность излучения экспоненциально падает вглубь объема фотосуспензии (формула 2.19<sup>1</sup>). Так, на Рис. 4.34 г разность в степени конверсии  $C=C$  ближней и дальней поверхности составляет около  $0,3 \div 0,4$ . Полученное значение  $\alpha$  в результате анализа ИК-спектра образца с дальней поверхности (красный кружок) составило  $0,37$ , а по построенной аппроксимационной кривой с учетом ослабления дозы излучения на глубине  $1$  см (толщина исследуемого образца –  $1$  см,  $D_p=0,88$  мм) –  $\alpha=0,41$ .



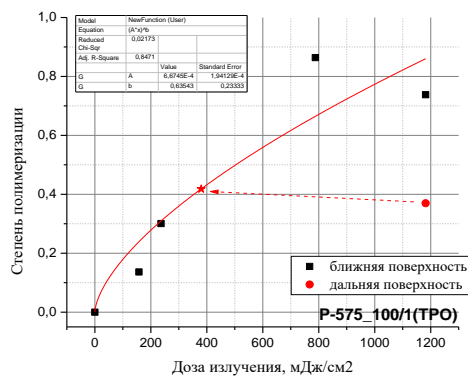
а)



б)



в)



г)

Рис. 4.34. Зависимость степени полимеризации (степени конверсии  $C=C$ ) от дозы для различных составов гидрогелей.

Таким образом, для достижения приблизительно одинаковой степени конверсии  $C=C$  гидрогеля по всему объему необходимо либо производить засветку суспензии со всех сторон одинаково (использование зеркал, пост-обработка образцов), либо задавать дозу излучения, которая полимеризует слой, на порядок меньший по сравнению с фоточувствительностью суспензии.

<sup>1</sup>  $W = W_0 \cdot e^{-\left(\frac{x}{D_p}\right)}$  (2.19)

#### 4.4.3 Выбор красителя

Для замедления полимеризации суспензии в её состав вводят поглотители (ингибиторы) полимеризации, либо красители. Как правило, УФ-поглотители являются цитотоксичными и плохо растворяются в воде. Красители же используются в процессе стереолитографической печати для улучшения латерального разрешения в малых количествах (несколько сотых массовых процента). В качестве водорастворимых биосовместимых красителей используются пищевые добавки ряда *E* (Рис. 4.35). Для эффективного поглощения излучения при длине волны  $\lambda=405$  нм они должны иметь желтую или оранжевую окраску.



Рис. 4.35. Внешний вид водных растворов красителей *E* ( $C=10^{-5}$  М в колбах и 0,2 масс. % в маленьких баночках) слева направо: E102, E104, E110, E122, E124, E129 (Табл. 12.1).

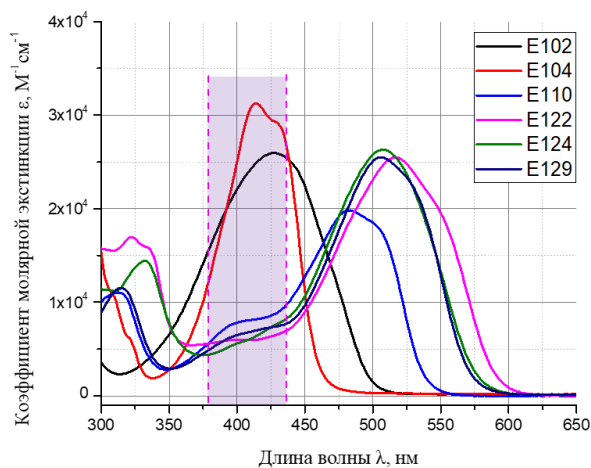


Рис. 4.36. УФ-видимые спектры поглощения пищевых красителей *E* ( $C=10^{-5}$  М) (пунктиром обозначен диапазон излучения светодиодов).

Спектры поглощения водных растворов красителей представлены на Рис. 4.36. Так, наибольший коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon$  при 405 нм имеет краситель E104 хинолиновый

желтый. Также перспективным выглядит краситель E102 тартразин, который также имеет максимум поглощения в спектре светодиодов принтера Ember.

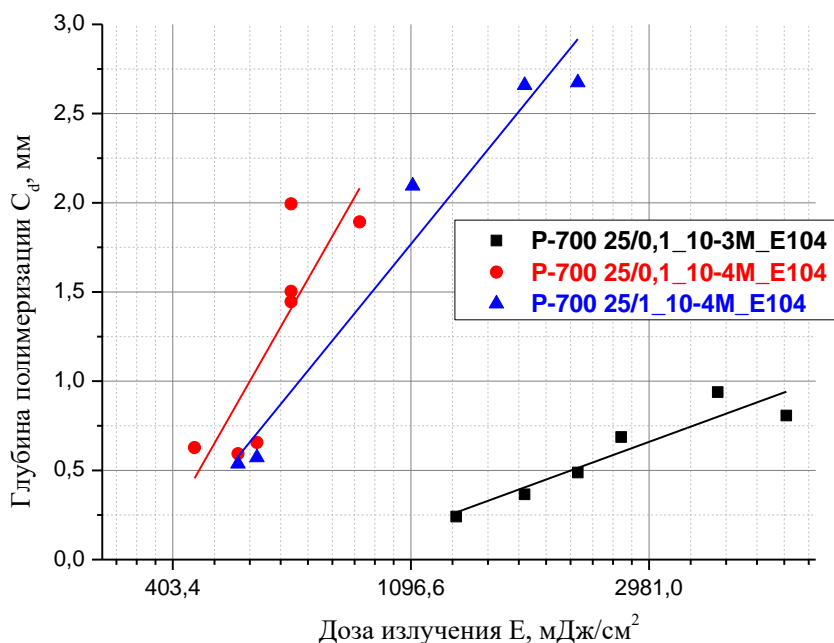


Рис. 4.37. Зависимость глубины полимеризации от дозы излучения гидрогеля P-700/25 с различным содержанием красителя E104 ( $10^{-3}$ М и  $10^{-4}$ М) фотоинициатора I819 (0,1 и 1 масс. % от мономера).

Табл. 4.8. Значения фоточувствительности суспензий P-700\_25  $D_p$  и критической энергии полимеризации  $E_c$ .

Обозначение	$C_d=C_d[E]$	$D_p$ , мм	$E_c$ , мДж/см <sup>2</sup>
<b>P-700_25/0,1_1E-3M_E104</b>	0,49lnE-3,25	0,49±0,09	775,64±326,42
<b>P-700_25/0,1_1E-4M_E104</b>	2,35lnE-13,83	2,35±0,69	363,72±223,79
<b>P-700_25/1_1E-4M_E104</b>	1,64lnE-9,71	1,64±0,20	373,14±96,81

Таким образом, в качестве красителя при создании фотосуспензий был выбран E104.

Как видно из Рис. 4.37 и Табл. 4.8 суспензии на основе 25 масс. % мономера при добавлении красителя имеют большие значения критической энергии полимеризации, что будет значительно сказываться на времени стереолитографической печати. Добавление  $10^{-3}$  М красителя повышает  $E_c$  более чем в два раза по сравнению с  $10^{-4}$  М красителя.

При увеличении количества воды в суспензии приемлемые значения фоточувствительности (0,4÷0,5 мм) достигаются при введении в суспензию  $5 \cdot 10^{-4}$  М красителя (0,024 масс. %). При этом



критическая энергия полимеризации составляет  $68,32 \pm 23,31$  мДж/см<sup>2</sup> для состава **P-700\_50/1\_5E-4M\_E104**. Для печати слоя толщиной 200 мкм требуется 2÷2,5 секунды воздействия излучения, что позволяет достаточно быстро проводить печать моделей малых размеров.

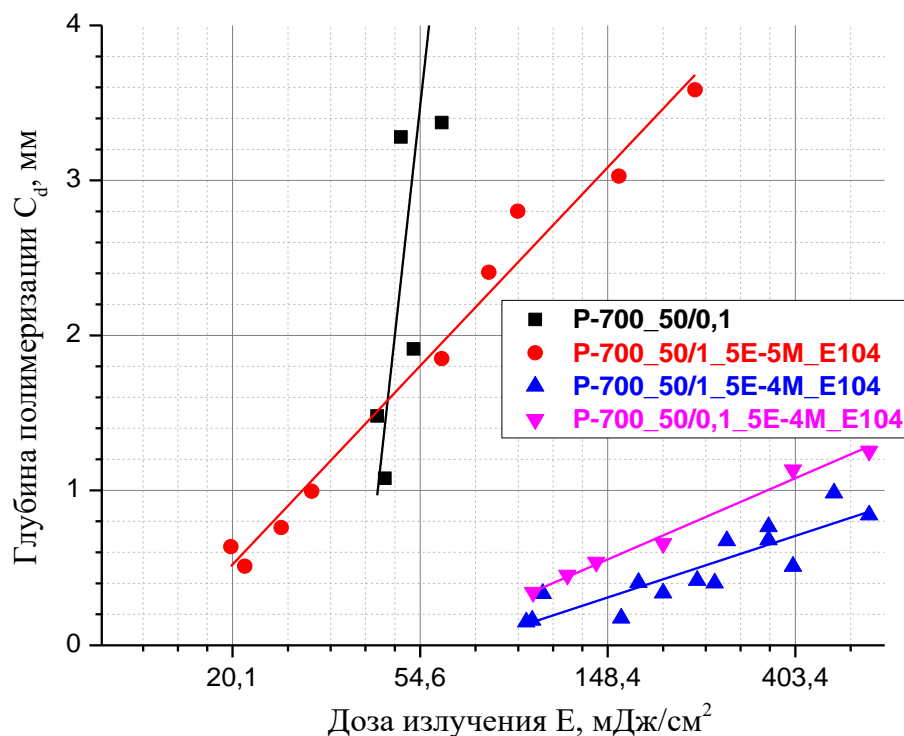


Рис. 4.38. Зависимость глубины полимеризации от дозы излучения гидрогеля P-700\_50 с различным содержанием красителя E104 ( $10^{-3}M$  и  $10^{-4}M$  от мономера), фотоинициатора Irgacure®819 (0,1 и 1 масс. % от мономера) и воды.

Стоит отметить, что помимо добавления красителя большее содержание ФИ (Рис. 4.37, Рис. 4.38, Табл. 4.8) позволяет снизить фоточувствительность суспензии. Введение в состав красителя несколько замедляет реакцию полимеризации за счёт поглощения фотонов первичного излучения, что выражается в меньшей конверсии C=C гидрогелей по сравнению с образцами без добавления красителя (Рис. 4.39). Тем не менее, значения конверсии C=C стремятся к 0,7, что сопоставимо со значениями, представленными на Рис. 4.34.

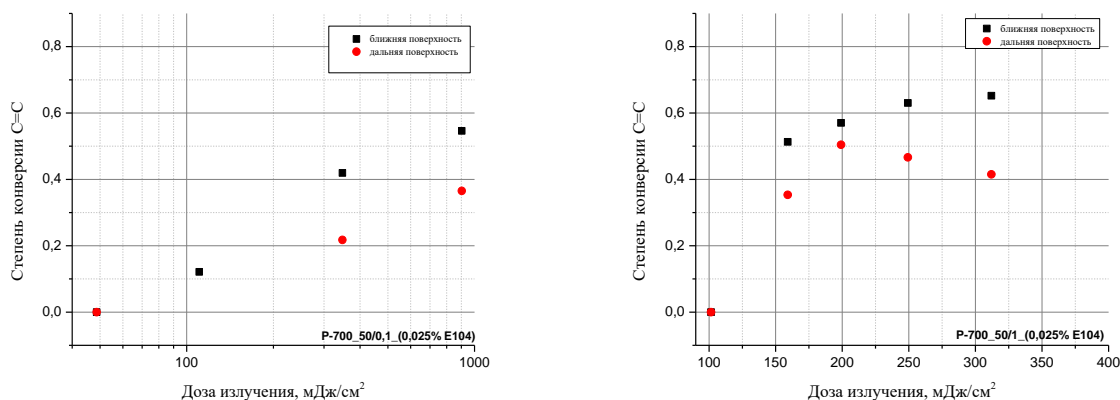


Рис. 4.39. Зависимость конверсии  $C=C$  от дозы излучения для гидрогелей (толщина образцов – 200 мкм) состава P-700\_50 с разным содержанием ФИ и одинаковым содержанием красителя.

#### 4.5 Апробация способов наполнения гидрогелей фосфатами кальция

При подготовке данной главы использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М. В. Ломоносова, частично отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

**Tikhonov A.,** Evdokimov P., Klimashina E., Tikhonova S., Karpushkin E., Scherbackov I., Dubrov V., Putlayev V. Stereolithographic fabrication of three-dimensional permeable scaffolds from CaP/PEGDA hydrogel biocomposites for use as bone grafts // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 2020. Т. 110. С. 103922. doi:10.1016/j.jmbbm.2020.103922.

**Тихонов А.А.,** Климашина Е.С., Евдокимов П.В., Кукуева Е.В., Бирюков А.С., Путляев В.И., Щербаков И.М., Дубров В.Э. Дикарбоксилатзамещенные октакальциевые фосфаты для наполнения гидрогелей и изготовления резорбируемой керамики // Перспективные материалы. 2020. Т. 12. С. 27–41. doi:10.30791/1028-978x-2020-12-27-41.

Кроме того, результаты, приведенные в данной главе, являются частью отчета по гранту РНФ №17-79-20427, а также магистерской диссертации автора «Остеокондуктивные биоматериалы для костной пластики на основе гидрогелей, наполненных фосфатами кальция».

##### 4.5.1 Оценка стабильности порошков фосфата кальция в гидрогелях

ОКФ – термодинамически нестабильная фаза, которая в околонеutralной и щелочной средах превращается в ГАП. По этой причине необходимо знать время кинетической стабильности ОКФ в среде данного состава. Дифрактограммы порошков ОКФ после выдерживания в воде в течение 1, 6 часов и 1, 2 дней при постоянном перемешивании представлены на Рис. 4.40. Такие временные

интервалы были выбраны исходя из типичных времен хранения фотосуспензии перед фотополимеризацией в данной работе. По данным РФА после выдерживания ОКФ в воде и растворе мономера ПЭГ-ДА с водой (Рис. 4.40-Рис. 4.41) не происходит появления новых фаз, что свидетельствует о стабильности ОКФ в воде в данные сроки.

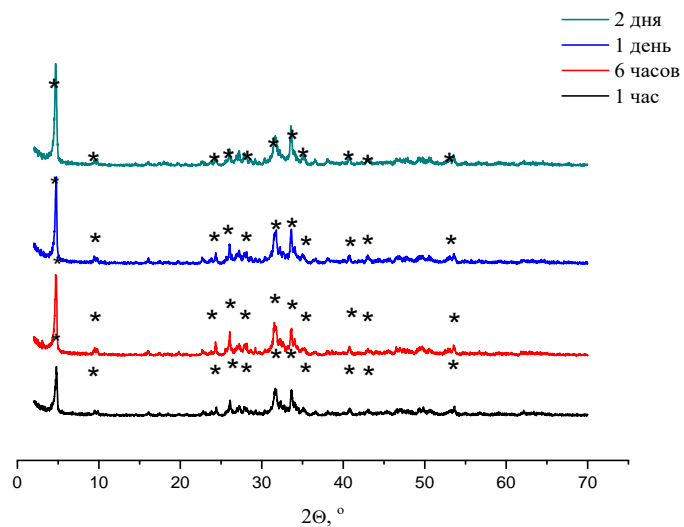


Рис. 4.40. Дифрактограммы порошка ОКФ после выдерживания в воде. (\*) помечены пики соответствующие ОКФ.

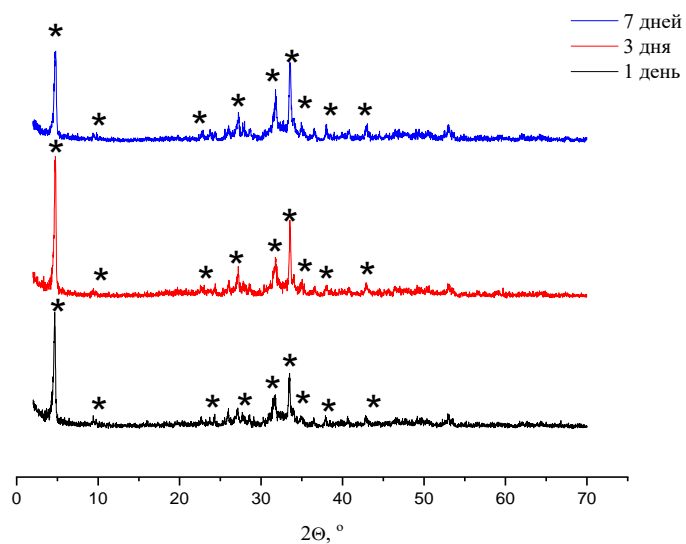


Рис. 4.41. Дифрактограммы порошка ОКФ после выдерживания в растворе мономера ПЭГ-ДА +  $H_2O$ . (\*) помечены пики соответствующие ОКФ.

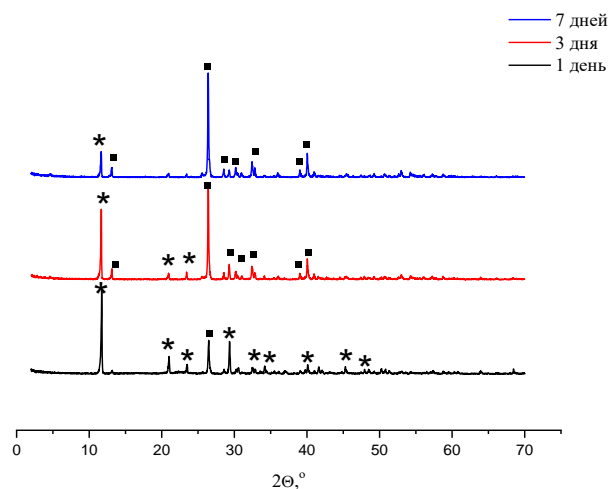


Рис. 4.42. Дифрактограммы порошка брусшита после выдерживания в водном растворе мономера ПЭГ-ДА. (\*) помечены пики соответствующие брусшиту, (■) – монетиту.

При выдерживании порошка брусшита в мономере ПЭГ-ДА (Рис. 4.42) происходит появление новой фазы монетита  $\text{CaHPO}_4$ , что, по-видимому, связано с тем, что мономер забирает кристаллизационную воду у брусшита, образуя раствор. При увеличении сроков выдерживания происходит увеличение доли фазы монетита, и после 7 суток перемешивания порошка при комнатной температуре происходит практически полное превращение брусшита в монетит.

Алкилфосфаты кальция, исследуемые в данной работе, также показали неизменность фазового состава при помещении в раствор ПЭГ-ДА-700 с водой (см. 11 Приложение).

#### 4.5.2 Выращивание кристаллов брусшита диффузией ионов $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ или $\text{Ca}^{2+}$

Выращивание кристаллов брусшита в гидрогеле ПЭГ-ДА осуществлялось с помощью диффузии ионов  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  или  $\text{Ca}^{2+}$  из раствора в объем геля, содержащего  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , соответственно. Несомненным преимуществом данного способа является возможность избежать проблем недостаточной устойчивости фотосуспензии к седиментации и присутствия частиц фосфатов, которые рассеивают излучение, в результате чего ухудшается латеральное разрешение 3D-печати.

Максимальное количество солей обуславливается их растворимостью в воде при условиях синтеза (Табл. 3.1), учитывая практически полную нерастворимость в органической фазе – ПЭГ-ДА. Так, при диффузии ионов  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  в заполимеризованный гидрогель, содержащий ион  $\text{Ca}^{2+}$ , можно достичь максимального наполнения в 57,72% (см. Табл. 3.1), однако ион кальция более диффузионно-подвижен в объеме гидрогеля из-за своих малых размеров, что в конечном итоге приводит к тому, что кристаллы фосфатов кальция образуются не в объеме геля, а на границе

гель/раствор со стороны раствора, или даже в растворе (Рис. 4.45). При диффузии ионов кальция из раствора в заподимеризованный гидрогель, содержащий эквимольную смесь гидро- и дигидрофосфата натрия, происходит помутнение геля с образованием смеси брушита и ОКФ согласно РФА (Рис. 4.43), что вероятно происходит из-за щелочного рН раствора гидрофосфата натрия. При введении смеси гидро- и дигидрофосфата в соотношении, задающем рН=5 в растворе, в качестве единственного продукта наблюдается брушит, что подтверждает необходимость контроля рН. На Рис. 4.44 приведено сравнение морфологии двух вариантов гидрогелей (в геле фосфатный анион или катион кальция). В случае катиона кальция морфология гидрогелей не отличается от ненаполненных аналогов. Поверхность скола гидрогеля гладкая и соответствует хрупкому характеру разрушения. При этом поверхность самого образца сморщивается, образуя складки субмикронной величины, предположительно, из-за выделения воды из объема гидрогеля. В случае фосфатных анионов на поверхности и сколах наблюдаются мелкие частицы другой фазы, по-видимому, (ди-)гидрофосфата натрия.

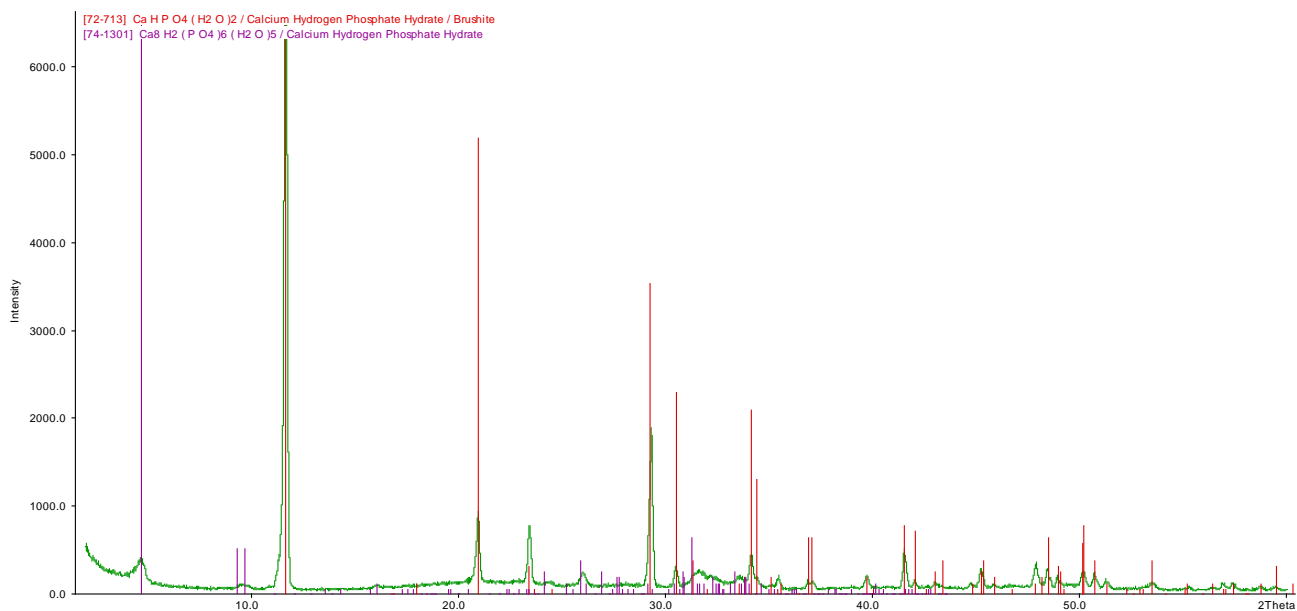


Рис. 4.43. Рентгенограмма порошка, полученного при выдерживании в течение суток гидрогеля P-700\_50/1\_(1,25M\_CaCl<sub>2</sub>) в избытке раствора гидрофосфата натрия, штрих-диаграмма соответствует карточкам [72-713] (брушит) и [74-1301] (ОКФ) базы ICDD PDF-2.

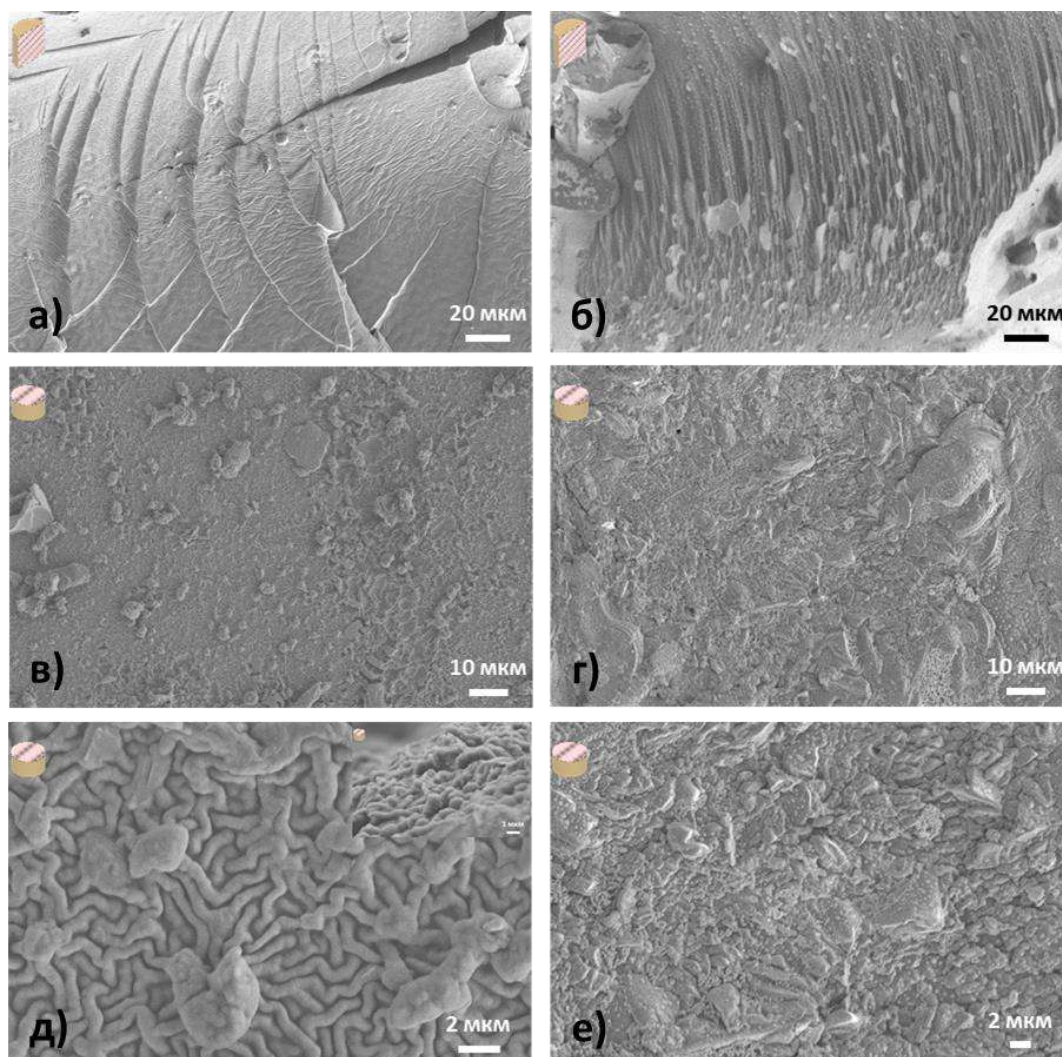


Рис. 4.44. Морфология поверхности и скола гидрогелей  $P-700_{50/0,1_{1,25M_{CaCl_2}}$  (а, в, д) и  $P-700_{50/1_{5E-4M_{E104}}(Na_2HPO_4+NaH_2PO_4)$  (рН=5) (б, г, е) после фотополимеризации с водными растворами солей.

