

Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины

С.М.Баринов

Институт металлургии и материаловедения им. А.А.Байкова Российской академии наук
119991 Москва, Ленинский просп., 49, факс (499) 135–8680

Обсуждены актуальные проблемы химии и технологии получения на основе фосфатов кальция биоматериалов, предназначенных для замещения и восстановления поврежденных костных тканей. Описаны особенности синтеза нанопорошков и нанокристаллической керамики для имплантатов. Отмечены достижения в области создания пористых матриц из резорбируемых остеокондуктивных фосфатов кальция, а также гибридных композиционных материалов, являющихся основой нового метода в медицине — инженерии костной ткани.

Библиография — 131 ссылка.

Оглавление

I. Введение	15
II. Материалы для замещения костных тканей	16
III. Материалы для регенерации костной ткани	20
IV. Заключение	29

I. Введение

Согласно данным археологических исследований, еще в древности в стоматологической ортопедии применяли имплантаты — устройства для замещения дефектов костной ткани, — изготовленные из природных материалов: кораллов, слоновой кости, а также из костей человека и животных.^{1,2} Проблема замещения твердых тканей не ограничивается стоматологией: в настоящее время, как и ранее, значительная часть населения подвержена заболеваниям костных тканей скелета, связанным с их патологической деградацией (остеопорозом), воспалительными процессами и онкологией. В развитых странах число пациентов с хроническими заболеваниями такого рода достигает ~50% от населения в возрасте старше 50 лет. В соответствии с прогнозами, в результате тотального увеличения продолжительности жизни и прироста населения число пожилых людей удвоится к 2020 г.³ Лечение заболеваний костных тканей, особенно злокачественных опухолей (остеосаркомы), часто связано с хирургическим вмешательством, как правило, приводящим к обширным послеоперационным дефектам. Проблемой является восстановление нарушенных

функций отдельных органов, частей скелета и всего опорно-двигательного аппарата.⁴

Возможны два принципиально различных подхода к решению этой проблемы: механическое замещение дефекта кости имплантатом с созданием целостной биоинженерной конструкции либо регенерация (восстановление) поврежденной костной ткани. Соответственно, разрабатывают материалы двух видов, отличающиеся по микроструктуре, свойствам и поведению *in vivo* в организме человека.^{5–8}

В настоящем обзоре предпринята попытка обобщить и проанализировать результаты исследований и разработок в области химии и технологии таких материалов. Поскольку основными критериями качества материалов для имплантатов являются, помимо биологической совместимости, также близость механических свойств к таковым у кости при условии долговременной работоспособности, то в первой части обзора представлены (весьма кратко) сведения о структуре и свойствах костной ткани. Затем приведена информация о структуре и свойствах некоторых фосфатов кальция (ФК) — наиболее перспективных для создания как имплантатов, так и материалов, используемых для регенерации костных тканей из-за близости их состава к составу минеральной компоненты кости. Далее рассмотрены особенности химической технологии получения ФК-материалов, позволяющей достичь высокого уровня их механических свойств, в том числе за счет наноструктурированности. Затем описаны принципы новой биомедицинской технологии — регенерации костной ткани *in situ* — так называемой инженерии костной ткани, для реализации которой необходимы материалы с иными свойствами, чем свойства материалов для перманентных имплантатов. Фактически такая технология базируется на тех же процессах, которые происходят с костной тканью в организме человека — процессах ремоделирования (резорб-

С.М.Баринов. Член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе ИМЕТ РАН. Телефон: (499) 135–8510, e-mail: barinov_s@mail.ru

Область научных интересов: неорганическая химия, материаловедение, керамические материалы и биоматериалы, фосфаты кальция.

Дата поступления 13 августа 2009 г.

ции — биологической деградации посредством взаимодействия с клетками (остеокластами) — и минерализации — осаждении ФК на коллагеновый матрикс). Рассмотрены требования, которым должны удовлетворять различные матриксы для клеточных культур, — гранулы, пористая керамика и композиционные материалы. Последние наиболее перспективны, поскольку по свойствам в большей степени соответствуют костной ткани; в процессе хирургической операции ими можно гибко манипулировать. Особое место в проблеме создания ФК-материалов для медицины занимают костные цементы — вяжущие системы, предназначенные не только для пластического закрытия костных дефектов, но и для изготовления пористых матриксов.

II. Материалы для замещения костных тканей

1. Костная ткань

Костная ткань человека представляет собой сложный композиционный материал с организованной на нескольких уровнях микроструктурой, обладающий уникальными механическими свойствами.^{9, 10} Основными составляющими костной ткани являются коллаген типа I (~20%), минеральная фаза (~60%), вода (~9%), неколлагеновые белки (~3%), остаток — полисахариды, липиды. Минеральный компонента, так называемый биологический апатит $(\text{Ca}, \text{Na}, \text{Mg})_{10}(\text{PO}_4, \text{HPO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH}, \text{F}, \text{Cl})_2$, представляет собой кальцийдефицитный гидроксиапатит (ГА) с катионными (магний, натрий) и анионными (карбонатные группы, хлор и фтор) замещениями.⁸ Примерное содержание физиологически важных для жизнедеятельности организма ионов в костях человека следующее:

Ион	Мас. %	Ион	Мас. %
Ca^{2+}	36.51	K^+	0.03
PO_4^{3-}	15.2	CO_3^{2-}	7.4
Na^+	0.9	F^-	0.03
Mg^{2+}	0.72	Cl^-	0.13

Состав кости зависит от многих факторов, в том числе и от возраста индивидуума. Однозначного мнения о роли ионных замещений в физиологии кости нет. Известно, что магний дестабилизирует структуру ГА. Карбонатные группы играют важную роль в биохимических взаимодействиях костной ткани с плазмой крови, создают решеточные деформации, повышая резорбируемость ГА. Ионы фтора, замещающие гидроксильные группы, снижают растворимость ГА при значениях pH, близких к нейтральным, вследствие их более высокой энергии связи с кальцием в ГА.¹¹ Натрий, возможно, необходим для обеспечения оптимальной структуры карбонатсодержащего ГА.^{12, 13}

Органическая компонента костной ткани представлена в основном волокнами коллагена и белками, такими как остеокальцин, остеоонектин, фибронектин и др.¹⁴ Биологический апатит формируется посредством образования зародышей кристаллизации на макромолекулах коллагена и их последующего роста за счет ионного транспорта и осаждения из жидкости организма.¹⁵

Важным качеством кости является наличие в ней системы взаимосвязанных пор размерами 100–300 нм и 10–50 мкм в кортикальной костной ткани и 200–600 мкм — в трабекуляр-

Таблица 1. Механические свойства кортикальной и трабекулярной костных тканей.

Свойство	Кортикальная костная ткань	Трабекулярная костная ткань
Прочность при сжатии, МПа	100–230	2–12
Прочность при изгибе и растяжении, МПа	50–150	10–20
Деформация до разрушения, %	1–3	5–7
Трещиностойкость, МПа·м ^{1/2}	2–12	—
Модуль Юнга, ГПа	7–30	0.05–0.5

ной (губчатой) костной ткани. Размеры и взаимосвязанность пор влияют на биологические потоки, процессы неоваскуляризации, на жизнедеятельность (пролиферацию) клеток.

Кристаллы минеральной компоненты имеют вид пластинок длиной ~40–60 нм, шириной ~20–30 нм и толщиной ~1.5–5 нм.¹⁶ Кристаллы ориентированы таким образом, что их продольная ось параллельна оси фибрилл коллагена. Соотношение кальция и фосфора в минеральной фазе костной ткани меньше стехиометрического (1.67) для ГА, т.е. биологический апатит всегда дефицитен по кальцию.

Плотная и компактная кортикальная костная ткань составляет внешнюю часть всех скелетных структур. Трабекулярная костная ткань находится внутри длинных костей, особенно в их концевых частях, в телах позвонков, во внутренних частях костей таза и других крупных плоских костей. Такая ткань представляет собой сеть из тонких костных элементов — трабекул. Кость весьма неоднородна по микроструктуре и механическим свойствам. Последние зависят от пористости (содержание пор изменяется от 5 до 95%), степени минерализации и ориентации волокон коллагена. Основные показатели механических свойств кортикальной и трабекулярной костных тканей приведены в табл. 1.^{8, 17, 18} Эти значения могут служить ориентиром при разработке материалов, предназначенных для изготовления имплантатов.

2. Требования к материалам для имплантации

Среда организма человека характеризуется высокой коррозионной активностью. Основные требования, предъявляемые к материалам для имплантации, — устойчивость к коррозионно-активным средам и биомеханическая совместимость. Имплантат должен иметь значения модуля упругости, прочности (статической и усталостной) и трещиностойкости, близкие к таковым у кости. Модуль упругости материала должен быть таким, чтобы не экранировать костную ткань от физиологических нагрузок, необходимых для ее жизнедеятельности (кость, лишённая растягивающих нагрузок, деградирует). Высокие прочность и трещиностойкость необходимы для обеспечения надежной эксплуатации имплантата в организме.

Для замещения костных дефектов изначально использовали алло- и аутографты — фрагменты кости донора и собственной кости пациента соответственно. Однако это связано с определенными сложностями (возможные иммунные реакции, необходимость вторичных операций). Поэтому в течение многих лет усилия исследователей были направ-

лены на создание для этих целей синтетических материалов. Эволюция разработок в этой области связана с тремя поколениями материалов: от биоинертных (первое поколение), биоактивных остеокондуктивных (второе поколение) до остеоиндуктивных материалов, стимулирующих остеосинтез (материалы третьего поколения).⁴ Биоактивность материала — способность к взаимодействию с микроокружением организма, в частности к образованию связи между материалом и окружающей костной тканью. Остеокондуктивность материала — способность поддерживать жизнедеятельность остеобразующих клеток и образование новой костной ткани.^{2, 19} Остеоиндуктивность — способность материала вызывать эктопическое (вне кости) формирование костной ткани *de novo*. Данное качество может быть имманентным, т.е. проявляющимся без искусственного введения остеогенетических факторов (морфогенетических белков), или введенным с помощью таких факторов.²

Биоинертные материалы (первое поколение биоматериалов) не влияют на процесс остеосинтеза; на поверхности, изготовленных из них имплантатов происходит формирование фиброзной ткани, препятствующей образованию связи имплантата с костью. Существует риск отторжения таких материалов организмом, часто посредством воспалительных реакций, и основные проблемы, которые решаются при проектировании имплантатов из биоинертных материалов, — приближение упругих характеристик имплантата к характеристикам кости, а также снижение скорости коррозионных процессов. Материалы первого поколения широко применяют в ортопедических устройствах, например эндопротезах тазобедренного и коленного суставов.

Из всех синтетических материалов, которые принципиально можно использовать для имплантации, наиболее перспективна керамика на основе фосфатов кальция, по химическому и фазовому составу аналогичная минеральной компоненте костной ткани. В отличие от полимеров и металлов, ФК-керамика на основе ГА биосовместима и биоактивна, но ее недостатком является хрупкость. Наилучшие материалы для создания ортопедических устройств опорно-двигательного аппарата, подвергающихся механическим нагрузкам, — металлы и сплавы с ФК-покрытием, обеспечивающим биологическую совместимость и способность к биоинтеграции имплантата в костную ткань. Важной проблемой является долговременная устойчивость покрытия к резорбции; устойчивость зависит не только от прочности адгезии, но и от фазового состава и степени кристалличности структуры покрытия.^{20–22} Резорбция может приводить к образованию дебриса, закупорке кровеносных капилляров и некрозам. Повысить сопротивление биорезорбции позволяет введение атома фтора в состав ГА-покрытия: фторгидроксипатит имеет существенно более низкое значение произведения растворимости в водных солевых растворах, чем ГА.²³

Для нанесения ГА-покрытия на металлические имплантаты используют магнетронное распыление, совместное электронно-лучевое испарение СаО и термическое испарение Р₂О₅, ионно-стимулированное осаждение, импульсную лазерную абляцию, химическое осаждение из паровой фазы, электрофоретическое осаждение, золь–гель-технологии, биомиметические методы.^{7, 20} Основным методом формирования ГА-покрытий, нашедшим коммерческое применение, является плазменное напыление, несмотря на такие недостатки получающегося покрытия, как невысокая прочность адгезии к подложке, неоднородность морфологии, кристалличности и фазового состава.

3. Ортофосфаты кальция

Сведения о составе, плотности и растворимости ортофосфатов кальция представлены в табл. 2. Подробный обзор данных о структуре, синтезе и свойствах ортофосфатов кальция опубликован в работах^{24–28}. Предложено разделить все ортофосфаты кальция на две группы. К первой относятся соединения, которые могут быть получены синтезом при физиологических условиях; ко второй — высокотемпературные соединения, которые могут быть получены с применением термической обработки промежуточных продуктов синтеза.²⁹ К последним относятся, в частности, трикальцийфосфат (ТКФ) α -модификации и тетракальцийфосфат — исходные ингредиенты при получении большинства костных цементов. Такая классификация удобна при разработке технологии ФК-материалов, однако она весьма условна. Например, ГА, который относят к высокотемпературным ФК, может быть получен в кристаллической форме гидролизом октакальцийфосфата (ОКФ). Основным минералом костных тканей, дентина и эмали зубов в организме человека является кальцийдефицитный карбонатсодержащий ГА. В кальцификациях мягких тканей обнаружен аморфный фосфат кальция (Са₃(РО₄)₂ · n H₂O) и трикальцийфосфат β -модификации; в камнях мочевого пузыря — ОКФ; в патологических отложениях зубов — ОКФ, магнийсодержащий ТКФ и двухводный дикальцийфосфат.² В костной ткани ГА присутствует в виде наноразмерных кристаллов.

