

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М. В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Тихонов Андрей Александрович

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

1.4.15 - Химия твердого тела

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре неорганической химии в лаборатории неорганического материаловедения Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

**Научный
руководитель:**

Путляев Валерий Иванович
Кандидат химических наук, доцент

**Официальные
оппоненты:**

Гавричев Константин Сергеевич

Доктор химических наук

заведующий лабораторией термического анализа и калориметрии, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова» Российской академии наук

Успенская Ирина Александровна

Доктор химических наук, доцент

профессор кафедры физической химии Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Соколов Петр Сергеевич

Кандидат химических наук

Старший научный сотрудник Курчатовского комплекса химических исследований (ИРЕА) НИЦ «Курчатовский институт»

Защита диссертации состоится «15» декабря 2023 г. в 17 часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.8 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991 г. Москва, Ленинские горы д.1, стр.3, Химический факультет, ауд. 446.

E-mail: andytikhon94@gmail.com (Тихонов А.А., соискатель), ea_er@mail.ru (Еремина Е.А., ученый секретарь диссертационного совета МГУ.014.8).

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.8/2692>.

Автореферат разослан «13» ноября 2023 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета МГУ.014.8

кандидат химических наук

Е. А. Еремина

Общая характеристика работы

Актуальность. На сегодняшний день помимо традиционно используемых в хирургии металлов и металлических сплавов разрабатываются биокерамические материалы на основе фосфатов кальция (гидроксиапатита кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГАП) и других) – 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). Слоистое строение таких фосфатов позволяет проводить замещение в их структуре на биологически активные и значимые фрагменты. 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. Данные фосфаты при резорбции создают в окружающей растворной среде слабокислые значения pH, вследствие чего происходит частичное растворение (подтравливание) кристаллов гидроксиапатита (ГАП) нативной костной ткани, что позволяет реализовать регенеративный подход при восстановлении кости. 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 биокерамики на основе $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (ТКФ), ГАП и пирофосфата кальция $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (ПФК), которые получают в различных соотношениях (в зависимости от полученной степени замещения) при термическом разложении замещенных ОКФ и алкилфосфатов.

Бесспорными недостатками биокерамических материалов является их хрупкость и низкая эластичность, в результате чего требуется доступ ко всему костному дефекту во время операции. В связи с этим особый интерес представляют материалы с вязкоупругими механическими свойствами, способные к большим обратимым деформациям. За счет обратимой деформации и набухания 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. Подобная

формулировка состава материала для костной имплантации во многом напоминает костную ткань, органической составляющей которой является коллаген. Помимо подобия химического состава архитектура материала должна способствовать протеканию биологических потоков, прорастанию нативной костной ткани и определять необходимые механические характеристики (прочность/жесткость), при этом оптимальной структуры материала с точки зрения остеокондуктивных свойств не существует. Сложные архитектуры и материалы любой формы на сегодняшний день безальтернативно создаются с помощью трехмерной (3D) печати.

С учетом вышесказанного, перспективными материалами, помимо биокерамики, выглядят гидрогели на основе полиэтиленгликоль-диакрилата (ПЭГ-ДА), которые зарекомендовали себя как материалы для регенерации различных тканей организма, чаще всего, мягких. Наполнение гидрогелей пластинчатыми частицами слоистых фосфатов кальция интересно в плане армирования гелей и модификации ряда их целевых свойств.

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 *биodeградации* – 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 термолиза замещенных слоистых фосфатов и алкилфосфатов; использование термолизированных порошков для изготовления резорбируемой керамики.

3. Разработка способов равномерного наполнения гидрогелей фосфатами кальция для создания биокомпозитов 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 биокомпозитов 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 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 Са/Р <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 термоллиза октакальциевых фосфатов, замещенных адипинат-ионом, для получения плотной биокерамики на основе β -ТКФ и условия термоллиза алкилфосфатов кальция с различной длиной алкильной цепи для получения бифазной биокерамики на основе трехкальциевого фосфата и пирофосфата кальция.

3. Описаны 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 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 «гироид», 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 остеокондуктивные 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 остеокондуктивных 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 им. М. В. Ломоносова. Автором осуществлен критический анализ литературных источников по тематике работы с последующими выводами, самостоятельно проведен синтез всех исследуемых в работе составов и их подготовка к проведению исследований, включая самостоятельное проведение исследований 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, анализе, обработке и систематизации полученных результатов, написании публикаций по теме диссертации.

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.

Основное содержание работы. Работа состоит из списка терминов и сокращений, введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, приложений и благодарностей.

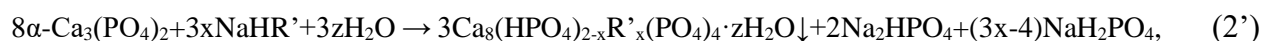
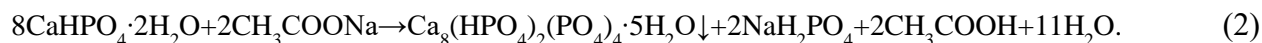
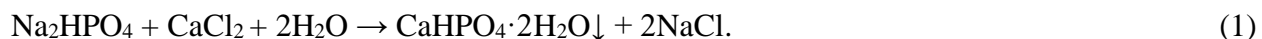
Во введении обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и поставлены задачи работы, сформулированы научная новизна, практическая значимость работы, перечислены положения, выносимые на защиту, приведен список конференций, на которых была проведена апробация работы, и описаны личный вклад автора, достоверность представленных результатов, объем и структура работы.