Можно заметить, что в обоих случаях хотя и происходит формирование фосфатных кристаллов внутри геля, однако, они неоднородно распределены в объеме геля, более плотно вблизи поверхности геля, контактирующей с раствором (Рис. 4.45). На поверхности помимо агрегированных пластинчатых частиц можно наблюдать кристаллы нитевидной формы (Рис. 4.45 в), вытянутые в сторону раствора и образующиеся в результате диффузии ионов  $Ca^{2+}$  под действием осмотического давления и капиллярных сил (в литературе приведены данные об образовании ГАП по подобному механизму).

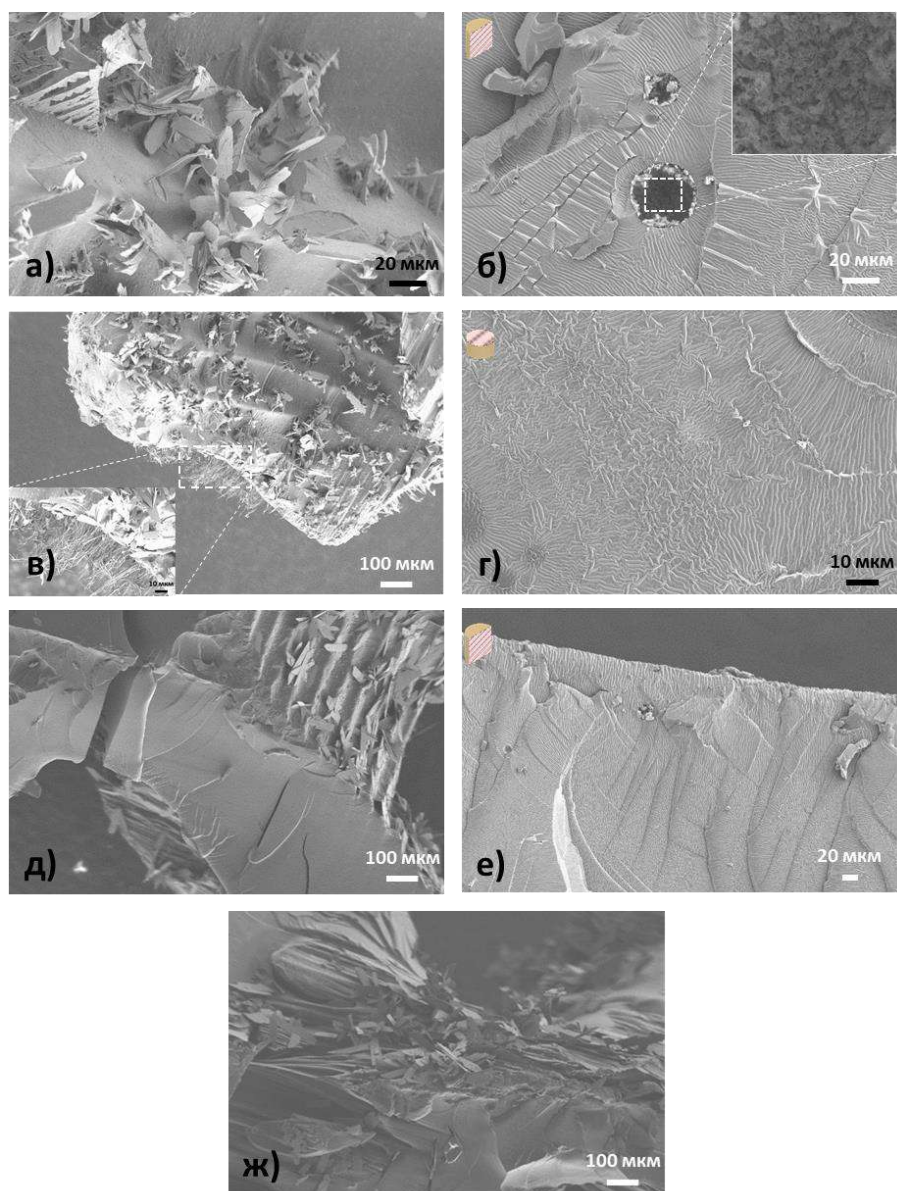


Рис. 4.45. Морфология гидрогелей (с  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) после выдерживания в растворе соответствующей соли: поверхность (а, в) и скол (д) образца со структурой «гиририд» P-700\_50/1\_5E-4M\_E104\_1,25M\_CaCl<sub>2</sub>, вымоченный в течение 1 суток в буферном растворе NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH=5); поверхность (г) и скол (б, е) плотного образца P-700\_50/0,1\_0,1M\_NaHPO<sub>4</sub>, вымоченный в течение 1 суток в избытке раствора CaCl<sub>2</sub>; поверхность образца со структурой «гиририд» P-700\_50/1\_5E-4M\_E104\_1,25M\_CaCl<sub>2</sub>, вымоченный в течение 1 суток в избытке Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (ж).

Рентгенограмма, снятая с поверхности гидрогеля, вымоченного в течение суток в растворе гидрофосфата натрия, указывает на образование рентгеноаморфного продукта (Рис. 4.46). Некоторые рефлексы можно отнести к фазам брушита и хлорида натрия, которые образуются при взаимодействии хлорида кальция и гидрофосфата натрия.

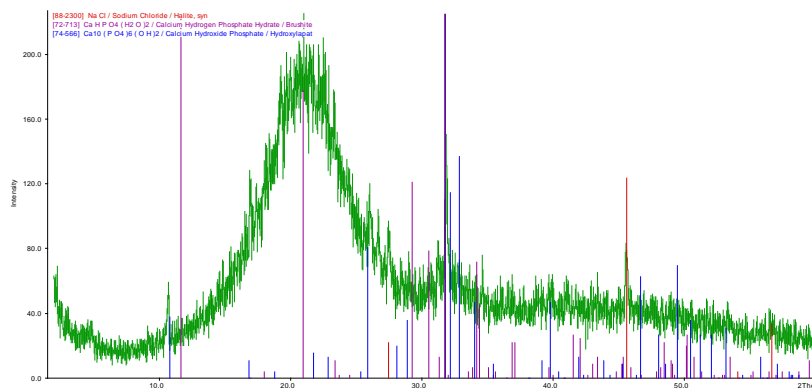


Рис. 4.46. Рентгенограмма гидрогеля P-700\_50/1\_ (1,25M CaCl<sub>2</sub>), вымоченного в избытке раствора гидрофосфата натрия, штрих-диаграмма соответствует карточкам [72-713] (брушит), [74-566] (ГАП), [88-2300] (NaCl) базы ICDD PDF-2

Фоточувствительность суспензий при различном содержании и типе солевой компоненты (хлорид кальция или гидрофосфат натрия) практически не меняется и в основном определяется концентрацией красителя (Табл. 4.9, Рис. 12.1).

Табл. 4.9. Значения фоточувствительности  $D_p$  суспензий P-700\_50 и критической энергии полимеризации  $E_c$ .

Обозначение	$C_d=C_d[E]$	$D_p$ , мм	$E_c$ , мДж/см <sup>2</sup>
P-700_50/1_	0,56lnE-1,87	0,56±0,05	27,93±5,81
5E-4M_E104_1,25M CaCl <sub>2</sub>			
P-700_50/1_	3,18lnE-10,05	3,18±0,34	23,49±5,74
5E-5M_E104_1,25M CaCl <sub>2</sub>			
P-700_50/1_	0,56lnE-1,10	0,56±0,04	7,23±1,45
5E-4M_E104_2,5M CaCl <sub>2</sub>			
P-700_50/1_	0,58lnE-2,16	0,58±0,06	41,70±10,05
5E-4M_E104_0,25M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			
P-700_25/0,1_	0,79lnE-4,30	0,79±0,07	228,69±45,88
7,5E-4M_E104_3,75M CaCl <sub>2</sub>			

Таким образом, данный подход к наполнению гидрогелей фосфатами кальция в варианте односторонней диффузии практически не реализуем из-за высокой плотности гидрогелевого каркаса, вследствие чего частицы брушита выпадают в основном на интерфейсе гидрогель/раствор. Ограничить высокую скорость диффузии ионов Ca<sup>2+</sup> можно с помощью реализации варианта двойной диффузии, при этом может возникнуть проблема кристаллизации достаточно крупных кристаллов. Помимо этого, не вполне ясно, каким образом можно будет проводить «нагружение» растущих внутри гидрогеля кристаллов специальными белками для придания остеоиндуктивных свойств в случае необходимости изготовления подобных функционализированных имплантатов.



### 4.5.3 Конверсия фосфатов в объеме гидрогеля

Из-за пластинчатой морфологии слоистых фосфатов кальция не удаётся достичь высоких степеней наполнения, вследствие чего гидрогели наполнялись порошками  $\alpha$ -ТКФ. Кроме того, при введении в состав фотосуспензии готовых пластинчатых кристаллов фосфатов кальция возникают проблемы, связанные с седиментацией частиц и их агрегированием. Использование  $\alpha$ -ТКФ, помимо увеличения степени наполнения гидрогелей, обладает другим преимуществом, таким как возможность избежать проблемы потери устойчивости фотосуспензии к седиментации. В результате эксперимента удалось достигнуть степени наполнения 60 масс.% (24 об.%), что значительно превышает степень наполнения ОКФ и брушитом (10 - 15 масс.%). При этом введение в состав суспензии метакрилатного производного ПЭГ (ПЭГ-МА,  $M_w=350$  Да) не влияет на максимальную степень наполнения (Табл. 4.10). Это позволит в перспективе обеспечить и более высокую биоактивность гидрогелей, и достичь более высоких прочностных свойств (необходимых, например, для уменьшения степени набухания; разумеется, при этом растёт жесткость гелей и снижается вязкая компонента деформации).

Табл. 4.10. Исследование максимально возможного наполнения гидрогелей.

Обозначение	Степень наполнения $\alpha$ -ТКФ, масс. %	Степень наполнения $\alpha$ -ТКФ, об. %
ПЭГ-МА/ПЭГ-ДА 30/70 + 1%I819	60	23,8
ПЭГ-МА/ПЭГ-ДА 50/50 + 1%I819	60	23,6

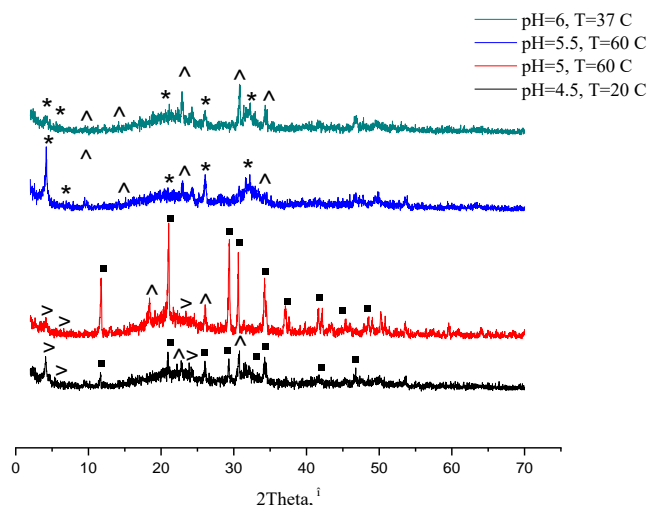
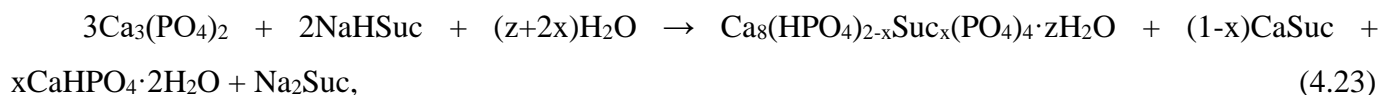
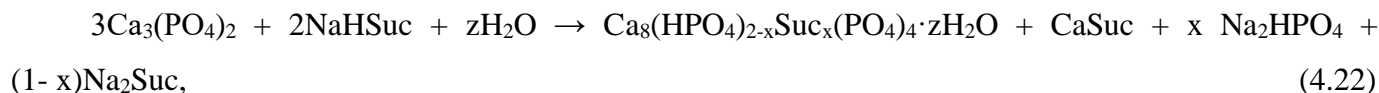


Рис. 4.47. Дифрактограммы гидрогелей ПЭГ-МА/ПЭГ-ДА 50/50 + 60%  $\alpha$ -ТКФ после выдерживания в янтарном буфере. (\*) помечены пики соответствующие ОКФ, (■) – брушиту, ^ -  $\alpha$ -ТКФ, > - сукцинат@ОКФ.

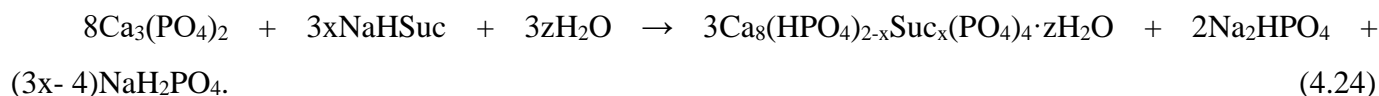
Дифрактограммы гидрогелей состава ПЭГ-МА/ПЭГ-ДА 50/50 + 60%  $\alpha$ -ТКФ после выдерживания в течение суток в сукцинатном (янтарном) буфере при различных рН представлены на Рис. 4.47. На основании анализа ионных равновесий (учитывая преобладающие ионные формы) при обработке суспензии  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  раствором  $\text{NaHSuc}$ , образование ОКФ и сукцинат-замещенного  $\text{Suc}@\text{ОКФ}$  можно представить в следующем виде:



для  $x < 2/3$



для  $x > 2/3$



Для апробирования конверсии частиц  $\alpha$ -ТКФ в объёме гидрогеля были выбраны условия, соответствующие областям существования ОКФ и брушита на диаграмме рН-Т. Согласно полученным данным (Рис. 4.47), при рН=5 и температуре 60 °С и рН=4,5 при комнатной температуре в течение 1 суток основной фазой является брушит, что показывает возможность его синтеза внутри геля при соответствующих условиях. В янтарнокислом (сукцинатном) буфере при гидролизе  $\alpha$ -ТКФ происходит замена части гидрофосфатных анионов на сукцинатные, что объясняет наличие пиков, отнесённых к сукцинат@ОКФ. Для синтеза ОКФ наиболее подходящими являются условия рН=5,5 и Т=60 °С, согласно полученным дифрактограммам. При тех же условиях наблюдаются также пики, отнесённые к  $\alpha$ -ТКФ, что связано с неполной конверсией  $\alpha$ -ТКФ в ОКФ внутри гидрогеля.

Конверсию брушита в ОКФ в янтарнокислом буфере можно описать следующей реакцией:



После выдерживания гидрогелей, содержащих брушит в исходном составе, образуется многофазный продукт: наблюдаются фазы, соответствующие брушиту, ОКФ и монетиту. Переход брушита в монетит также наблюдался при исследовании стабильности гидрогелей. Отмечены пики, отнесённые к ОКФ (Рис. 4.48), но основной фазой является брушит, что говорит о лишь частичной конверсии брушита в ОКФ. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что следует увеличить время обработки геля в буферном растворе, однако в этом случае встает вопрос о сохранении метастабильной фазы ОКФ.

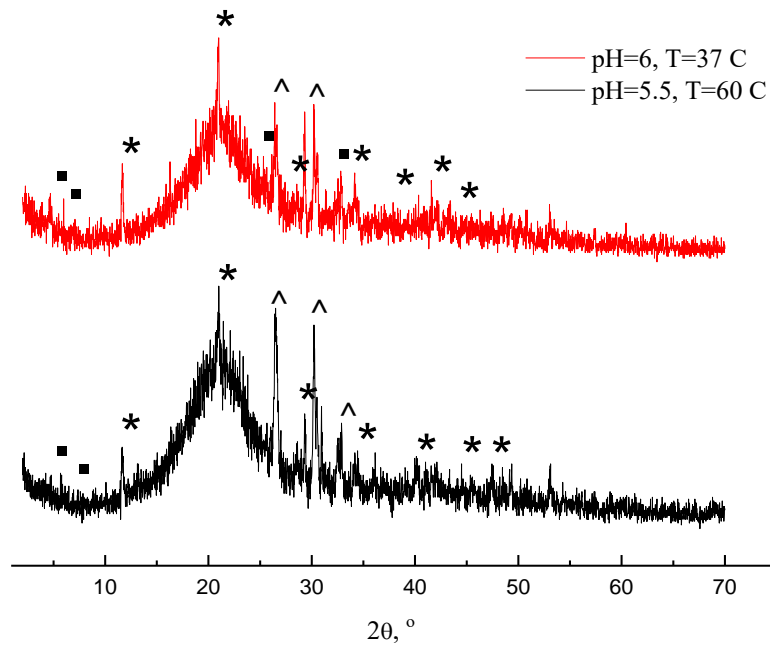


Рис. 4.48. Дифрактограммы гидрогелей ПЭГДА + 10% брусита после выдерживания в янтарном буфере. (\*) помечены пики соответствующие бруситу, (■) – ОКФ, (^) - монетиту.

#### 4.5.4 Наполнение фотосуспензии готовыми кристаллами фосфатов кальция

При введении в состав фотосуспензии готовых кристаллов фосфатов кальция возникают несколько проблем. Во-первых, частицы начинают агрегировать между собой, вследствие чего происходит их седиментация. Процесс стереолитографической печати малых объектов (до 1 см<sup>3</sup>) с разрешением 100–200 мкм занимает 1–2 ч, поэтому необходимо, чтобы время расслоения суспензии гарантировано превышало время печати.

Оценка скорости седиментации по закону Стокса (применим для разбавленных суспензий, хорошо описывает экспериментальные данные в случае полидисперсных порошков-наполнителей), по которому скорость оседания порошка в суспензии определяется как:

$$v_s = \frac{(\rho_p - \rho_f)gd^2}{18\eta}, \quad (4.25)$$

где  $\rho_p$  и  $\rho_f$  – плотности порошка и жидкости, соответственно;  $d$  – средний диаметр частиц порошка,  $\eta$  – вязкость суспензии; дает результаты представленные в Табл. 4.11.

Табл. 4.11. Оценка скорости оседания на основании закона Стокса для различных мономеров в сравнении с водной суспензией.

	ПЭГ-ДА-700	ПЭГ-ДА-575	Вода
<b>Плотность (при 25°C), г/мл</b>	1,1	1,1	1,0
<b>Вязкость, сП</b>	>75	57,0	1,0
<b>Скорость осаждения частиц <math>d=1</math> мкм, мм/ч</b>	<0.08	0,1	>6
<b>Скорость осаждения частиц <math>d=10</math> мкм, мм/ч</b>	<10	13,1	>600

В случае наполнения суспензий порошком брусшита (средняя длина пластинок – 10,9 мкм по данным РЭМ) скорость осаждения частиц не превышает 10 мм/ч, что допустимо при стереолитографической печати без периодического перемешивания фотосуспензии. Дополнительное введение ПАВ должно способствовать большей устойчивости таких суспензий к седиментации, однако, в данной работе такой вариант не был предусмотрен из-за опасения возможной цитотоксичности со стороны ПАВ.

Частицы фосфатного порошка играют роль как поглотителя, так и рассеивателя излучения, что приводит к уменьшению глубины полимеризации и ухудшению латерального разрешения. Введение до 10 масс.% наполнителя (кристаллов брусшита или ОКФ) приводит к еще существенному снижению фоточувствительности: глубина полимеризации становится меньше 0,2 мм вплоть до 240 мДж/см<sup>2</sup> (Рис. 12.2, Табл. 4.12). В первом приближении при одинаковой доле наполнения разница между брусшитом и ОКФ не заметна, что можно связать с близостью гранулометрии и морфологии кристаллов наполнителя. Это говорит о том, что если в случае красителя основной механизм ослабления света – поглощение, то при наполнении наблюдается рассеяние света на частицах с большим, чем у мономера, показателем преломления.

Табл. 4.12. Значения фоточувствительности  $D_p$  суспензий P-700\_50/1 с различными наполнителями и критической энергии полимеризации  $E_c$

Обозначение	$C_d = C_d(E)$	$D_p$ , мм	$E_c$ , мДж/см <sup>2</sup>
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_5%ОКФ</b>	0,21lnE-0,78	0,21±0,04	43,04±22,2
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_10%ОКФ</b>	0,17lnE-0,72	0,17±0,03	70,73±28,38
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_5%Брусшит</b>	0,30lnE-1,44	0,30±0,02	115,20±20,11
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_10%Брусшит</b>	0,25lnE-1,15	0,25±0,02	101,34±14,62
<b>P-700_100/0,1_10%ОКФ</b>	0,70lnE-1,30	0,70±0,02	6,34±0,61

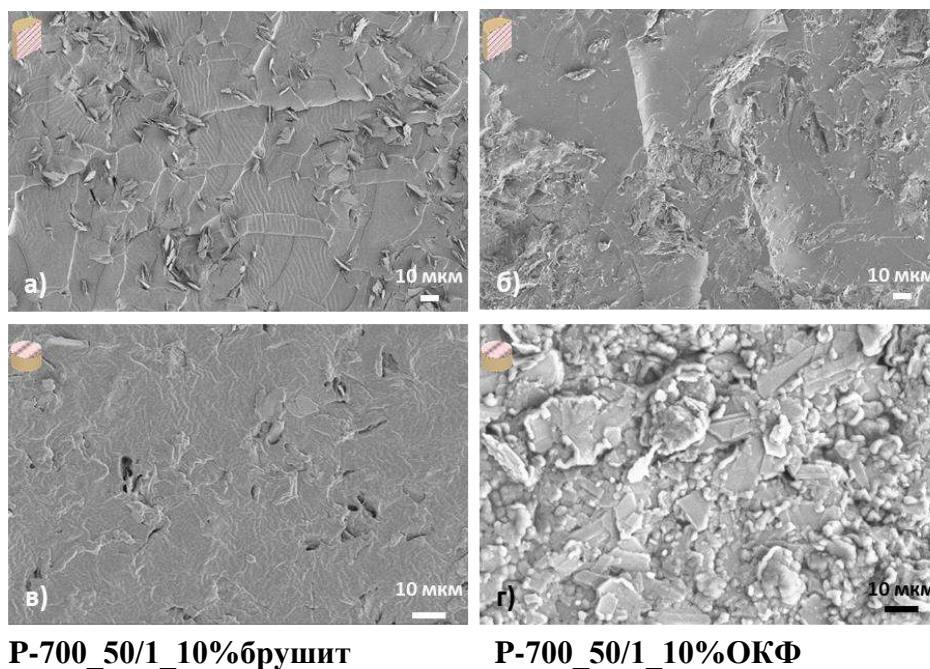


Рис. 4.49. Морфология скола (а и б) и поверхности (в и г) гидрогелей, наполненных свежееосажденными кристаллами брушита и ОКФ.

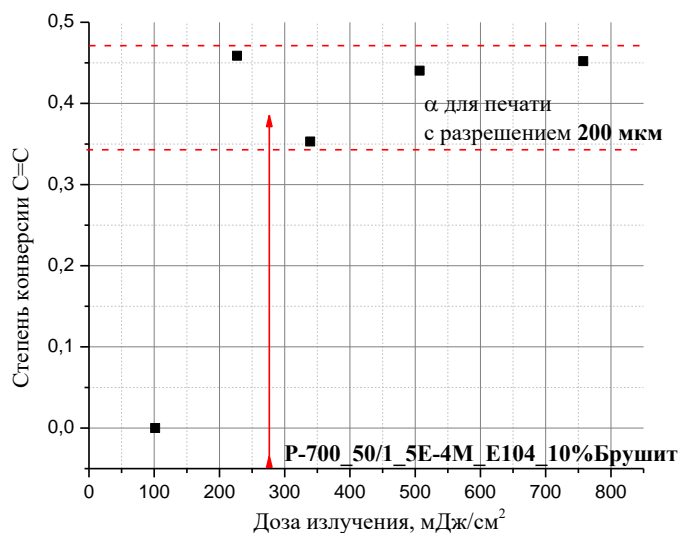


Рис. 4.50. Зависимость степени конверсии C=C от дозы излучения для композита гидрогель/фосфат кальция (толщина образцов – 200 мкм) состава Р-700\_50/1\_5Е-4М\_Е104\_10%Брушит.

При увеличении доли наполнителя помимо снижения оптической прозрачности суспензий происходит существенное увеличение вязкости (Рис. 4.67). Это имеет принципиальное значение, поскольку используемый в работе метод DLP 3D печати требует использования достаточно подвижных фотосуспензий, которые будут затекать в образовавшиеся пустоты при смене слоя и подъеме/опускании стола принтера при печати модели. При наполнении суспензии 20 масс. %

порошка образуется пастообразный материал, использование которого возможно только с использованием дополнительного механизма выравнивания слоя (например, шпателя), который не использовался в рамках данной работы.

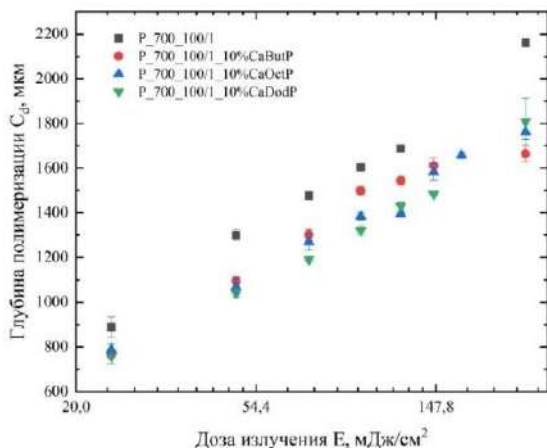


Рис. 4.51. Зависимость глубины полимеризации от дозы излучения гидрогеля ПЭГДА-700 с 1 масс. % фотоинициатора Irgacure®819 и различными наполнителями.