4. Нанокристаллический гидроксипатит и керамика на его основе

Нанокристаллы ФК обладают двумя важнейшими для физиологии костной ткани качествами: они находятся в динамическом равновесии с биологическим окружением в цикле ремоделирования (резорбции/минерализации) и проявляют высокий уровень механических свойств. Нанокристаллический ГА (нано-ГА) обладает повышенной способностью адсорбировать белки, необходимые для жизнедеятельности клеток, а также избирательностью по отношению к функциям клеток, образующих костную и фиброзную ткани.³⁰ Разработки материалов на основе нанокристаллических фосфатов кальция проводят в двух направлениях: нанокристаллическая керамика и композиционные материалы с биополимерными матрицами, армированными наночастицами фосфатов.

Хронология развития методов синтеза нано-ГА рассмотрена в обзоре³¹. Разработан ряд методов, включая золь–гель, твердофазные реакции, гидротермальный синтез.^{32–35}

Таблица 2. Плотность и растворимость при 25°C ортофосфатов кальция.

Соединение	Плотность, г · см ^{–3}	–lg K (см. ^a)
Са(Н ₂ РО ₄) ₂ · Н ₂ O	2.23	1.14
СаНРО ₄ · 2 Н ₂ O	2.32	6.59
СаНРО ₄	2.89	6.90
Са ₈ Н ₂ (РО ₄) ₆ · 5 Н ₂ O	2.61	96.6
α -Са ₃ (РО ₄) ₂	2.86	25.5
β -Са ₃ (РО ₄) ₂	3.07	28.9
Са ₁₀ (РО ₄) ₆ (ОН) ₂	3.16	116.8
Са ₄ (РО ₄) ₂ O	3.05	38–44

^a K — произведение растворимости.

Получить ГА стехиометрического состава, высокой чистоты и однородности золь–гель-методом относительно легко.³¹ Однако наиболее простым методом синтеза нано-ГА является осаждение из водного раствора. Исследовано влияние температуры реакции и длительности старения осадка на размер частиц ГА и степень их кристалличности.^{36, 37} Синтез проводили взаимодействием хлорида кальция с кислым фосфатом аммония.³⁶ Как кристалличность, так и размер кристаллитов увеличиваются с повышением температуры синтеза. Обнаружено, что при $\sim 60^\circ\text{C}$ происходит переход от монокристаллических к поликристаллическим частицам. От температуры зависит и морфология частиц ГА. С понижением температуры осаждения из растворов нитрита кальция и кислого фосфата аммония аммиаком от 80 до 0°C размер частиц синтезируемого продукта уменьшается от 37 до 12 нм (оценка по методу Шеррера). На размер и форму осаждающихся частиц также влияют катионные и анионные замещения. В частности, анионные замещения $\text{CO}_3 \rightarrow (\text{PO}_4, \text{OH})$ и $\text{SiO}_4 \rightarrow \text{PO}_4$ в ГА приводят к решеточным деформациям (из-за различия размеров анионов) и уменьшению размеров кристаллитов ГА.³⁸

Процесс образования костной ткани в организме человека включает минерализацию коллагена в результате осаждения кристаллов апатита из внеклеточной жидкости. Продуктом синтеза ГА в растворе коллагена является коллагенсодержащий карбонатзамещенный ГА.³⁹ Желатина — продукт частичного гидролиза коллагена — представляет собой смесь тропоколлагеновых цепей и их фрагментов. Она не обладает потенциально опасными для медицинского применения свойствами коллагена животного происхождения. Изучены особенности получения нанокристаллических порошков ГА синтезом в растворе желатины.^{40–44} Зависимость удельной поверхности порошков от концентрации желатины представлена на рис. 1; синтез проводили осаждением из растворов нитрата кальция и кислого фосфата аммония.⁴³ Максимальная удельная поверхность составила $\sim 220 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$ (что соответствует размеру кристаллитов < 15 нм). Прямое исследование с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) подтвердило этот результат (рис. 2). В процессе осаждения ГА в растворе желатины концентрация последней является определяющим фактором в зарождении кристаллов ГА. При синтезе в водном растворе без желатины происходит гомогенная кристаллизация при взаимодействии ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} .

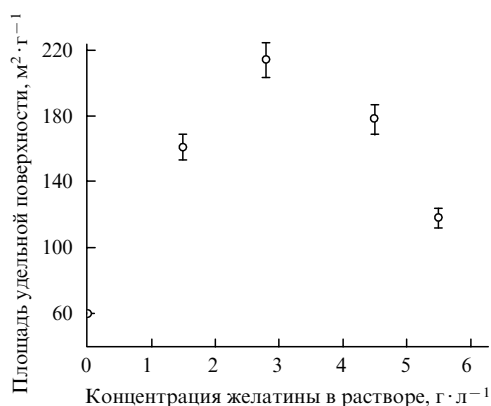


Рис. 1. Зависимость удельной поверхности порошков ГА от концентрации желатины в растворе.

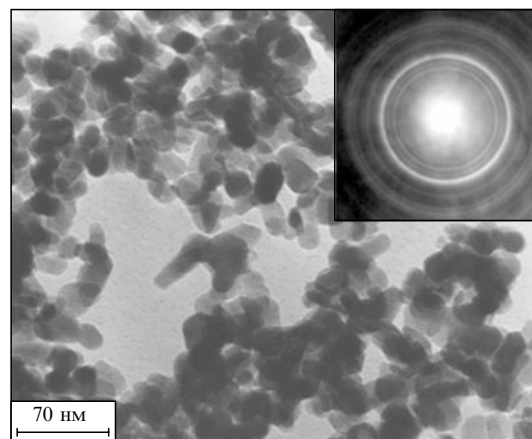


Рис. 2. ПЭМ-Изображение порошка ГА, синтезированного осаждением в растворе желатины.

На врезке — картина дифракции электронов.

В растворе желатины ионы кальция из раствора взаимодействуют с карбоксильными группами желатины, инициируя зарождение кристаллов новой фазы. К формирующимся кальциевым комплексам присоединяются фосфат-ионы, образуются зародыши новой фазы критического размера, из которых вырастают нанокристаллы ГА. По-видимому, плотность центров кристаллизации, зависящая от концентрации желатины в растворе, имеет определяющее значение для размера частиц выделяющейся фазы. При высокой плотности центров кристаллизации происходят взаимодействие растущих частиц, их объединение и укрупнение. По данным работы⁴⁴, в ИК-спектрах продукта синтеза ГА в растворах желатины помимо полос, характерных для ГА, присутствуют также полосы валентных колебаний групп N—H при $3441\text{--}3425 \text{ см}^{-1}$, C—H — при $2925, 2855$ и 1453 см^{-1} и C=O — при 1645 см^{-1} , характерных для желатины. Наличие атомов азота и углерода в продукте подтверждается данными химического анализа. После прокаливании при 1000°C и выше из спектров исчезают полосы, соответствующие желатине.

Данный подход — кристаллизация *in situ* — может быть использован при создании композиционных материалов биополимер–наночастицы фосфата кальция. Недостатком желатины, ограничивающим возможность ее применения в таких композитах, является слишком высокая скорость биологической резорбции в организме, не совместимая с кинетикой остеосинтеза. Поэтому изучаются возможности синтеза ФК в растворах других биополимеров, в частности протеиновых, таких как хитозан.⁴⁵

Хитозан ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$)_n — аминополисахарид, по строению близкий к целлюлозе, нетоксичен, обладает биосовместимостью с тканями организма. Проводили исследования по синтезу ГА в уксуснокислых растворах хитозана, используя CaCl_2 и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в качестве исходных компонентов и аммиак в качестве осадителя, при изменении pH среды от 8 до 10.6.⁴⁵ По данным химического анализа, продукты синтеза содержали атомы азота и углерода, входившие в состав хитозана. В ИК-спектрах продуктов присутствуют полосы валентных колебаний групп N—H при 3426 см^{-1} , а также колебаний группы C—H при $2924, 2854$ и 1446 см^{-1} . При сушке на воздухе продукты синтеза превращались в твердые однородные бионеорганические материалы, содержащие ГА

в нанокристаллическом состоянии (размер блоков Коши, по данным РФА, составил 12.5–18.7 нм).

Трудно решаемой проблемой является сохранение размера зерна на наноуровне в керамике, спеченной из нанопорошков, так как нанокристаллические порошки из-за высокой площади поверхности подвержены значительной собирательной рекристаллизации при спекании. Как следствие, прочность керамики, спеченной до плотного состояния из нанопорошков, ниже прочности керамики, полученной из исходных порошков с частицами микрометровых размеров. Поэтому важно снизить температуру спекания. Обычно для этой цели процесс спекания проводят с участием легкоплавкой жидкой фазы, образующейся при плавлении относительно легкоплавкой добавки, которую вводят в шихту. При этом может происходить вторичная кристаллизация из образующегося расплава. Примеры таких микроструктур приведены на рис. 3: в результате выделения вторичных стержневидных кристаллов из расплава, образуемого легкоплавкими добавками двойных карбонатов калия–кальция, достигается эффект «самоармирования». Прочность при изгибе таких материалов, спеченных при 750°C, составляет 125 МПа, а материалов из микропорошков ГА, спеченных при 1250°C до плотного состояния, не превышает 90 МПа. Стержневидные кристаллы эффективно препятствуют распространению трещин, т.е. приводят к повышению прочности.

Сохранить размер зерна в керамике, спеченной из нанопорошков ГА, можно за счет применения высоких давлений при прессовании сырой заготовки.⁴⁶ На рис. 4 приведены ПЭМ-изображения исходной прессовки из нанопорошков

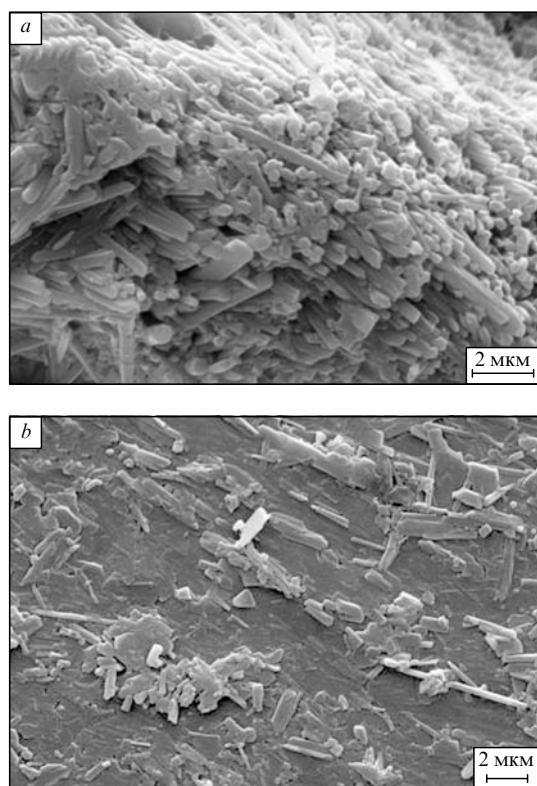


Рис. 3. Микроструктура керамики, спеченной из нанопорошков ГА с введением карбонатных добавок в шихту. *a* — поверхность излома, *b* — шлиф.

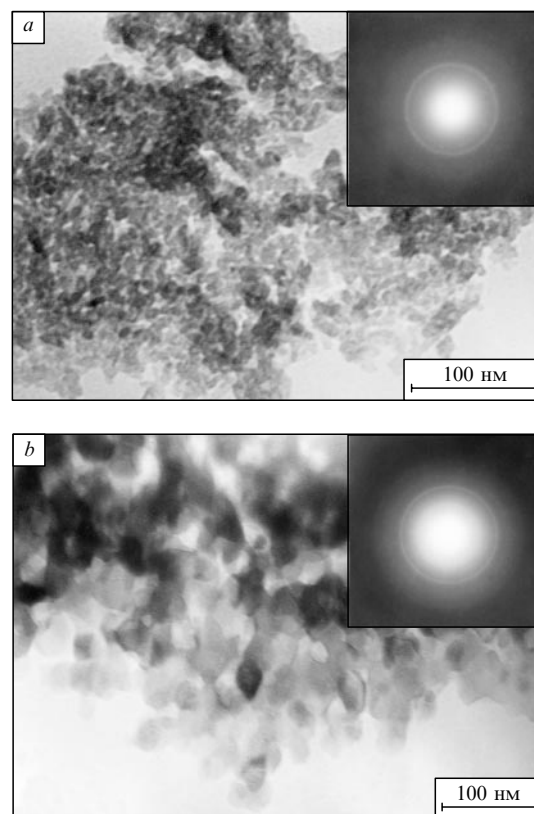


Рис. 4. ПЭМ-Изображения исходной прессовки (*a*) и спеченной керамики (*b*) из нанопорошков ГА. На врезках — картины дифракции электронов.

ГА, полученной одноосным прессованием под высоким давлением (3 ГПа), и микроструктуры керамики, спеченной при 670°C. Применение высокого давления позволило снизить температуру спекания на ~550°C по сравнению с температурой спекания прессовок, полученных при 100 МПа, и сохранить тем самым размер зерна в керамике на уровне 35–50 нм. Микротвердость материала достигает 5.8 ГПа, это существенно (в 1.6 раза) выше микротвердости керамики, спеченной из микропорошков. С применением высоких давлений (~1 ГПа в очаге деформации) при прокатке нанопорошков ГА на титановых пластинах были получены компактные керамические пленки толщиной ~0.1 мм. После термообработки при 690°C размер кристаллов ГА в спеченной до плотного состояния пленке составлял лишь 15–35 нм. Таким образом, активирование путем обработки высокими давлениями позволяет существенно снизить температуру спекания наночастиц ГА. Однако такая технология реализована лишь для относительно тонких объектов. Очевидна необходимость проведения дальнейших исследований с целью получения объемных материалов.

Несмотря на некоторые успехи, достигнутые в области повышения механических свойств ГА-керамики за счет ее наноструктурирования, керамические имплантаты можно использовать только для замещения участков костей, не несущих значительных механических нагрузок. Это обусловлено хрупкостью керамики и высокой чувствительностью к коррозии под напряжением в жидкостях организма, приводящей к замедленному разрушению имплантата.^{7, 28} Альтернативой является концепция регенерации костной ткани.