Литературный обзор состоит из 9 разделов. *В первом разделе* описаны состав и строение костной ткани. *Во втором разделе* перечислены основные свойства современных материалов, которые используются в регенеративной медицине. *Третий раздел* посвящен гидрогелям и подробному описанию их синтеза, структуры и свойств, интересных в контексте создания биоимплантатов для регенерации костной ткани: механических свойств, характеров набухания и деградации. *В четвертом разделе* представлено описание фотополимеризации, а именно, основных компонентов (функционального мономера, фотоинициатора, поглотителей, наполнителей), необходимых для проведения процесса фотополимеризации и получения гидрогелевых материалов и композитов на их основе. *В пятом и шестом разделах* описаны структура, свойства и примеры применения слоистых фосфатов кальция: брушита, октакальциевого фосфата, замещенных октакальциевых фосфатов, алкилфосфатов кальция и бифазных керамик на основе фосфатов кальция. *В седьмом разделе* представлены примеры композитов на основе гидрогелей и фосфатов. *Восьмой раздел* посвящен способам создания макропористых материалов и выбору архитектуры макропористых материалов. *В девятом разделе* сформулированы выводы из представленного литературного обзора.

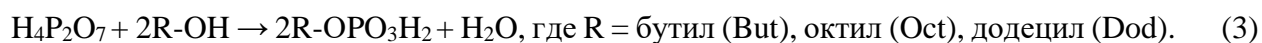
Экспериментальная часть состоит из двух частей. Первая часть описывает подготовку (синтез, 3D печать) исследуемых в работе соединений с подробным указанием условий проведения экспериментов и используемых реагентов.

Слоистые фосфаты кальция получали методом осаждения из водных растворов солей (брушит и алкилфосфаты кальция) и гидролизом брушита и α -ТКФ

в буферных растворах (замещенный сукцинат-, адипинат- и цитрат-анионами и чистый ОКФ).



где R' = сукцинат (Suc²⁻), адипинат (Adi²⁻), (гидро)цитрат (HCit²⁻) анионы.



Плотные и макропористые гидрогели получали фотополимеризацией растворов и суспензий под действием УФ-излучения в хозяйственной лампе или стереолитографическом принтере Ember (Autodesk, США) с длиной волны 405 нм. Приготовленные составы перемешивались в лабораторном планетарном миксере SpeedMixer DAC 150.1 FV (Германия) при 3000 об/мин.

Для обозначения состава гидрогеля использовались следующие обозначения: **P-700_50/0,1_(1E-4M_E100)_(1M_CaCl₂/50%_брушит)**,

где **P-700** - молекулярная масса мономера, **50/0,1** - массовая доля мономера/массовая доля фотоинициатора относительно мономера, **(1E-4M_E100)** - концентрация красителя (10⁻⁴М) и тип красителя (E100), **1M_CaCl₂/50%_брушит** - концентрация соли/массовая доля наполнителя.

В работе использован набор инструментальных методов исследования. Методами *растровой электронной микроскопии* (РЭМ) (растровый электронный микроскоп с автоэмиссионным источником LEO SUPRA 50VP (Carl Zeiss, Германия)) и *оптической микроскопии* исследовали микро- и макроструктуру получаемых порошков и гидрогелей; методом *рентгеноспектрального микроанализа* (РСМА/EDX) (система энергодисперсионного микроанализа INCA Energy 300 (Oxford Instruments, Великобритания)) исследовали элементный состав полученных образцов. Распределение частиц по размерам проводили методом *статического рассеяния света* на лазерном анализаторе частице Analysette-22 (Fritsch, Германия). Методами *синхронного термического анализа* (СТА) (синхронный термоанализатор с вертикальной загрузкой образцов STA 409 PC Luxx (Netzsch, Германия)) изучали особенности термического разложения слоистых фосфатов кальция. Методом *спектроскопии поглощения* (спектрометре Varian Cary 50) определяли подходящий под выбранную длину волны фотоинициатор, краситель

и молярный коэффициент экстинкции. Методом *ИК-спектроскопии* (ИК-спектрофотометре Spectrum One (Perkin-Elmer, США)) определяли степень конверсии связи C=C в гидрогелях и композитах. Метод *рентгенофазового анализа* (РФА) (дифрактометре Rigaku D/Max-2500 с вращающимся анодом) использовали для определения фазового состава полученных порошков и гидрогелевых композитов. Набухание материалов определяли с использованием *гравиметрического* метода до и после вымачивания в среде и *магнитно-резонансной томографии* (ЯМР спектрометре Bruker Avance DPX 200). *Прочностные и вязкоупругие* характеристики гидрогелей и композитов (прочность при сжатии, модуль Юнга и величину обратимой деформации, модуль сдвига, фактор потерь) определяли с помощью машин Instron 5848 (Instron, Великобритания) и Thermo Scientific HAAKE RheoStress RS600 (Австралия), соответственно. *Моделирование протекания жидкостей и нагрузки* макропористых тел проводили в программном пакете SolidWorks 2013 (дополнительные модули Flow Simulation и Simulation, соответственно). Кинетику растворения гидрогелей проводили методом *pH-статирования* в растворе лимонной кислоты при pH=4 и pH=5. *In vitro* испытания образцов проводили с помощью *МГТ-теста* и *оптической флуоресцентной микроскопии*. Исследование имплантации композитов *in vivo* проводили на лабораторных крысах линии Wistar в возрасте 25–30 недель на монокортикальном дефекте бедренной кости.

Результаты и их обсуждение включают в себя 7 разделов.