Полученные зависимости глубины полимеризации от дозы излучения и состава смеси до полимеризации в случае наполнения алкилфосфатами кальция показали, что увеличение доли фотоинициатора (вплоть до 1%) и одинаковое соотношение воды и мономера в смеси позволяют достигать приемлемых, но при этом не избыточных значений глубины полимеризации даже без использования фотопоглотителей и красителей (Рис. 4.51–Рис. 4.52, Табл.

4.13). На данном этапе максимальным наполнением суспензий было 15 масс. %. Из-за слоистой морфологии и наличия алкильных гидрофобных хвостов в алкилфосфатах их смешивание с мономером несколько затруднено из-за наличия воды в суспензии и слипания частиц. Таким образом, способ наполнения готовыми частицами был выбран как оптимальный, несмотря на низкие значения максимального наполнения гидрогеля.

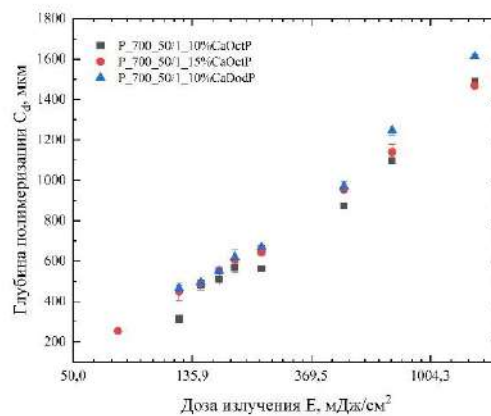
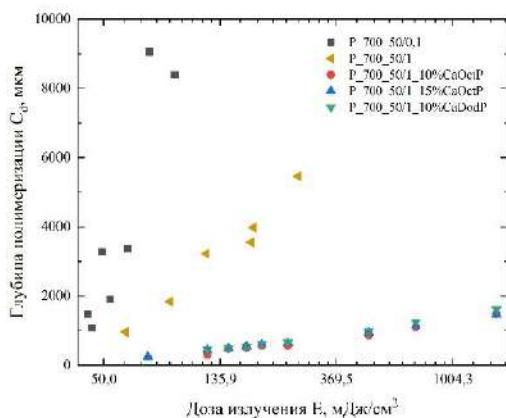


Рис. 4.52. Зависимость глубины полимеризации от дозы излучения гидрогеля ПЭГДА-700 с 1 масс. % фотоинициатора Irgacure®819 (соотношение мономер:вода=1:1) и различными алкилфосфатами кальция в качестве наполнителей.

Табл. 4.13. Значения фоточувствительности суспензий и критической энергии для композитов ПЭГ-ДА/алкилфосфаты кальция.

Состав суспензии	$C_d=C_d[E]$	$D_p, \text{ мм}$	$E_c, \text{ мДж/см}^2$
P-700_50/0,1	10,96lnE-40,38	10,96±2,12	39,76±16,19
P-700_50/1	2,90lnE-11,03	2,90±0,27	44,58±9,62
P-700_100/1	0,57lnE-0,98	0,57±0,02	1,79±0,28
P-700_100/1_10%CaButP	0,47lnE-0,74	0,47±0,03	4,83±0,90
P-700_100/1_10%CaOctP	0,41lnE-0,57	0,41±0,06	4,02±0,80
P-700_100/1_10%CaDodP	0,41lnE-0,57	0,41±0,01	4,02±2,00
P-700_50/1_10%CaOctP	0,48lnE-1,98	0,41±0,08	61,87±13,63
P-700_50/1_10%CaDodP	0,40lnE-1,50	0,40±0,01	42,52±2,76
P-700_50/1_15%CaOctP	0,49lnE-1,95	0,49±0,02	53,50±4,93

#### 4.6 Проектирование оптимальной архитектуры костного имплантата

При подготовке данной главы использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М. В. Ломоносова, частично отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

**Тихонов А.А.**, Евдокимов П.В., Путляев В.И., Сафронова Т.В., Филиппов Я.Ю. О выборе архитектуры остеокондуктивных биокерамических имплантатов // *Материаловедение*. 2018. № 8. С. 43–48. doi:10.31044/1684-579X-2018-0-8-43-48.

Кроме того, результаты, приведенные в данной главе, являются частью отчета по гранту РФФИ №17-79-20427, а также магистерской диссертации автора «Остеокондуктивные биоматериалы для костной пластики на основе гидрогелей, наполненных фосфатами кальция».

При создании костных имплантатов в последнее время большое внимание уделяется созданию материалов определенной архитектуры. Поскольку костные имплантаты должны обладать остеокондуктивными свойствами, т.е. быть высокопроницаемыми для обеспечения прорастания нативной костной ткани и доступа к ней питательных веществ, участвующих в процессе регенерации кости, в данной работе проводилось сравнение высокопористых ячеистых структур на примере структуры Кельвина и трехмерных периодических минимальных поверхностей (ТПМП) «гириода» и «алмаза» (Рис. 4.53).

Из Табл. 4.14 видно, что наиболее проницаемые варианты реализуются в случае структур Кельвина и типа «гириод». Следует отметить, что достигаемое для таких имплантатов расчетное значение проницаемости в 987 дарси соответствует проницаемости трабекулярной (губчатой) костной ткани (порядка 1000 дарси). Малая проницаемость алмазной архитектуры может быть

понята из рассмотрения карты линий потока (Табл. 4.15, наличие вихреобразных потоков с малой скоростью). Архитектура типа «гиرويد», по-видимому, достаточно перспективна с точки зрения проницаемости, помимо этого, каждая точка на её поверхности является седловой, что положительно сказывается на адгезии остеобразующих клеток.

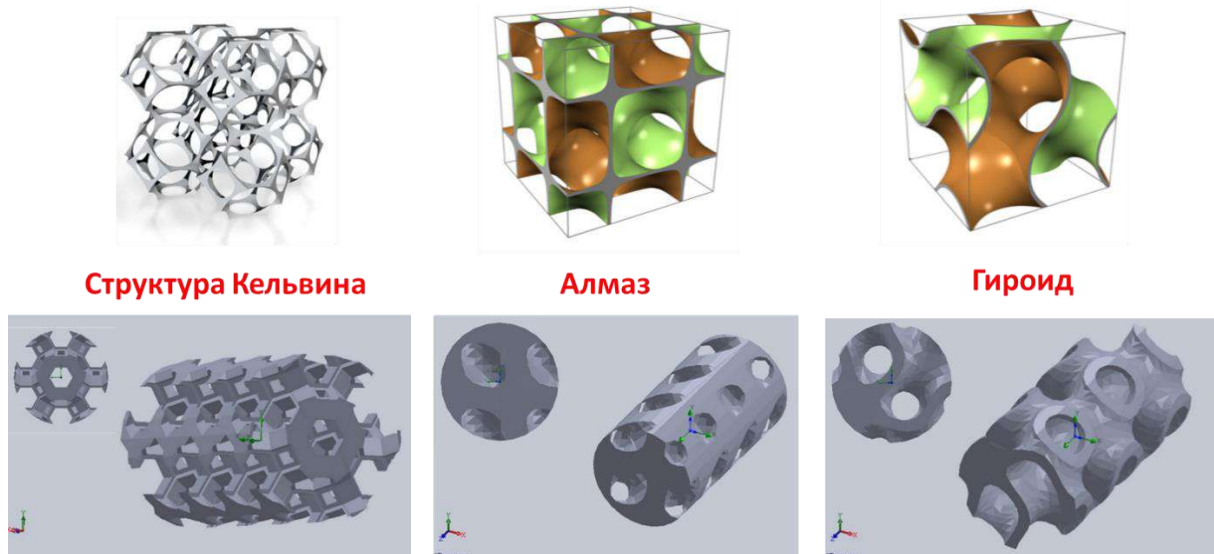


Рис. 4.53. Иллюстрация исследуемых структур и моделей макропористых имплантатов.

Табл. 4.14. Результаты моделирования нагружения и протекания жидкости через имплантаты с выбранными структурами.

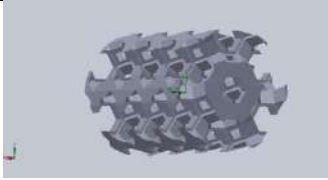
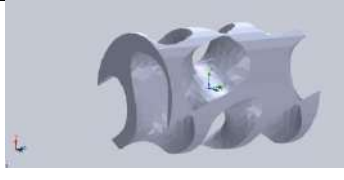
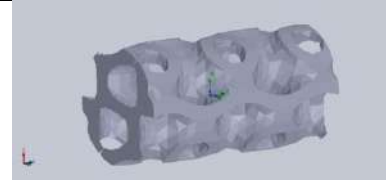
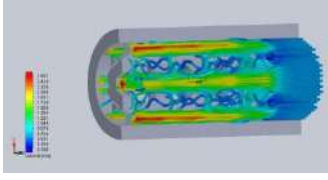
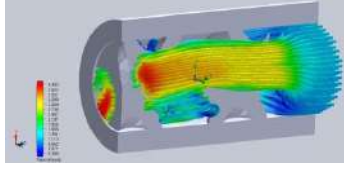
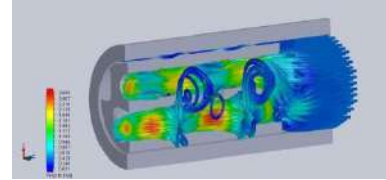
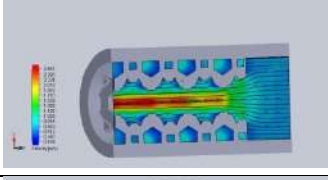
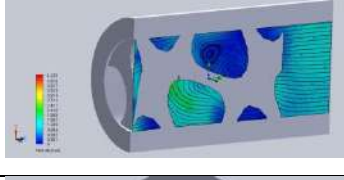
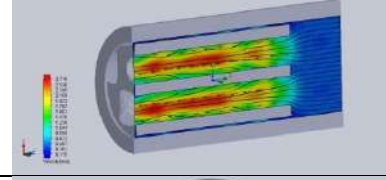

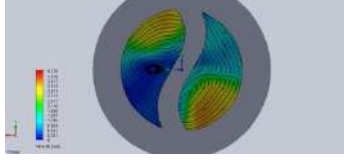
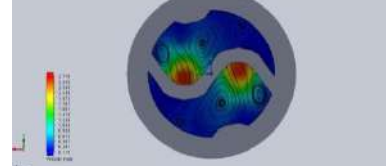
	Кельвин				Гиرويد					Алмаз			
Пористость, %	50	50	<b>70</b>	70	70	<b>70</b>	70	50	50	70	70	50	50
Направление	[111]	[100]	<b>[111]</b>	[100]	[100]	<b>[100]</b>	[111]	[100]	[111]	[110]	[100]	[100]	[110]
Размер каналов, мкм	750	750	<b>750</b>	750	1500	<b>750</b>	1500	750	750	750	750	750	750
Относительная жесткость, $E/E_0$	0,05	0,03	<b>0,17</b>	0,15	0,07	<b>0,09</b>	0,04	0,16	0,18	0,09	0,09	0,18	0,19
Проницаемость $k$ , дарси	694	640	<b>987</b>	824	905	<b>877</b>	1550	720	1163	651	778	499	368

Приобретаемая в ходе создания пористых материалов гибкость может быть полезна в вариантах операций, при которых имеется неполный доступ (к примеру, узкий канал) к дефекту. Так, дополнительная гибкость (податливость материала) позволит производить сжатие имплантата, введение в дефект, в котором он упруго отрелаксирует и плотно заполнит полость. Так, моделирование нагружения моделей имплантатов методом конечных элементов (МКЭ) показывает, что в случае сетчато-ячеистой структуры (как, например, у архитектуры Кельвина) потеря устойчивости конструкции происходит в соответствии с моделью Гибсон-Эшби [175] описывающей деформацию ячеистого материала, в рамках которой рассматриваются две моды разрушения при



выгибании прямолинейного элемента каркаса (перемычки): при достижении предела упругости материала каркаса и разрушение при пластической деформации. В случае тонких балок модели (см. модели Кельвина и типа «гиرويد» в Табл. 4.16) вследствие обрезания пористой среды внешним контуром имплантата заметно выгибание балок и перекашивание модели.

Табл. 4.15. Иллюстрации моделирования протекания воды (25°C) через структуры Кельвина, типа «гиرويد», типа «алмаз» с 70% в наиболее проницаемых направлениях ([111] для Кельвина и [100] для гироида и алмаза).


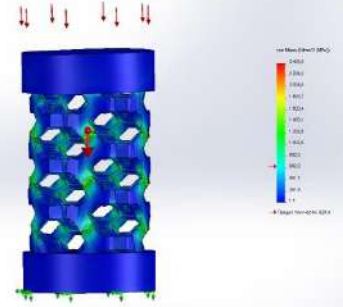
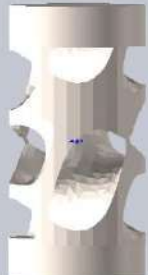
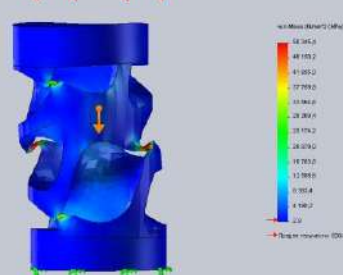
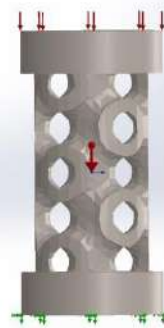
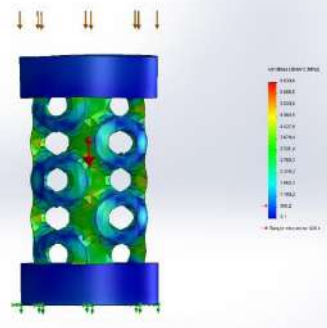
	Кельвин	Гироид	Алмаз
Вид модели			
Карта линий потока			
Сечение вдоль потока			
Сечение поперек потока			

По величине деформации оценен модуль Юнга пористой модели и соотнесен с модулем упругости сплошного материала для оценки жесткости имплантата. Из Табл. 4.14 видно, что наиболее жесткой является модель с алмазной архитектурой, а наиболее податливой – Кельвина или гироида (в зависимости от направления, однако для выбора между ними необходимо моделирование на образцах с различным размером для нивелирования возможных граничных эффектов); заметна ожидаемая антибатность проницаемости и жесткости.

В ходе данной работы в качестве оптимальной с точки зрения проницаемости, податливости и биологических свойств была выбрана архитектура гироида с пористостью 70% и размером каналов пор 750 мкм в направлении [100] (Рис. 4.54 и Рис. 12.3), значения проницаемости и относительной жесткости выделены жирным шрифтом в Табл. 4.14. Для дальнейших механических испытаний печатались образцы высотой 12 мм и диаметром 6 мм с разрешением 200 мкм. Степень конверсии

C=C таких образцов предположительно составляет  $0,35 \div 0,47$  (по определенному профилю печати (Табл. 4.12) и данным ИК-спектроскопии, Рис. 4.50).

Табл. 4.16. Иллюстрации МКЭ-моделирования нагружения моделей имплантатов (цилиндр 3x6 мм) с пористостью 70% (направления нагрузки соответствуют направлению потока в табл. 4.12, сжатие 300 МПа, материал модели – сталь, упругий модуль  $E=200$  ГПа).

	Исходная модель	Распределение напряжений после нагружения
Кельвин		
Гироид		
Алмаз		

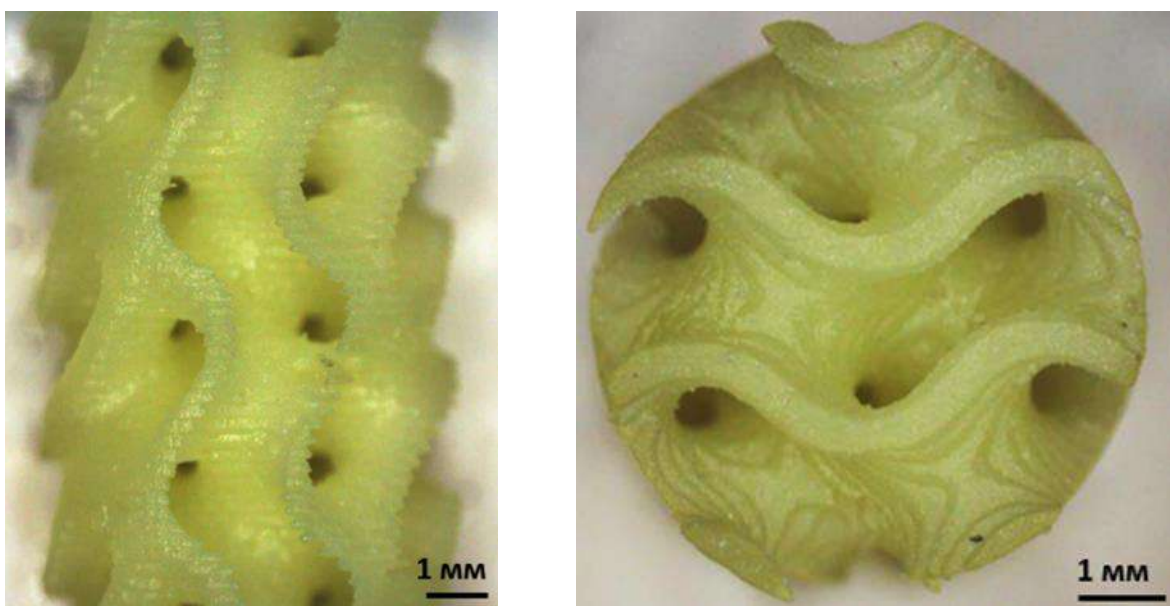


Рис. 4.54. Композитный имплантат (гидрогель/брушиит) P-700\_50/1\_(5E-4M\_E104)\_10%брушиит в форме цилиндра (диаметр 6мм, высота 10-12 мм) с архитектурой типа «гиرويد», сформированные стереолитографической 3D-печатью (хорошо заметна слоистость печати вдоль оси z с периодом 200 мкм); слева – вид сбоку, справа – вид сверху.

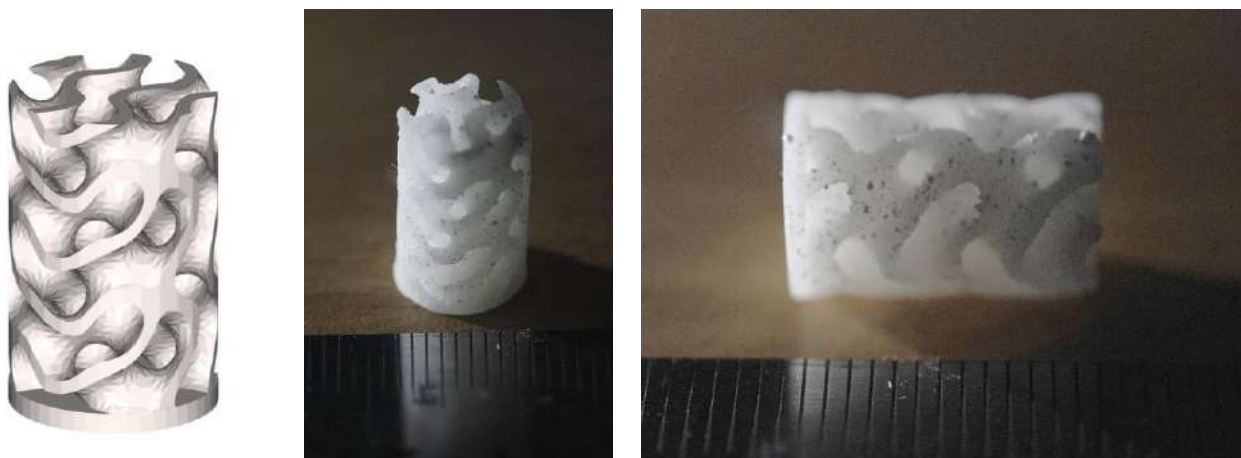


Рис. 4.55. Визуализация 3D модели и фотографии композита P-700\_50/1\_10%CaOcpP со структурой гироида.

Предварительно, были напечатаны композиты состава P-700\_50/1\_10%CaOcpP со структурой гироида (внешняя форма: цилиндр диаметром 6 мм, высотой 15 мм) с заданной пористостью 70% и размером каналов пор 1,5 мм (Рис. 4.55). В ходе работы представлена теоретическая возможность создания композитов на основе ПЭГ-ДА гидрогелей, наполненных алкилфосфатами кальция, однако, практическое применение таких материалов маловероятно из-за обнаруженной цитотоксичности синтезированных порошков (13 Приложение) вне зависимости от длины алкильной цепи и ожидаемой гидрофобности порошков.

## 4.7 Свойства полученных гидрогелей и композитов

При подготовке данной главы использованы публикации автора, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ имени М. В. Ломоносова, частично отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

**Tikhonov A.**, Evdokimov P., Klimashina E., Tikhonova S., Karpushkin E., Scherbackov I., Dubrov V., Putlayev V. Stereolithographic fabrication of three-dimensional permeable scaffolds from CaP/PEGDA hydrogel biocomposites for use as bone grafts // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 2020. Т. 110. С. 103922. doi:10.1016/j.jmbbm.2020.103922.

Щербаков И.М., Климашина Е.С., Евдокимов П.В., **Тихонов А.А.**, Путляев В.И., Шипунов Г.А., Зацепин В.А., Дубров В.Э., Данилова Н.В., Мальков, П.Г. Оценка свойств костнозамещающих материалов на основе полиэтиленгликоль диакрилата и октакальциевого фосфата на модели монокортикального диафизарного дефекта бедренной кости крысы: экспериментальное исследование // Травматология и ортопедия России. 2023. Т. 29. № 1. С. 25–35. doi:10.17816/2311-2905-2039.

Кроме того, результаты, приведенные в данной главе, являются частью отчета по гранту РНФ №17-79-20427, а также магистерской диссертации автора «Остеокондуктивные биоматериалы для костной пластики на основе гидрогелей, наполненных фосфатами кальция».

### 4.7.1 Набухание

Важнейшим свойством гидрогелей является способность к набуханию (поглощению больших количеств воды без растворения). Обычно данное свойство описывают с помощью величин набухания (степени набухания) и равновесного содержания воды. Так, на Рис. 4.56 приведена зависимости степени набухания (СН) гидрогелей на основе мономеров с различной молекулярной массой. При одинаковой дозе облучения (порядка 3 мДж/см<sup>2</sup>) наибольшую СН=55,0±2,5% демонстрируют образцы, содержащие мономер большей молекулярной массы. Подобное поведение можно связать с большим свободным объемом гидрогеля  $\xi$  ( $\xi=0,53$  нм для **P-700\_100** и  $\xi=0,38$  нм для **P-575\_100**).

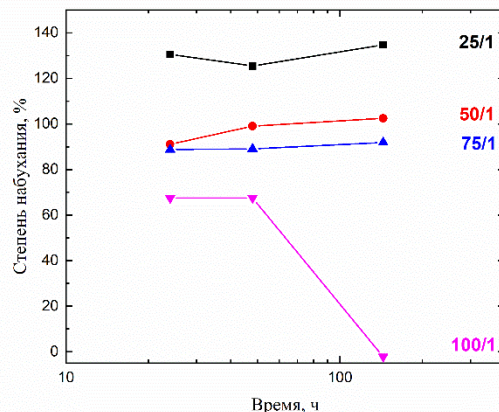
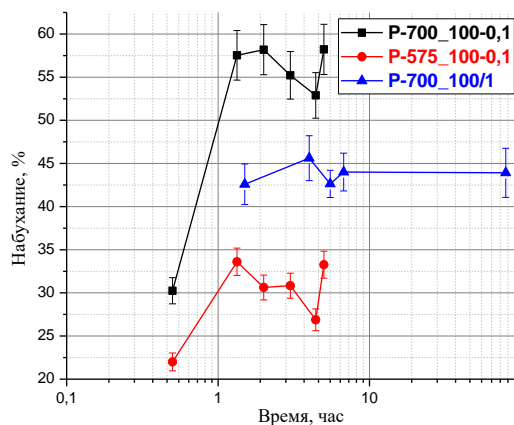


Рис. 4.56. а) Зависимость набухания гидрогелей P-700(575)\_100 от времени выдерживания в воде; б) зависимость степени набухания от времени для а) гидрогелей P-700 с различным содержанием мономера в исходном составе (от 25 до 100% с шагом 25%).

При введении в состав исходной фотосуспензии воды СН таких гидрогелей увеличивается. Учитывая тот факт, что доза излучения при фотополимеризации влияет на степень конверсии С=C и плотность сшивки гидрогеля, можно было предположить, что при большей дозе (степени конверсии С=C) набухание гидрогеля должно быть меньше из-за образования более жесткой полимерной сетки. Однако, по приведенным зависимостям на Рис. 4.57 можно говорить о том, что СН не зависит от дозы излучения.

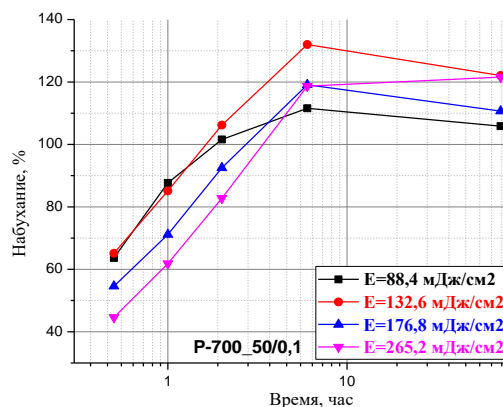
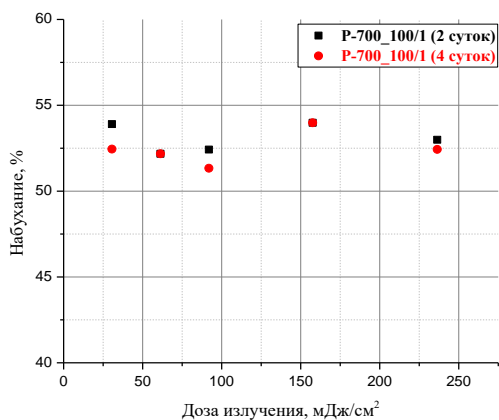


Рис. 4.57. Зависимость набухания гидрогелей от дозы излучения при фотополимеризации и времени выдерживания в среде набухания (воде).

Гидрогели на основе ПЭГ-ДА-700, судя по зависимостям набухания от времени на Рис. 4.56-Рис. 4.57, поглощают воду в первые 2–6 ч, после чего переходят в равновесное состояние. При высушивании набухшего гидрогеля происходит удаление воды до первоначального состояния, при этом в составе гидрогеля остается связанная вода, которая образуется при гидратации

функциональных групп (связанная вода). Также можно говорить об изотропности процесса набухания (толщина и диаметр возрастают в одинаковое число раз: 1,23 для **P-700\_100** и 1,3 для **P-700\_50**), а плотность снижается от  $1,3\pm 0,1$  г/мл до  $1,1\pm 0,1$  г/мл, что связано с поглощением воды.