III. Материалы для регенерации костной ткани

По сочетанию механических (модуль упругости, прочность, трещиностойкость) и биологических (кинетика резорбции, матричные свойства для адгезии клеток и адсорбции белков) свойств ФК-керамика не сопоставима с биологической костной тканью и не может полноценно заменить ее с восстановлением физиологических функций.

Прогресс в разработке и создании биоматериалов второго и третьего поколений обеспечил необходимые условия для изменения медицинских технологий в костной терапии: переходу от заместительно-реконструктивного принципа к инженерии костной ткани — клеточной технологии самовосстановления кости на остеокондуктивном матриксе. Это новое направление, разработанное и получившее развитие в течение последнего десятилетия; инженерия костной ткани основана на результатах исследования процессов биоминерализации в организме человека.

1. Биоминерализация и инженерия костной ткани

Костная система организма человека характеризуется определенной кинетикой ремоделирования, заключающегося в резорбции минеральной компоненты и биоминерализации (осаждении).¹⁴ Процесс биоминерализации включает гетерогенную нуклеацию минеральной фазы в порах коллагеновых фибрилл, катализируемую карбоксильными группами, и последующий рост кристаллов вдоль фибрилл коллагена.⁴⁷ Природа первичной минеральной фазы однозначно не идентифицирована. Существует мнение, что биологический апатит кристаллизуется из кластеров $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, образующих хаотичную упаковку с молекулами воды в структуре предшественника, так называемого аморфного фосфата кальция. Это косвенно подтверждается присутствием в минеральной фазе ионов магния, стабилизирующих аморфную фазу. Согласно другой теории, предшественниками биологического апатита являются двухводный дикальцийфосфат и ОКФ, кристаллическая структура которых подобна структуре апатита.

Инженерия костной ткани базируется на результатах исследования процессов биоминерализации; основная цель разработок этого направления — достижение максимального соответствия свойств ткани, образующейся *de novo*, свойствам исходной восстанавливаемой ткани. Предполагалось, что организм способен сам восстановить повреждение, если поместить в место дефекта матрикс (носитель) необходимой архитектуры, изготовленный из биологически совместимого с организмом материала, с культивированными в него остеобластами (клетками (остеобластами)), и если имеются стимулы для жизнедеятельности этих клеток, неоваскуляризации и биологических потоков в матрикс. Были сформулированы следующие основные требования к материалам матриксов:

— материал должен соответствовать костной ткани по минеральному составу, механическим характеристикам, пористости, размерам и распределению пор;^{28, 48, 49}

— материал должен обладать высокими матричными свойствами для остеокластов, осуществляющих резорбцию, и остеобластов, формирующих коллаген, обеспечивая жизнедеятельность клеток;¹⁴

— матрикс должен иметь кинетику биорезорбции, совместимую с кинетикой образования костной ткани *de novo*;^{4, 50–53}

— материал должен быть остеокондуктивным, а в идеальном случае — и остеоиндуктивным, создающим биологические стимулы для остеогенеза, и обеспечивать возможность комбинирования с биологически активными компонентами, усиливающими регенеративный потенциал системы, такими как морфогенетические белки и стероиды. В частности, морфогенетические белки стимулируют дифференцировку остеобластов и подавляют таковую для мускульных клеток, индуцируют эндохондральное формирование костной ткани.^{2, 14} Матрикс должен создавать пространственную структуру для роста костной ткани. Даже объемные 3D-укладки из не связанных между собой ФК-микросфер могут быть хорошими матриксами.¹⁴

В одном из вариантов метода инженерии костной ткани используют мезенхимальные стволовые клетки, которые способны дифференцироваться в остеобласты. В этом случае значительный успех мог бы быть достигнут при использовании для создания матрикса остеоиндуктивных материалов.² Известны результаты, согласно которым при имплантировании некоторых ФК в мягкие ткани животных на них происходил остеосинтез, т.е. материалы способны проявлять имманентную остеоиндуктивность.² Это открывает новые перспективы для развития методов восстановительной терапии.

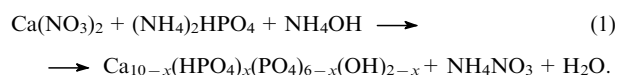
Среди фосфатов кальция, кинетику резорбции которых можно контролировать и которые можно использовать для матриксов, наибольшее внимание привлекают бифазные материалы системы ГА–ТКФ, карбонатсодержащий ГА и ОКФ.

2. Бифазные материалы системы гидроксипатит – трикальцийфосфат

Концепция бифазных материалов системы ГА–ТКФ (БФК) была разработана, исходя из предположения о возможности регулирования кинетики резорбции путем изменения соотношения менее (ГА) и более (ТКФ) растворимых фаз в одном материале.^{54–56} Растворение ТКФ-составляющей в жидкости организма способствует процессу минерализации, и биологическое поведение бифазных материалов зависит от соотношения ГА : ТКФ.⁵⁴

Бифазные материалы системы ГА–ТКФ могут быть получены как механическим смешением компонентов, так и термической обработкой кальцийдефицитного апатита ($\text{Ca}:\text{P} = 1.5–1.67$) при температуре $> 700^\circ\text{C}$.^{56–58} Второй метод предпочтительнее, так как он обеспечивает высокую равномерность распределения компонентов. Кальцийдефицитный апатит получают осаждением из растворов или гидролизом дикальцийфосфата.

Исследовано влияние состава кальцийдефицитного апатита и температуры термообработки на фазовые соотношения в композиционных материалах, получаемых путем его термического разложения.⁵⁹ В качестве исходных реагентов использовали растворы $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Происходит реакция



Синтез проводили, поддерживая значение pH раствора в интервале от 7 до 8.5, что является важным условием для получения кальцийдефицитного апатита. Осадок сушили с использованием СВЧ-излучения. Рентгенофазовый анализ показал, что фазовый состав продукта разложения зависит

как от соотношения Са и Р в продукте синтеза, так и от температуры термической обработки. Например, для образца с исходным отношением Са:Р = 1.57 после термообработки при 900°C состав включает 62% β-ТКФ и 38% ГА. С повышением температуры до 1000°C содержание ГА увеличивается до 47%, а β-ТКФ уменьшается до 53%. При 1100°C основной фазой является ГА (61%). После термообработки при температуре > 1200°C появляется α-ТКФ.

Таким образом, метод осаждения кальцийдефицитного апатита из растворов с варьируемым отношением компонентов (Са:Р от 1.54 до 1.64) и последующей термической обработкой продукта синтеза при температуре в интервале от 900 до 1300°C обеспечивает возможность получения двухфазных фосфатов с отношением ГА:β-ТКФ в широких пределах — от 12:88 до 89:11, а также трехфазных фосфатов с соотношением ГА:β-ТКФ:α-ТКФ от 55:24:21 до 93:3:7.

Из порошков бифазных материалов суспензионным методом, используя несмешивающиеся жидкости, получали гранулы.^{59,60} Порошки смешивали с 10%-ным раствором желатины, суспензию вводили в дисперсионную среду (масло) и перемешивали. В результате формировались сферические капельки водной суспензии в масле, которые после сшивания структуры желатины отверждались. После оттаивания гранулы подвергали термообработке при 1000°C для спекания. Средний размер гранул и параметры распределения их размеров в диапазоне от 50 до 2000 мкм зависели от концентрации суспензии, температуры дисперсионной жидкости и скорости перемешивания.

Измеряли растворимость гранул фракции 300–500 мкм в изотоническом 0.1 М растворе NaCl в течение 28 сут при постоянном объеме жидкой фазы (замкнутая система); такую методику обоснованно применяют при исследованиях биоматериалов.⁶¹ Определяли концентрацию кальция в жидкой фазе. Результаты исследования кинетики растворения гранул ГА, β-ТКФ, α-ТКФ и бифазных (ГА–β-ТКФ) композиционных гранул представлены на рис. 5.

Регрессионный анализ кинетических кривых показал, что растворение гранул — многостадийный процесс, подобный растворению гранул стекла Bioglass®.⁶² На начальной стадии (до 1 сут) зависимость концентрации кальция в растворе от времени ($c(t)$) можно аппроксимировать логарифмической или степенной функцией. С течением времени растворение

замедляется, и кинетика подчиняется экспоненциальной зависимости

$$c(t) = c_0 + c_m[1 - \exp(-bt)], \quad (2)$$

где c_0 — условная начальная концентрация, c_m — концентрация насыщения, b — коэффициент.

Экспоненциальная зависимость соответствует кинетике реакции первого порядка, когда скорость изменения количества «активных центров растворения» ($C(t)$) в растворяемом материале пропорциональна их количеству в данный момент:

$$\frac{dC(t)}{dt} = -kC(t),$$

где коэффициент k не зависит от времени.

Представляет интерес количественная оценка скорости изменения концентрации кальция в растворе в зависимости от соотношения ГА:β-ТКФ в гранулах. На «экспоненциальной» стадии растворения скорость изменения концентрации со временем уменьшается

$$\frac{dc(t)}{dt} = c_m b \exp(-bt),$$

поэтому в качестве количественной меры можно рассматривать начальную скорость растворения

$$\frac{dc(t)}{dt} = c_m \cdot$$

Результаты количественных оценок кинетических параметров процесса представлены в табл. 3. Начальная скорость растворения возрастает с увеличением содержания β-ТКФ в гранулах. Максимальную растворимость имеют гранулы из α-ТКФ. Принято значения параметров кинетического уравнения растворения нормировать на величину удельной поверхности, это позволяет сравнивать растворимости разных материалов. Начальная скорость выделения кальция, нормированная на изменение удельной поверхности, возрастает с увеличением содержания β-ТКФ в гранулах (рис. 6). Следовательно, скорость растворения зависит не только от удельной поверхности, но и от фазового состава материала. Существенное увеличение удельной поверхности гранул после выдержки в изотоническом растворе свидетельствует о селективном растворении отдельных структурных элемен-

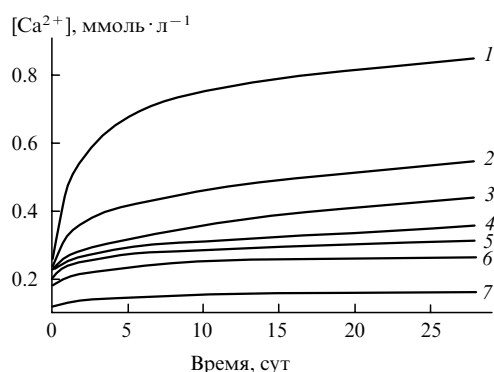


Рис. 5. Изменение концентрации ионов Ca^{2+} в изотоническом растворе при растворении гранул. 1 — α-ТКФ, 2 — β-ТКФ, 3 — 80% β-ТКФ + 20% ГА, 4 — 60% β-ТКФ + 40% ГА, 5 — 40% β-ТКФ + 60% ГА, 6 — 20% β-ТКФ + 80% ГА, 7 — ГА.

Таблица 3. Параметры «экспоненциальной» стадии растворения, удельная поверхность до (S_0) и после (S_k) испытаний гранул на растворимость в зависимости от фазового состава гранул.

Содержание β-ТКФ, мас. %	c_0 (см. ^а)	c_m (см. ^а)	$c_m b$	b , сут ⁻¹	S_0 , м ² ·г ⁻¹	S_k , м ² ·г ⁻¹
0	0.123	0.019	0.119	6.28	0.639	2.248
16	0.184	0.039	0.208	5.33	1.391	2.181
36	0.225	0.030	0.165	5.50	—	—
53	0.236	0.043	0.230	5.34	0.402	1.113
77	0.250	0.074	0.392	5.30	0.325	1.367
100	0.28	0.104	0.517	4.97	0.027	0.680
α-ТКФ	0.407	0.199	0.953	4.79	—	0.898

^а В ммоль·л⁻¹.

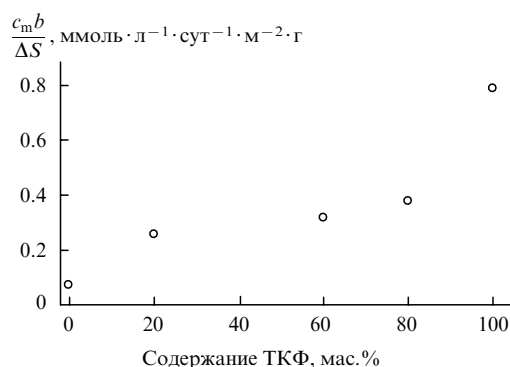
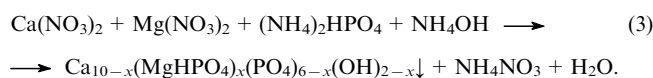


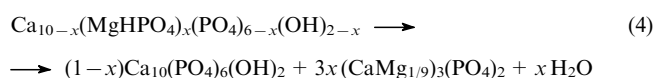
Рис. 6. Соотношение между нормированной на изменение удельной поверхности начальной скоростью растворения на «экспоненциальной» стадии растворения и содержанием β -ТКФ в гранулах.

тов. Согласно данным рентгенофазового анализа, содержание β -ТКФ в образцах после испытания уменьшается. Увеличение удельной поверхности ГА-гранул, не содержащих β -ТКФ, возможно в результате частичного растворения и ГА.

Физиологически важным для костной ткани является наличие магния. Проведены эксперименты по синтезу магнийсодержащих двухфазных фосфатов кальция в системе ГА–ТКФ осаждением из растворов $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.⁶³ Происходит реакция



Разложение кальцийдефицитного магнийсодержащего апатита при термической обработке происходит по гипотетической реакции



с образованием ГА и магнийсодержащего β -ТКФ.

Количество введенного магния составляло от 1 до 6% от отношения магния к общему содержанию кальция и магния. К раствору нитратов кальция и магния приливали раствор фосфата аммония, полученный осадок старили, отфильтровывали, сушили и подвергали термообработке при 900 и 1100°C. Размер частиц порошка составлял 300–500 нм.