Синтез порошков слоистых фосфатов кальция

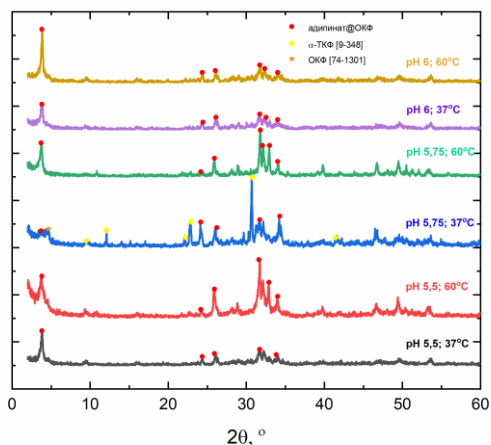


Рисунок 1. Рентгенограммы продуктов замещения адипинат-аниона в структуре ОКФ при использовании в качестве прекурсора α-ТКФ (время синтеза – 3 часа)

В разделе описаны результаты синтеза замещенных карбоксилатами (сукцинат, адипинат и цитрат) ОКФ (@ОКФ), которые сопоставляются с выведенными в работе фундаментальными закономерностями, вытекающими из ионных и гетерогенных равновесий в соответствующих буферных растворах. Условия синтеза адипинат- и цитратзамещенного ОКФ приведены в табл. 1. При синтезе адипинат@ОКФ гидролизом брушита и α-ТКФ (рис. 1) образуется ОКФ с

Ca/P=1,5 (степень замещения $x=0,67$). Изменение основности и нуклеофильности дикарбоксилатных анионов приводит к малым изменениям условий и результатов синтеза при числе атомов углерода в цепи дикарбоновой кислоты $n>4$. Длительные синтезы цитрат@ОКФ при комнатной температуре приводят к образованию фазы ГАП с примесью β -ТКФ, а при 37 и 60°C – к одному из цитратов кальция (также с примесью β -ТКФ).

Полученные продукты бутил-, дибутил-, октил- и додецилфосфата кальция представляли собой белые порошки. Межплоскостное расстояние, соответствующее трём первым рефлексам на дифрактограммах полученных алкилфосфатов кальция, линейно зависит от числа атомов углерода в алкильной цепи (рис. 2), соотносится как 3:2:1 и соответствует рефлексам (00 l). На основе результатов двухуровневого трехфакторного эксперимента 2^3 синтеза брушита, ОКФ и сукцинат@ОКФ методом ортогонального регрессионного анализа были построены полные полиномиальные зависимости среднего размера (d_{50}) частиц фаз фосфатов кальция от условий синтеза pH, T и концентрации реагентов (в случае брушита) и буферного раствора (в случае ОКФ и сукцинат@ОКФ), учитывающие как одиночное, так и смешанное действие параметров (рис. 3):

Таблица 1. Экспериментальные условия синтеза замещенных ОКФ

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

$$d_{50}(\text{брушит}) = 13.025 + 4.85pH^* - 2,225T^* + 3,4C^* - 5,25pH^*T^* - 0,175pH^*C^* - 2.85T^*C^* - 1,275pH^*T^*C^*, \quad (4)$$

$$\text{где } pH^* = \frac{pH-5,25}{1,25}, T^* = \frac{T-32,5}{7,5}, C^* = \frac{C-0,2}{0,1}.$$

$$d_{50}(\text{ОКФ}) = 6.3375 - 1.7375pH^{**} + 0.8625T^{**} - 0.9375C^{**} - 1.3625pH^{**}T^{**} - 1,5125pH^{**}C^{**} - 0.6625T^{**}C^{**} + 0,5125pH^{**}T^{**}C^{**}, \quad (5)$$

$$\text{где } pH^{**} = \frac{pH-5,875}{0,125}, T^{**} = \frac{T-50}{10}, C^{**} = \frac{C-0,2}{0,1}.$$

$$d_{50}(\text{сукцинат@ОКФ}) = 18,075 + 2,575pH^{***} + 7,525T^{***} + 1,525C^{***} - 7,975pH^{***}T^{***} + 1,625pH^{***}C^{***} + 3,075T^{***}C^{***} + 3,175pH^{***}T^{***}C^{***}, \quad (6)$$

$$\text{где } pH^{***} = \frac{pH-5,75}{0,25}, T^{***} = \frac{T-50}{10}, C^{***} = \frac{C-0,175}{0,075}.$$

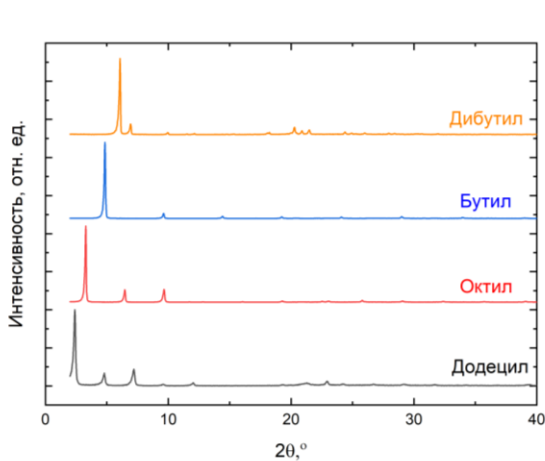


Рисунок 2. Дифрактограммы порошков бутил-, октил- и додецилфосфатов кальция

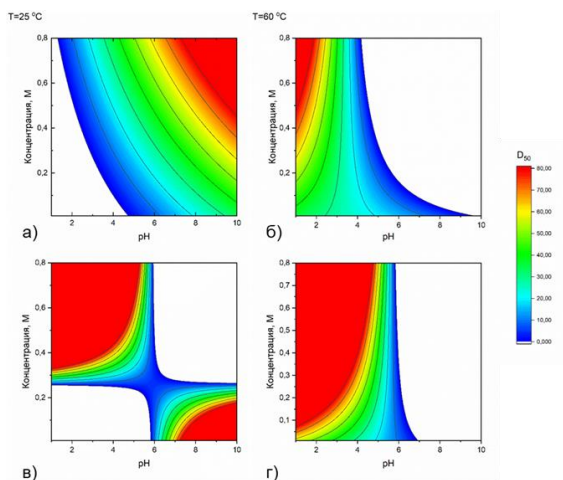


Рисунок 3. Диаграммы зависимости среднего размера частиц от условий синтеза: брусита (а, б) и ОКФ (в, г) при различных температурах (25 (а, в) и 60 (б, г) °С)