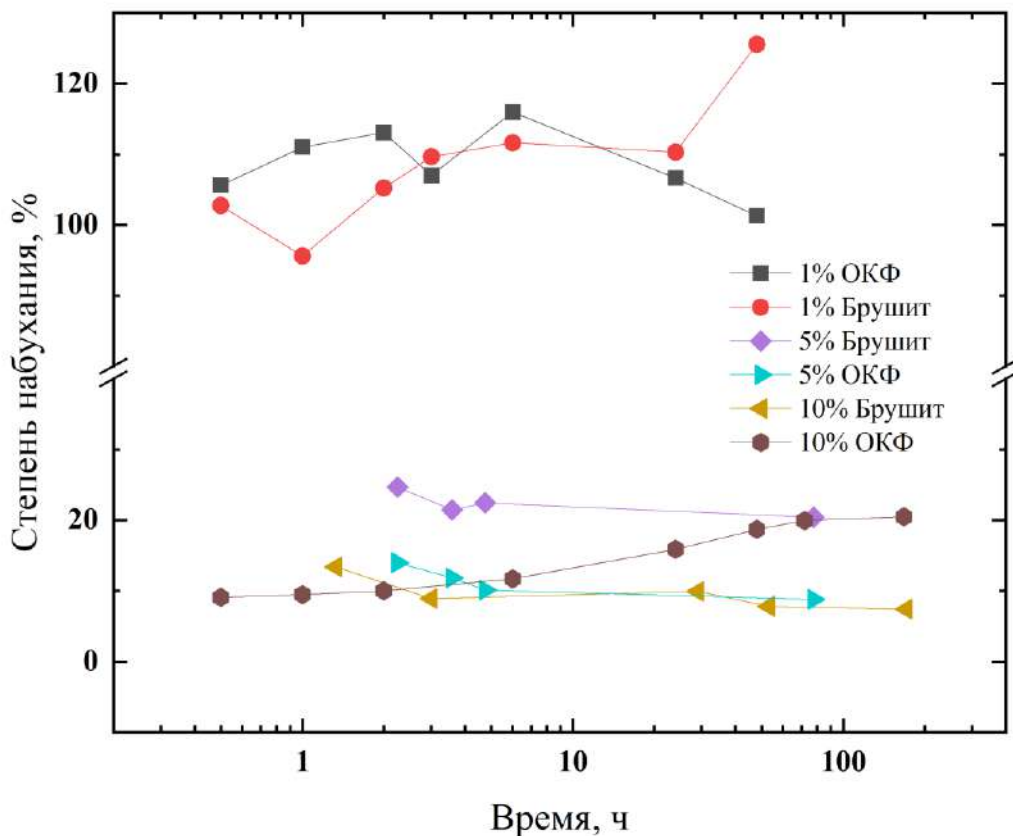


Рис. 4.58. Зависимость набухания для композитов гидрогель/брушит(ОКФ) от времени вымачивания (состав гидрогеля - P-700\_50/1\_5E-4M\_E104).

Для композитов гидрогель/фосфат кальция скорость набухания (Рис. 4.58) сопоставима с ненаполненными гидрогелями (выход на постоянное значение после 1,5 ч вымачивания). При увеличении доли наполнителя или уменьшении гранулометрии порошка (в случае ОКФ) предел набухания уменьшается (вплоть до 10%) из-за адсорбции молекул  $H_2O$  пластинчатыми частицами ОКФ и брушита. Таким образом, контролируя состав исходной фотосуспензии (количество воды, доля твердого наполнителя, гранулометрия наполнителя), можно управлять набуханием гидрогелей, в том числе предотвращать их избыточное набухание.

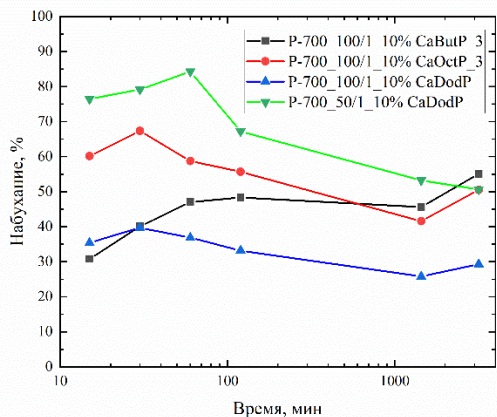
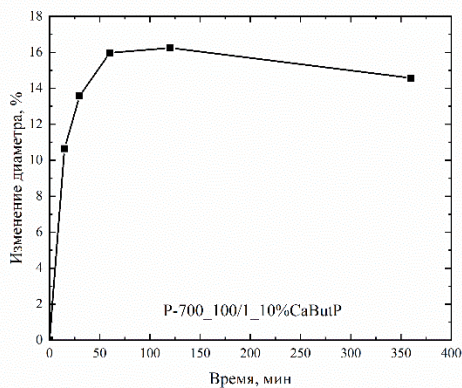


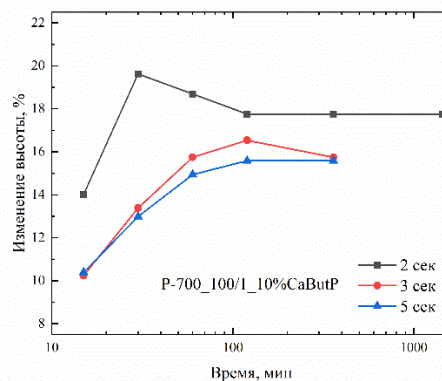
Рис. 4.59. Зависимость степени набухания от времени для композитов P-700\_100/1 с различными алкилфосфатными наполнителями.

Полученные зависимости степени набухания образцов композитов с алкилфосфатными наполнителями в дистиллированной воде говорят об отсутствии прямого влияния длины алкильной цепи на величину степени набухания. Введение октилфосфата кальция привело к незначительному уменьшению предельного набухания до 60–65%, а для бутилфосфата и додецилфосфата кальция до 50–55 и 35–40%, соответственно. Полученные композиты обладают высокой скоростью набухания,

увеличение как массы, так и геометрических размеров образцов (Рис. 4.60) происходит в первые 60 минут после погружения в среду набухания. Процесс неоднороден вдоль оси и базовой плоскости 3D печати: в случае композита P-700\_100/1\_10% CaButP диаметр увеличивается на 15–16%, а высота – на 18%.



а)



б)

Рис. 4.60. Кривые зависимостей изменения диаметра (а) и высоты (б – указанное время обозначает различную дозу получения исследуемых гидрогелей) образцов от времени в процессе набухания в дистиллированной воде

В качестве альтернативного метода изучения процесса набухания гидрогелей и композитов использовался метод магнитно-резонансной томографии, которая позволяет исследовать микроскопическое поведение системы и оценить транспорт молекул воды в процессе помещения образцов в водную среду. Структура образцов (распределение интенсивности сигнала по срезу) в целом однородная, за исключением образца с наполнением бруснитом (Рис. 4.61 а). При контакте

образцов с водой визуализируется процесс проникновения жидкости в глубину образца с последующим набуханием и нарушением их целостности. В пробном варианте образец никак не фиксировался в ампуле, устанавливался на подложку, вследствие чего происходило быстрое разрушение с «расползанием» по ампуле (Рис. 4.61 б).

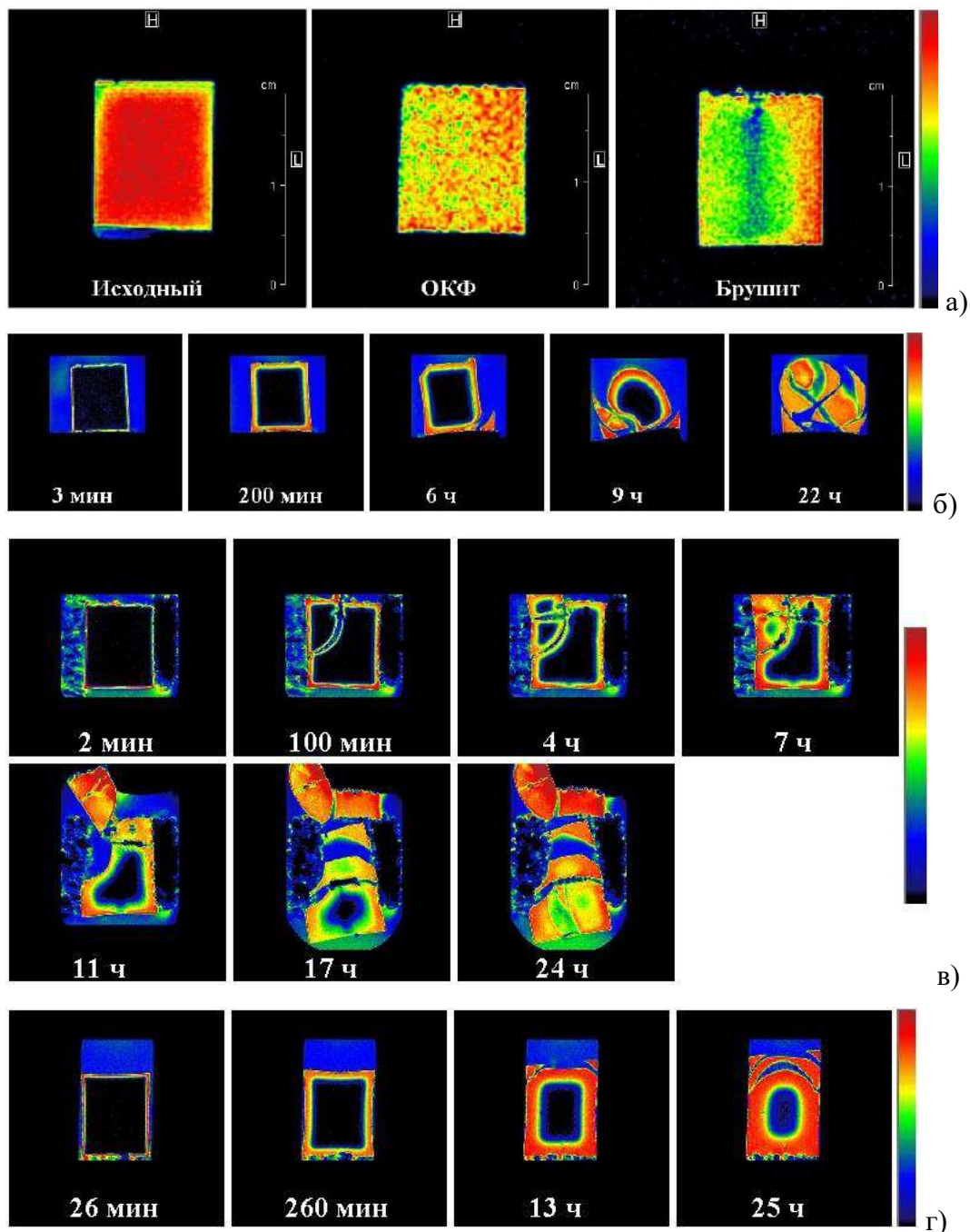


Рис. 4.61. Визуализация распределение интенсивности отклика по срезу в ходе МРТ-исследования гидрогелей и их композитов: а) томограммы исследуемых образцов всех типов в сухом состоянии; б) томограммы образца с наполнением «ОКФ»; в) томограммы образца с наполнением «Брушит»; г) томограммы образца без наполнения. Во всех случаях толщина среза 1 мм, матрица 128x128 пикселей. Время указано с момента погружения образца в воду.



С учетом этого опыта, следующий образец был плотно упакован в мягкую поролоновую обертку, чтобы при набухании как можно дольше сохранить его целостность, при этом все равно наблюдались разрушения в ходе набухания (Рис. 4.61 в). Наконец, в третьем случае образец был помещен в стеклянную ампулу с внутренним диаметром чуть больше диаметра самого образца, при этом разрушения не происходило (Рис. 4.61 г).

Стоит отметить, что, несмотря на очевидную анизотропию физико-механических свойств, обусловленную методом приготовления (вдоль и поперек напечатанных слоев свойства отличаются), процесс транспорта воды и последующего набухания изотропен – скорость проникновения воды примерно одинаковая со всех поверхностей образцов (как вдоль, так и поперек полимерных слоев).

Была проведена количественная оценка скорости проникновения воды в образцы. Для этого измерялось расстояние, прошедшее краем фронта от поверхности (области контакта с водой) вглубь образца. На представленной динамике профиля интенсивности сигнала (Рис. 4.62 а) это соответствует передней кромке до момента, когда левое и правое крылья соприкоснутся, после чего в центре интенсивность начинает плавно возрастать, в соответствии с фиковским сценарием диффузии в полимерной матрице. Оказалось, что скорость (а значит, и коэффициент диффузии) практически не зависит от наличия наполнения (Рис. 4.62 б).

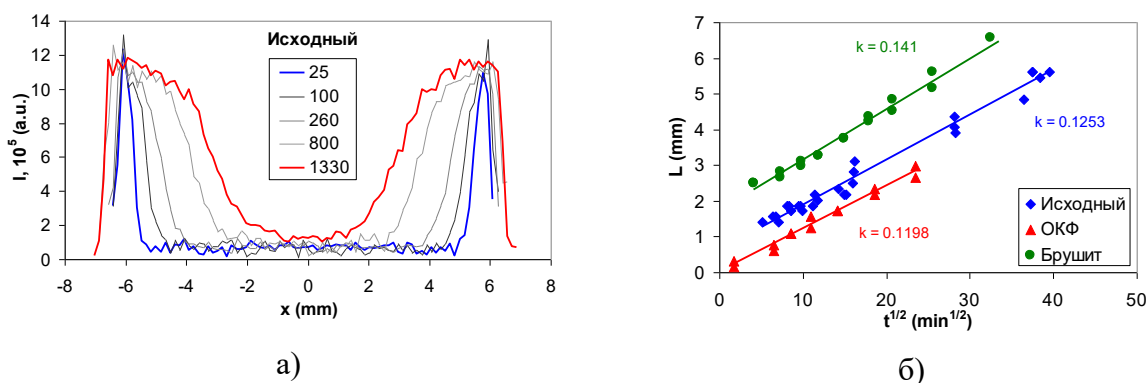


Рис. 4.62. Профиль интенсивности сигнала для образца ПЭГ-ДА-700 без наполнения (а) в зависимости от времени погружения в воду (в минутах) и зависимости глубины проникновения воды от времени погружения (б).

#### 4.7.2 Реологическое поведение

Для корректного исследования реологии гидрогелей было необходимо соблюдение двух условий: стационарное состояние образца и линейность вязкоупругой деформации. Поскольку исследуемые гидрогели были в некотором роде мягкими, то важно было подбирать измерительный зазор, который определял нормальную деформацию образца и действующее на него нормальное

давление. Для устранения проскальзывания образца при измерении была выбрана нормальная сила, приблизительно равная 4 Н, которая не изменяла структуры образца.

Измерения образца гидрогеля состава ПЭГ-ДА-575\_50/0,1\_(H<sub>2</sub>O) в сухом виде показали, что модуль упругой (эластической) компоненты составляет порядка 100 кПа, а фактор потерь – 2-3° (Рис. 4.63). В заданном диапазоне частот (от 0,1 до 30 Гц) эластический модуль сдвига практически не зависит от частоты и на порядок превышает величину вязкого модуля сдвига. Таким образом, в данном диапазоне частот гидрогель находится в высокоэластическом состоянии. Фактор потерь (tanδ) составляет примерно 0,05 и близок к нулю, что типично для сшитых полимерных сеток. При увеличении молекулярной массы мономера (Рис. 4.64) абсолютные значения обоих модулей падают (G'≈20 кПа, G''≈2 кПа), при этом фактор потерь возрастает до 5-7°, т.е. увеличивается вклад вязкой компоненты. Увеличение длины цепи мономера ПЭГ-ДА приводит к большему числу С-Н связей и большей гибкости/эластичности единичного фрагмента.

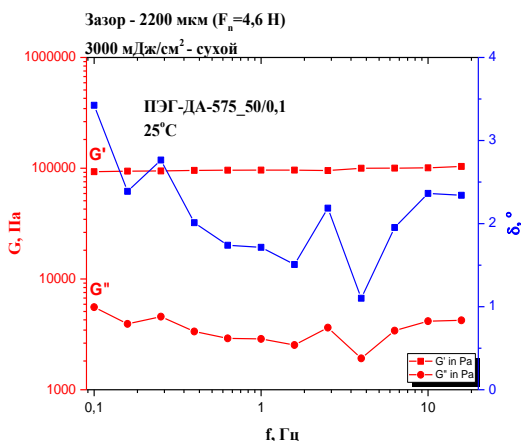


Рис. 4.63. Зависимость упругой ( $G'$ ) и вязкой ( $G''$ ) компонент модуля сдвига, а также фактора потерь  $\delta$  от частоты P-575\_50/0,1\_(H<sub>2</sub>O) (нормальная сила – 4,6 Н; доза – 3 Дж/см<sup>2</sup>, сухой, T=25°C).

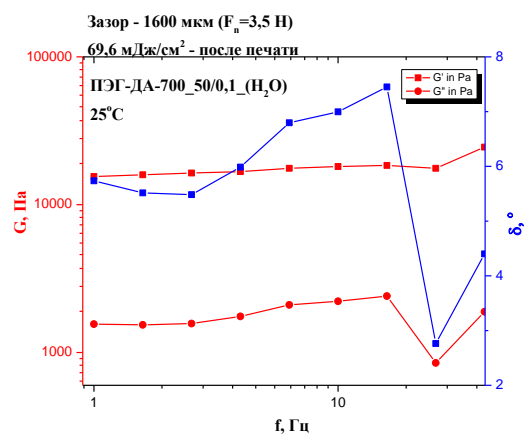


Рис. 4.64. Зависимость упругой ( $G'$ ) и вязкой ( $G''$ ) компонент модуля сдвига, а также фактора потерь  $\delta$  от частоты P-700\_50/0,1\_(H<sub>2</sub>O) (нормальная сила – 3,5 Н; доза – 69,6 мДж/см<sup>2</sup>, сухой, T=25°C).

При вымачивании гидрогеля в воде и достижении предельной степени набухания (после 2 суток) упругий модуль сдвига повышается до 50 кПа (Рис. 4.65 а), а вязкий модуль практически не изменяется, в результате чего образец становится более упругим. На Рис. 4.65 б представлены результаты измерения при 37 °С, т. е. при нормальной температуре тела человека. Сравнивая результаты с измерениями при комнатной температуре, можно заметить одновременное увеличение вязкой компоненты и уменьшение упругой компоненты, при неизменной величине измерительного зазора нормальная сила, действующая со стороны образца на сенсор, не изменяется, что опять же свидетельствует о «смягчении» гидрогеля.

Измерения образцов композитов гидрогель/ОКФ (10 масс.%) (Рис. 4.66) показали, что с увеличением частоты растёт упругий модуль сдвига (от 112 до 153 кПа при 25 °С, от 90 до 140 кПа при 37 °С), а вязкий модуль проходит через минимум. Фактор потерь составляет 6–8 ° при комнатной температуре и 6–12 ° при 37 °С, наибольшие значения  $\delta$  наблюдаются при минимальной частоте сдвига ( $f = 0,1$  Гц). Подобное поведение – усиление вклада от вязкого поведения с ростом наполнения гидрогеля, может быть связано с меньшей по сравнению с пустыми гидрогелями степенью полимеризации образцов, за счёт чего в составе композита остаётся не сшитый мономер, а также с существенным повышением вязкости фотосуспензии во время полимеризации.

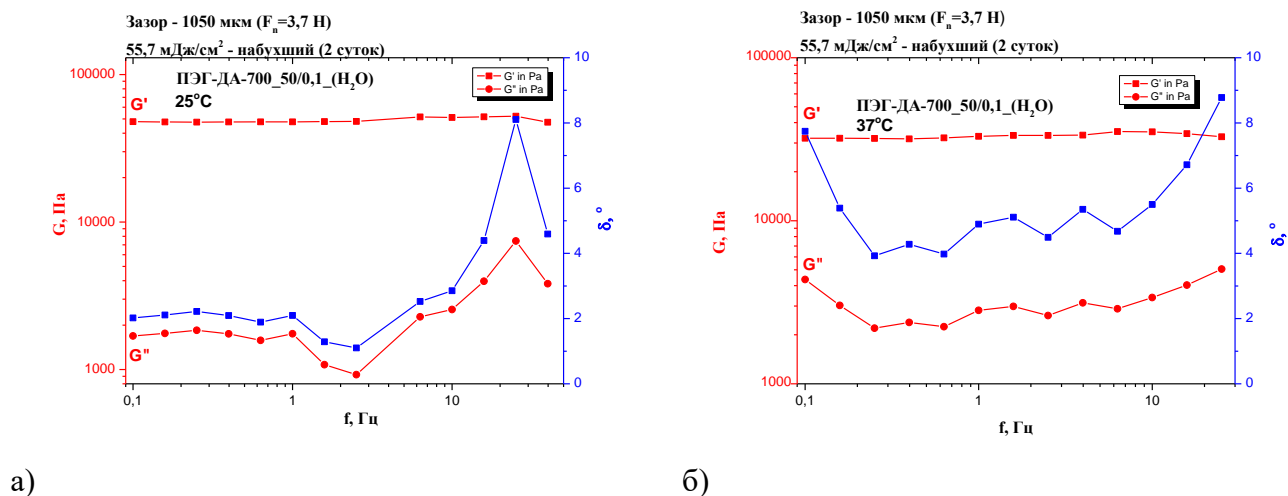


Рис. 4.65. Зависимость упругой ( $G'$ ) и вязкой ( $G''$ ) компонент модуля сдвига, а также фактора потерь  $\delta$  от частоты P-700\_50/0,1 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (нормальная сила – 3,7 Н; доза – 55,7  $\text{мДж}/\text{см}^2$ , набухший) при а) 25 °С и б) 37 °С.

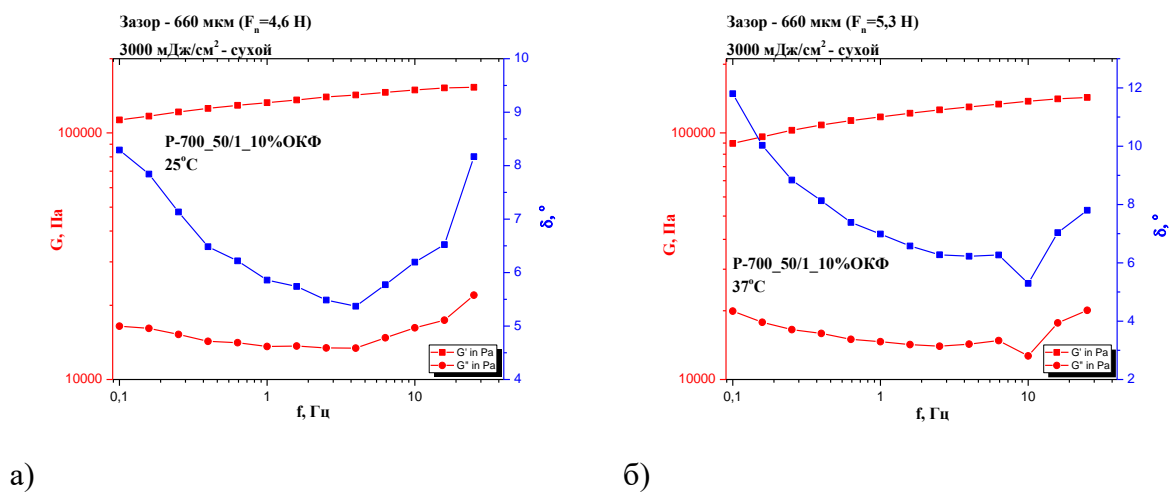


Рис. 4.66. Зависимость упругой ( $G'$ ) и вязкой ( $G''$ ) компонент модуля сдвига, а также фактора потерь  $\delta$  от частоты для P-700\_50/1\_10%ОКФ (нормальная сила – 4,6 Н; доза – 3  $\text{Дж}/\text{см}^2$ , сухой,  $T=25^\circ\text{C}$ ) (слева) и P-700\_50/1\_10%ОКФ (нормальная сила – 5,3 Н; доза – 3  $\text{Дж}/\text{см}^2$ , сухой,  $T=37^\circ\text{C}$ ) (справа).

Исследование вязкости фотоотверждаемых суспензий на примере смеси ПЭГ-ДА-700, воды, фотоинициатора и порошка брушита показало (Рис. 4.67), что суспензии демонстрируют псевдопластичный характер течения: вязкость уменьшается при увеличении скорости сдвига. По-видимому, это связано с ориентированием частиц брушита при течении.

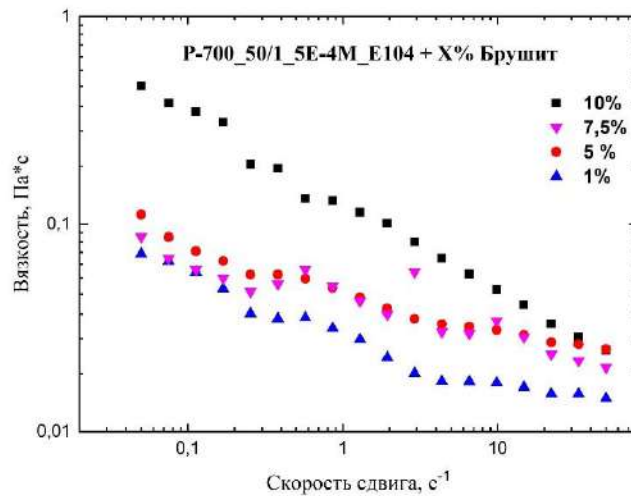


Рис. 4.67. Вязкость фотоотверждаемых суспензий, наполненных брушитом.

#### 4.7.3 Механические характеристики

Исследуемые композиты предполагается вводить в костный дефект в сжатом состоянии, после чего необходима обратимая упругая деформация материала в теле дефекта. Для определения предела упругой деформации, а также прочности макропористых композитов проводились механические испытания при сжатии. Для получения корректных результатов печатались цилиндрические образцы высотой 12 мм и диаметром 6 мм с послойным разрешением 200 мкм.

В Табл. 4.17 представлены рассчитанные из кривых нагружения значения модулей Юнга макропористых и плотных материалов, а также относительная жесткость (отношение модулей Юнга материалов со структурой гироида и плотных цилиндров). Выбранная для испытаний структура гироида в ходе проведения экспериментов по компьютерному моделированию одноосного нагружения давала значения относительной жесткости **0,09** (Табл. 4.14). Экспериментальные значения для различных материалов, как пустых гидрогелей, так и композитов, практически совпадают с данным значением, что позволяет заменять трудоемкие и рутинные механические испытания реальных образцов на виртуальные эксперименты по моделированию.