Согласно данным РФА, во всех образцах присутствуют две фазы — β -ТКФ и ГА. Содержание β -ТКФ увеличивается с повышением содержания магния в кальцийдефицитном апатите. При замещении 1% ионов кальция на магний образуется 16% β -ТКФ, а при 3%-ном замещении соотношение фаз ГА: β -ТКФ составило 56:44. Введение >6% магния приводит к образованию практически однофазного магнийсодержащего β -ТКФ. Фазовый состав получаемых порошков мало изменяется с повышением температуры от 900 до 1100°C.

Положение дифракционных максимумов, соответствующих β -ТКФ, смещается в длинноволновую область при введении магния. Для определения параметров элементарной ячейки использовали положения максимумов отражений (300), (021), (220) для β -ТКФ и (410), (213), (112), (211) для ГА. Введение магния в БФК не влияет на параметры элементар-

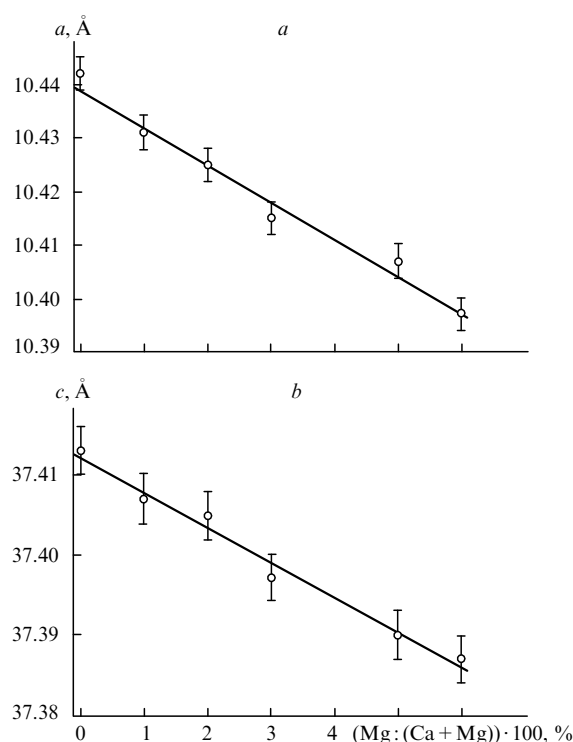


Рис. 7. Изменение параметров a (a) и c (b) элементарной ячейки ТКФ в зависимости от атомного отношения $\text{Mg}:(\text{Mg} + \text{Ca})$.

ной ячейки ГА ($a = 9.432 \pm 0.002 \text{ \AA}$ и $c = 6.883 \pm 0.002 \text{ \AA}$). Однако с увеличением содержания катионов магния в БФК параметры элементарной ячейки β -ТКФ уменьшаются (рис. 7), что обусловлено различием ионных радиусов кальция (1.14 Å) и магния (0.86 Å). Таким образом, можно предположить, что магний образует твердый раствор замещения в β -ТКФ и не входит в структуру ГА.⁶⁴

Исследования *in vivo* при имплантировании гранул БФК в костный дефект голени крысы линии Wistar показали, что резорбция гранул происходит неоднородно: ГА-составляющая остается «замурованной» в костной ткани, образующейся *de novo*.⁶⁵ Это является существенным недостатком БФК-керамики. Можно полагать, что однородный по фазовому составу карбонатсодержащий ГА будет характеризоваться более благоприятным биологическим поведением в организме.

3. Карбонатсодержащий гидроксиапатит

Карбонатные группы могут занимать два положения в структуре ГА, замещая соответственно группы OH (А-тип замещения) либо PO_4 (Б-тип).⁶⁶ Замещение анионов PO_4^{3-} карбонат-ионами приводит к уменьшению размеров кристаллов и степени кристалличности ГА. Замещение OH-групп приводит к расширению элементарной ячейки вдоль оси a и небольшому сжатию вдоль оси c , что сопровождается изменением пространственной группы $P6_3/m$ на $P2_1/b$. В случае карбонатсодержащего ГА Б-типа, наоборот, наблюдается уменьшение параметра a и увеличение c . Как природная костная ткань, так и синтетический карбонатсодержащий гидроксиапатит (КГА), получаемый осаждением из растворов, имеет смешанный АБ-тип замещения, в котором соотношение между составляющими А и Б зависит

от многих факторов. В частности, при химическом синтезе это соотношение может зависеть от условий проведения реакции.

Карбонатсодержащий ГА Б-типа либо смешанного АБ-типа замещения получают осаждением из водных растворов при повышенных значениях pH.^{67–69} Может быть использована реакция между растворами нитрата кальция, двузамещенного фосфата аммония, карбоната аммония и аммиаком. При замещении по типу Б проблемой является сохранение зарядового баланса. Поэтому синтез карбонатсодержащего ГА Б-типа обычно проводят с участием ионов натрия или аммония, частично замещающих ионы кальция.⁶⁷ Ионные радиусы натрия и кальция близки. Температура синтеза и содержание карбонатных групп существенно влияют на морфологию кристаллизующихся частиц (от сферической при высоких содержаниях до игольчатой — при низких). Превалирующий тип замещения зависит от содержания карбонат-ионов: при содержаниях CO_3^{2-} более 4 мас. % они предпочтительно занимают Б-позиции в структуре.

Карбонатсодержащий ГА может быть получен также из оксида кальция, кислого фосфата аммония и карбоната аммония в условиях твердо-жидкофазного взаимодействия.^{70–72} Исходные ингредиенты в твердом состоянии интенсивно смешивают, к смеси добавляют воду и продолжают смешение, затем смесь помещают в микроволновую печь (известно ускоряющее воздействие микроволнового излучения на синтез КГА). Продукт реакции подвергают термообработке на воздухе для кристаллизации КГА.

Карбонатсодержащий ГА термически нестабилен, поэтому проблематично изготовление керамики на его основе. Исследования методом фурье-ИК-спектроскопии конденсата паровой фазы, образующейся при нагреве в ячейке Кнудсена образцов карбонатсодержащих ГА разных составов, выявили, что разложение начинается уже при температурах 300–400°C с выделением CO и CO_2 .^{70–73} Термическая устойчивость карбонатсодержащего ГА зависит как от его состава, так и от химической предыстории (способа и условий синтеза). В качестве примера на рис. 8 приведены данные о зависимости площадей пиков CO (2149 и 2138 cm^{-1}) и CO_2 (при 2345 и 2339 cm^{-1}) в ИК-спектрах конденсата паровой фазы от температуры испарения образцов карбонатсодержащего ГА, имеющих 3.1 и 6.3 мас. % CO_3 соответственно, а также 0.1 мас. % Mg.⁷⁰ В интервале температур 1200–1300°C карбонатсодержащий ГА полностью теряет карбонатные группы. Карбонатсодержащий ГА, синтезированный гетерофазным взаимодействием, более устойчив к термическому разложению, что обусловлено его более высокой кристаллическостью. По данным химического анализа, карбонатсодержащий ГА теряет > 50% карбонатных групп после термообработки при 1100°C. Исчезает также полоса поглощения OH-групп в ИК-спектре, а полосы карбонатных групп в области 1650–1300 cm^{-1} существенно изменяются. Анализ формы спектров ЯМР ^1H показал, что после термической обработки карбонатсодержащего ГА при 1100°C содержание протонов снижается в три раза; при этом происходит структурная перестройка ГА в оксиапатит.⁷³

Исследована возможность стабилизации карбонатсодержащего ГА посредством компенсации зарядового дисбаланса, возникающего при вхождении CO_3^{2-} в структуру ГА.¹² Для компенсации часть катионов Ca^{2+} может быть пропорционально замещена на одновалентный катион, предпочтительно Na^+ (из-за близости их ионных радиусов). Установлено, что натрий, занимая смежную позицию с карбонат-

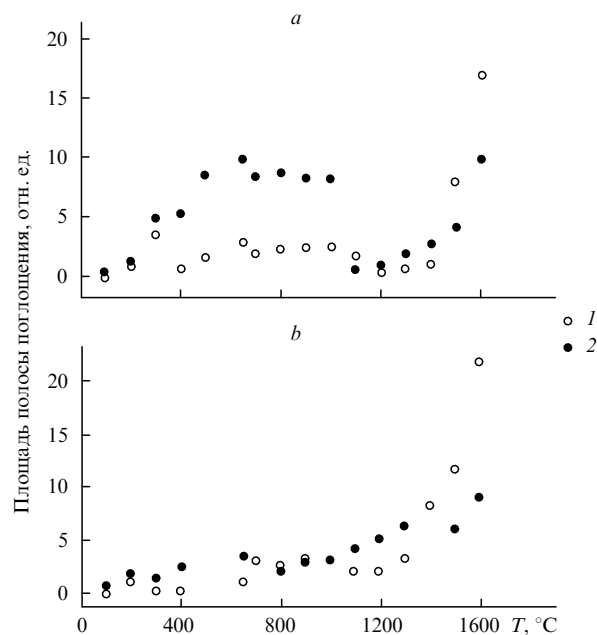


Рис. 8. Температурные зависимости площадей полос поглощения CO (1) и CO_2 (2) в ИК-спектрах конденсатов паровой фазы, образующейся при нагреве КГА. Образец с содержанием 3 (a) и 6 мас. % (b) CO_3 .

ионом в подрешетке $\text{Ca}1$, способствует образованию дефектов Б-типа в карбонатсодержащем ГА, которые термодинамически менее устойчивы по сравнению с дефектами АБ-типа (замещение $2\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}, \text{OH}^-$).

Таким образом, температуру спекания порошков карбонатсодержащих ГА для получения керамики нужно снизить по меньшей мере на 450–500°C по сравнению с температурой спекания ГА-керамики (1250–1300°C). С этой целью проведены эксперименты по спеканию керамики на основе карбонатсодержащего ГА при пониженных температурах с участием жидкой фазы. Установлено, что эффективными добавками, формирующими жидкую фазу, являются двойные карбонаты кальция и щелочных металлов. При введении в шихту таких добавок в количестве до 8 мас. % удалось снизить температуру спекания керамики до 750–800°C и избежать тем самым существенной потери карбонатных групп. При спекании происходит вторичная кристаллизация из расплава добавки с продуктами растворения основной фазы, что подтверждено при изучении элементного состава кристаллов методом локального анализа. Кристаллизация вторичных стержневидных кристаллов приводит к упрочнению керамики.

Пористая керамика на основе карбонатсодержащего ГА более перспективна в качестве материала матрикса, чем БФК-керамика. Кинетические кривые изменения концентрации ионов кальция в изотоническом растворе для гранул с разной степенью замещения приведены на рис. 9.⁷⁴ Растворимость гранул повышается с увеличением содержания карбонатных групп. В испытаниях *in vivo* установлено, что гранулы остеокондуктивны, на них происходит активное формирование костной ткани, скорость резорбции гранул в костном дефекте превышает таковую для β -ТКФ-керамики.^{65, 74} Данные о том, что карбонатсодержащий ГА может проявлять остеоиндуктивные свойства, неизвестны.

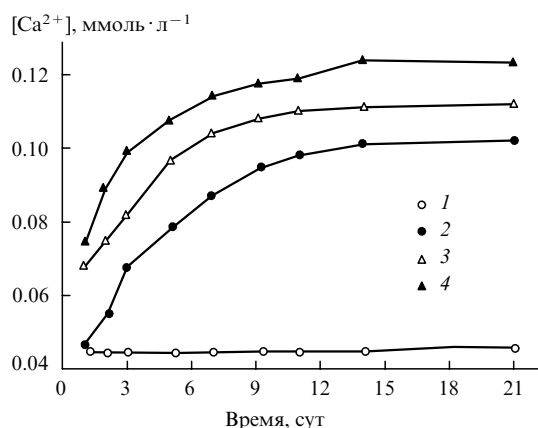


Рис. 9. Изменение во времени концентрации ионов Ca^{2+} в изотоническом растворе при растворении гранул ГА (1), карбонатсодержащего ГА с 0.6 (2), 6 (3) и 9 мас.% (4) карбонатных групп.

4. Октакальцийфосфат: возможная остеиндуктивность

Одним из возможных остеиндуктивных веществ является ОКФ. Исследования материалов на основе ОКФ начаты недавно, поэтому литературные данные весьма ограничены. Стехиометрический состав ОКФ соответствует формуле $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; атомное отношение $\text{Ca}:\text{P}$ равно 1.33. Кристаллическая структура ОКФ относится к триклинной сингонии с пространственной группой $P1$.^{75, 76} Структура ГА до некоторой степени подобна структуре ОКФ, сходство состоит в том, что последний имеет слои со структурой апатита (слои А), разделенные гидратированными слоями (слои Б), содержащими молекулы воды.⁷⁶ Существует мнение, что ОКФ представляет собой термодинамически метастабильную полиморфную модификацию ГА.⁷⁷ Слои Б содержат два типа групп HPO_4^{2-} , одна из которых соединена со слоем А, а другая расположена между слоями А в конфигурации $\text{Ca}-\text{HPO}_4\text{Ca}$.⁷⁸ Такая структура делает возможным интеркаляцию в ОКФ других анионов посредством ионного обмена с ними групп HPO_4^{2-} . Интеркалированный ОКФ может быть использован для доставки лекарственных препаратов в организм.⁷⁸ Частично гидролизированный ОКФ может состоять из доменов ОКФ и ГА.⁷⁹ Структура ОКФ сохраняется в некоторой области гомогенности его состава, так что в общем случае состав ОКФ соответствует формуле $\text{Ca}_{10}\text{H}_{4+x}(\text{PO}_4)_{12}(\text{OH})_x \cdot (10-x)\text{H}_2\text{O}$.⁸⁰

Уникальной особенностью ОКФ является его способность обратимо менять содержание анионов HPO_4^{2-} в гидратированных слоях Б. Это содержание можно варьировать, изменяя среду от щелочной до нейтральной.⁸¹ Морфологически ОКФ кристаллизуется в форме плоских кристаллов, ориентированных по плоскостям $\{100\}$ вдоль оси симметрии a триклинной структуры.