Оперируя тремя факторами – концентрацией раствора солей (буферного раствора), температурой, pH, причем последние два фактора 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, приемлемыми для наполнения ими фотополимеризуемых гидрогелей. Следует отметить, что в случае брусита, по-видимому, еще одним фактором является также скорость добавления растворов, определяющая начальное снижение pH; в случае сукцинат@ОКФ получают более крупные кристаллы.

Изучение термического поведения слоистых фосфатов кальция

Изучение термического поведения слоистых фосфатов кальция позволяет определить как условия получения керамики на их основе (в частности, температуру спекания), так и косвенно получить информацию об исходном составе таких соединений.

Термолиз адипинат@ОКФ состоит из следующих стадий, диагностируемых по кривым термогравиметрии (рис. 4а):

1. выделение влаги и кристаллизационной воды из структуры ОКФ (до 240°C) – образование «коллапсированного» ОКФ $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_{1,33}\text{Adi}_{0,67}(\text{PO}_4)_4$;
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 $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_{1,33-y}(\text{P}_2\text{O}_7)_{y/2}(\text{Adi})_{0,67-z}(\text{PO}_4)_4(\text{OH})_{2z}$, который может обладать высокой дефектностью и сохраняет пластичатую исходную морфологию по аналогии с промежуточным апатитоподобным продуктом при термолизе незамещенного ОКФ и сукцинат@ОКФ;
4. образование β -ТКФ (выше 770 °C) и выход кривой на постоянную массу.

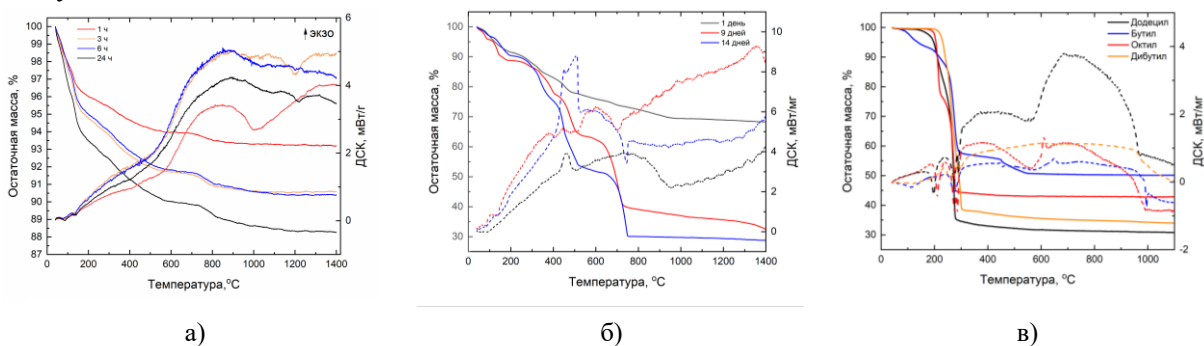
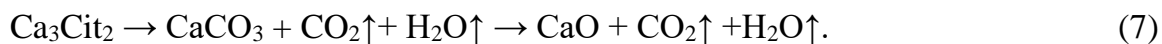


Рисунок 4. Кривые потери массы и ДСК для порошков: а) адипинат@ОКФ (полученных при pH 5,5 и T 37 °C, прекурсор – α -ТКФ); б) цитрат@ОКФ (полученных при pH 6,5 и T 37 °C в течение 1, 9 и 14 суток); в) алкилфосфатов кальция

Данные термического анализа ОКФ, замещенного остатком лимонной кислоты, подтверждают образование фазы цитрата кальция после 14 дней гидролиза из-за совпадения остаточной массы после нагрева с теоретической (остаток массы при термолизе цитрата кальция до оксида кальция – 29,5%) и четко выраженных ступеней при 420–700 °C и выше 750–770 °C (рис. 4б):



В случае алкилфосфатов синхронный термический анализ показал, что разложение происходит в 2 стадии для октил- и додецилфосфата кальция, и в 3 стадии для бутилфосфата (рис. 4в). Масс-спектрометрия отходящих газов показывает удаление воды и углекислого на каждой ступени. Остаточная масса и наличие эндоэффекта чуть ниже 1000 °C соответствует образованию метафосфата кальция, что говорит о формировании кристаллогидратов кислых алкилфосфатов

кальция в ходе синтеза. Согласно рентгенофазовому анализу при 600 °С образуется β -Ca(PO₃)₂ с примесями оксида кальция и гидроксипатита, при повышении температуры до 1000 °С состав термолизированных образцов представлен фазами β -Ca₃(PO₄)₂ и β -Ca₂P₂O₇.