Табл. 4.17. Рассчитанные значения модулей упругости гидрогелей и композитов (в МПа).

Обозначение	Гироид		Плотный		Относительная жесткость ( $E_{\text{гироид}}/E_{\text{плотн}}$ )	
	Сухой	набухший	Сухой	набухший	сухой	Набухший
<b>P_700_100/1</b>	0,03	0,04	0,33	-	<b>0,10</b>	-
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104</b>	0,01	0,01	0,08	0,08	<b>0,06</b>	<b>0,05</b>
<b>P-700_50/0,1_5E-4M_E104</b>		0,01	0,40			
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_5%ОКФ</b>	0,01	0,01	0,07	0,06	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_5%брушит</b>	0,01	0,01	0,11	-	<b>0,05</b>	-
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_10%брушит</b>	0,01	0,01	0,11	0,10	<b>0,10</b>	<b>0,10</b>

Типичные кривые нагружения плотного и макропористого (гироид) композитов представлены на Рис. 4.68. Для плотного образца зависимость отклоняется от линейной вероятно из-за процессов перестроения полимерной сетки при сжатии, а для макропористого образца зависимость линейна до предела прочности (0,2 МПа), после которого происходит разрушение из-за предельного выгибания поверхности, образующей каркас материала. При этом после первого разрушения композит способен выдерживать минимальную нагрузку (порядка 0,05 МПа), кривая приобретает пилообразный вид, каждый «зубец» которой соответствует разрушению одной поверхности (в случае ячеистых структур – одной балки).

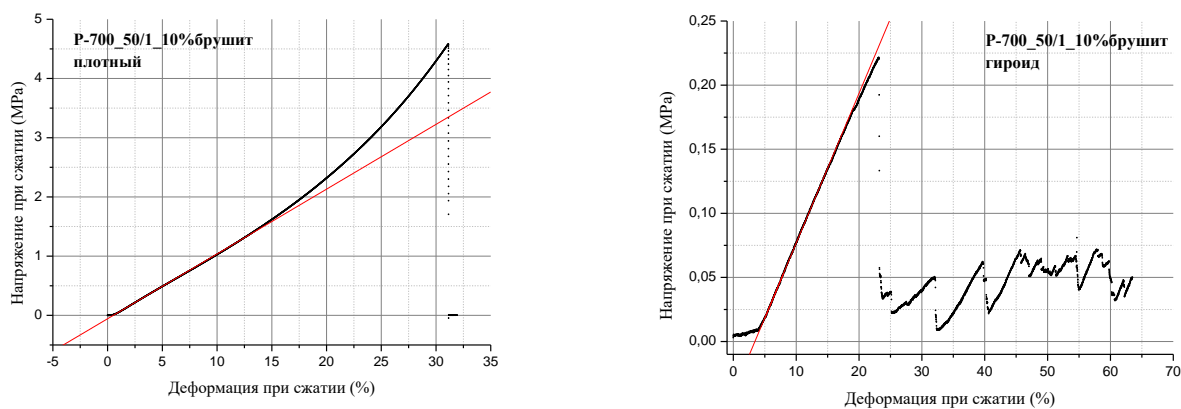


Рис. 4.68. Зависимости напряжения при сжатии от деформации для композита **P-700\_50/1\_10%брушит** с плотной (слева) и пористой (справа) архитектурой (скорость нагружения – 1 мм/мин, красная линия – аппроксимация кривой в области линейной упругой деформации).

Увеличение доли наполнителя композита увеличивает предел прочности при сжатии (Табл. 4.18), при этом порошок с меньшими частицами (ОКФ) является менее прочным как в случае плотных композитов, так и макропористых. Низкие значения прочности также могут быть связаны

с недостаточной полимеризацией композитов ( $\alpha = 0,40 \pm 0,05$ ). Достижение более высоких значений возможно при дополнительной обработке композитов УФ-излучением после 3D-печати. Упругая деформация макропористых материалов составляет 13–14% (Табл. 12.2, 12 Приложение). Таким образом, размер входного отверстия в дефект можно уменьшить не более чем на данную величину. Увеличение деформации материала приведёт к перестроению его структуры вплоть до разрушения. Для получения более деформируемых материалов, по-видимому, требуется использование мономера с большей длиной углеродной цепи (большей молекулярной массой) или введение большего количества воды в состав исходной суспензии (за счёт использования более водорастворимого ФИ).

Табл. 4.18. Пределы прочности гидрогелей и композитов (в МПа).

Обозначение	Гироид		Плотный	
	Сухой	набухший	сухой	набухший
<b>P_700_100/1</b>	0,31	0,21	19,87	
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104</b>	0,03	0,03	1,79	1,17
<b>P-700_50/0,1_5E-4M_E104</b>		0,03	2,04	
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_5%ОКФ</b>	0,05	0,05	1,57	1,06
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_5%брушит</b>	0,07	0,08	2,71	
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_10%брушит</b>	0,17	0,17	4,21	3,23

#### 4.7.4 Дегградация гидрогелей в модельной среде

Для оценки динамики дегградации гидрогелей и композитов в качестве модельной среды использовалась лимонная кислота, содержащаяся в костной ткани (2 масс.%), и играющая важную роль в метаболизме костной ткани (в частности, на стадии резорбции, обеспечивая противоионом протонные насосы мембран остеокластов). Можно выделить несколько процессов, происходящих в ходе такого эксперимента: 1) вымывание остатков мономеров из полимерного геля и осмотическое выравнивание содержания воды в порах геля и окружающем растворе; 2) частичное расщепление эфирных связей в ПЭГ-цепочках, подобно ферментативному гидролизу в организме; 3) резорбция частиц фосфатов кальция, наполняющих гидрогель, и их дальнейшая консолидация с нативной костной тканью. На Рис. 4.69 показаны зависимости изменения массы гидрогелей на основе диакрилата полиэтиленгликоля от времени выдержки в лимонной кислоте.

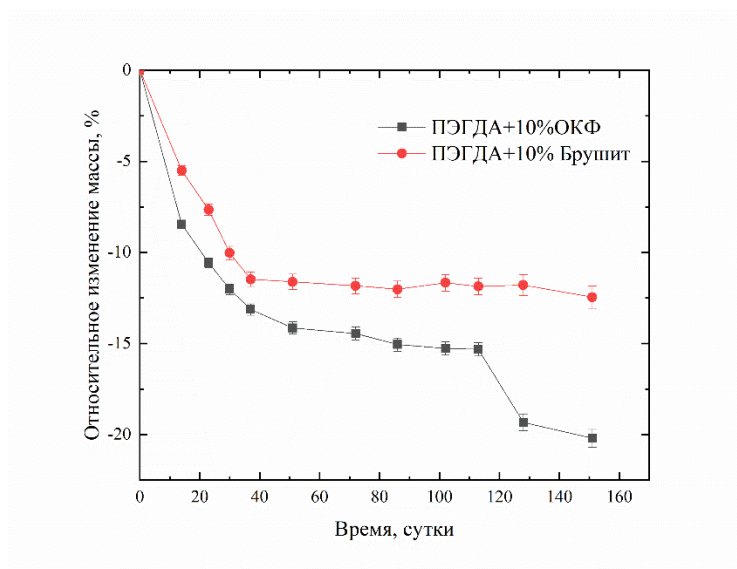


Рис. 4.69. Кривые зависимости биодegradации композитов гидрогелей на основе ПЭГ-ДА 700

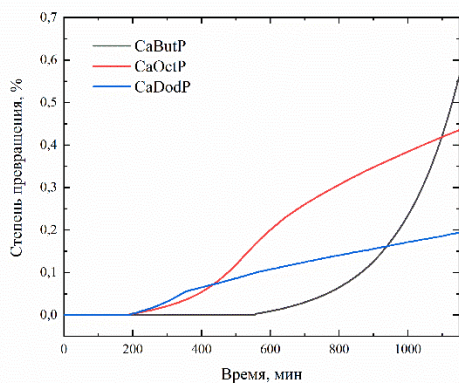
В ходе эксперимента по биодegradации установлено, что гидрогели на основе ПЭГ-ДА-700, наполненные ОКФ, с учётом набухания претерпевают большую биодegradацию по сравнению с гидрогелями, наполненными брушитом. Для учета процесса набухания проводились параллельно эксперименты по набуханию и по выдерживанию гелей в лимонной кислоте для корректировки процесса набухания.

В случае наполнения алкилфосфатами степень растворения наполнителя оценивалась исходя из количества потраченной на рН-статирование лимонной кислоты за определенный промежуток времени по представленным реакциям:

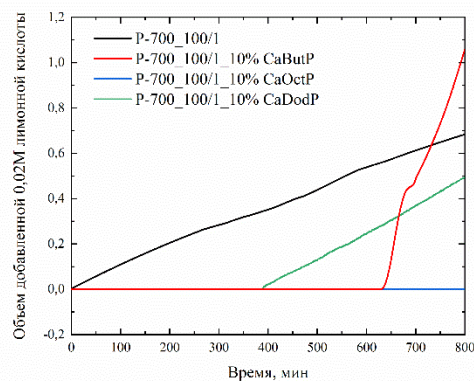


Эксперименты по статированию при рН=5 показали медленную скорость растворения как порошков, так и композитов (объем добавленной кислоты не изменялся в течение 24 часов). При рН=4 (Рис. 4.70) наблюдалось полное растворение всех порошков и частичное растворение композитов (в основном за счёт растворения наполнителя). Скорость и степень превращения порошков увеличивается с уменьшением длины алкильной цепи (Рис. 4.70 аРис. 4.70). В случае композитов и ненаполненного гидрогеля Р-700\_100/1 (Рис. 4.70 б) сравнение характера дegradации материалов проводилось по удельному объему добавленной лимонной кислоты из-за сложного

процесса их деградации: в случае композитов накладывается эффект растворения наполнителя и деградации сложно сшитой полимерной сетки гидрогеля.



а)



б)

Рис. 4.70. Кривые зависимости а) степени конверсии алкилфосфатов кальция (в виде порошков) от времени; б) объема добавленной кислоты к гидрогелю P-700\_100/1 и его композитам с алкилфосфатами кальция от времени; полученные в ходе экспериментов по статированию при pH 4 в 0,02M водном р-ре лимонной кислоты.

#### 4.7.5 Медико-биологические испытания композитов с гидрогелевой матрицей

##### 4.7.5.1 In vitro испытания

Для исследования на цитотоксичность (МТТ-тест) были представлены следующие образцы:

**A – P-700\_100/1\_1E-4M\_E104**

**B – P-700\_50/1\_5E-4M\_E104 ( $\alpha=0,5$ )**

**C – P-700\_50/1\_5E-4M\_E104 ( $\alpha=0,6$ )**

**D – P-700\_100/1**

**E – P-700\_50/1\_5E-4M\_E104\_2,5M\_CaCl<sub>2</sub>+Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (диффузия в течение суток)**

**K – контроль (пустая лунка)**

**DMSO – ДМСО для МТТ-теста**

Выбор образцов был продиктован необходимостью оценить токсичность всех компонентов фотоотверждаемой суспензии (мономера, ФИ, красителя), а также образцов с различной степенью полимеризации. Из Рис. 4.71 видно, что наименьшее количество формазана по сравнению с контролем имеет образец В – гидрогель с оптимальной для 3D печати концентрацией красителя. Полученное различие в оптической плотности можно трактовать как слабо-токсическую реакцию. Кроме того, образец В обладал наименьшей степенью конверсии C=C, что свидетельствует о



наибольшем количестве остаточного мономера, который может сам по себе продемонстрировать цитотоксический эффект.

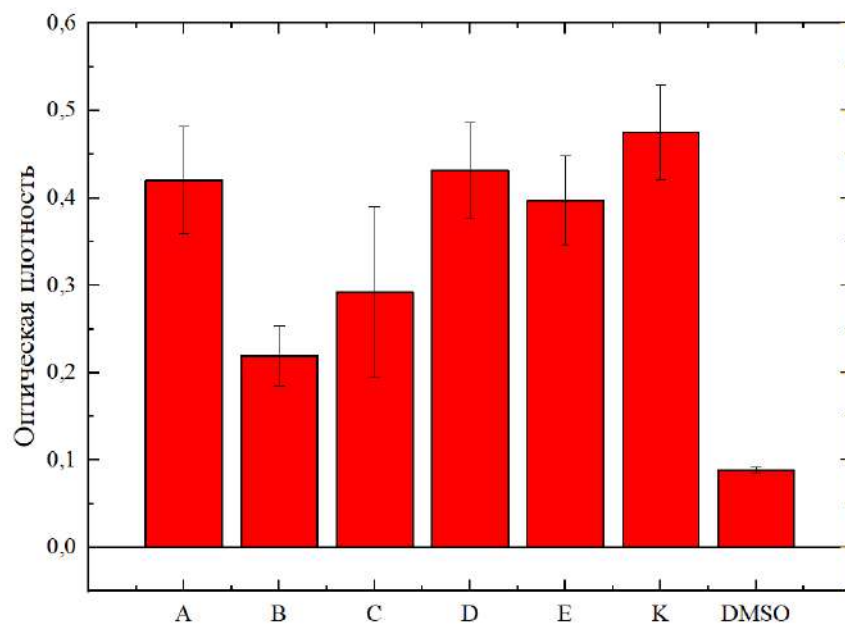


Рис. 4.71. Оптическая плотность цветных растворов после добавления ДМСО к формазану (K – контроль), образцы B и C значимо (по критерию Манну-Уитни) отличаются от контрольного образца K.

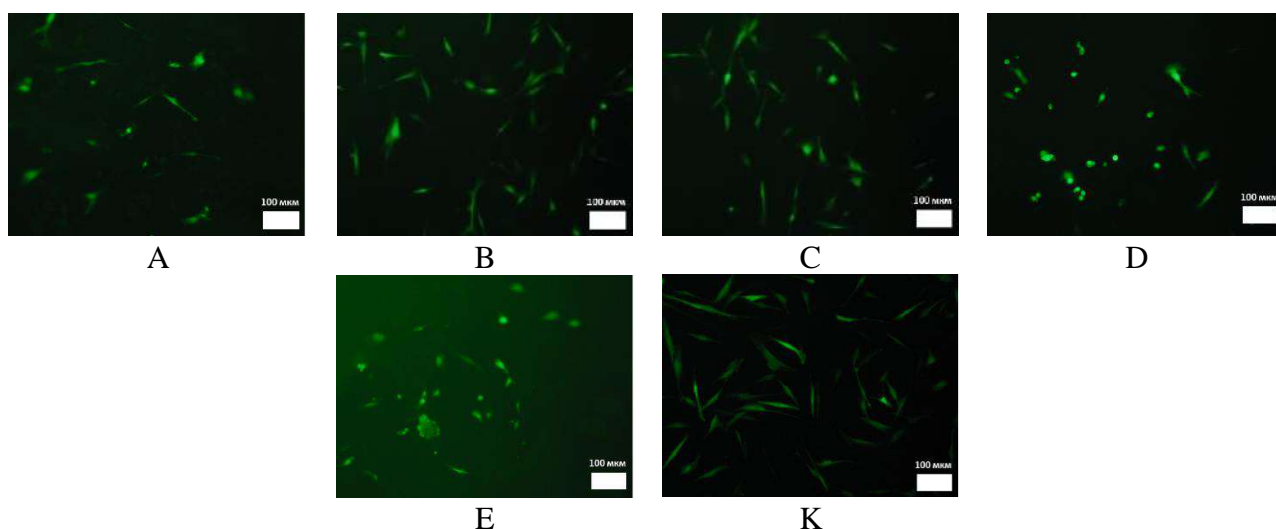


Рис. 4.72. Данные оптической флуоресцентной микроскопии гидрогелей и композитов на их основе (1 сутки культивирования, зеленая окраска вызвана белком GFP, присутствующем в используемых МСК человека).

По данным оптической флуоресцентной микроскопии (Рис. 4.72) можно говорить о том, что адгезия МСК человека на всех исследуемых материалах происходит сравнимо с контрольным образцом. В случае выращивания кристаллов брусита диффузией ионов  $\text{HPO}_4^{2-}$  в гидрогель, содержащий соль  $\text{CaCl}_2$  (E), побочный продукт  $\text{NaCl}$  не оказывает токсического влияния на культивируемые клетки. Исследуемые доли красителя ( $1 \cdot 10^{-4}$  и  $5 \cdot 10^{-4}$  М, образцы A, C, E) и ФИ (1

масс. %) не оказывают токсического влияния на клетки, происходит их адгезия и распластывание по поверхности, схожая с образцом контроля (покрывное стекло) (Рис. 12.4).

#### 4.7.5.2 *In vivo* испытания

Для имплантации материалов *in vivo* производился критический полуцилиндрический диафизарный дефект бедренной кости крысы (его модель представлена на Рис. 4.73 – Рис. 4.74). При имплантации материалов проводилась профилактика инфекционных осложнений, для чего строго соблюдались правила асептики и антисептики. Проводилось пресечение трех путей передачи инфекции – имплантационного, контактного и воздушного.

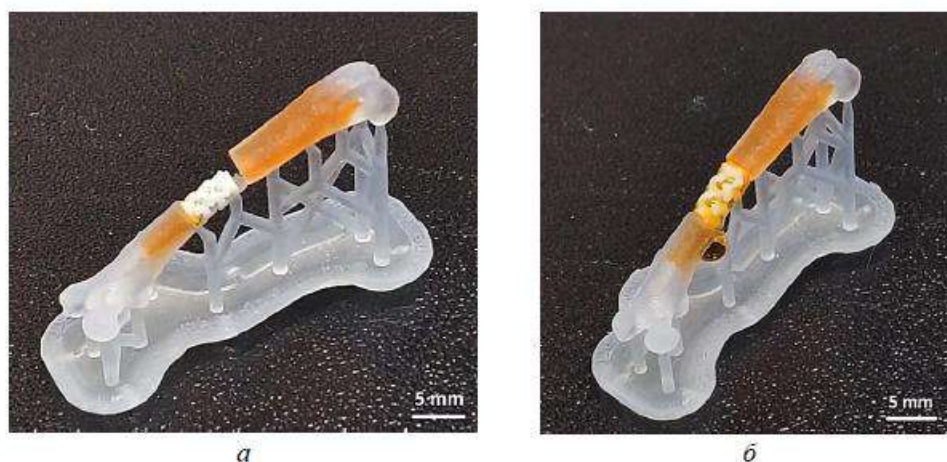


Рис. 4.73. Фотографии «фантома» бедренной кости крысы с моделированным продольным костным дефектом; а) продемонстрировано заполнение дефекта композитным материалов ОКФ/гидрогель в первоначальный момент (0 минут); б) продемонстрировано плотное заполнение дефекта набухшим композитом ОКФ/гидрогель спустя 30 минут выдерживания в подкрашенном водном растворе.

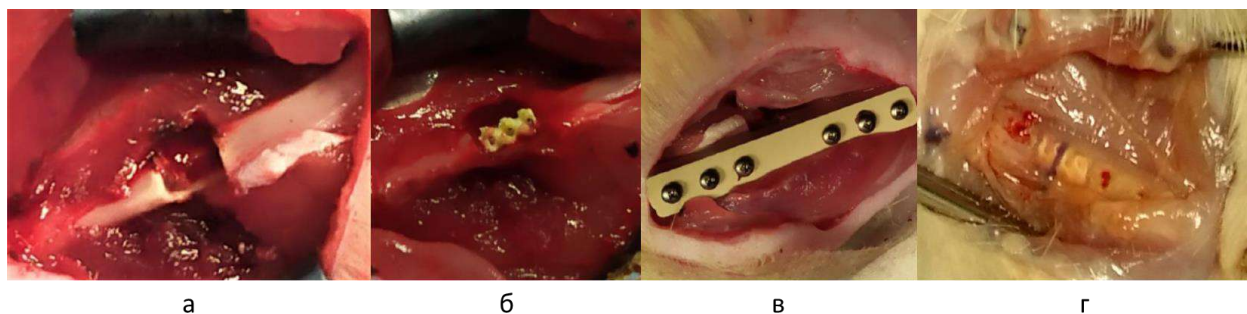


Рис. 4.74. Этапы имплантации материала на основе гидрогеля и ОКФ: а) сформированный дефект средней трети диафиза бедренной кости с помощью фрезы; б) имплантация макропористого материала в зону дефекта; в) фиксация бедренной кости пластиной и винтами; г) вид заполненной зоны дефекта через 3 недели после имплантации перед забором образцов для гистологического исследования.

Изменений поведения животных в процессе наблюдения не зафиксировано. Все животные после выхода из наркоза и до вывода из эксперимента передвигались на четырех лапах без

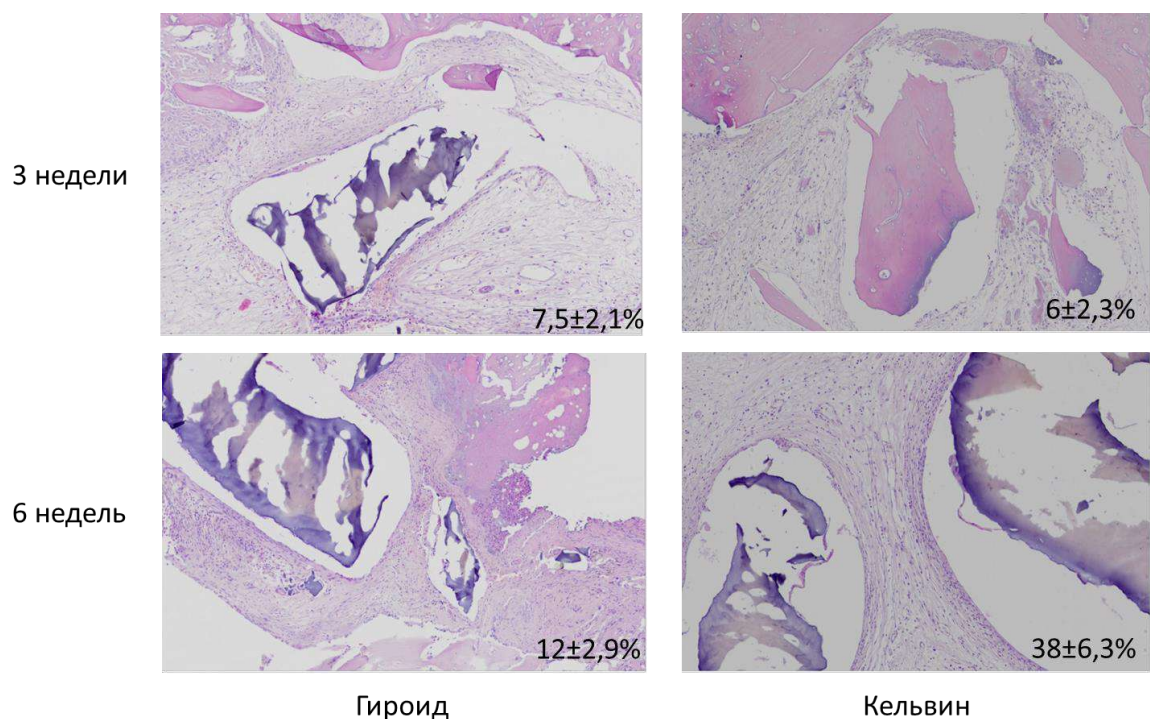
ограничений. У всех животных послеоперационные раны зажили первичным натяжением. Внешних признаков инфекционных осложнений зафиксировано не было. В процессе забора материала при осмотре зоны имплантации также не было зафиксировано признаков нагноения, повреждения или миграции фиксаторов, переломов кости.

Табл. 4.19. Отношение площади новообразованной костной ткани к площади костного дефекта по группам исследования

Группа	Срок наблюдения, недели	Средняя площадь новообразованной костной ткани, мм <sup>2</sup>	Максимальная площадь новообразованной костной ткани, мм <sup>2</sup>	Минимальная площадь новообразованной костной ткани, мм <sup>2</sup>
Контроль	3	0,1462	0,8350	0,0000
	6	0,0515	0,7070	0,0000
Кельвин	3	1,2650	2,9780	0,0870
	6	0,9107	1,8270	0,0000
Гироид	3	0,0497	0,6060	0,0000
	6	0,0853	0,6710	0,0000

Для имплантации на сроки 3 и 6 недель были изготовлены образцы со структурой «Кельвин» и «Гироид» с наибольшей проницаемостью, полученной в ходе моделирования остеокондуктивных свойств (см. раздел 4.6, Табл. 4.14). Во всех группах (Рис. 4.75) на препаратах отмечается зрелая пластинчатая костная ткань оставшейся части диафиза бедренной кости, при этом на некоторых препаратах отмечается реакция периоста и эндоста в виде формирования костной ткани в подлежащей к ним областях (размером до 50% от первоначальной толщины кости), тесно связанных с кортикальной костной тканью, однако это явление не носит постоянный характер и, вероятно, обусловлено неспецифической реакцией указанных тканей на операцию и имплантацию. Указанный фрагмент стенки диафиза бедренной кости являлся постоянным маркером расположения и распространения дефекта на препаратах.

В группе «Гироид» на гистологических срезах обращает на себя внимание наличие округлых пустот, повторяющих контуры имплантируемых блоков материала, содержащих меньшие по площади окрашиваемые в коричнево-красный цвет структуры, не содержащих клеточных элементов и волокон различной неправильной формы с наличием постоянных ленточных элементов строения. Данные объекты расценены как остатки гидрогеля, из которого изготавливались блоки материала. На гистологических препаратах через 3 недели с момента имплантации отмечено полное заполнение пор материала грануляционной соединительной тканью с довольно активным образованием трабекул кости.



*Рис. 4.75. Гистологические срезы костной ткани (окрашивание гематоксилин-эозином) в области дефекта кости крысы после 6-недельной имплантации исследуемых материалов с указанной долей заполнения дефекта костной тканью.*

В группе «Кельвин» на гистологических препаратах также выявляются зоны округлых пустот, повторяющих контуры имплантируемых блоков материала, содержащих меньшие по площади окрашиваемые в коричнево-красный цвет структуры, не содержащих клеточных элементов и волокон различной неправильной формы с наличием постоянных ленточных элементов строения. При этом форма этих пустот отличается от таковых на препаратах с имплантированным материалом с архитектурой типа «гироид». Osteoconductive свойства материала с архитектурой Кельвина были выражены лучше, о чем говорит большая масса костной ткани вокруг материала и в его порах (статистически площадь новообразованной кости через 6 недели в группе «Кельвин» больше, чем в группе «Гироид», U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ). По скорости деградации материала образцы в группах «Гироид» и «Кельвин» были сопоставимы.