Гидроксиапатит — наименее растворимый ортофосфат кальция при значениях $\text{pH} \sim 7$, соответствующих pH плазмы крови; ОКФ в этих условиях растворяется существенно лучше.⁸² Синтез ОКФ проводят осаждением из водных растворов.⁸³ Часто он образуется как промежуточный продукт при получении термодинамически более устойчивых фаз, например ГА, в области нейтральных значений pH из растворов с концентрацией ионов кальция < 5 ммоль $\cdot$ л⁻¹ и фосфата — < 60 ммоль $\cdot$ л⁻¹ при температуре

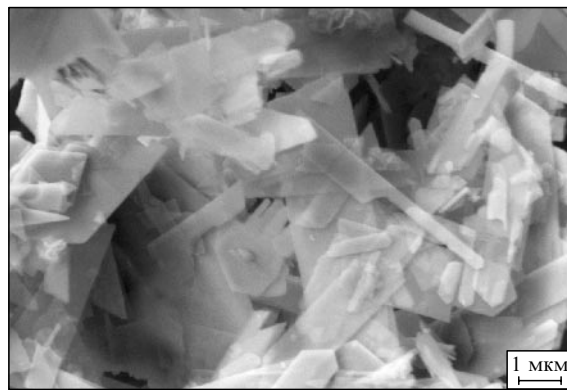
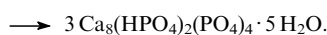
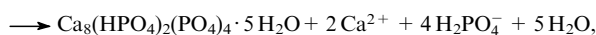


Рис. 10. Морфология частиц октакальцийфосфата.

$\sim 40^\circ\text{C}$.^{83, 84} В работе⁸⁴ в качестве исходных были использованы растворы $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (от 0.005 до 0.03 моль $\cdot$ л⁻¹) и $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, осаждение проводили раствором мочевины, гидролизующейся с выделением аммиака. В ходе реакции значение pH изменялось от 4 до ~ 7 . Согласно данным рентгенофазового анализа продукта осаждения, ОКФ является основной фазой при высокой (0.03 моль $\cdot$ л⁻¹) концентрации нитрата кальция в растворе. При меньших концентрациях происходит гидролиз ОКФ с образованием ГА. Частицы ОКФ имеют характерную морфологию пластинчатых кристаллов (рис. 10). В ИК-спектрах присутствуют полосы при 873 и 1420 см⁻¹, соответствующие модам колебаний ν_2 и ν_3 карбонатных групп, источником которых является CO_2 воздуха.

Один из вариантов синтеза ОКФ осаждением основан на взаимодействии $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и Na_2HPO_4 в буферном растворе ацетата натрия. Реакцию проводят при 45–55°C и pH в интервале 6.5–7.2 в течение 48 ч.⁸⁵ Установлено, что такие параметры, как температура и pH , влияют на размер и морфологию получаемых частиц. Они могут иметь сферическую либо пластинчатую форму, размер пластинок составляет от десятков до сотен микрометров. Для ИК-спектров ОКФ характерно присутствие полосы поглощения групп HPO_4 при 910 см⁻¹, по наличию и интенсивности которой можно идентифицировать ОКФ. Другой вариант синтеза детально описан в исследованиях^{79, 86, 87}. Раствор 0.04 М $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (250 мл) добавляют к 750 мл раствора, содержащего по 5 ммоль $\cdot$ л⁻¹ Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 , при непрерывном перемешивании. Температуру и pH поддерживают равными 60°C и 5 соответственно. Осадок после старения в течение 10 мин промывают дистиллированной водой и сушат при 37°C. Получен порошок с частицами чешуйчатой морфологии, представляющий собой чистый ОКФ без примесей других фаз.

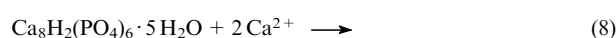
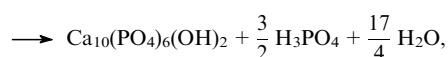
Октакальцийфосфат может быть также получен гидролизом других ортофосфатов — двухводного дикальцийфосфата (брушита, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (см.⁸⁸)) и α -трикальцийфосфата (α -ТКФ, $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (см.⁸⁹)) — согласно следующим реакциям:



В обоих случаях конечным продуктом гидролиза при определенных условиях может быть кальцийдефицитный ГА, при этом ОКФ будет интермедиатом.⁹⁰

Гидролиз α -ТКФ до ОКФ осуществляют, например, следующим образом.⁷⁸ Порошок α -ТКФ в количестве $2.0 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ суспендируют в 18 мл буферного раствора $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ при начальном значении pH в интервале 3.9–4.7. Суспензию выдерживают при 50–70°C, непрерывно перемешивая магнитной мешалкой в течение 3–24 ч. Продукт гидролиза сушат при 50°C в течение 24 ч.

Проблема гидролиза ОКФ важна в связи с гипотезой о процессе биоминерализации, согласно которой образование стабильной в организме фазы — биологического апатита — включает стадию образования промежуточной метастабильной фазы — октакальцийфосфата. Увеличение атомного отношения Са : Р в организме, соответствующее тенденции к формированию со временем ГА (Са : Р = 1.67), демонстрируют данные табл. 4.⁹¹ Трансформация ОКФ в ГА в организме может происходить в результате либо его непрерывного гидролиза, либо по механизму растворения ОКФ и осаждения ГА из пересыщенного раствора. При гидролизе сохраняется кристаллографическое соответствие фаз на границе раздела ОКФ/ГА.⁹² Превращение ОКФ в ГА спонтанное и необратимое.⁸¹ Гидролиз сопровождается присоединением к молекуле ОКФ ионов кальция из раствора и переходом части фосфат-ионов в раствор согласно реакциям⁹³



Экспериментально обнаружено, что при гидролизе нестехиометрического ОКФ с отношением Са : Р = 1.26 происходит образование кальцийдефицитного ГА (Са : Р = 1.49).⁸⁰

В связи с тем что в биологической костной ткани присутствуют примесные ионы, представляет интерес выявить их влияние на процесс гидролиза. Установлено значительное ингибирующее влияние ионов магния на гидролиз брусита с образованием ОКФ и ГА.⁸⁶ При высоких концентрациях ионов магния ($> 10^{-4} \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) продуктом гидролиза могут быть даже не ОКФ и ГА, а β -ТКФ.⁹³ Изучено влияние ионов различных металлов (в количестве 5 и 10 мкмоль $\cdot \text{л}^{-1}$) на гидролиз двухводного дикальцийфосфата до ОКФ и ГА в растворе ортофосфорной кислоты с добавлением нитрата металла.⁹⁴ Наиболее сильное ингибирующее действие на превращения оказывают ионы Zn^{2+} и Cu^{2+} . Гидролиз в присутствии этих ионов характеризуется индукционным периодом, относительно протяженной стадией слабого изме-

нения pH и быстрой стадией резкого снижения pH до конечного значения. Ионы Pb^{2+} способствовали превращению брусита в ОКФ; ионы Mg^{2+} были слабыми ингибиторами этого процесса, а ионы переходных металлов — Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} — соответственно ингибитором, слабым ингибитором и слабым промотором такого превращения. Двухвалентные ионы железа и цинка полностью подавляют превращение брусита в ГА. Механизм ингибирующего действия связывают с адсорбцией ионов, препятствующей росту зародышей новых фаз. По-видимому, примесные ионы могут существенно влиять на процессы ремоделирования костной ткани, происходящие в организме человека.

Известно, что ОКФ обладает высокими osteoconductive свойствами. Как показали эксперименты, проведенные на крысах линии Wistar, имплантирование гранул ОКФ в дефект кости ускоряет процесс ее регенерации.⁹⁵ Покрытие титановых имплантатов ОКФ способствует их биоинтеграции в окружающую костную ткань.⁹⁶ Установлено, что кристаллы ОКФ присутствуют в дентине зубов человека, причем из него состоит центральная часть кристаллической фазы дентина, которая покрыта слоем апатита.⁹⁷ Полагают, что кристаллизация ГА происходит на его предшественнике — ОКФ, играющем важную роль в процессе минерализации зубных тканей.

Возможны отклонения в составе ОКФ от стехиометрии за счет, например, частичного гидролиза. Эти отклонения могут существенно влиять на биологическое поведение материала. В работе⁹⁸ исследовали влияние состава ОКФ на его osteoconductive свойства и характеристики иммунной реакции на модели костного мозга крысы. Установлено, что частично гидролизованный, низкокristаллический ОКФ с отношением Са : Р = 1.37 эффективно повышает образование костной ткани *de novo*, подавляет активность остеокластов и снижает воспалительные реакции организма, проявляет более высокие osteoconductive свойства по сравнению с β -ТКФ и полностью гидролизованным ОКФ с отношением Са : Р = 1.48.

Обнаружено, что титановые имплантаты с ОКФ-покрытием и морфогенерическим белком rhBMP-2 проявляют osteoinductive свойства, а имплантаты без покрытия не обладают этим свойством.² В отличие от ГА и керамики на его основе, ОКФ проявляет в биологическом микроокружении имманентную osteoinductive способность — способность инициировать образование костной ткани *de novo*, например при подкожном имплантировании.^{2,99} Причины такого биологического поведения ОКФ окончательно не выяснены.¹⁰⁰ Существуют две точки зрения на проблему его osteoinductive свойств.

Согласно данным работы², состав ОКФ не является решающим фактором для osteoinductive способности. Полагают, что osteoinductive способность некоторых материалов связана с их способностью концентрировать на своей поверхности морфогенетические белки и osteoобразующие клетки из окружающей биологической среды. Специфическая способность ОКФ адсорбировать белки, возможно, заключается в его микроструктуре — наличии микропор между образующими его кристаллами. На модели костного дефекта мыши проведено исследование влияния микроструктуры гранул из ОКФ на динамику восстановления костной ткани.¹⁰¹ Гранулы диаметром 300–500 мкм с микроструктурой двух типов имплантировали в костный дефект. В гистологических исследованиях выявлено активное формирование костной ткани на гранулах с более тонкой микроструктурой, состоящей из пластинчатых кристаллов ОКФ. Полагают, что

Таблица 4. Изменение со временем содержания кальция и фосфора в костной ткани цыпленка.

Возраст	Са, мас. %	Р, мас. %	Са : Р	Плотность костной ткани, г $\cdot$ см ⁻³
Эмбриональный	17.8	9.6	1.43	1.85
10 недель	24.6	12.5	1.52	2.11
1 год	26.2	12.5	1.61	2.14

микроструктура влияет на адгезию остеобластов; пластинчатая форма кристаллов способствует адгезии. Гипотеза о том, что основной причиной остеоиндуктивности ОКФ является его микроструктура, также косвенно подтверждается исследованиями иных ФК-материалов.²

Согласно другой точке зрения, гидролиз ОКФ в ГА, происходящий в организме, сам по себе может быть одним из факторов, стимулирующих дифференцировку мультипотентных стволовых клеток в остеобласты.⁹⁹ Превращение имплантируемого ОКФ в ГА в костном дефекте крысы доказано в рентгеновских микродифракционных исследованиях.⁸¹ Октакальцийфосфат выполняет не только роль источника кальция и фосфора, но также и функцию темплата, на котором формируется костная ткань; со временем он рассасывается в организме посредством резорбции остеокластами или гигантскими многоядерными клетками, причем изменения структуры имплантатов из ОКФ и ГА под воздействием таких клеток существенно отличаются. Скорость резорбции ОКФ значительно превышает скорости резорбции ГА и ТКФ. После шести недель имплантирования в костный дефект крысы ОКФ практически полностью исчезал, в отличие от ТКФ и, особенно, ГА. Количество образовавшейся в дефекте костной ткани при имплантировании ОКФ было максимальным.⁸¹ В работе¹⁰¹ проведено сравнительное исследование ОКФ и ГА с целью выяснения следующего вопроса: обусловлена ли остеоиндуктивность ОКФ его особыми физико-химическими свойствами? Исследование проведено *in vitro* на модели стромальных клеток костного мозга крысы. Установлено, что ОКФ вызывает повышенную экспрессию остеогенных маркеров, а для ГА данный эффект не обнаружен. Следовательно, по мнению авторов рассматриваемой работы, ОКФ индуцирует дифференцировку стромальных клеток в остеобласты — клетки, строящие костную ткань.

Обе рассмотренные выше гипотезы имеют право на существование, поэтому вопрос о механизме проявления остеоиндуктивности в ОКФ остается пока открытым.

Систематических исследований по направленному синтезу частиц ОКФ заданного размера и морфологии не проводили. В литературе отсутствуют данные о технологии изготовления объемных керамических материалов из ОКФ. Практически все исследования выполнены на порошках, гранулах или покрытиях. Октакальцийфосфат — термически неустойчивое соединение, разлагающееся при температурах, значительно более низких, чем необходимы для спекания керамики. Потеря воды в ОКФ начинается при $\sim 80^\circ\text{C}$, при 180°C нарушаются связи между слоями в структуре ОКФ, а при 300°C происходят превращения, сопровождающиеся образованием пирофосфата.¹⁰² Таким образом, изготовить керамику из ОКФ традиционными методами, включающими спекание, невозможно. В качестве альтернативы спеканию перспективным может быть метод химического связывания, по существу идентичный технологии получения вяжущих материалов (цементов). Однако за исключением ранней работы¹⁰³ исследования по созданию вяжущих систем на основе ОКФ неизвестны,¹⁰⁴ что, по-видимому, обусловлено превращением ОКФ в другую фазу в результате гидролиза в затворяющей жидкости. Разработка таких систем позволила бы сформировать керамику при физиологической температуре без стадии спекания. Неизвестны показатели механических, химических и биологических свойств объемных материалов на основе ОКФ.