Получение керамики на основе замещенных фосфатов кальция

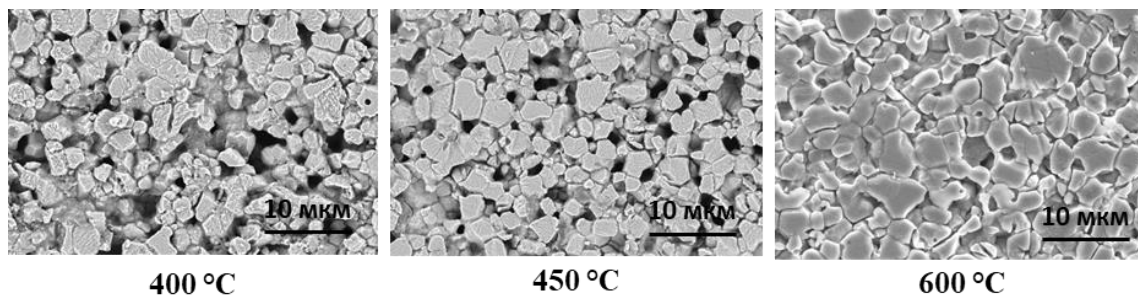


Рисунок 5. Микроструктура шлифов плотных образцов керамики на основе продуктов термолиза адипинат@ОКФ, полученных после дилатометрии

На основе продуктов термолиза адипинат@ОКФ при температурах 400–600 °С были приготовлены образцы модельной плотной керамики β -ТКФ. По данным РЭМ (рис. 5) полученная керамика демонстрирует заметную пористость (20–42%) и однородность размеров зёрен (2–5 мкм). Наиболее плотная (71,7%) и прочная (твёрдость по Виккерсу 1,56 ГПа) керамика изготовлена спеканием при 1100 °С из порошков адипинат@ОКФ, разложенных при 600 °С. 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. При спекании в условиях дилатометрического эксперимента получается существенно повысить плотность до 80,8% и твёрдость до 1,86 ГПа (из порошка, предварительно обожженного при 600 °С) по сравнению с обжигом в обычных условиях.

Синтез гидрогелей

Раздел посвящен фотохимическим аспектам создания костных имплантатов на основе гидрогелей. При выборе состава важно учитывать цитосовместимость 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 (ДА) производные полиэтиленгликоля (ПЭГ) являются

коммерчески доступными соединениями с широким варьированием молекулярной массы. В данной работе исследовались ПЭГ-ДА с $M_w=250, 575$ и 700 Да.

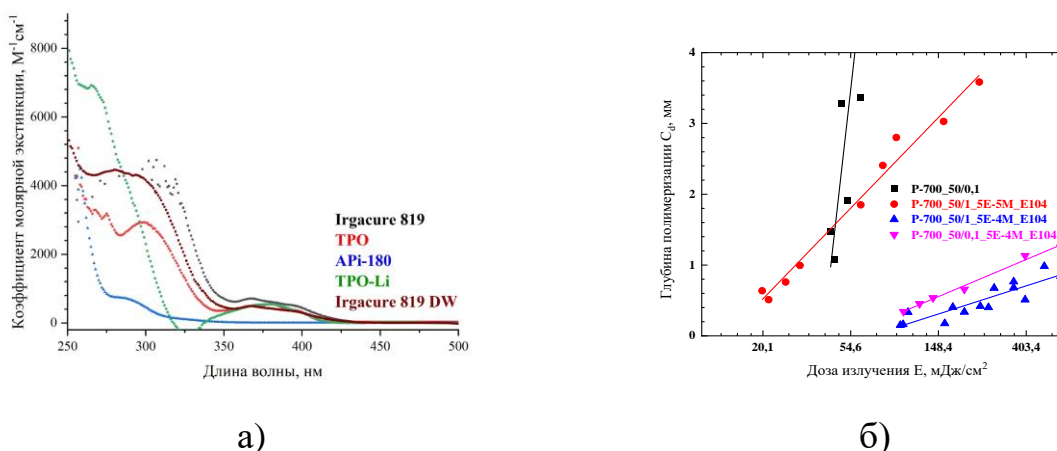


Рисунок 6. а) Экспериментальные УФ-видимые спектры поглощения коммерческих фотоинициаторов ($C=10^{-3}M$); б) зависимость глубины полимеризации от дозы излучения для гидрогеля P-700_50 с различным содержанием красителя E104 ($10^{-3}M$ и $10^{-4}M$ от мономера), фотоинициатора Irgacure®819 (0,1 и 1 масс. % от мономера) и воды

Состав гидрогеля определялся с помощью метода спектроскопии поглощения в УФ и видимом диапазонах (рис.6а), а также по рассчитанным значениям критической энергии полимеризации (E_c) и фоточувствительности (D_p) с помощью уравнения Джейкобса [1] (рис.6б):

$$C_d = D_p \ln \left(\frac{E}{E_c} \right), \quad (8)$$

где E – доза излучения, C_d – толщина заполимеризованного слоя образца. Кроме того, учитывались данные по растворимости в воде и (полу)летальным дозам фотоинициатора для определения оптимального содержания компонентов фотоотверждаемого раствора для получения гидрогелевых каркасов с использованием источника излучения стереолитографического 3D принтера Ember (Autodesk, США): смесь мономера ПЭГ-ДА-700 ($M_w = 700$ Да) с дистиллированной водой 1:1, 1 масс. % (отн. массы мономера) фотоинициатора Irgacure®819 (I819) (Фенилбис(2,4,6-триметилбензоил)фосфин оксид) и краситель E104 хинолиновый желтый ($C = 5 \cdot 10^{-4} M$).

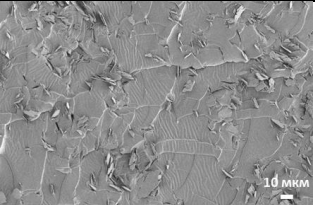
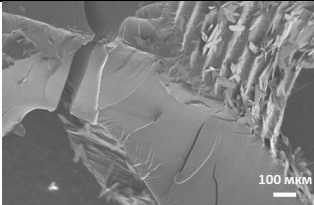
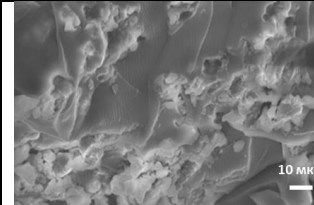
Апробация способов наполнения гидрогелей фосфатами кальция

Частицы фосфатного порошка поглощают и рассеивают излучение, что приводит к уменьшению глубины полимеризации и ухудшению латерального разрешения в ходе 3D печати. С целью достижения равномерного распределения

частиц фосфатов были апробированы способы заполнения гидрогелевых каркасов, альтернативные наполнению готовыми частицами фосфатов кальция (табл. 2).