На основании полученных данных можно сделать вывод о превосходстве в плане osteoconductive свойств архитектуры «Кельвин» над архитектурой «Гироид» у материалов на основе ПЭГДА-700\_10%ОКФ. Одной из причин этого может быть биологическое взаимодействие тканей с трехмерными порами, приводящее к запуску определенных механотрансдуктивных сигналов и направлению дифференцировки клеток-предшественников по пути остеобластов, лучше выраженное в структуре «Кельвин». Альтернативной причиной может являться более быстрая

деградация и потеря механической структуры материала с архитектурой типа «гиرويد», что на поздних сроках затруднило образование новой кости.

## 5 Заключение

На текущий момент множество гидрогелей как природного, так и синтетического происхождения нашли своё коммерческое применение [176] в качестве средств доставки лекарств, материалов гигиенических средств, ранозаживляющих изделий и контактных линз, в тканевой инженерии. Полученные в ходе работы композиционные материалы на основе гидрогелевой полиэтиленгликоль диакрилатной матрицы, наполненной слоистыми фосфатами кальция, предлагаются впервые для апробации замещения дефектов костной ткани. Материалы с пористостью 70% и архитектурой типа «гиронид» без пост-обработки обладают уникальным сочетанием свойств: набуханием вплоть до 15–18% в размерах и до 100% по массе, прочностью до 0,17 МПа, предельной обратимой деформацией до 14,2% и деградацией на 15–16% по массе в течение 100 суток выдерживания в 0,1 М растворе лимонной кислоты. Изменение исходного состава гидрогеля и количества наполнителя позволяет получать требуемые свойства конечного имплантата. В литературе известны примеры получения гидрогелей, наполненных частицами гидроксиапатита [134,177,178] или трехкальциевого фосфата [179] с использованием ПЭГ-ДА в качестве матрицы и процесса фотополимеризации в качестве метода получения. В большей части работ используется водорастворимый и широкодоступный фотоинициатор Irgacure®2959, который не применим в методе проекционной 3D-печати из-за несоответствия длины волны источников излучения и диапазона поглощения излучения фотоинициатором. Встречается ряд работ, в которых октакальциевый фосфат используется в качестве наполнителей композитов на основе желатина [180,181], альгината натрия [182], поликапролактона [183], образуется в результате гидролиза пористого скаффолда на основе  $\alpha$ -ТКФ, полученного методом струйной 3D печати [184]. Такие композиты обладают лучшей механической стойкостью по сравнению с разработанными композитами ПЭГ-ДА/слоистые фосфаты кальция, однако их получают методами с менее точным воспроизведением требуемой архитектуры изделия (экструзионная печать, струйная печать) или традиционными методами (электроспиннинг, вспенивание), которыми невозможно контролировать пористую архитектуру.

## 6 Выводы

- 1) Предложены три вида слоистых фосфатов кальция для наполнения гидрогелей и в качестве прекурсоров для изготовления керамики: брушит –  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , октакальциевый фосфат –  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (ОКФ) и его сукцинат- и адипинатзамещенные аналоги, а также алкилфосфаты кальция  $\text{Ca}(\text{RPO}_4\text{H})_2$  ( $\text{R}=\text{C}_4\text{H}_9, \text{C}_8\text{H}_{17}, \text{C}_{12}\text{H}_{25}$ ). Показано, что определяющее

влияние на латеральный размер кристаллов брушита и ОКФ оказывают такие параметры синтеза, как pH и температура, а также их смешанное действие.

- 2) Термолиз адипинатзамещенного ОКФ приводит к образованию  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (800 °С) с формированием апатитоподобной промежуточной фазы (выше 400 °С). Керамика наибольшей плотности и твердости получена из продуктов термолиза адипинатзамещенного ОКФ при 600 °С. Термическое разложение алкилфосфатов кальция протекает в 2–3 стадии, связанные с удалением кристаллизационной воды и пиролизом органического аниона, с образованием  $\beta$ - $\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$  с примесями оксида кальция и гидроксиапатита при 600 °С. При температуре спекания состав керамики представлен фазами  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  и  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .
- 3) Добавление красителя, кальций-фосфатного наполнителя различной гранулометрии, а также увеличение доли фотоинициатора позволяет решить проблему высокой фоточувствительности гидрогелей при стереолитографической печати: снизить фоточувствительность (с единиц мм до 0,2 мм) и добиться послойного разрешения печати (до 100 мкм), достаточного для воспроизведения заданной архитектуры имплантата.
- 4) Однородное наполнение гидрогеля (до 10 масс. %) удалось реализовать при введении в состав мономера заранее синтезированных кристаллов брушита или ОКФ. Выращивание кристаллов фосфатов в гидрогелевой матрице за счет односторонней диффузии ионов  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{HPO}_4^{2-}$  в заполимеризованный гидрогель приводит к их формированию преимущественно на поверхности гидрогеля, контактирующей с раствором.
- 5) Проведены реологические, механические и токсикологические испытания композитов гидрогель/фосфат кальция, а также изучен процесс их набухания в воде в зависимости от состава фотосуспензии (молярной массы мономера, доли воды, фотоинициатора и наполнителя). Введение кальций-фосфатного наполнителя снижает степень конверсии двойных связей  $\text{C}=\text{C}$  при полимеризации гидрогеля, усиливает вклад от вязкого элемента в реологическом описании материала и повышает статический предел прочности при сжатии.
- 6) В рамках предложенного в работе априорного подхода к анализу архитектуры osteoconductive имплантатов показано, что наибольшей податливостью и проницаемостью обладают структуры Кельвина и типа «гиرويد»; проницаемость имплантатов с такой архитектурой макропор и пористостью 70% при протекании через них воды близки к соответствующей характеристике губчатой костной ткани (~1000 дарси).
- 7) С использованием установленных параметров стереолитографической печати были изготовлены прототипы композитных имплантатов на основе гидрогелей из

полиэтиленгликоль-диакрилата ( $M_w=700$  Да), наполненных 10 масс. % ОКФ, со структурами Кельвина и типа «гироид» с пористостью 70% и размерами пор 1,5 мм в форме цилиндров (диаметр 6 мм, высота 10–12 мм), которые продемонстрировали образование костной ткани в порах материала в течение 3 и 6 недель при замещении монокортикального дефекта диафиза бедренной кости крысы. Результаты медико-биологических испытаний позволяют рекомендовать подобные материалы к дальнейшим испытаниям в качестве остеокондуктивных резорбируемых имплантатов для слабонагруженных участков скелета.



## 7 Список литературы

1. Crockett J.C. et al. Bone remodelling at a glance // *J. Cell Sci.* 2011. Vol. 124, № 7. P. 991–998.
2. Florencio-Silva R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells // *Biomed Res. Int.* 2015. Vol. 2015.
3. Wang W., Yeung K.W.K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review // *Bioact. Mater.* Elsevier Ltd, 2017. Vol. 2, № 4. P. 224–247.
4. Doremus R.H. Bioceramics // *J. Mater. Sci.* 1992. Vol. 27. P. 285–297.
5. Hench L.L. Bioceramics // *Stress Int. J. Biol. Stress.* 1998. Vol. 28. P. 1705–1728.
6. Kokubo T., Kim H., Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties // *Biomaterials.* 2003. Vol. 24. P. 2161–2175.
7. Roberts T.T., Rosenbaum A.J. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing // *Organogenesis.* 2012. Vol. 8, № 4. P. 114–124.
8. Boskey A.L. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects // *BoneKEY Reports 2.* Nature Publishing Group, 2013. № 447. P. 1–11.
9. Murugan R., Ramakrishna S. Development of nanocomposites for bone grafting // *Compos. Sci. Technol.* 2005. Vol. 65. P. 2385–2406.
10. Pal S. Design of artificial human joints & organs // *Des. Artif. Hum. Joints Organs.* 2014. Vol. 9781461462. P. 1–419.
11. Фигурска М. Структура компактной костной ткани // *Российский журнал биомеханики.* 2007. Vol. 11, № 3. P. 28–38.
12. Evdokimov P. V. et al. Osteoconductive ceramics with a specified system of interconnected pores based on double calcium alkali metal phosphates // *Dokl. Chem.* 2015. Vol. 460, № 2. P. 61–65.
13. Баринов С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. Наука, 2005. Vol. 2. 204 р.
14. Путляев В.И., Сафронова Т.В. Новое поколение кальцийфосфатных биоматериалов: роль фазового и химического составов // *Стекло и керамика.* Стекло и керамика, 2006. № 3. P. 30–33.
15. LeGeros R.Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics // *Clin. Mater.* 1993. Vol. 14, № 1. P. 65–88.
16. Barbucci R. *Hydrogels: Biological Properties and Applications.* Springer Milano, 2009. 197 p.
17. Gupta P., Vermani K., Garg S. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery // *Drug Discov. Today.* 2002. Vol. 7, № 10. P. 569–579.
18. Sperling L.H. *Introduction to physical polymer science.* 4th ed. 2006. 866 p.
19. Wang Y., Zhang S., Wang J. Photo-crosslinkable hydrogel and its biological applications // *Chinese Chem. Lett.* Chinese Chemical Society and Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, 2021. Vol. 32, № 5. P. 1603–1614.

20. Yan Q. et al. Controlled release of simvastatin-loaded thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for bone tissue regeneration: In vitro and in vivo characteristics // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2015. Vol. 103, № 11. P. 3580–3589.
21. Liu M. et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering // *Bone Res*. 2017. Vol. 5, № January.
22. Gibbs D.M.R. et al. A review of hydrogel use in fracture healing and bone regeneration. 2014.
23. Bemmelen J.M. Der Hydrogel und das kristallinische Hydrat des Kupferoxydes // *Zeitschrift für Chemie und Ind. der Kolloide*. 1907. Vol. 1, № 7. P. 225–227.
24. Wichterle O., Lím D. Hydrophilic Gels for Biological Use // *Nature*. 1960. Vol. 185, № 4706. P. 117–118.
25. Peppas N.A. et al. Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels in drug delivery // *J. Control. Release*. 1999. Vol. 62. P. 81–87.
26. Hydrogel sensors and actuators / ed. Gerlach G., Arndt K.-F. 2006. Vol. 4, № 5. 251 p.
27. Singh A., Elisseeff J. Biomaterials for stem cell differentiation // *J. Mater. Chem*. 2010. Vol. 20, № 40. P. 8832–8847.
28. Samadian H. et al. Natural polymers-based light-induced hydrogels: Promising biomaterials for biomedical applications // *Coord. Chem. Rev. Elsevier B.V.*, 2020. Vol. 420. P. 213432.
29. Potiwiput S. et al. Dual-crosslinked alginate/carboxymethyl chitosan hydrogel containing in situ synthesized calcium phosphate particles for drug delivery application // *Mater. Chem. Phys. Elsevier B.V.*, 2020. Vol. 241.
30. Peppas N.A. et al. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology // *Adv. Mater*. 2006. Vol. 18, № 11. P. 1345–1360.
31. Swami S.N. Radiation synthesis of polymeric hydrogels for swelling-controlled drug release studies. Doctor of philosophy candidate thesis. 2004.
32. Ottenbrite R., Park K., Okano T. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. 2010.
33. Shet R. et al. Effect of Crosslinking Agent Concentration on the Properties of Unmedicated Hydrogels. 2015. P. 305–319.
34. Ferry J.D. *Viscoelastic Properties of Polymers*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Ltd, 1980. 631 p.
35. Кузнецов О.А., Волошин Е.В., Сагитов Р.Ф. Реология пищевых масс: Учебное пособие. Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005. 106 p.
36. Mezger T.G. *The Rheology handbook For users of rotational and oscillatory rheometers*. 4th ed. 2014.
37. Sun J.Y. et al. Highly stretchable and tough hydrogels // *Nature*. Nature Publishing Group, 2012. Vol. 489, № 7414. P. 133–136.
38. Czerner M. et al. Determination of Elastic Modulus of Gelatin Gels by Indentation Experiments // *Procedia Mater. Sci. Elsevier B.V.*, 2015. Vol. 8. P. 287–296.
39. Gäbler S. et al. Determination of the viscoelastic properties of hydrogels based on polyethylene glycol

- diacrylate ( PEG-DA ) and human articular cartilage // *Int. J. Mater. Eng. Innov.* 2009. Vol. 1, № 1. P. 3–20.
40. Chan V. et al. Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation // *Lab Chip*. 2010. Vol. 10, № 16. P. 2062–2070.
  41. Cavallo A. et al. Photo-crosslinked poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA) hydrogels from low molecular weight prepolymer: Swelling and permeation studies // *J. Appl. Polym. Sci.* 2017. Vol. 134, № 2. P. 1–9.
  42. Padmavathi N.C., Chatterji P.R. Structural Characteristics and Swelling Behavior of Poly(ethylene glycol) Diacrylate Hydrogels // *Macromolecules*. 1996. Vol. 29, № 6. P. 1976–1979.
  43. Flory P.J., Rehner J. Statistical mechanics of cross-linked polymer networks I. Rubberlike elasticity // *J. Chem. Phys.* 1943. Vol. 11, № 11. P. 512–520.
  44. Hawkins A.M. et al. Tuning biodegradable hydrogel properties via synthesis procedure // *Polymer (Guildf)*. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 54, № 17. P. 4422–4426.
  45. Pereira I. et al. Injectable hydrogels as a delivery system for bone regeneration // *Bioinspired Materials for Medical Applications*. Elsevier Ltd., 2016. 241–271 p.
  46. Mcbath R.A., Shipp D.A. Swelling and degradation of hydrogels synthesized with degradable poly ( b -amino ester ) crosslinkers // *Polym. Chem.* 2010. Vol. 1. P. 860–865.
  47. Bryant S.J., Anseth K.S. Photopolymerization of Hydrogel Scaffolds // *Scaffolding in tissue engineering*. 2005. № 6. P. 71–90.
  48. Yong K., Bouhadir K.H., Mooney D.J. Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules // *Biomaterials*. 2004. Vol. 25. P. 2461–2466.
  49. Shi K. et al. Synthesis, characterization and application of reversible PDLA-PEG-PDLA copolymer thermogels in vitro and in vivo // *Nat. Publ. Gr. Nature Publishing Group*, 2016. № December 2015. P. 1–15.
  50. Reid B. et al. PEG hydrogel degradation and the role of the surrounding tissue environment // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013. Vol. 9, № 3. P. 315–318.
  51. Browning M.B., Cosgriff-hernandez E. Development of a Biostable Replacement for PEGDA Hydrogels // *Biomacromolecules*. 2012. Vol. 13, № 3. P. 779–786.
  52. Browning M.B., Cereceres S.N., Luong P.T. Determination of the in vivo degradation mechanism of PEGDA hydrogels. 2014. Vol. 2014, № January. P. 4244–4251.
  53. Fairbanks B.D. et al. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2009. Vol. 30, № 35. P. 6702–6707.
  54. Ferreira P. et al. Photocrosslinkable Polymers for Biomedical Applications. 2011.
  55. Nguyen K.T., West J.L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications // *Biomaterials*. 2002. Vol. 23. P. 4307–4314.
  56. Уэйн Р. Основы и применения фотохимии / ed. Верещагин Л.Н., Разживин А.П. Мир, 1991. 304 p.

57. Starly B., Chang R., Sun W. UV-Photolithography fabrication of poly-ethylene glycol hydrogels encapsulated with hepatocytes // Proceedings of the 17th Annual Solid Freeform Fabrication Symposium, University of Texas at Austin. 2006. P. 102–110.
58. Lee J.H., Prud R.K., Aksay I.A. Cure depth in photopolymerization : Experiments and theory // J. Mater. Res. 2001. Vol. 16, № 12. P. 3536–3544.
59. Halloran J.W. et al. Photopolymerization of powder suspensions for shaping ceramics // J. Eur. Ceram. Soc. 2011. Vol. 31, № 14. P. 2613–2619.
60. Ifkovits J.L., Burdick J.A. Review : Photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications // Tissue Eng. 2007. Vol. 13, № 10. P. 2369–2385.
61. Brady G.A., Halloran J.W. Differential photo-calorimetry of photopolymerizable ceramic suspensions // J. Mater. Sc. 1998. Vol. 3. P. 4551–4560.
62. Hamid Z.A.A., Lim K.W. Evaluation of UV-crosslinked Poly(ethylene glycol) Diacrylate/Poly(dimethylsiloxane) Dimethacrylate Hydrogel: Properties for Tissue Engineering Application // Procedia Chem. Elsevier Ltd., 2016. Vol. 19. P. 410–418.
63. Choi D. et al. Preparation of poly(ethylene glycol) hydrogels with different network structures for the application of enzyme immobilization // Biomed. Mater. Eng. 2008. Vol. 18, № 6. P. 345–356.
64. Siguan M.A., Fischer R. Development and Characterization of a Hydrogel for Flexible and Stretchable Substrates. 2017. P. 1–5.
65. Bäckström S. et al. Tailoring Properties of Biocompatible PEG-DMA Hydrogels with UV Light // Mater. Sci. Appl. 2012. Vol. 03, № 06. P. 425–431.
66. Gorsche C. et al. Real Time-NIR/MIR-Photorheology: A Versatile Tool for the in Situ Characterization of Photopolymerization Reactions // Anal. Chem. 2017. Vol. 89, № 9. P. 4958–4968.
67. Kambly K. Characterization of curing kinetics and polymerization shrinkage in ceramic-loaded photocurable resins for large area maskless photopolymerization (lamp) // A Thesis Present. to Acad. Fac. 2009. Vol. Georgia In. P. 1–65.
68. Bartolo P.J. Stereolithography. Materials, Processes and Applications. Springer, 2011.
69. McAvoy K., Jones D., Thakur R.R.S. Synthesis and Characterisation of Photocrosslinked poly(ethylene glycol) diacrylate Implants for Sustained Ocular Drug Delivery // Pharm. Res. 2018. Vol. 35, № 2. P. 36.
70. Gibas I., Janik H. Review : Synthetic polymer hydrogels for biomedical applications // Chem. Chem. Technol. 2010. Vol. 4, № 4. P. 297–304.
71. Yañez-Soto B. et al. Biochemically and topographically engineered poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels with biomimetic characteristics as substrates for human corneal epithelial cells // J. Biomed. Mater. Res. - Part A. 2013. Vol. 101 A, № 4. P. 1184–1194.
72. Tan G. et al. Synthesis and Characterization of Injectable Photocrosslinking Poly ( ethylene glycol ) Diacrylate based Hydrogels. 2008. Vol. 98. P. 91–98.
73. Cuchiara M.P. et al. Biomaterials Multilayer microfluidic PEGDA hydrogels // Biomaterials. 2010. Vol. 31, № 21. P. 5491–5497.

74. Au A.K. et al. Biocompatible 3d-printed peg-diacrylate microfluidics // 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. 2015. P. 1548–1550.
75. Benedikt S. et al. Highly efficient water-soluble visible light photoinitiators // J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. 2016. Vol. 54, № 4. P. 473–479.
76. Karaca N. et al. Preparation of hydrogels by photopolymerization of acrylates in the presence of Type I and one-component Type II photoinitiators // J. Photochem. Photobiol. A Chem. 2010. Vol. 209, № 1. P. 1–6.
77. Ligon S.C. et al. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. 2017.
78. Pawar A.A. et al. High-performance 3D printing of hydrogels by water-dispersible photoinitiator nanoparticles // Sci. Adv. 2016. Vol. 2, № 4. P. 1–7.
79. Alonso R.C.B. et al. Photoinitiator concentration and modulated photoactivation: influence on polymerization characteristics of experimental composites // Appl. Adhes. Sci. 2014. Vol. 2, № 1. P. 10.
80. McElroy D.M. et al. The effect of photoinitiator concentration on the physicochemical properties of hydrogel contact lenses // Appl. Mech. Mater. 2014. Vol. 679. P. 118–127.
81. Khandaker M. et al. Biomechanical Performances of Networked Polyethylene Glycol Diacrylate : Effect of Photoinitiator Concentration , Temperature , and Incubation Time // Int. J. Biomater. 2016. Vol. 2016. P. 8.
82. Tomeckova V. et al. Photopolymerization of acrylate suspensions with visible dyes // J. Eur. Ceram. Soc. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 33, № 4. P. 699–707.
83. Maslowska J., Janiak J. Voltammetric and Spectrophotometric Studies on Tartrazine - a Food Colorant // Chem. Anal. 1996. Vol. 41. P. 855–864.
84. Berzas Nevado J.J., Rodríguez Flores J., Villaseñor Llerena M.J. Simultaneous spectrophotometric determination of Tartrazine, Sunset Yellow and Ponceau 4R in commercial products by partial least squares and principal component regression multivariate calibration methods // Fresenius. J. Anal. Chem. 1998. Vol. 361, № 5. P. 465–472.
85. Kim S., Chu C. Fabrication of a Biodegradable Polysaccharide Hydrogel With Riboflavin , Vitamin B2 , as a Photo-Initiator and L -Arginine as Coinitiator Upon UV Irradiation // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009. Vol. 91, № 1. P. 390–400.
86. Tomeckova V., Halloran J.W. Flow behavior of polymerizable ceramic suspensions as function of ceramic volume fraction and temperature // J. Eur. Ceram. Soc. 2011. Vol. 21. P. 2535–2542.
87. Gentry S.P., Halloran J.W. Depth and width of cured lines in photopolymerizable ceramic suspensions // J. Eur. Ceram. Soc. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 33, № 10. P. 1981–1988.
88. Chartier T. et al. Stereolithography process : Influence of the rheology of silica suspensions and of the medium on polymerization kinetics – Cured depth and width // J. Eur. Ceram. Soc. 2012. Vol. 32. P. 1625–1634.
89. Tomeckova V., Halloran J.W. Critical energy for photopolymerization of ceramic suspensions in acrylate monomers // J. Eur. Ceram. Soc. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 30, № 16. P. 3273–3282.
90. Dorozhkin S. V. Biphasic, Triphasic and Multiphasic Calcium Orthophosphates // Acta Biomater.

- Acta Materialia Inc., 2012. Vol. 8, № 3. P. 963–977.
91. Dorozhkin S. Bioceramics of calcium orthophosphates // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 31, № 7. P. 1465–1485.
  92. Bose S., Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review // *Acta Biomater*. Acta Materialia Inc., 2012. Vol. 8, № 4. P. 1401–1421.
  93. Dapporto M. et al. A novel route for the synthesis of macroporous bioceramics for bone regeneration // *J. Eur. Ceram. Soc*. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 36, № 9. P. 2383–2388.
  94. Tozzi G. et al. Composite Hydrogels for Bone Regeneration. 2016. P. 1–24.
  95. LeGeros R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. // *Clin. Orthop. Relat. Res*. United States, 2002. № 395. P. 81–98.
  96. Каназава Т. Неорганические фосфатные материалы. Киев: Наукова думка, 1998. 298 p.
  97. Song Y. et al. Electrodeposition of Ca – P coatings on biodegradable Mg alloy: In vitro biomineralization behavior // *Acta Biomater*. Acta Materialia Inc., 2010. Vol. 6, № 5. P. 1736–1742.
  98. Hurle K. et al. Ion-doped Brushite Cements for Bone Regeneration // *Acta Biomater*. Elsevier Ltd, 2021. Vol. 123. P. 51–71.
  99. Al-Sanabani J.S., Madfa A.A., Al-Sanabani F.A. Application of calcium phosphate materials in dentistry // *Int. J. Biomater*. 2013. Vol. 2013.
  100. Kuznetsov V.N. et al. Controllability of brushite structural parameters using an applied magnetic field // *Mater. Sci. Eng. C*. Elsevier B.V., 2016. Vol. 60. P. 547–553.
  101. Heijnen W.M.M., Hartman P. Structural morphology of gypsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), brushite ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) and pharmacolite ( $\text{CaHAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) // *J. Cryst. Growth*. 1991. Vol. 108. P. 290–300.
  102. Curry N.A., Jones D.W. Crystal Structure of Brushite, Calcium Hydrogen Orthophosphate Dihydrate: A Neutron-diffraction Investigation // *J. Chem. Soc. A*. 1971. P. 3725–3729.
  103. Pan H., Darvell B.W. Solubility of Dicalcium Phosphate Dihydrate by Solid Titration // *Caries Res*. 2009. Vol. 43. P. 254–260.
  104. Monma H., Goto M. Complexes of apatitic layered compound  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  with dicarboxylates // *J. Incl. Phenom*. 1984. Vol. 2, № 1–2. P. 127–134.
  105. Frost R.L., Palmer S.J. Thermal stability of the ‘ cave ’ mineral brushite  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – Mechanism of formation and decomposition // *Thermochim. Acta*. 2011. Vol. 521. P. 14–17.
  106. Mathew M. et al. Crystal structure of octacalcium bis(hydrogenphosphate) tetrakis(phosphate)pentahydrate,  $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  // *J. Crystallogr. Spectrosc. Res*. 1988. Vol. 18, № 3. P. 235–250.
  107. Гурин А.Н. et al. Октакальций фосфат . Метастабильная фаза минерализации биологических апатитов // *Российский стоматологический журнал*. 2012. Vol. 3. P. 4–8.
  108. Suzuki O. Octacalcium phosphate: Osteoconductivity and crystal chemistry // *Acta Biomater*. Acta Materialia Inc., 2010. Vol. 6, № 9. P. 3379–3387.