Альтернативным вариантом может быть синтез ОКФ как продукта схватывания в вяжущей системе. В работе¹⁰⁵ описаны результаты исследования вяжущей системы, в которой

кристаллизуется ОКФ, и ее применения для закрытия пульпы зуба. Порошок исходной системы имел следующий состав:

Компонент системы	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$	CaCO_3	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Содержание, моль $\cdot \text{л}^{-1}$	3	5	9

Затворяющей жидкостью служил раствор кислого фосфата натрия с pH 7.4. Октакальцийфосфат является основной кристаллической фазой, выделяющейся при схватывании этого цемента. Установлено, что цемент способствует активному формированию дентинных трубочек в пульпе.

В последнее время значительное внимание уделяется разработке матриц из материалов на основе биополимеров, биологически совместимых с организмом человека. Однако они не обладают биологической активностью и необходимыми механическими свойствами, что оказывается весьма критичным на начальном послеоперационном этапе. Поэтому активно ведутся поиски композиционных материалов на основе биополимеров. Возможно, что применение ОКФ в качестве наполнителя позволит существенно улучшить свойства матриц. Авторами работы¹⁰⁶ получены композиционные материалы с коллагеновой матрицей, армированной частицами ОКФ. Интересна микроструктура таких материалов: пластинчатые кристаллы ОКФ ориентированы вдоль фибрилл коллагена, причем доказано наличие химической связи между ними.

Учитывая особенности свойств керамики, цементов и композиционных материалов с ОКФ, можно полагать что вопросы технологии их получения будут предметом интенсивных исследований в области biomaterials нового поколения.

5. Гранулы и пористая керамика для матриц

Результаты исследований *in vivo* продемонстрировали принципиальную возможность использования трехмерных упаковок ФК-гранул в качестве матриц для аллогенных и аутологических клеточных культур.¹⁰⁷ Гранулы должны быть в основном сферической формы (во избежание воспалительных реакций организма). Для получения таких гранул используют суспензионную технологию, основанную на эффекте сфероидизации в несмешивающихся жидкостях. Предложенный в работе¹⁰⁸ метод основан на диспергировании суспензии ГА — раствор хитозана в жидком парафине. Сферические капли хитозана с ГА отверждают глутаровым альдегидом. Недостатком данного способа является использование расплавленного парафина.

Разработана более простая и гибкая технология получения гранул размерами от 50 до 2000 мкм из различных ФК.^{60,61} Тонкодисперсный порошок ФК смешивают с водным раствором биополимера и получают суспензию, которую затем интенсивно перемешивают с дисперсионной жидкостью, например с растительным маслом. Технология позволяет легко варьировать размеры гранул в широких пределах.⁷ Термическая обработка гранул приводит к выжиганию биополимера, формированию системы открытых взаимосвязанных пор и к усадке. Пористость $\sim 70\%$ достигается при малых соотношениях ГА:биополимер и при низких температурах термообработки ($\sim 1100^\circ\text{C}$). Доминируют поры размером 0.1–5 мкм, их относительное содержание в общем количестве открытых пор достигает 60%. Сферичность геометрии гранул отражена на рис. 11.

При использовании упаковок гранул в качестве матриц существует опасность их уноса потоками жидкостей организма из места костного дефекта. Более перспективным

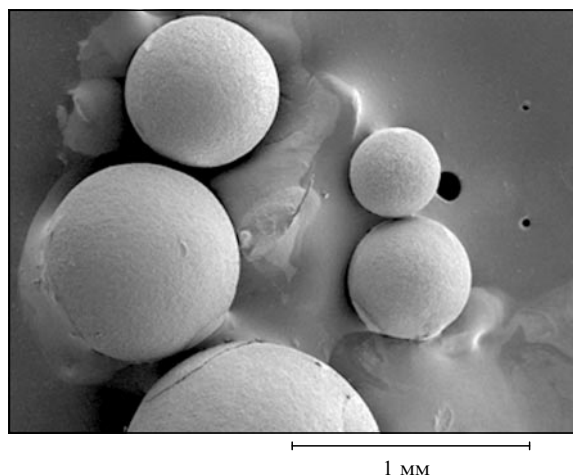


Рис. 11. Микрофотография ФК-гранул, полученных суспензионным методом.

представляется использование пористой керамики. Взаимопроникающие поры такой керамики должны иметь размер не менее 100–135 мкм, чтобы обеспечивать доступ крови к контактным поверхностям, неоваскуляризацию, прорастание и фиксацию костной ткани. Поры меньшего размера также необходимы, поскольку они способствуют адсорбции белков. Таким образом, желательно, чтобы пористая керамика имела бимодальное распределение пор по размерам (крупные и тонкие поры).

В технологии пористой керамики на основе ФК применяют метод выгорающих добавок, пропитку и последующее выжигание органических (полиуретановых) губок, а также вспенивание, например при введении пероксида водорода. Разработан способ получения пористой керамики, содержащей до 70 об.% тонких и крупных взаимопроникающих пор, основанный на спекании пористых гранул.¹⁰⁹ После выжигания биополимера в гранулах образуются тонкие поры (интрапоры), укладка гранул обуславливает формирование межгранульных взаимосвязанных пор (интерпоры). Микроструктура такой керамики показана на рис. 12. Высокая

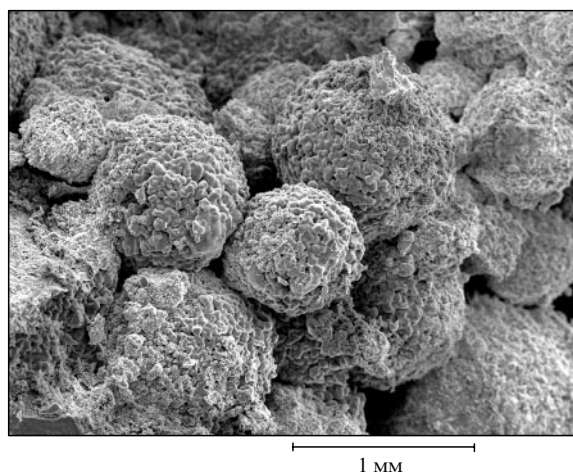


Рис. 12. Микроструктура ГА-керамики с бимодальной (внутри- и межзеренной) пористостью.

пористость способствует эктопическому образованию костной ткани вследствие увеличения удельной поверхности и растворимости. Повышение в результате растворения концентрации ионов кальция и фосфат-ионов во внеклеточной жидкости способствует дифференцировке клеток в остеогенные, а также осаждению на матриксе апатитоподобной фазы.⁴⁷

Пористые керамические материалы успешно используют в качестве матриксов в инженерии костной ткани. Однако их существенным недостатком является жесткость, не позволяющая полностью заполнить дефект кости, особенно если этот дефект имеет сложную конфигурацию. Кроме того, трудно изготовить керамику спеканием порошков термически неустойчивых соединений, таких как КГА, избежав при спекании химических и фазовых изменений, влияющих на свойства керамики. Альтернативой может быть технология вяжущих систем (кальцийфосфатных цементов), схватывающихся и твердеющих при физиологической температуре.

6. Пористые матриксы, полученные по цементной технологии

Большинство вяжущих ФК-систем основано на химическом взаимодействии компонентов с низким и высоким отношением $\text{Ca} : \text{P}$ в затворяющей жидкости.^{110, 111} Типичным примером является цемент, в состав которого входят тетракальцийфосфат ($\text{Ca} : \text{P} = 2.0$) и дикальцийфосфат ($\text{Ca} : \text{P} = 1.0$), а также вода или ортофосфорная кислота, используемая в качестве затворяющей жидкости. Соотношение компонентов выбирают в зависимости от требуемого фазового состава продукта. Альтернативной является система, включающая α -ТКФ, карбонат кальция и монокальцийфосфат моногидрат (цементы Norian[®], кристаллизующаяся фаза — карбонатсодержащий ГА). Так называемые бруштитовые цементы ($\text{Ca} : \text{P} = 1.0$ в кристаллизующейся фазе) получают в системе ТКФ — монокальцийфосфат моногидрат. С уменьшением отношения $\text{Ca} : \text{P}$ в конечном продукте от 1.67 до 1.5 скорость резорбции в организме *in vivo* возрастает.¹¹² Бруштитовые цементы характеризуются высокими растворимостью и резорбируемостью.

Обзор состояния разработок в области кальцийфосфатных цементов, нашедших практическое применение в медицине, дан в работе¹¹³. Свойства таких цементов (кинетика схватывания и твердения, пористость) зависят не только от химического и фазового состава, но и от дисперсности компонентов, соотношения твердое : жидкое, степени предварительного уплотнения.

Схватывание и твердение цементов сопровождаются постепенно уменьшающимся содержанием жидкой фазы вследствие образования кристаллогидрата при кристаллизации двухводного дикальцийфосфата или вхождения гидроксильных групп в структуру апатита. Обычно при схватывании и твердении кальцийфосфатных цементов формируются микропоры размером порядка нескольких микрометров. Для обеспечения жизнедеятельности остеобразующих клеток, неоваскуляризации и прорастания костной ткани в поровое пространство матрикса необходимы взаимосвязанные поры размером 100–500 мкм. Такие поры образуются в цементе при использовании растворимых или вспенивающих добавок, которые вводят в вяжущую систему. В качестве растворимой добавки часто используют NaCl, в качестве вспенивающей — $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, при этом получают материалы с пористостью до 80%.¹¹⁴ Между порами необходимо иметь

каналы диаметром не менее 50 мкм для обеспечения проницаемости.¹¹⁵

Один из успешных экспериментов по изготовлению цементов из кальцийдефицитного ГА с отношением Са:Р = 1,5 и пористостью до 81% описан в работе¹¹⁶. Исходные компоненты — тетракальций- и дикальций-фосфаты — смешивали в соотношении 1:2, вводили воду, при соотношении твердое:жидкость, равном 3:1, получали пасту, к которой добавляли кристаллы NaCl размером 400–500 мкм в качестве порога. Смесь формовали под давлением 2 МПа и выдерживали при 37°C и относительной влажности 100% в течение двух суток. Кристаллы соли вымывали путем погружения образцов в воду, затем образцы подвергали сушке вымораживанием, при этом формировалась пеноструктура. В полученных матриксах культивировали мезенхимальные стволовые клетки. Испытания *in vivo* продемонстрировали прекрасные матриксные свойства такой биоконструкции, полностью соответствующие требованиям инженерии костной ткани.

Механические и реологические свойства кальцийфосфатных цементов могут быть улучшены при введении соответствующих гелеобразующих добавок (например, гидрокси-пропилметилцеллюлозы) и армирующих волокон. В системе тетракальцийфосфат–двухводный дикальцийфосфат получены инъектируемые материалы с пористостью до 83% при введении водорастворимого порога — маннита с размером частиц 300–500 мкм. Пористость в цементе может быть сформирована путем введения биополимеров, в частности желатини.¹¹⁷ В целом технологии, основанные на применении кальцийфосфатных цементов для формирования пористых матриксов, являются новыми и малоизученными. Основной недостаток таких материалов состоит в их низких механических свойствах, обусловленных, по-видимому, остаточной микропористостью. Задача снижения такой пористости при сохранении высокой макропористости пока не решена.

7. Композиционные материалы биополимер–фосфаты кальция

Гибридные композиционные материалы с полимерной составляющей более эластичны, чем пористая керамика, что позволяет заполнять такими материалами костный дефект любой формы без зазора между костью и матриксом. Гибридные композиционные материалы с матриксами из биополимеров могут соответствовать по структуре и свойствам костной ткани в намного большей степени, чем спеченная керамика. Минеральная фаза ФК придает композиционному материалу повышенную жесткость и биологическую активность, которая не присуща полимеру. В качестве матриксов используют коллаген и желатину, полисахариды (хитин, хитозан, крахмал, гиалуроновую кислоту), а также синтетические полимеры: полилактиды и их сополимеры с полигликолидами, поликапролактон и некоторые другие.

Для формирования пористости в полимере используют следующие методы. Полимер растворяют и диспергируют в нем порообразующую добавку, удаляют растворитель, селективно выделяют добавку.¹¹⁸ Недостаток метода заключается в сложности полного удаления растворителя, присутствии которого может вызывать цитотоксичность. Другой способ — сушка вымораживанием. При определенных температурных условиях и составе замораживаемой жидкой фазы могут быть получены большие кристаллы льда регулируемой геометрии.¹¹⁹ Разработаны и другие методы, такие как фазовое разделение, вспенивание, быстрое прототипиро-

вание. В частности, микроструктуру, подобную таковой у трабекулярной кости, можно получить методом термически индуцированного фазового разделения.¹²⁰

Композиционные материалы могут быть изготовлены разными способами. По-видимому, простейшим является диспергирование частиц ФК в полимерной матрице. Таким способом в системе ГА–коллаген получали композиционные материалы, которые по составу схожи с естественной костью.^{121, 122} Эти материалы имеют низкую прочность при растяжении (до 6,5 МПа). Преимущество способа состоит в возможности получения объемно-армированных материалов.

Одним из перспективных представляется процесс, моделирующий биоминерализацию: осаждение ФК на поверхность полимера в ячеистой микроструктуре пористого матрикса. Принципы такой искусственной (биомиметической) минерализации подробно рассмотрены в обзоре¹²³. Как правило, осаждение ФК проводят из жидкостей, моделирующих жидкости организма, пересыщенных по ионам кальция и фосфат-ионам. Их составы приближены к составу плазмы крови и включают следующие ионы:¹²³

Ион	Na ⁺	K ⁺	Mg ⁺	Ca ²⁺	Cl [–]	HCO ₃ [–]	H ₂ PO ₄ [–]	SO ₄ ^{2–}
Содержание, ммоль · л ^{–1}	142	5	1,5	2,5	103–148,8	4,2–27	1	0–0,5

Из-за опасности инфицирования имеются ограничения в клиническом использовании коллагена — продукта животного происхождения. Поэтому значительное внимание уделяется созданию композиционных материалов с матриксами из желатини, хитозана или их смесей. Материалы на основе хитозана обладают биосовместимостью и биорезорбируемостью. Введение ГА в качестве наполнителя в пористые хитозановые структуры приводит к повышению адсорбции белков и ионов кальция, а в результате этого — к улучшению адгезивных свойств и усилению дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток.¹²⁴ Для получения пористых хитозановых губок, как правило, применяют сушку вымораживанием. Для сшивания структуры хитозана после получения пористой структуры используют глутаровый альдегид, недостатком которого является токсичность.