Способ, включающий диффузию солей Ca^{2+} или HPO_4^{2-} в объеме гидрогеля, позволяет использовать оптически прозрачные фотоотверждаемые растворы, обработка которых теоретически может привести к высокой степени заполнения гидрогеля. Однако, в ходе проведенных экспериментов, выпадение частиц брушита происходило преимущественно на поверхности гидрогеля. Конверсия α -ТКФ, проведенная подобно синтезу октакальциевых фосфатов из водных суспензий, привела к неполному превращению исходного фосфата и образованию примеси ГАП. Таким образом, способ наполнения готовыми частицами был выбран как оптимальный, несмотря на низкие значения максимального наполнения гидрогеля.

Таблица 2. Способы наполнения гидрогелей фосфатами кальция

	Наполнение готовыми частицами	Диффузия солей в объеме гидрогеля	Конверсия фосфатов в объеме гидрогеля
Максимальное наполнение гидрогеля фосфатами кальция, масс. %	~10	57,7	~ 60
Целевой продукт наполнения	Алкилфосфаты кальция, брушит, сукцинат@ОКФ	$\text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} \rightarrow \text{Брушит}$	$\alpha\text{-ТКФ} \rightarrow \text{ОКФ, сукцинат@ОКФ}$
Полученный результат	Однородное распределение частиц	Выпадение частиц преимущественно на поверхности гидрогелевых каркасов	Неполная конверсия α -ТКФ с образованием примеси ГАП. Необходимость корректировки условий обработки композита гидрогель/ α -ТКФ (ОКФ)
Микроструктура	 Скол гидрогелевого каркаса P-700_50/1_10%брушит	 Скол вымоченного в течение 1 суток в буферном растворе $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH=5) гидрогеля P-700_50/1_5E-4M_E104_1,25M_CaCl2	 Скол вымоченного в течение 3 суток в сукцинатном буфере (T=60°C, pH=5,75) гидрогеля P-700_50/1_10%_α-ТКФ

Проектирование оптимальной архитектуры костного имплантата

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) «гироида» и «алмаза» (рис. 7). Из табл. 3 видно, что наиболее проницаемые варианты реализуются в случае структур Кельвина и типа «гиرويد». Следует отметить, что достигаемое для таких имплантатов расчетное значение проницаемости в 987 дарси соответствует проницаемости трабекулярной (губчатой) костной ткани (порядка 1000 дарси).

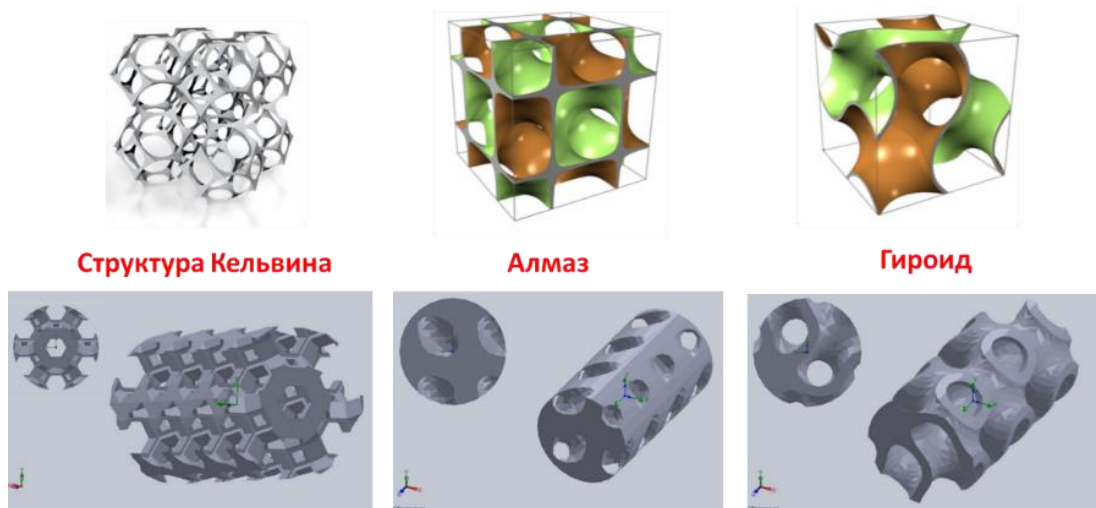


Рисунок 7. Исследуемые структуры и модели макропористых имплантатов [2,3].

По величине деформации оценен модуль Юнга пористой модели и соотнесен с модулем упругости сплошного материала для оценки жесткости имплантата. Из табл. 3 видно, что наиболее жесткой является модель с алмазной архитектурой, а наиболее податливой – Кельвина или типа «гиرويد» (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.

Таблица 3. Результаты моделирования нагружения и протекания жидкости через имплантаты с выбранными структурами.