109. Boanini E. et al. Antiresorption implant coatings based on calcium alendronate and octacalcium phosphate deposited by matrix assisted pulsed laser evaporation // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. Elsevier B.V., 2015. Vol. 136. P. 449–456.
110. Arellano-Jiménez M.J., García-García R., Reyes-Gasga J. Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction // *J. Phys. Chem. Solids*. 2009. Vol. 70, № 2. P. 390–395.
111. Путляев В.И. et al. Особенности термолитза октакальциевого фосфата // *Новые огнеупоры*. 2013. Vol. 10. P. 52–56.
112. Тихонов А.А. et al. Синтез Замещенного Октакальциевого Фосфата Для Наполнения Композитных Имплантатов На Основе Полимерных Гидрогелей, Сформированных Стереолитографической 3 D -Печатью // *Неорганические Материалы*. 2018. Vol. 54, № 10. P. 1123–1132.
113. Markovic M. et al. Octacalcium phosphate carboxylates. 1. Preparation and Identification // *Chem. Mater*. 1993. Vol. 5, № 10. P. 1401–1405.
114. Davies E. et al. Citrate bridges between mineral platelets in bone // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2014. Vol. 111, № 14.
115. Yokoi T. et al. Incorporation of tetracarboxylate ions into octacalcium phosphate for the development of next-generation biofriendly materials // *Commun. Chem. Springer US*, 2021. P. 2–11.
116. Цикл трикарбоновых кислот [Electronic resource]. URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Цикл\\_трикарбоновых\\_кислот](https://ru.wikipedia.org/wiki/Цикл_трикарбоновых_кислот).
117. Lagazzo A. et al. Molecular level interactions in brushite-aminoacids composites. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. Netherlands*, 2017. Vol. 70, № Pt 1. P. 721–727.
118. Tanaka H. et al. Formation and structure of calcium alkyl phosphates. // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 1998. Vol. 139. P. 341–349.
119. Fiore M. The synthesis of mono-alkyl phosphates and their derivatives: An overview of their nature, preparation and use, including synthesis under plausible prebiotic conditions // *Org. Biomol. Chem. Royal Society of Chemistry*, 2018. Vol. 16, № 17. P. 3068–3086.
120. Ozin G.A. et al. Bone mimetics: A composite of hydroxyapatite and calcium dodecylphosphate lamellar phase // *J. Mater. Chem.* 1997. Vol. 7, № 8. P. 1601–1607.
121. Ishikawa T. et al. Modification of calcium hydroxyapatite using ethyl phosphates // *J. Mater. Chem.* 1995. Vol. 5, № 11. P. 1963–1967.
122. Wu J. et al. Influence of alkyl chain length on calcium phosphate deposition onto titanium surfaces modified with alkylphosphonic acid monolayers // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2013. Vol. 101 A, № 8. P. 2267–2272.
123. Xu D. et al. Solvent-Free Synthesis of Surfactants of High-Carbon Alkyl Phosphates Used for Cosmetics // *J. Surfactants Deterg.* 2018. Vol. 21, № 6. P. 789–795.
124. Spori D.M. et al. Influence of alkyl chain length on phosphate self-assembled monolayers // *Langmuir*. 2007. Vol. 23, № 15. P. 8053–8060.
125. Nelson A.K., Toy A.D.F. The Preparation of Long-Chain Monoalkyl Phosphates from

- Pyrophosphoric Acid and Alcohols // *Inorg. Chem.* 1963. Vol. 2, № 4. P. 775–777.
126. Baumgarten H.E., Setterquist R.A. Pyrolysis of Alkyl Phosphates // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. Vol. 79, № 10. P. 2605–2608.
127. Cihlar J., Castkova K. Synthesis of calcium phosphates from alkyl phosphates by the sol-gel method // *Ceram. - Silikaty.* 1998. Vol. 42, № 4. P. 164–170.
128. Dueymes C., Pirat C., Pascal R. Facile synthesis of simple mono-alkyl phosphates from phosphoric acid and alcohols // *Tetrahedron Lett.* 2008. Vol. 49, № 36. P. 5300–5301.
129. Champion E. Sintering of calcium phosphate bioceramics // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2013. Vol. 9, № 4. P. 5855–5875.
130. Hench L.L., Thompson I. Twenty-first century challenges for biomaterials // *J. R. Soc. Interface.* 2010. Vol. 7, № SUPPL. 4.
131. Bouler J.M., LeGeros R.Z., Daculsi G. Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta-TCP ratio. // *J. Biomed. Mater. Res. United States*, 2000. Vol. 51, № 4. P. 680–684.
132. Ryu H. et al. An improvement in sintering property of beta-tricalcium phosphate by addition of calcium pyrophosphate. 2002. Vol. 23. P. 909–914.
133. Kamitakahara M., Ohtsuki C., Miyazaki T. Review paper: Behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition // *J. Biomater. Appl.* 2008. Vol. 23, № 3. P. 197–212.
134. Gaharwar A.K. et al. Highly Extensible , Tough , and Elastomeric Nanocomposite Hydrogels from Poly ( ethylene glycol ) and Hydroxyapatite Nanoparticles // *Biomacromolecules.* 2011. P. 1641–1650.
135. Egorov A.A. et al. 3D printing of mineral-polymer bone substitutes based on sodium alginate and calcium phosphate // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016. Vol. 7, № 1. P. 1794–1799.
136. Dessì M. et al. Novel biomimetic thermosensitive  $\beta$ -tricalcium phosphate/chitosan-based hydrogels for bone tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 2013. Vol. 101, № 10. P. 2984–2993.
137. Basu P. et al. Biocompatibility and biological efficiency of inorganic calcium filled bacterial cellulose based hydrogel scaffolds for bone bioengineering // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 12. P. 1–16.
138. Zhu W. et al. 3D Printed Nanocomposite Matrix for the Study of Breast Cancer Bone Metastasis // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier B.V.*, 2016. Vol. 12, № 1. P. 69–79.
139. Demirtaş T.T., Irmak G., Gümüşderelioğlu M. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering // *Biofabrication. IOP Publishing*, 2017. Vol. 9, № 3. P. 35003.
140. Schweikle M. et al. Stabilisation of amorphous calcium phosphate in polyethylene glycol hydrogels // *Acta Biomater. Acta Materialia Inc.*, 2019. Vol. 90. P. 132–145.
141. Yokoi T. et al. Synthesis of calcium phosphate crystals in a silica hydrogel containing phosphate ions // *J. Mate. Res.* 2009. Vol. 24, № 6. P. 2154–2160.
142. Iijima M., Moriwaki Y. Lengthwise and oriented growth of octacalcium phosphate crystal in polyacrylamide gel in a model system of tooth enamel apatite formation // *J. Cryst. Growth.* 1998.



- Vol. 194. P. 125–132.
143. Yokoi T. et al. Formation of octacalcium phosphate with incorporated succinic acid through gel-mediated processing // *JCS-Japan*. 2010. Vol. 118, № 6. P. 491–497.
  144. Tanahashi M. et al. Fibrous hydroxyapatite grown in the gel system : effects of pH of the solution on the growth rate and morphology // *J. Mater. Sc.* 1992. Vol. 3. P. 48–53.
  145. Yokoi T., Kawashita M., Ohtsuki C. Biomimetic mineralization of calcium phosphates in polymeric hydrogels containing carboxyl groups // *J. Asian Ceram. Soc. Taibah University*, 2013. Vol. 1, № 2. P. 155–162.
  146. Добровольский А.Г. Шликерное литье. Изд. 2-е., «Металлургия», 1977. 240 p.
  147. Zocca A. et al. Additive Manufacturing of Ceramics: Issues, Potentialities, and Opportunities // *J. Am. Ceram. Soc.* 2015. Vol. 98, № 7. P. 1983–2001.
  148. Studart A.R. et al. Processing routes to macroporous ceramics: A review // *J. Am. Ceram. Soc.* 2006. Vol. 89, № 6. P. 1771–1789.
  149. Гордеев Е.Г., Анаников В.П. Общедоступные технологии 3D-печати в химии, биохимии и фармацевтике: приложения, материалы, перспективы // *Успехи Химии*. 2020. Vol. 89, № 12. P. 1507–1561.
  150. Ni J. et al. Three-dimensional printing of metals for biomedical applications // *Mater. Today Bio.* 2019. Vol. 3.
  151. Hull C.W. Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects By Stereolithography // *Patent*. 1984. № 19. P. 16.
  152. Finny A.S., Jiang C., Andreescu S. 3D Printed Hydrogel-Based Sensors for Quantifying UV Exposure // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2020. Vol. 12, № 39. P. 43911–43920.
  153. Ligon S.C. et al. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing // *Chem. Rev.* 2017. Vol. 117, № 15. P. 10212–10290.
  154. Blaeser A. et al. 3D bioprinting of cell-laden hydrogels for advanced tissue engineering // *Curr. Opin. Biomed. Eng. Elsevier Ltd*, 2017. Vol. 2. P. 58–66.
  155. Jang T. et al. 3D printing of hydrogel composite systems: Recent advances in technology for tissue engineering. // *Int. J. bioprinting. Singapore*, 2018. Vol. 4, № 1. P. 126.
  156. Bauer J. et al. High-strength cellular ceramic composites with 3D microarchitecture // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. Vol. 111, № 7. P. 2453–2458.
  157. Kapfer S.C. et al. Biomaterials Minimal surface scaffold designs for tissue engineering // *Biomaterials. Elsevier Ltd*, 2011. Vol. 32, № 29. P. 6875–6882.
  158. Gariboldi M.I., Best S.M. Effect of Ceramic Scaffold Architectural Parameters on Biological Response. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015. Vol. 3. P. 151.
  159. Chang H.I., Wang Y. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds // *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. 2011.
  160. Brinkmann J. et al. Response of osteoclasts to titanium surfaces with increasing surface roughness: an in vitro study. // *Biointerphases. United States*, 2012. Vol. 7, № 1–4. P. 34.

161. Zadpoor A.A. Bone tissue regeneration: The role of scaffold geometry // *Biomater. Sci. Royal Society of Chemistry*, 2015. Vol. 3, № 2. P. 231–245.
162. Saito E. et al. Effects of designed PLLA and 50:50 PLGA scaffold architectures on bone formation in vivo. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013. Vol. 7, № 2. P. 99–111.
163. Hing K.A. Bioceramic bone graft substitutes: Influence of porosity and chemistry // *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2005. Vol. 2, № 3. P. 184–199.
164. Socrates G. Infrared and Raman characteristic group frequencies // *Infrared and Raman characteristic group frequencies*. 3rd ed. John Wiley & Sons Ltd, 2004. 366 p.
165. Puigdomenech I. Chemical Equilibrium Diagrams [Electronic resource]. URL: <https://www.kth.se/che/medusa/chemeq-1.369367>.
166. Dicarboxylic acid [Electronic resource]. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Dicarboxylic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Dicarboxylic_acid).
167. Eriksson G. An algorithm for the computation of aqueous multicomponent, multiphase equilibria // *Anal. Chim. Acta.* 1979. Vol. 112. P. 375–383.
168. Gustafsson J.P. Visual MINTEQ ver. 3.1 [Electronic resource]. URL: <https://vminteq.lwr.kth.se/>.
169. Monma H. The Incorporation of Dicarboxylates into Octacalcium Bis(hydrogenphosphate) Tetrakis(phosphate) Pentahydrate // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1984. Vol. 57, № 2. P. 599–600.
170. Markovic M., Fowler B., Brown W.E. Octacalcium phosphate carboxylates 4. Kinetics of formation and solubility of octacalcium phosphate succinate // *J. Cryst. Growth.* 1994. Vol. 135. P. 533–538.
171. Sugiura Y., Makita Y. Ammonium inhibition of the intercalation of dicarboxylic acid molecules into octacalcium phosphate layer by substitution // *J. Solid State Chem.* Elsevier Ltd, 2019. Vol. 279, № June. P. 120923.
172. Suzuki O. et al. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27, № 13. P. 2671–2681.
173. Кукуева Е.В. et al. Октакальциевый Фосфат Как Прекурсор Для Синтеза Композитной Биокерамики // *Неорганические Материалы.* 2017. Vol. 53, № 2. P. 198–205.
174. Yokoi T. et al. Synthesis of Octacalcium Phosphate Containing Glutarate Ions with a High Incorporation Fraction // *Materials (Basel).* 2023. Vol. 16, № 1.
175. Gibson L.J., Ashby M.F. *Cellular Solids: Structure and Properties* // Cambridge Solid State Science Series. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
176. Cascone S., Lamberti G. Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review // *Int. J. Pharm.* 2020. Vol. 573. P. 118803.
177. Liu W. et al. PEGDA/HA mineralized hydrogel loaded with Exendin4 promotes bone regeneration in rat models with bone defects by inducing osteogenesis // *J. Biomater. Appl.* SAGE Publications Ltd STM, 2021. Vol. 35, № 10. P. 1337–1346.
178. Wang Y. et al. A GelMA-PEGDA-nHA Composite Hydrogel for Bone Tissue Engineering // *Materials.* 2020. Vol. 13, № 17.
179. Chronopoulou L. et al. Biosynthesis of innovative calcium phosphate/hydrogel composites: physicochemical and biological characterisation // *Nanotechnology.* IOP Publishing, 2021. Vol. 32,

№ 9. P. 95102.

180. Panzavolta S. et al. Porous composite scaffolds based on gelatin and partially hydrolyzed  $\alpha$ -tricalcium phosphate // *Acta Biomater.* 2009. Vol. 5, № 2. P. 636–643.
181. Miura K. et al. Characterization and bioactivity of nano-submicro octacalcium phosphate/gelatin composite // *Appl. Surf. Sci.* 2013. Vol. 282. P. 138–145.
182. Bordbar-Khiabani A. et al. Octacalcium Phosphate-Laden Hydrogels on 3D-Printed Titanium Biomaterials Improve Corrosion Resistance in Simulated Biological Media // *International Journal of Molecular Sciences.* 2023. Vol. 24, № 17.
183. Heydari Z., Mohebbi-Kalhari D., Afarani M.S. Engineered electrospun polycaprolactone (PCL)/octacalcium phosphate (OCP) scaffold for bone tissue engineering // *Mater. Sci. & Eng. C, Mater. Biol. Appl. Materials Engineering Department, Faculty of Engineering, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran., 2017.* Vol. 81. P. 127–132.
184. Komlev V.S. et al. 3D printing of octacalcium phosphate bone substitutes // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2015. Vol. 3, № JUN. P. 1–7.

## 8 Приложение. Свойства фосфатов кальция

Табл. 8.1. Свойства фосфатов кальция [91].

Формула, название	Обозначение рус./англ.	Ca/P	Плотность, г/см <sup>3</sup>
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> монокальциевый фосфат	МКФ (MCPA)	0,5	2,22
CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O дикальциевый фосфат дигидрат	ДКФД (DCPD)	1	2,319
CaHPO <sub>4</sub> дикальциевый фосфат	ДКФ (DCPA)	1	2,929
Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O октакальциевый фосфат	ОКФ (OCP)	1,33	2,673
Ca <sub>x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>y</sub> ·zH <sub>2</sub> O аморфный фосфат кальция	АФК (ACP)	1,2-2,2	-
Ca <sub>10-x</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6-x</sub> (OH) <sub>2-x</sub> нестехиометрический гидроксиапатит (кальций дефицитный)	нГАП (CDHA)	1,5-1,67	-
α-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> α-трехкальциевый фосфат	α-ТКФ (α-TCP)	1,5	2,814
β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> β-трехкальциевый фосфат	β-ТКФ (β-TCP)	1,5	3,067
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> гидроксиапатит	ГАП (HA)	1,67	3,155
Ca <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>9</sub> тетракальциевый фосфат	ТТКФ (TTCP)	2	3,056

Табл. 8.1. Свойства фосфатов кальция [91] (продолжение).

Формула, название	Ca/P	Растворимость при 25 °С, г/л	Интервал стабильности рН (25 °С)	Произведение растворимости	
				рПР (25 °С)	рПР (37 °С)
Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> монокальциевый фосфат	0,5	~17	-	1,14	-
CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O дикальциевый фосфат дигидрат	1	~0,088	2-6	6,59	6,63
CaHPO <sub>4</sub> дикальциевый фосфат	1	~0,048	2-6	6,90	7,02
Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O октакальциевый фосфат	1,33	~0,0081	5,5-7	96,6	95,9
Ca <sub>x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>y</sub> ·zH <sub>2</sub> O аморфный фосфат кальция	1,2-2,2	-	>5	25,7-32,7	-
Ca <sub>10-x</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6-x</sub> (OH) <sub>2-x</sub> нестехиометрический гидроксиапатит (кальций дефицитный)	1,5-1,67	~0,0094	6,5-9,5	85,1	85,1
α-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> α-трехкальциевый фосфат	1,5	~0,0025	-	25,5	25,5
β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> β-трехкальциевый фосфат	1,5	~0,0005	-	28,9	29,5
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub> гидроксиапатит	1,67	~0,0003	9,5-12	116,8	117,2
Ca <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>9</sub> тетракальциевый фосфат	2	~0,0007	-	38-44	37-42

## 9 Приложение. Анализ условий получения порошков слоистых фосфатов кальция

Табл. 9.1. Факторный план эксперимента по исследованию зависимости размеров кристаллов брушита от условий синтеза.

№ синтеза	pH	T, °C	C <sub>реак</sub> , M	pH Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Средний размер частиц (мода 1/мода 2), мкм	Примесь ОКФ/ГАП
1	6,51	25	0,3	8,96	32,7	-
2	4	25	0,3	9,21	10,3	-
3	6,3	25	0,1	9,2	18,0	-
4	4	25	0,1	9,38	растворился	-
5	6,5	40	0,3	9,24	9,5	-
6	4	40	0,3	8,05	13,2/2,4	-
7	5,36	40	0,1	9,34	11,3/4,9	-
8	4	40	0,1	7,34	9,2	+

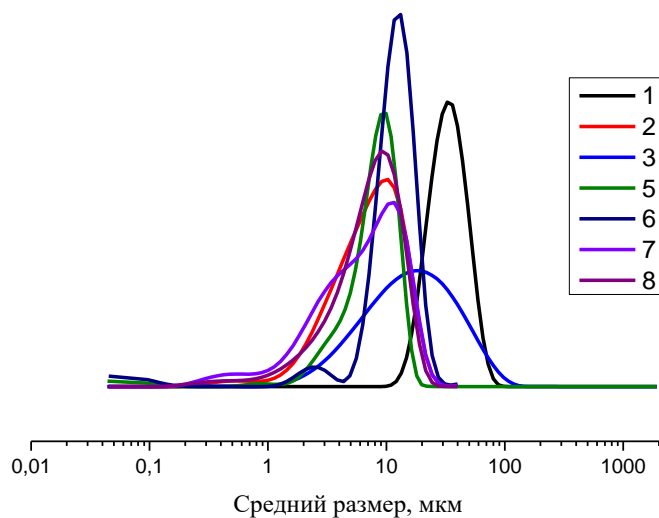


Рис. 9.1. Графики распределения среднего размера частиц брушита, полученных при варьировании условий синтеза (pH, T, C).

Табл. 9.2. Факторный план эксперимента по исследованию зависимости размера кристаллов ОКФ от условий синтеза.

№ синтеза	pH	T, °C	C <sub>буф</sub> , M	Моды размеров частиц, мкм	Фаза ОКФ по данным РФА (+ - чистая, - - брушит, ± - смесь ОКФ и брушита)
1	5,75	60	0,1	0,5/2,2/10,9	±
2	5,75	40	0,1	0,6/4,1	-
3	5,75	60	0,3	1,5/9,7	-
4	5,75	40	0,3	0,6/7,6	-
5	6	60	0,1	0,7/6,7	+
6	6	40	0,1	0,4/7,4	-
7	6	60	0,3	0,2/1,5	±
8	6	40	0,3	0,4/2,8	-

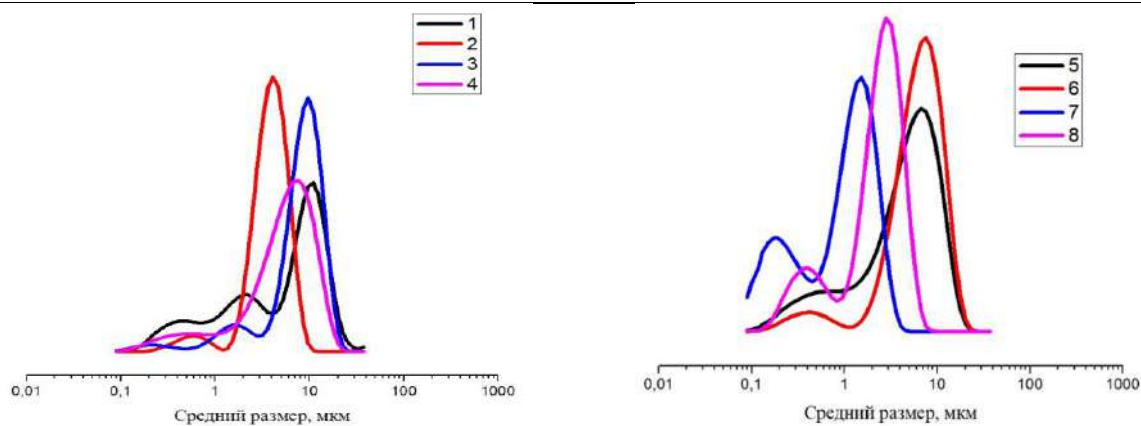


Рис. 9.2. Графики распределения среднего размера частиц ОКФ, полученных при варьировании условий синтеза (рН, T, C).

Табл. 9.3. Факторный план эксперимента по исследованию зависимости размера кристаллов  $Suc@OKF$  от условий синтеза.

№ синтеза	рН	T, °C	C <sub>буф</sub> , М	Моды размеров частиц, мкм	Фаза $Suc@OKF$ по данным РФА (+ - чистая, - - брушит)
1	6	60	0,1	10,8	+
2	5,5	60	0,1	0,3/1,3/4,0/31,2	+
3	5,5	60	0,25	2,7/9,0/30,8	+
4	6	60	0,25	3,3/8,1/29,6	+
5	6	40	0,25	4,9/18,0	+
6	5,5	40	0,25	-	-
7	5,5	40	0,1	-	-
8	6	40	0,1	2,8/6,4/24,2	+

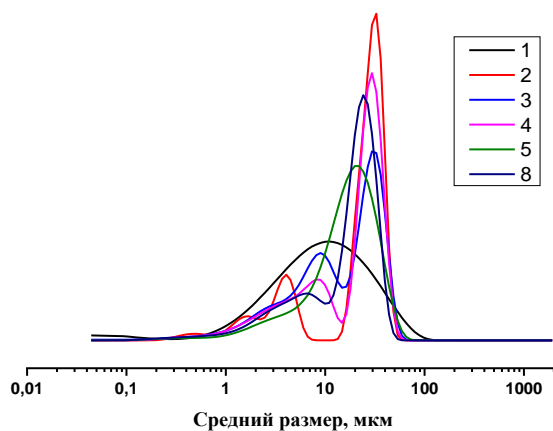
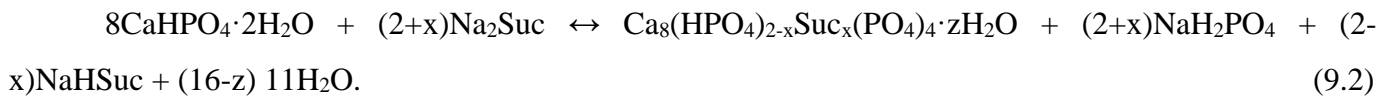
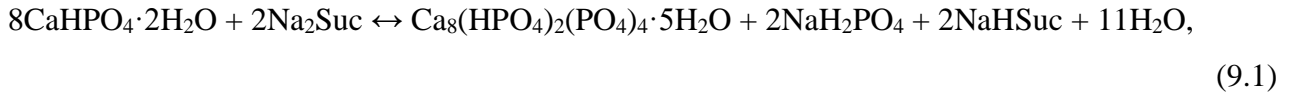


Рис. 9.3. Графики распределения среднего размера частиц  $Suc@OKF$ , полученных при варьировании условий синтеза (рН, T, C).

## 10 Приложение. Особенности ионных и гетерогенных равновесий в растворах, содержащих фазы ОКФ, брушита и $\alpha$ -ТКФ

*Синтез ОКФ гидролизом брушита в сукцинатном буферном растворе.* На основании расчетов ионных равновесий в растворах, содержащих ионы  $[\text{Ca}^{2+}]$ ,  $[\text{PO}_4^{3-}]$ ,  $[\text{Na}^+]$ ,  $[\text{Suc}^{2-}]$ ,  $[\text{H}^+]$  (Рис. 10.1 а, б), а также при титровании суспензии брушита раствором  $\text{Na}_2\text{Suc}$  (Рис. 10.1 в, г), образование ОКФ и сукцинат-замещенного  $\text{Suc}@ОКФ$  можно представить в следующем виде:



В предположении метастабильного равновесия между брушитом и ОКФ в реакциях (9.1), (9.2) можно записать:

$$\text{pH}_{\text{брушит/ОКФ}} = \frac{\Delta G_T^\circ(9.1)}{4.6T} + \text{lg}a_{\text{H}_2\text{PO}_4} + \text{p}K_{2,\text{H}_2\text{Suc}} = \frac{\Delta H_T^\circ(9.1)}{4.6T} + \left( \text{lg}a_{\text{H}_2\text{PO}_4} + \text{p}K_{2,\text{H}_2\text{Suc}} - \frac{\Delta S_T^\circ(9.1)}{4.6} \right), \quad (9.3)$$

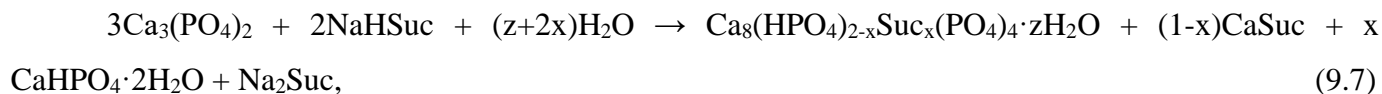
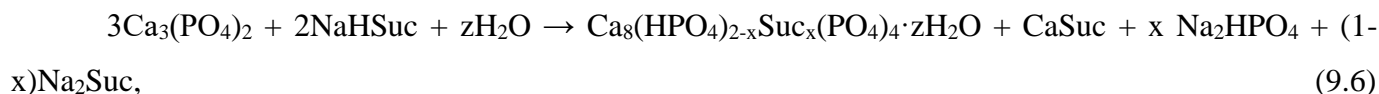
$$\text{pH}_{\text{брушит/Suc@ОКФ}} = \frac{\Delta G_T^\circ(9.2)}{(4.6+2.3x)T} + \text{lg}a_{\text{H}_2\text{PO}_4} + \text{p}K_{2,\text{H}_2\text{Suc}} - \frac{2x}{2+x} \text{lg}a_{\text{HSuc}} = \frac{\Delta H_T^\circ(9.2)}{(4.6+2.3x)T} + \left( \text{lg}a_{\text{H}_2\text{PO}_4} + \text{p}K_{2,\text{H}_2\text{Suc}} - \frac{2x}{2+x} \text{lg}a_{\text{HSuc}} - \frac{\Delta S_T^\circ(9.2)}{(4.6+2.3x)} \right), \quad (9.4)$$

где  $\Delta G_T^\circ(9.1)$ ,  $\Delta G_T^\circ(9.2)$ ,  $\Delta H_T^\circ(9.1)$ ,  $\Delta H_T^\circ(9.2)$  – свободная энергия, энтальпия и энтропия при температуре  $T$  реакций (9.1) и (9.2), соответственно,  $\text{p}K_{2,\text{H}_2\text{Suc}}$  – отрицательный десятичный логарифм второй константы диссоциации  $\text{H}_2\text{Suc}$ . Уравнения (9.1), (9.2), соотношения (9.3), (9.4), а также Рис. 10.1 позволяют сделать следующие выводы: 1) для трехфазных, пятикомпонентных систем (9.1), (9.2) при фиксации pH система (9.1) находится в невариантном состоянии; для системы (9.2) с дополнительной степенью свободы (параметр  $x$ ) достижение невариантного состояния (в частности, для фиксации состава  $\text{Suc}@ОКФ$ , т.е. параметра  $x$ ) связано с дополнительным ограничением на состав системы, например, фиксацией отношения  $[\text{Suc}]/[\text{PO}_4]$ . 2) В координатах интенсивных переменных  $\text{pH} - 1/T$  фазовая граница брушит/ОКФ представляет собой прямую линию, причем при одинаковых  $T$  переход от ОКФ к замещенному  $\text{Suc}@ОКФ$  означает сдвиг границы в сторону меньших pH в соответствии с (9.2) и (9.4).