Разработан простой метод изготовления пористых хитозановых и хитозан/желатиновых композиционных материалов, содержащих биоактивные соединения кальция.^{125, 126} Он основан на растворении биополимеров, введении наполнителя, вспенивании и последующем замещении растворителя жидкостью, в которой хитозан нерастворим. Порошок среднемолекулярного хитозана (50–190 кДа) в количестве 2 г растворяли в 50 мл 8%-ного раствора уксусной кислоты. К раствору добавляли наполнитель в массовом соотношении хитозан:наполнитель, равном 1:1, и вспенивающий реагент — карбонат аммония. Полученную густую суспензию помещали в полиэтиленовую цилиндрическую форму и замораживали до образования кристаллов льда при температуре ниже –10°C. Замороженный твердый образец помещали в этанол, при этом происходило постепенное замещение содержащейся в образце уксусной кислоты на спирт. Затем образцы сушили при 60°C до полного удаления жидкой фазы. В результате были получены композиционные материалы с пористостью >90%, содержащие до 50 мас.% ФК-наполнителя с удельной поверхностью до 120 м² · г^{–1}. Композиционные материалы имели равномерную микроструктуру, количество крупных пор размером 100–300 мкм составляло

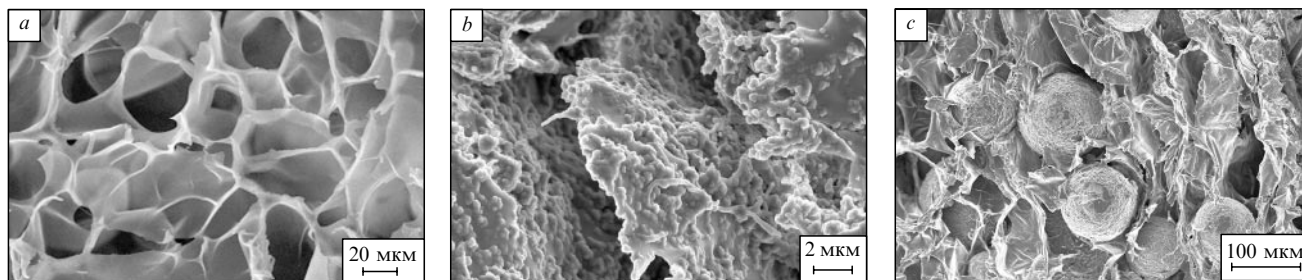


Рис. 13. Пористый матрикс хитозан/желатина (а), стенки которого армированы ультрадисперсными частицами ФК (b) и гранулами ФК (c).

~80% от общей пористости. Микроструктуры пористого хитозан/желатинового матрикса, стенки которого армированы ультрадисперсными частицами ФК и гранулами ФК, приведены на рис. 13.

Другой способ введения частиц ФК — пропитка ими пористого полимерного каркаса в центрифуге.¹²⁷ Готовили 10%-ный раствор поликапролактона с добавкой хитозана в уксусной кислоте, который затем обрабатывали 40%-ным NaOH и промывали водой. В результате фазового разделения в центрифуге (4000 об·мин⁻¹) получали пористую структуру, которую пропитывали суспензией нано-ГА в 10%-ном растворе поливинилового спирта (ПВС). Взаимодействие ионов Ca^{2+} гидроксиапатита с молекулами ПВС обеспечивало повышенную прочность композиционного материала. Получены материалы с пористостью 60–80%.

Явление фазового разделения было использовано и при получении композиционных материалов в системе нано-ГА–поли-L-лактид (ПЛЛ).¹²³ Последний растворяли в суспензии наночастиц ГА в растворителе (диоксан/вода) и замораживали, обеспечивая условия для фазового разделения, затем подвергали сушке вымораживанием для удаления растворителя. Получали материалы с пористостью до 94% при массовом соотношении PLL : ГА, равном 70 : 30.

В системе ГА–хитозан были получены и низкопористые композиционные материалы, имеющие микроструктуру, близкую к таковой у костной ткани.¹²⁸ Низкомолекулярный хитозан (35 кДа) растворяли в уксусной кислоте, затем добавлением аммиака доводили pH до 10 и получали золь. В золе проводили синтез ГА взаимодействием двухводного

дикальцийфосфата с нитратом кальция при расчетном соотношении ГА : хитозан 20 : 80. Получали суспензию, которую обрабатывали в шаровой мельнице при комнатной температуре. После нагрева до 25–60°C осадок отфильтровывали, промывали до нейтрального значения pH и прессовали под давлением 30 МПа. Полученный композиционный материал имел структуру, состоящую из игольчатых кристаллов ГА на макромолекулах хитозана (рис. 14).

Альтернативным процессом может быть схватывание и твердение вяжущей системы, включающей раствор хитозана в качестве затворяющей жидкости.¹²⁹ Мониторинг кинетики фазообразования из-за высокой скорости протекающих процессов может быть осуществлен *in situ* методом энергодисперсионной рентгеновской дифракции.^{130, 131}

Проблемы регулирования кинетики резорбции композиционных материалов с полимерными матриксами для обеспечения их эффективного применения в технологии инженерии костной ткани пока не решены. Важной является задача модифицирования поверхности полимеров для управления процессом минерализации. Очевидно, необходимы дальнейшие исследования, направленные на максимальное приближение свойств композиционных материалов к свойствам биологической костной ткани.

IV. Заключение

Успехи химии фосфатов кальция стимулировали исследования в области разработки материалов, предназначенных как для замещения костных дефектов, так и для создания прин-

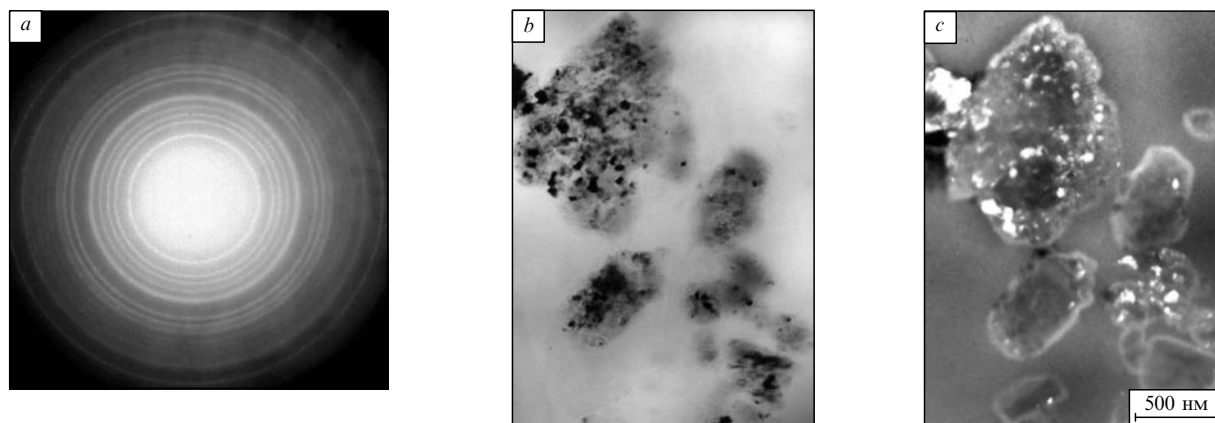


Рис. 14. Электронограмма (а), светлопольное (b) и темнопольное (c) ПЭМ-изображения хитозанового матрикса с наночастицами кальция.

ципально новых клеточных технологий регенерации поврежденной костной ткани. Наиболее актуальными являются исследования по созданию наноструктурированных материалов, особенно подобных по структуре и свойствам костной ткани, в том числе гибридных композиционных материалов в системах биополимер–фосфаты кальция, а также по синтезу и разработке материалов на основе предшественников минерализации апатита в организме, таких как октакальцийфосфат, которые могут проявлять имманентную остеоиндуктивность. Разработка и внедрение в медицинскую практику таких материалов приведет к радикальному улучшению лечения заболеваний костных тканей, особенно онкологических.

Автор благодарен коллективу, руководимому академиком В.М.Иевлевым (Воронежский государственный университет), за ПЭМ-исследования и сотрудникам Лаборатории керамических композиционных материалов ИМЕТ РАН, результаты совместных исследований с которыми использованы в данной работе. Обзор написан при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-03-00187а) и Программы президентства Российской академии наук П-21 «Фундаментальные науки — медицине».

Литература

1. M.E.Ring. In *Dentistry. An Illustrated History*. Abrade Press, New York, 1985. P. 15
2. R.Z.LeGeros. *Chem. Rev.*, **108**, 4742 (2008)
3. M.Navarro, A.Michiardi, O.Castaño, J.A.Planell. *J. R. Soc. Interface*, **5**, 1137 (2008)
4. L.L.Hench, J.Polak. *Science*, **295**, 1014 (2002)
5. А.Г.Вересов, В.И.Путляев, Ю.Д.Третьяков. *Рос. хим. журн.*, **44** (36), 32 (2000)
6. В.П.Орловский, В.С.Комлев, С.М.Баринов. *Неорг. матер.*, **38**, 973 (2002)
7. С.М.Баринов, В.С.Комлев. *Биокерамика на основе фосфатов кальция*. Наука, Москва, 2005
8. W.Suchanek, M.Yoshimura. *J. Mater. Res. Soc.*, **13**, 94 (1998)
9. R.B.Martin. *Mater. Sci. Forum*, **7**, 5 (1999)
10. Р.П.Самусев, Ю.М.Селин. *Анатомия человека*. Медицина, Москва, 1990. С. 479
11. В.П.Орловский, С.П.Ионов. *Журн. неорг. химии*, **40**, 1961 (1995)
12. С.М.Баринов, И.В.Фадеева, Д.Ферро, Дж.В.Пау, С.Н.Чезаро, В.С.Комлев, А.С.Фомин. *Журн. неорг. химии*, **53**, 204 (2008)
13. S.Peroos, Z.Du, N.Y.de Leeuw. *Biomaterials*, **27**, 2150 (2006)
14. G.A.Silva, O.P.Coutinho, P.Ducheyene, R.L.Reis. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 97 (2007)
15. S.J.Omelon, M.D.Grynps. *Chem Rev.*, **108**, 4694 (2008)
16. S.Weiner, S.D.Wagner. *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **28**, 271 (1998)
17. D.W.Hutchmacher, J.T.Schanz, C.X.F.Lam, K.C.Tan, T.C.Lim. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 245 (2007)
18. H.Aoki. *Science and Medical Applications of Hydroxyapatite*. JAAS, Tokyo, 1991
19. C.Ohtsuki, M.Kamitakahara, T.Miyazaki. *J. R. Soc. Interface*, **6**, S349 (2009)
20. I.S.Lee, D.H.Kim, Y.C.Jung, C.H.Han. *Biomaterials*, **23**, 609 (2002)
21. F.Fazan, P.M.Marquis. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **11**, 787 (2000)
22. Z.S.Luo, F.Z.Cui, Q.L.Feng. *Surf. Coat. Technol.*, **131**, 192 (2000)
23. L.Gineste, M.Gineste, X.Ranz, A.Elleftherion, A.Guilhem, N.Rouquet, P.Frayssinet. *J. Biomed. Mater. Res. B*, **48**, 224 (1999)
24. V.P.Orlovski, S.M.Barinov. *Russ. J. Inorg. Chem.*, **46**, S129 (2001)
25. R.Z.LeGeros. In *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Karger, Basel, 1991. P. 210
26. S.V.Dorozhkin. *Materials*, **2**, 399 (2009)
27. S.V.Dorozhkin. *J. Mater. Sci.*, **42**, 1061 (2007)
28. S.M.Barinov, V.S.Komlev. *Calcium Phosphate Based Bioceramics for Bone Tissue Engineering*. TransTech Publ., Zuerich, 2008
29. M.Bohner. *Eur. Spine J.*, **10**, 114 (2001)
30. H.Liu, T.J.Webster. *Biomaterials*, **28**, 354 (2007)
31. S.J.Kalita, A.Bhardwaj, H.A.Bhatt. *Mater. Sci. Eng. C*, **27**, 449 (2007)
32. W.J.Shih, Y.F.Chen, M.C.Wang, M.H.Hon. *J. Cryst. Growth*, **270**, 211 (2004)
33. N.Kivrak, A.C.Tas. *J. Am. Ceram. Soc.*, **81**, 2245 (1998)
34. S.Sarig, F.Kahana. *J. Cryst. Growth*, **237–239**, 55 (2002)
35. И.В.Мелихов, В.Ф.Комаров, А.В.Северин. *Докл. АН*, **373**, 355 (2000)
36. Y.X.Pang, X.Bao. *J. Eur. Ceram. Soc.*, **23**, 1697 (2003)
37. Н.В.Бакунова, С.М.Баринов, Л.И.Шворнева. *Рос. нанотехнол.*, **2** (9–10), 102 (2007)
38. A.E.Porter, N.Patel, J.N.Skepper, S.M.Best, W.Bonfield. *Biomaterials*, **24**, 4609 (2003)
39. Ж.А.Ежова, Е.М.Коваль, В.П.Орловский. *Журн. неорг. химии*, **48**, 341 (2003)
40. M.C.Chang, C.C.Ko, W.Y.Douglas. *Biomaterials*, **24**, 2853 (2003)
41. M.C.Chang, W.H.Douglas, J.Tanaka. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **17**, 387 (2006)
42. M.C.Chang, R.DeLong. *Dent. Mater.*, **25**, 261 (2009)
43. А.С.Фомин, С.М.Баринов, В.М.Иевлев, И.В.Фадеева, В.С.Комлев, Е.К.Белоногов, Т.Л.Тураева. *Докл. АН*, **411**, 219 (2006)
44. Ж.А.Ежова, Н.А.Захаров, Е.М.Коваль, В.Т.Калинников. *Журн. неорг. химии*, **54**, 526 (2009)
45. В.Т.Калинников, Ж.А.Ежова, Н.А.Захаров, Е.М.Коваль. *Журн. неорг. химии*, **53**, 404 (2008)
46. А.С.Фомин, С.М.Баринов, В.М.Иевлев, В.В.Смирнов, Б.П.Михайлов, Е.К.Белоногов, Н.А.Дроздова. *Докл. АН*, **418**, 22 (2008)
47. F.Barrère, C.A.van Blitterswijk, K.de Groot. *Int. J. Nanomed.*, **1**, 317 (2006)
48. S.Yang, K.-F.Leong, Z.Du, C.-K.Chua. *Tissue Eng.*, **7**, 679 (2001)
49. L.M.Rodriguez-Lorenzo, J.M.F.Ferreira. *Mater. Res. Bull.*, **39**, 83 (2004)
50. H.Yoshikawa, N.Tamai, T.Murase, A.Myoui. *J. R. Soc. Interface*, **6**, S341 (2009)
51. P.Roach, D.Eglin, K.Rohde, C.C.Perry. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **18**, 1263 (2007)
52. E.S.Place, N.D.Evans, M.M.Stevens. *Nat. Mater.*, **8**, 457 (2009)
53. H.-B.Pan, B.W.Darvell. *Cryst. Growth Des.*, **9**, 639 (2009)
54. R.Z.LeGeros, S.Lin, R.Rohanizaden, D.Mijares, J.P.LeGeros. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **14**, 201 (2003)
55. G.Daculsi, O.Laboux, O.Malard, P.Weiss. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **14**, 195 (2003)
56. O.Malard, J.Guicheux, J.-M.Bouler, O.Gautier, C.Beauvillain de Montreuil, E.Auguado, P.Pilet, R.LeGeros, G.Daculsi. *Bone*, **36**, 323 (2005)
57. О.Л.Кубарев, В.С.Комлев, М.Майтц, С.М.Баринов. *Докл. АН*, **413**, 360 (2007)
58. S.Raynaud, E.Champion, D.Bernache-Assolant, P.Thomas. *Biomaterials*, **23**, 1065 (2002)
59. О.Л.Кубарев. Дис. канд. техн. наук. ИПК РАН, Москва, 2007
60. V.S.Komlev, S.M.Barinov, E.V.Koplik. *Biomaterials*, **23**, 3449 (2002)