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

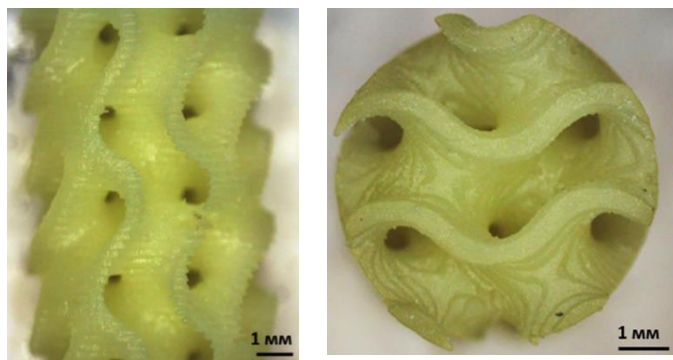


Рисунок 8. Композитный имплантат P-700_50/1_(5E-4M_E104)_10%брушит в форме цилиндра (диаметр 6мм, высота 10-12 мм) с архитектурой типа «гиرويد», сформированный стереолитографической 3D-печатью (хорошо заметна слойность печати вдоль оси z с периодом 200 мкм); слева – вид сбоку, справа – вид сверху

В ходе данной работы в качестве оптимальной с точки зрения проницаемости, податливости и биологических свойств была выбрана архитектура типа «гиرويد» с пористостью 70% и размером каналов 750 мкм в направлении [100] (рис. 8), в качестве альтернативной архитектуры исследовалась структура Кельвина.

Свойства полученных гидрогелей и композитов

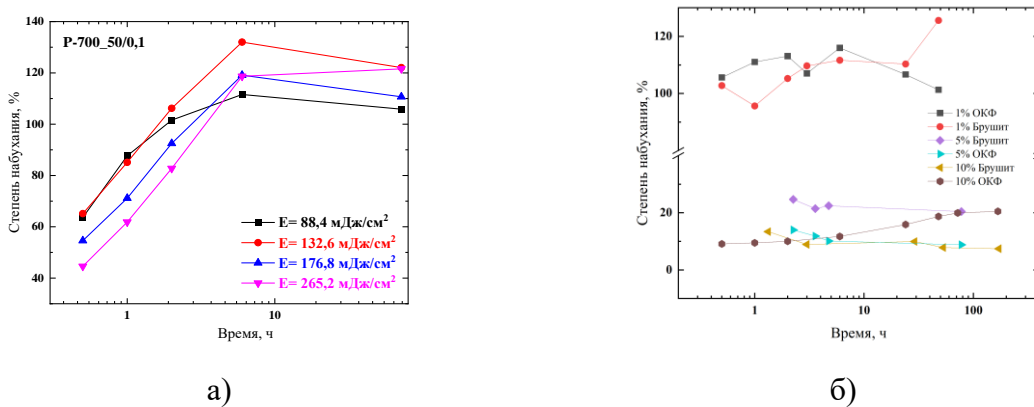


Рисунок 9. Зависимость степени набухания от времени вымачивания для: а) гидрогелей P-700_50/0,1 от дозы излучения при фотополимеризации; б) композитов гидрогель/брушит(ОКФ) (состав гидрогеля - P-700_50/1_5E-4M_E104)

Важнейшим свойством гидрогелей является способность к *набуханию* (поглощению больших количеств воды без растворения). Для композитов гидрогель/фосфат кальция скорость набухания (рис. 9) сопоставима с ненаполненными гидрогелями (выход на постоянное значение после 1,5 часов вымачивания). По данным ЯМР-томографии скорость проникновения воды в образцы гелей (описанная фиковским сценарием диффузии) изотропна и практически не зависит от наличия наполнения гидрогеля. При увеличении доли наполнителя или уменьшении гранулометрии порошка (в случае ОКФ) предел

набухания уменьшается (вплоть до 10%) из-за адсорбции молекул H₂O пластинчатыми частицами ОКФ и брусита.

Реологические измерения образцов композитов гидрогель/10%_ОКФ (рис. 10) 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 δ наблюдаются при минимальной частоте сдвига ($f = 0,1$ Гц).

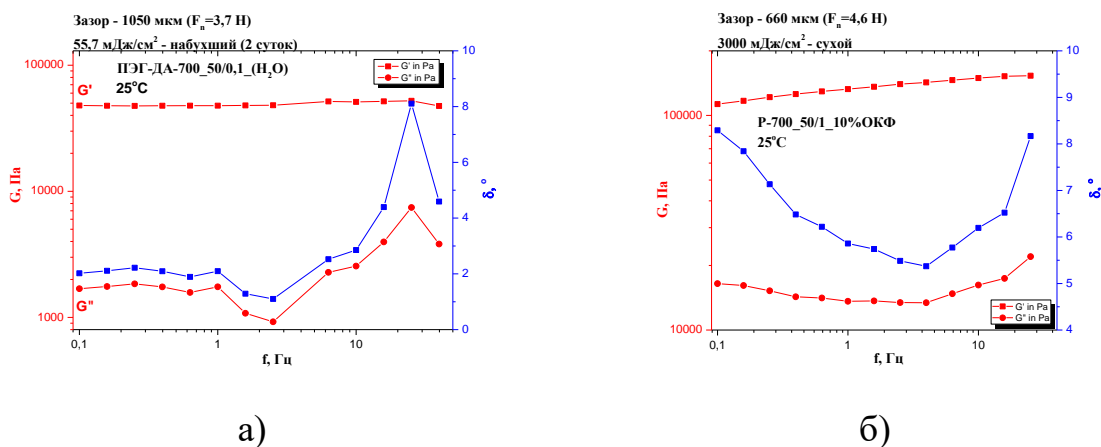


Рисунок 10. Зависимость упругой (G') и вязкой (G'') компонент модуля сдвига, а также фактора потерь δ от частоты для: а) P-700_50/0,1(H₂O) ; б) P-700_50/1_10%ОКФ

Таблица 4. Пределы прочности гидрогелей и композитов (в МПа)

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

Подобное поведение – усиление вклада от вязкого поведения с ростом наполнения гидрогеля, может быть связано с меньшей по сравнению с ненаполненными гидрогелями степенью полимеризации образцов (степени конверсии двойных связей C=C по данным ИК-спектроскопии), за счёт чего в

составе композита остаётся несшитый мономер, а также с существенным повышением вязкости фотоотверждаемой суспензии во время полимеризации.