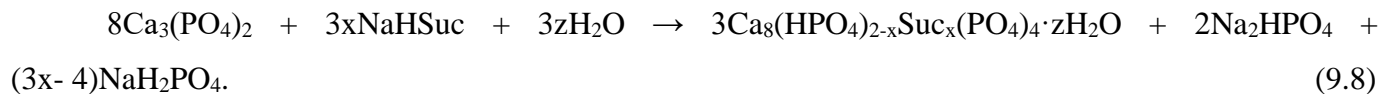
*Синтез ОКФ гидролизом  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> в сукцинатном буферном растворе.* На основании расчетов ионных равновесий при титровании суспензии  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> раствором NaHSuc (Рис. 10.1 д, е), образование ОКФ и сукцинат-замещенного Suc@ОКФ можно представить в следующем виде:



для  $x < 2/3$



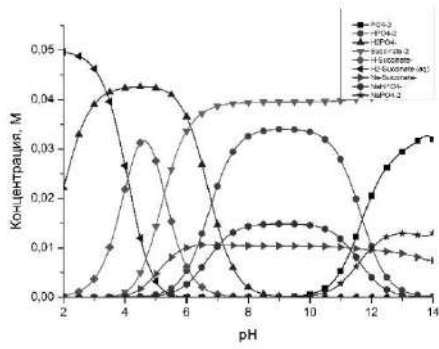
для  $x > 2/3$



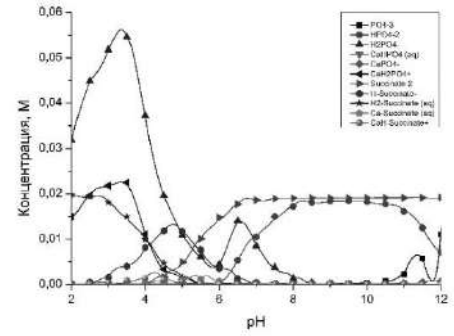
Представленные выше реакции необратимы хотя бы потому, что  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> не может существовать в водном растворе. Анализ уравнений (9.5)-(9.8) позволяет сделать следующие выводы: 1) в отличие от синтеза из брушита синтез из  $\alpha$ -ТКФ различается для составов с  $x$  больше или меньше 2/3 (Ca/P=1,5); 2) для Suc@ОКФ с  $x < 2/3$  независимо от величины  $x$  состав системы характеризуется [Suc]/[PO<sub>4</sub>]=1/3; с увеличением  $x$  нарастает доля примесной фазы брушита (см. (9.7)); 3) для Suc@ОКФ с  $x > 2/3$  содержание сукцината в ОКФ, по-видимому, зависит от отношения [Suc]/[PO<sub>4</sub>]=3x/16.

*Синтез цитрат-замещенного ОКФ.* По кривым титрования раствора, содержащего 60 мМ [Ca<sup>2+</sup>] и 40 мМ [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>] (что соответствует 20 мМ ТКФ) 0,02 М лимонной кислотой хорошо различимы три области (Рис. 10.2): 1) скачок до рН ниже 6 (обозначенный на одном из графиков, как «ОКФ?»), который в реальности соответствует растворению ТКФ, несмотря на то, что в этой области индекс пересыщения SI=0 (при более щелочных рН ОКФ вряд ли может осажаться); 2) область ступеньки, где индексы пересыщения и ОКФ и брушита равны нулю, в этой области начинает кристаллизоваться ОКФ; 3) далее рН снова начинает падать, ОКФ растворяется, это видно по понижению индекса пересыщения, но брушит остается в виде твердой фазы. Далее рН снова падает, что связано с растворением брушита. Таким образом, область существования ОКФ – это ступенька на кривой титрования (инвариантность рН есть следствие неинвариантности 3-фазной системы).

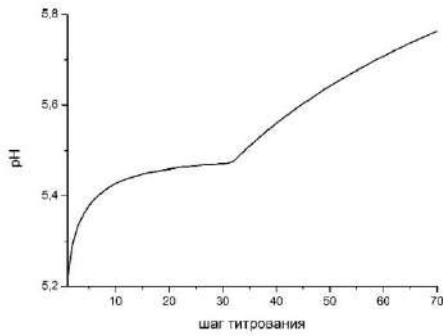




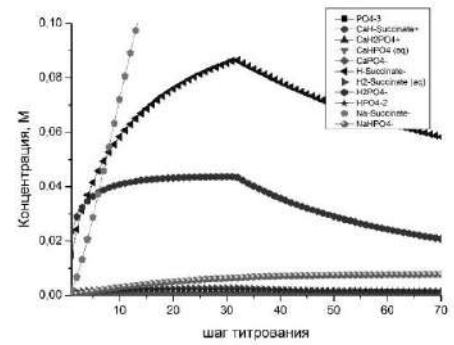
а



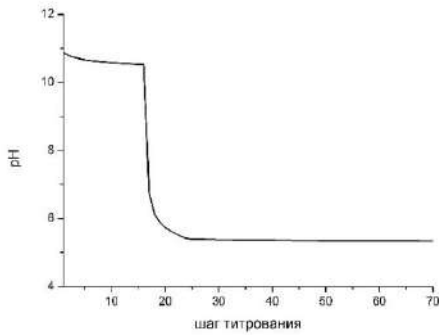
б



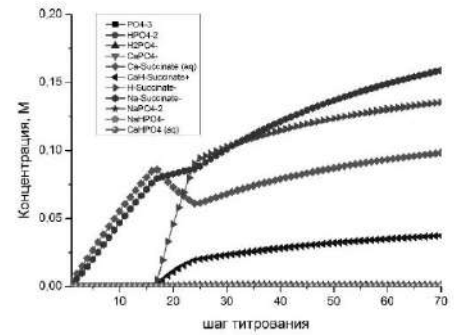
в



г



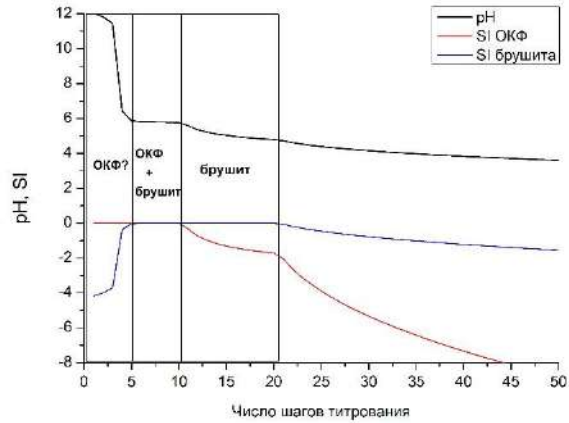
д



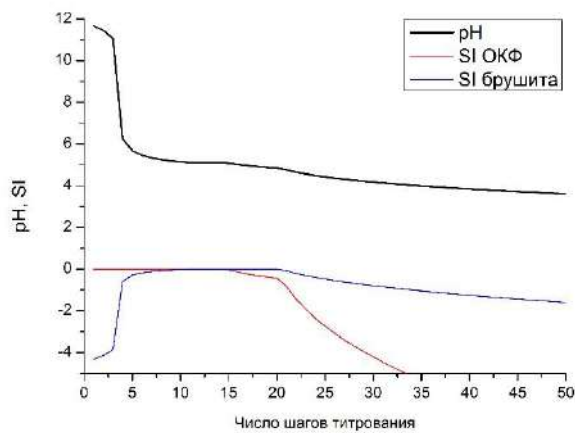
е

Рис. 10.1. а) ионные равновесия в системе  $[Na^+]-[PO_4^{3-}]-[Suc^{2-}]-[H^+]$ ,  $[PO_4^{3-}]=[Suc^{2-}]=50\text{мМ}$ , при  $25^\circ\text{C}$  в зависимости от  $pH$ ; б) ионные равновесия в системе  $[Ca^{2+}]=[PO_4^{3-}]=80\text{мМ}$ ,  $[Na^+]=[Suc^{2-}]=20\text{мМ}$  в зависимости от  $[H^+]$ , при  $25^\circ\text{C}$ ; 3-х фазное равновесие брушит-ОКФ-раствор при  $pH=6$  переходит в 2-х фазное ОКФ-раствор; в) изменение  $pH$  при титровании – добавлении к суспензии 0,4 моль брушита в 0,5 л раствора по 0,02 л 0,8 М  $Na_2Suc$  70 раз,  $40^\circ\text{C}$ ; в точке излома при  $pH=5,48$  3-х фазное равновесие переходит в 2-х фазное ОКФ-раствор; г) ионные равновесия при титровании как в случае в); д) изменение  $pH$  при титровании – добавлении к суспензии 0,4 моль  $\alpha-Ca_3(PO_4)_2$  в 0,5 л раствора по 0,02 л 0,8 М  $NaHSuc$  70 раз,  $25^\circ\text{C}$ ; при  $pH=5,39$  появляется 3-я фаза – брушит; е) ионные равновесия при титровании как в случае д); (расчет в VisualMINTEQ v.3.1)

25°C



37°C



60°C

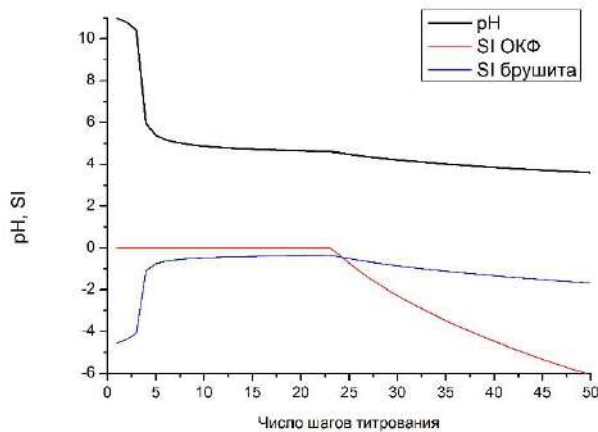


Рис. 10.2. Изменение pH и индекса пересыщения раствора (SI) относительно выпадения из него ОКФ и брушита при различных температурах при титровании 50 мл раствора, содержащего 60 мМ  $[Ca^{2+}]$  и 40 мМ  $[PO_4^{3-}]$  0,02 М лимонной кислотой; шаг титрования представляет добавление 2 мл раствора (расчет в VisualMINTeQ v.3.1)

Хорошо заметно, что с увеличением температуры: 1) размер ступеньки (соответствующей количеству добавленной лимонной кислоты, т.е. доли цитрат/фосфат) уменьшается и, следовательно, сужается по концентрации область существования замещенного ОКФ; 2) pH, при

котором, может образовываться @ОКФ падает (что находится в полном соответствии с диаграммой Монны [104], Рис. 2.30). С другой стороны, такая картина отражает экзотермический характер замещения цитратного аниона. Понижение температуры расширяет область существования цитрат-замещенного ОКФ с точки зрения соотношения устойчивости ОКФ и растворимых цитратных комплексов. Строго говоря, при 60 °С ни брушит, ни ОКФ уже не могут существовать в растворе ни при каких рН. Специфика расчетов заставила исключить из равновесия фазы ГАП и монетита. В реальности, они могут присутствовать в соответствующих интервалах рН.

## **11 Приложение. Рентгеноспектральный микроанализ и стабильность алкилфосфатов кальция**

Для изучения стабильности алкилфосфатов кальция в среде прекурсоров гидрогеля полиэтиленгликоль диакрилата (мономер – полиэтиленгликоль диакрилат  $M_w = 700$  Да и дистиллированная вода), порошки замешивались в концентрации 0,5 г на 10 мл раствора и отстаивались на воздухе в течение 7 суток. Так, порошок додецилфосфата кальция показал типичное гидрофобное поведение: при ручном замешивании в воде скапливался по стенкам пластиковой банки и на границе раздела жидкость-воздух. Для распределения порошка по всему объему емкости использовался лабораторный планетарный миксер SpeedMixer DAC 150.1 FV (Германия), перемешивание в котором проводилось при 3000 об/мин.

Стабильность фазового состава исследовалась методом рентгенофазового анализа и электронной микроскопии (Табл. 11.1). Показано, что за 7 суток изменений в фазовом составе и микроморфологии не наблюдается.

Табл. 11.1. Дифрактограммы алкилфосфатов кальция при выдерживании в смеси ПЭГДА-700 и H<sub>2</sub>O.

Бутил		
Октил		
Додecil		

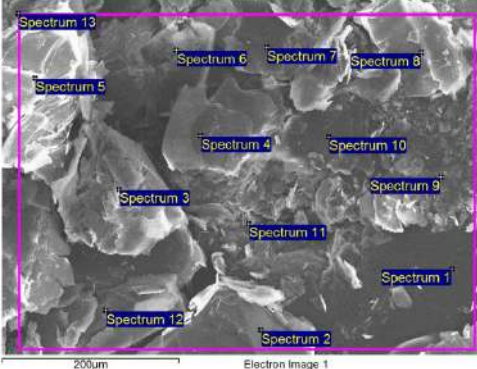
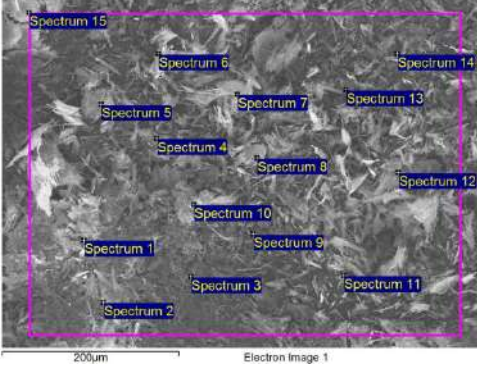
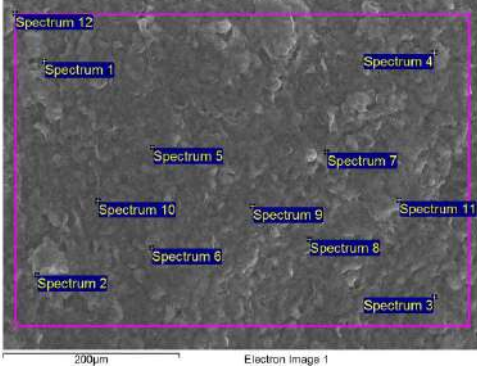
<p>Бутилфосфат кальция</p>	 <p>Electron Image 1</p>
<p>Октилфосфат кальция</p>	 <p>Electron Image 1</p>
<p>Додецилфосфат кальция</p>	 <p>Electron Image 1</p>

Рис. 11.1. Области РСМА порошков алкилфосфатов кальция.

## 12 Приложение. Синтез и свойства гидрогелей и композитов

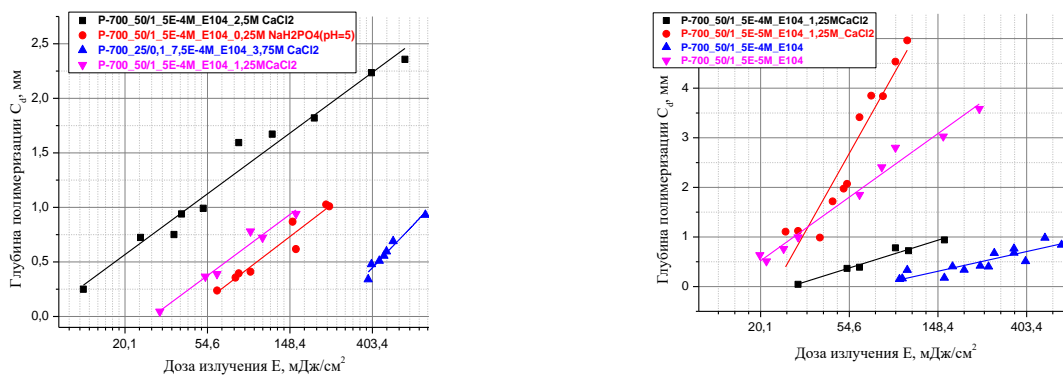


Рис. 12.1. Зависимость глубины полимеризации от дозы излучения гидрогелей с различным содержанием красителя E104 и компоненты в виде раствора солей  $\text{CaCl}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

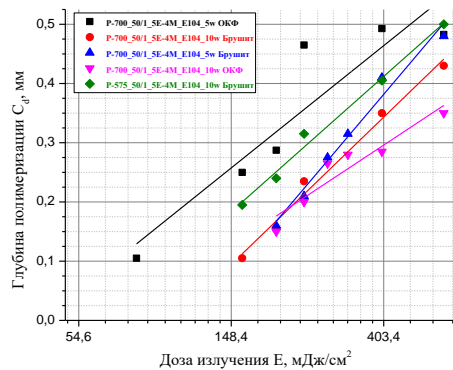


Рис. 12.2. Зависимость глубины полимеризации от дозы излучения гидрогелей с различным содержанием наполнителя (брушита и ОКФ).

Табл. 12.1. Водорастворимые пищевые красители, изученные в ходе работы.

Номер красителя	Название вещества	Структурная формула	Молярная масса
E102	Тартазин		534,3
E104	Хинолиновый желтый		477,38
E110	Желтый "солнечный закат"		452,37
E122	Кармазин		502,44
E124	Понсо 4R		604,47
E129	Аллора красный		496,42

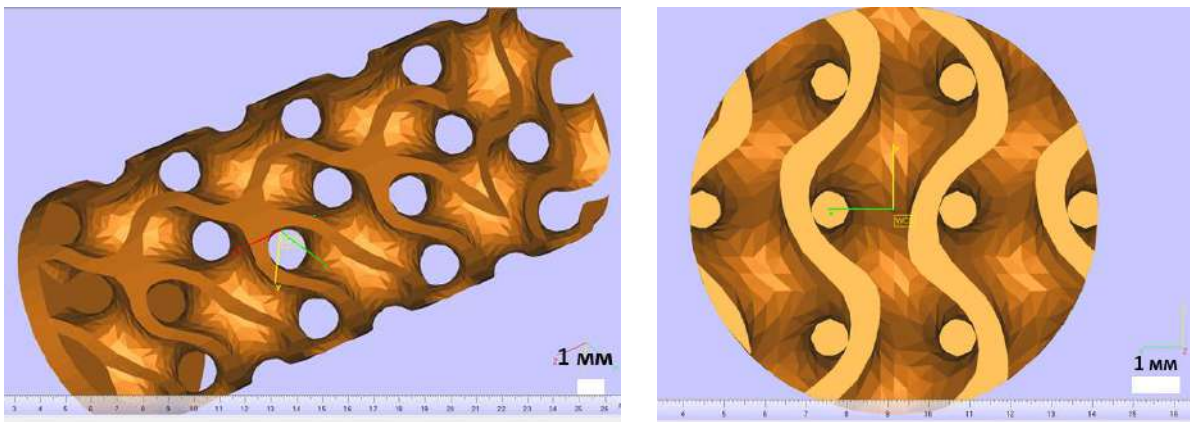


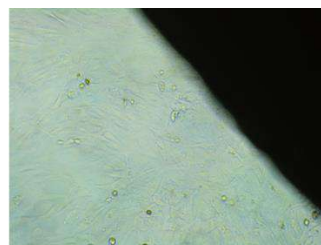
Рис. 12.3. 3D-модель имплантата со структурой гироида (соотношение высоты цилиндра к диаметру – 2 к 1, пористость – 70%, размер каналов пор в направлении [100] – 750 мкм).

Табл. 12.2. Пределы обратимой деформации гидрогелей и композитов (в %).

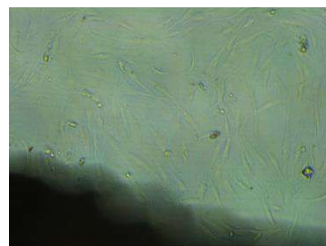
Обозначение	Гироид		Плотный	
	сухой	набухший	сухой	набухший
<b>P_700_100/1</b>	7,73		9,32	
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104</b>	6,66	4,73	5,84	4,70
<b>P-700_50/0,1_5E-4M_E104</b>		10,59	11,63	
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_5%ОКФ</b>	13,69	10,39	14,46	13,12
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_5%брушит</b>	12,86	12,27	13,88	
<b>P-700_50/1_5E-4M_E104_10%брушит</b>	14,19	17,86	15,01	7,09



Культуральный пластик



Плотный образец



Гироид



Кельвин

Рис. 12.4. Данные оптической микроскопии в присутствии гидрогелевых композитов состава ПЭГ-ДА+10% ОКФ с разной архитектурой (1 сутки культивирования МСК человека)



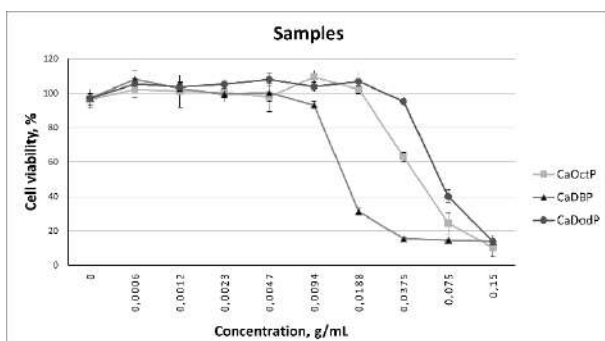
### 13 Приложение. *In vitro* испытания алкилфосфатов кальция

Для исследования цитотоксичности алкилфосфатов кальция в качестве тест-культуры использовали культуру клеточной линии эмбриональных мышечных фибробластов 3Т3. Клетки культивировали на адгезивных чашках Петри в стандартных условиях при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub> в ростовой среде, состоящей из DMEM/F12 (БиолоТ, Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) 10% (Thermo Fisher, США) и антибиотика-антимикотика 1% (Thermo Fisher, США). Стерилизацию образцов проводили при 120 °С в сухожаровом шкафу в течение 1 часа.

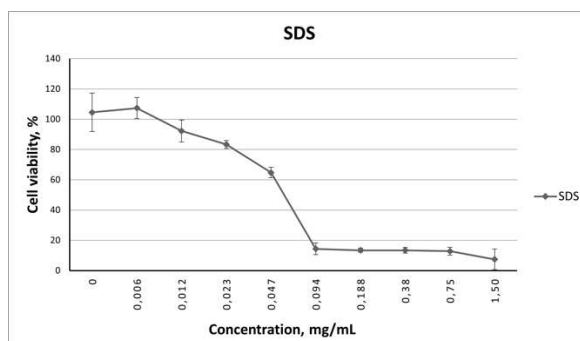
Анализ цитотоксичности был проведен с помощью колориметрического теста AlamarBlue assay (AlamarBlue Cell Viability Reagent, ThermoFisher, США) согласно инструкции производителя. В качестве положительного контроля была использована серия последовательных разведений додецилсульфата натрия (SDS) (максимальная концентрация составляла 1,5 мг/мл и далее двукратные разведения (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78%); в качестве отрицательного – ростовая среда без добавок (0%). Экстракты материалов для проведения анализа готовили из расчета 0,15 г материала на 1 мл ростовой среды путем инкубации в течение 24 часов при постоянном помешивании согласно ISO 10993–12 и разводили в двукратной последовательности.

Клетки инокулировали в лунки 96-луночного планшета в концентрации 5000 клеток на лунку и культивировали в течение 24 часов. Затем ростовую среду заменяли серийными разведениями экстрактов материалов и SDS и культивировали в течение 24 часов. Тест на метаболическую активность проводили на 3-и сутки путем добавления раствора аламарового синего в концентрации 10% после смены среды. Измерения флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 580/20 и эмиссии 625/30 нм на спектрофлуориметре Victor Nivo (PerkinElmer, США).

Экстракты исследуемых образцов керамических материалов достоверно снижали метаболическую активность 3Т3 клеток (Рис. 13.1). Наибольшая цитотоксичность была характерна для экстракта дибутил фосфата кальция (CaDBP): отмечалось значимое снижение жизнеспособности клеток до 31,1% относительно контроля у 8-кратного разведения исходного экстракта (0,0188 г/мл). Октил фосфат кальция (CaOctP) в меньшей степени снижал метаболическую активность клеток: так, снижение жизнеспособности клеток до 63% установлено для концентрации 0,0375 г/мл. Додецил фосфат кальция (CaDodP) обладал наименьшей цитотоксичностью и вызывал снижение метаболической активности клеток до 39,9% от контрольных значений при концентрации 0,075 г/мл.



a)



б)

Рис. 13.1. Цитотоксичность экстрактов образцов дибутил фосфата кальция (CaDBP), октил фосфата кальция (CaOctP) и додецил фосфата кальция (CaDodP) (а). Положительный контроль – додецилсульфат натрия (SDS) (б).

## 14 Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю к.х.н., доценту Путляеву Валерию Ивановичу за грамотное руководство в ходе выполнения данной работы, общее обучение и воспитание автора в качестве самостоятельного исследователя в течение 10 лет работы в группе электронной микроскопии.

Отдельную благодарность хочется выразить к.х.н., в.н.с. Евдокимову П.В. и к.х.н. Кукуевой Е.В., которые руководили работой автора на этапах бакалавриата и магистратуры, обучили навыкам и нюансам работы как в химической лаборатории, так и на многих приборах физико-химической диагностики материалов.

Также автор выражает благодарность сотрудникам кафедры неорганической химии Химического факультета МГУ Филипповой Т.В., Сафроновой Т.В., Климашиной Е.С., Гаршеву А.В., Колесник И.В., Шаталовой Т.Б., Ларионову Д.С., сотруднику ИМЕТ РАН Просвирнину Д.В., сотрудникам ИТЭБ РАН Селезневой И.И. и Савинцевой И.В., сотруднику Института механики МГУ Филиппову Я.Ю., сотруднику Физического факультета МГУ Шибаеву А.В., сотруднику факультета фундаментальной медицины Щербакову И.М. и проф. Дуброву В.Э., сотруднику Института физики им. Л.В. Киренского СО РАН Морозову Е.В. за неоценимую помощь в проведении исследований. Отдельную благодарность автор выражает сотруднику Химического факультета МГУ Карпушкину Е.А. за содержательные дискуссии по тематике гидрогелей в ходе выполнения данной работы.

Автор крайне признателен студентам, аспирантам и выпускникам группы электронной микроскопии и факультета наук о материалах Тихоновой С.А., Бирюкову А.С. и Преображенскому И.И., Орлову Н.К., Зуеву Д.М., Козлову Д.А., Милькину П.А., Насриддинову А.Ф., Мурашко А.М. за помощь в проведении исследований и поддержании рабочей атмосферы в стенах лаборатории.

Особую благодарность автор выражает жене, детям, семье и друзьям за всестороннюю поддержку, терпение, понимание и мотивацию к работе.