61. V.S.Komlev, S.M.Barinov, E.Girardin, S.Oscarsson, Å.Rosengren, F.Rustichelli, V.P.Orlovski. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **4**, 503 (2003)
62. M.Holz, M.Fahr. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **48**, 249 (2001)
63. M.G.Cerutti, D.Greenspan, K.Powers. *Biomaterials*, **26**, 4903 (2005)
64. О.Л.Кубарев, С.М.Баринов, В.С.Комлев. *Докл. АН*, **418**, 497 (2008)
65. В.И.Чиссов, И.К.Свиридова, Н.С.Сергеева, Г.А.Франк, В.А.Кирсанова, С.А.Ахмедова, И.В.Решетов, М.М.Филлюшин, С.М.Баринов, И.В.Фадеева, В.С.Комлев. *Клеточные технологии в биологии и медицине*, (3), 151 (2008)
66. J.C.Elliott. In *Phosphates: Geochemical, Geobiological and Materials Importance. Reviews in Mineralogy and Geochemistry. Vol. 48.* (Eds M.J.Kohn, J.Rakovan, J.M.Huges). MSA, Washington, 2002. P. 427
67. I.R.Gibson, W.Bonfield. *J. Biomed. Mater. Res.*, **59**, 697 (2002)
68. J.E.Barralet, S.M.Best, W.Bonfield. *J. Biomed. Mater. Res.*, **41**, 79 (1998)
69. R.Z.LeGeros, O.R.Trautz, J.R.LeGeros, E.Klein. *Bull. Soc. Chim. Fr. (Special Issue)*, 1712 (1968)
70. S.M.Barinov, J.V.Rau, I.V.Fadeeva, S.Nunziante Cesaro, D.Ferro, G.Trionfetti, V.S.Komlev, V.Yu.Bibikov. *Mater. Res. Bull.*, **41**, 485 (2006)
71. S.M.Barinov, J.V.Rau, S.Nunziante Cesaro, J.Durišin, I.V.Fadeeva, D.Ferro, L.Medvecký, G.Trionfetti. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **17**, 597 (2006)
72. J.V.Rau, S.N.Cesaro, D.Ferro, I.V.Fadeeva, S.M.Barinov. *J. Biomed. Mater. Res. B*, **71**, 441 (2004)
73. В.М.Бузник, С.Г.Козлова, С.П.Габуда, С.М.Баринов, В.Ю.Бибииков, И.В.Фадеева, В.С.Комлев. *Докл. АН*, **413**, 64 (2007)
74. В.С.Комлев, И.В.Фадеева, А.Н.Гурин, Е.С.Ковалева, В.В.Смирнов, Н.А.Гурин, С.М.Баринов. *Неорг. матер.*, **45**, 373 (2009)
75. W.E.Brown. *Nature (London)*, **196**, 1048 (1962)
76. W.E.Brown, J.Smith, J.Lehr, A.Frazier. *Nature (London)*, **196**, 1050 (1962)
77. X.Lu, Y.Leng. *Biomaterials*, **26**, 1097 (2005)
78. A.Nakahira, S.Aoki, K.Sakamoto, S.Yamaguchi. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **12**, 793 (2001)
79. M.J.Arellano-Jiménez, R.García-García, J.Reyes-Gasga. *J. Phys. Chem. Solids*, **40**, 390 (2009)
80. M.Mathew, W.E.Brown, L.Schroeder, B.Dickens. *J. Cryst. Spectrosc.*, **18**, 235 (1988)
81. O.Suzuki, S.Kamakura, T.Katagiri. *J. Biomed. Mater. Res. B*, **77**, 201 (2006)
82. L.Wang, G.H.Nancollas. *Chem. Rev.*, **108**, 4628 (2008)
83. R.Z.LeGeros. *Calcif. Tissue Int.*, **37**, 194 (1985)
84. А.В.Кузнецов, А.С.Фомин, А.Г.Вересов, В.И.Путляев, И.В.Фадеева, С.М.Баринов. *Журн. неорг. химии*, **53**, 5 (2008)
85. R.M.Shelton, Y.Liu, P.R.Cooper, U.Gbureck, M.J.German, J.E.Barralet. *Biomaterials*, **27**, 2874 (2006)
86. A.Bigi, G.Cojazzi, M.Gazzano, A.Ripamonti, N.Roveri. *J. Inorg. Biochem.*, **40**, 293 (1990)
87. A.Bigi, E.Boanini, M.Borgi, G.Cojazzi, S.Panzavolta, N.Roveri. *J. Inorg. Biochem.*, **75**, 145 (1999)
88. M.Tung, W.Brown. *Calcif. Tissue Int.*, **37**, 329 (1985)
89. H.Monma. *J. Mater. Sci.*, **15**, 2428 (1980)
90. C.Durucan, P.W.Brown. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **11**, 177 (2000)
91. M.D.Grynnpas, L.C.Bonar, M.J.Glimcher. *Calcif. Tissue Int.*, **36**, 291 (1984)
92. M.Iijima, Y.Moriwaki. *J. Cryst. Growth*, **198–199**, 670 (1999)
93. W.E.Brown, M.Mathew, M.S.Tung. *Prog. Cryst. Growth*, **25**, 209 (1981)
94. H.E.L.Madsen. *J. Cryst. Growth*, **310**, 2602 (2008)
95. S.Kamakura, Y.Sasano, H.Homma, O.Suzuki, M.Kagayama, K.Motegi. *J. Dent. Res.*, **78**, 1682 (1999)
96. R.J.Dekker, J.D.de Bruijn, M.Stigter, F.Barrere, P.Layrolle, C.A.van Blitterswijk. *Biomaterials*, **26**, 5231 (2005)
97. P.Bodier-Houlle, P.Steuer, J.C.Voegel, F.J.Cuisinier. *Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr.*, **54**, 1377 (1998)
98. M.Miyatake, K.N.Kishimoto, T.Anada, H.Imaizumi, E.Itoi, O.Suzuki. *Biomaterials*, **30**, 1005 (2009)
99. O.Suzuki, S.Kamakura, T.Katagiri, M.Nakamura, B.Zhao, Y.Honda. *Biomaterials*, **27**, 2671 (2006)
100. G.A.Silva, O.P.Coutinho, P.Ducheyene, R.L.Reis. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **1**, 97 (2007)
101. Y.Honda, T.Anada, S.Kamakura, S.Morimoto, T.Kiriyaagawa, O.Suzuki. *Tissue Eng., Part A*, **15**, 1 (2009)
102. T.Anada, T.Kumagai, Y.Honda, T.Masuda, R.Kamijo, S.Kamakura, N.Yoshihara, T.Kuriyagawa, H.Shimauchi, O.Suzuki. *Tissue Eng.*, **14**, 965 (2008)
103. O.Bermudez, M.G.Boltong, F.C.M.Driessens, J.A.Planell. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **5**, 144 (1994)
104. S.V.Dorozhkin. *Materials*, **2**, 221 (2009)
105. M.Sena, Y.Yamashita, Y.Nakano, M.Ohgaki, S.Nakamura, K.Yamashita, Y.Takagi. *Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, **97**, 749 (2004)
106. M.Iijima, N.Wakamatu, H.Kamemizu, M.Adachi, Y.Doi. *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**, 316 (2008)
107. В.И.Чиссов, И.К.Свиридова, Н.С.Сергеева, В.А.Кирсанова, С.А.Ахмедова, М.М.Филлюшин, С.М.Баринов, И.В.Фадеева, В.С.Комлев, В.В.Смирнов. *Клеточные технологии в биологии и медицине*, (2), 68 (2008)
108. W.Paul, C.P.Sharma. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **10**, 383 (1999)
109. V.S.Komlev, S.M.Barinov. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **13**, 295 (2002)
110. L.C.Chow. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, **599**, 27 (2000)
111. C.Combes, R.Bareille, C.Rey. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **79**, 318 (2006)
112. A.Tofighu, K.Schaffer, R.Palazzolo. *Key Eng. Mater.*, **361**, 303 (2008)
113. M.Bohner, U.Gbureck, J.E.Barralet. *Biomaterials*, **26**, 6423 (2005)
114. В.В.Смирнов, А.Ю.Федотов, В.С.Комлев, С.М.Баринов. *Перспек. матер.*, **6** (5), 49 (2008)
115. A.Kuznetsov, D.Larionov, A.Stepik, V.Kuznetsov, V.Putlayev, V.Ivanov. *Mat.-Wiss. Werkstofftech.*, **40**, 277 (2009)
116. H.Guo, J.Su, J.Wei, H.Kong, C.Liu. *Acta Biomater.*, 268 (2009)
117. M.Y.Shie, D.C.H.Chen, C.Y.Wang, T.Y.Chiang, S.J.Ding. *Acta Biomater.*, 646 (2008)
118. Q.Hoi, D.W.Grijpma, J.Feijen. *Biomaterials*, **24**, 1937 (2003)
119. H.H.K.Xu, M.D.Weir, E.F.Burguera, A.M.Fraser. *Biomaterials*, **27**, 4279 (2006)
120. G.Wei, P.X.Ma. *Biomaterials*, **25**, 4749 (2004)
121. S.Sotome, T.Uemura, M.Kikuchi. *Mater. Sci. Eng. C*, **24**, 341 (2004)
122. M.Kikuchi, H.N.Matsumoto, T.Yamada. *Biomaterials*, **25**, 63 (2004)
123. L.C.Palmer, C.J.Newcomb, S.R.Kaltz, E.D.Spoerke, S.I.Stupp. *Chem. Rev.*, **108**, 4754 (2009)
124. F.Zhao, W.L.Grayson, T.Ma, B.Bunnell, W.W.Lu. *Biomaterials*, **27**, 1859 (2006)
125. А.Ю.Федотов, В.В.Смирнов, А.С.Фомин, И.В.Фадеева, С.М.Баринов. *Докл. АН*, **423**, 771 (2008)
126. А.Н.Гурин, В.С.Комлев, А.Ю.Федотов, И.В.Фадеева, В.В.Смирнов, С.М.Баринов. *Перспек. матер.*, **6** (2), 14 (2008)
127. X.Xiao, R.Liu, Q.Huang. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **19**, 3429 (2008)
128. A.Yoshida, T.Miyazaki, E.Ishida, M.Ashizuka. *Mater. Trans.*, **45**, 994 (2004)
129. J.V.Rau, A.Generosi, V.V.Smirnov, D.Ferro, V.Rossi Albertini, S.M.Barinov. *Acta Biomater.*, **4**, 1089 (2008)
130. R.Caminiti, V.Rossi Albertini. *Int. Rev. Phys. Chem.*, **18**, 263 (1999)
131. B.Paci, A.Generosi, V.Rossi Albertini, E.Agostinelli, G.Varvaro, D.Fiorani. *Chem. Mater.*, **16**, 292 (2004)

CALCIUM PHOSPHATE-BASED CERAMIC AND COMPOSITE MATERIALS FOR MEDICINE

S.M.Barinov

*A.A.Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences
49, Leninsky prosp., 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(499)135–8680*

Topical problems in chemistry and technology of biomaterials based on calcium phosphates meant for application in medicine for both the replacement and the regeneration of damaged bone tissue are discussed. Features of synthesis of nanocrystalline powders and ceramics fabrication for implants are described. Achievements in the development of porous scaffolds from resorbable and osteoconductive calcium phosphates, and hybrid composites for bone tissue engineering, a new cell-based technology in medicine are considered.

Bibliography — 131 references.

Received 13rd August 2009