Доля наполнителя в композите увеличивает *предел прочности* при сжатии, при этом порошок с меньшими частицами (ОКФ) является менее прочным как в случае плотных композитов, так и материалов со структурой типа «гироид» (табл. 4). Это может быть объяснено усилением вклада от вязкого поведения с ростом наполнения гидрогеля за счет остатков несшитого мономера.

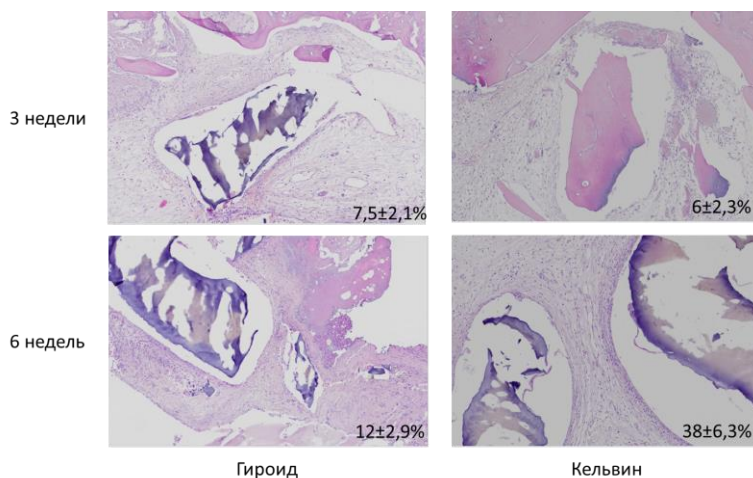


Рисунок 11. Гистологические срезы костной ткани (окрашивание гематоксилин-эозином) в области дефекта кости крысы после 6-недельной имплантации исследуемых материалов с указанной долей заполнения дефекта костной тканью.

В ходе экспериментов по *биodeградации* композитов в модельном растворе лимонной кислоты установлено, что гидрогели на основе ПЭГ-ДА-700, наполненные ОКФ, с учётом набухания претерпевают большую биodeградацию по сравнению с гидрогелями, наполненными брушитом.

На основании проведенных медико-биологических испытаний *in vitro* и *in vivo* можно сделать вывод о биосовместимости исследуемых компонентов гидрогеля, которые не оказывают токсического влияния на клетки и способствуют их адгезии и распластыванию по поверхности, и превосходстве в плане osteoconductive свойств архитектуры «Кельвин» с большей проницаемостью над архитектурой типа «гироид» у материалов на основе ПЭГ-ДА-700_10%ОКФ (рис. 11).

Заключение и выводы

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 «гиرويد» 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 слоистого кальцийфосфатного наполнителя позволяет получать требуемые свойства конечного имплантата.

В результате работы сделаны следующие **выводы**:

1. Предложены три вида слоистых фосфатов кальция для наполнения гидрогелей и в качестве прекурсоров для изготовления керамики: брусит – $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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 $\text{Ca}(\text{ROPO}_3\text{H})_2$ ($\text{R}=\text{C}_4\text{H}_9$, C_8H_{17} , $\text{C}_{12}\text{H}_{25}$). Показано, что определяющее влияние на латеральный размер кристаллов брусита 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 брусита или ОКФ. Выращивание кристаллов фосфатов в гидрогелевой матрице за счет односторонней диффузии ионов Ca^{2+} или 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 C=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 остеокондуктивных имплантатов показано, что наибольшей податливостью и проницаемостью обладают структуры Кельвина и типа «гироид»; 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 каналов 0,75 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.

Список цитируемой литературы

1. Halloran J. W. et al. Photopolymerization of powder suspensions for shaping ceramics // J. Eur. Ceram. Soc. 2011. Vol. 31. № 14. P. 2613–2619. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2010.12.003.

2. 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.

3. Kapfer S.C. et al. Biomaterials Minimal surface scaffold designs for tissue engineering // Biomaterials. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 32, № 29. P. 6875–6882.

Основные публикации по теме работы

Научные статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI, а также в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности.

Статьи

1. **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. Импакт-фактор РИНЦ: 0,535 (50%).

2. Дубров В.Э., Климашина Е.С., Щербаков И.М., Шипунов Г.А., Путляев В.И., Евдокимов П.В., **Тихонов А.А.**, Гулько С.В., Зюзин Д.А. Возможности получения и применения биоматериалов на основе гидрогелей для регенерации костной ткани человека // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019. Т. 21. № 3. С. 141–150. doi:10.15825/1995-1191-2019-3-141-150. Импакт-фактор РИНЦ: 0,2 (10%).

3. **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. Импакт-фактор Web of Science: 3,9 (60%).

4. **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. Импакт-фактор РИНЦ: 0,42 (40%).

5. **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. Импакт-фактор Web of Science: 2,8 (80%).

6. 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. Импакт-фактор РИНЦ: 0,3 (10%).

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.**, зав. лаб., к.ф.-м.н. ИТЭБ РАН **Селезневой И.И.** и сотруднику **Савинцевой И.В.**, сотруднику Института механики МГУ **Филиппову Я.Ю.**, сотруднику Физического факультета МГУ **Шibaеву 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 и аспирантам группы электронной микроскопии и факультета наук о материалах **Тихоновой С.А., Бирюкову А.С., 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.