

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

Российский химико-технологический университет имени Д. И.
Менделеева

На правах рукописи

Лукина Юлия Сергеевна

**КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫЕ ЦЕМЕНТЫ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СЕПТИЧЕСКИХ ВОСПАЛЕНИЙ
И ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ**

Специальность 2.6.14. – Технология силикатных и тугоплавких
неметаллических материалов

Диссертация на соискание ученой степени
доктора технических наук

Москва – 2025 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

Обозначения и сокращения	5
Термины, определения	7
Введение	9
1 НАУЧНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ОБЛАСТИ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ ЦЕМЕНТОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ.....	20
1.1 Состав, структура, причины поражения костной ткани	21
1.2 Возможность использования кальцийфосфатных цементах для лечения костной ткани	28
1.3 Получение и свойства кальцийфосфатных цементах.....	32
1.4 Кальцийфосфатные цементы как носители функциональных веществ.....	65
1.5 Выводы. Постановка цели и задач исследования	82
2 МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ	87
2.1 Характеристика исходных материалов.....	87
2.2 Методы исследования кальцийфосфатных цементах	96
3 СИНТЕЗ КАРБОНАТСОДЕРЖАЩЕГО ГИДРОКСИАПАТИТОВОГО ЦЕМЕНТА	113
3.1 Состав цементного камня в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при α -ТКФ = 80 мас. %.....	115
3.2 Свойства цементного камня в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при α -ТКФ = 80 мас. %.....	140
3.3 Результаты доклинических исследований in vivo цементного камня составов фигуративных точек.....	155

3.4 Состав и свойства цементного камня в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при α -ТКФ = 60 и 70 мас. %	164
3.5 Результаты доклинических исследований <i>in vivo</i> цементного камня составов фигуративных точек при фиксированном количестве ТКФ70 и ТКФ60.....	186
3.6 Выводы.....	191
4 ПОРИСТЫЕ МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ КАРБОНАТЗАМЕЩЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТОВОГО ЦЕМЕНТА	193
4.1 Влияние условий гидратации на кинетику образования цементного камня на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита и полноту протекания реакции	195
4.2 Технология получения макропористых матриксов на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита.....	206
4.3 Результаты доклинических исследований <i>in vivo</i> макропористого кальцийфосфатного матрикса.....	219
4.4 Выводы.....	222
5 КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПО ЦЕМЕНТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ, КАК СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СУБСТАНЦИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СЕПТИЧЕСКИХ ВОСПАЛЕНИЙ.....	224
5.1 Взаимодействие антибиотиков с компонентами системы.....	226
5.2 Состав и свойства цементных гранул на основе карбонатсодержащего гидроксиапатита, содержащих антибактериальные вещества	229
5.3 Результаты доклинических исследований <i>in vivo</i> антибактериальных цементов при лечении гнойно-септических воспалений костной ткани	238
5.4 Технология получения антибиотикосодержащего кальцийфосфатного матрикса на основе карбонатзамещенного цемента	252

5.5 Результаты доклинических исследований in vivo антибиотикосодержащего кальцийфосфатного матрикса	265
5.6 Выводы.....	270
6 ВЫСОКОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ БРУШИТНО-НЬЮБЕРИТНЫЕ ЦЕМЕНТЫ С РЕГУЛИРУЕМОЙ СКОРОСТЬЮ РЕЗОРБЦИИ.....	272
6.1 Технология получения брушитно-ньюберитных цементав.....	273
6.2 Результаты доклинических исследований in vivo брушитно-ньюберитных цементав	295
6.3 Выводы.....	314
7 КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПО ЦЕМЕНТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ	316
7.1 Клиническое использование антибактериальных гранул на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита в ветеринарии	316
7.2 Возможности клинического применения кальцийфосфатных материалов	327
7.3 Выводы	328
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	330
Список литературы.....	334
Приложение А.1	380
Приложение А.2	381
Приложение А.3	382
Приложение А.4	384
Приложение Б.1	385

Обозначения и сокращения

СВО – специальная военная операция

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

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

МКФМ – монокальцийфосфат моногидрат $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

ТетКФ – тетракальциевый фосфат $(\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O})$

КГАП – кальцийдефицитный гидроксиапатит $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_y(\text{PO}_4)_{1-y}_6(\text{OH})_2$

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

АФК – аморфный фосфат кальция $(\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O})$

ДКФД – дикальций фосфат дигидрат (брушит) $(\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$

ДКФА – дикальций фосфат ангидрат (монетит) (CaHPO_4)

СО₃-ГАП – карбонатзамещенный гидроксиапатит

SBF – simulated body fluid (искусственная межтканевая жидкость)

PBS – phosphate buffered saline (фосфатно-солевой буфер)

РФА – рентгенофазовый анализ

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

СО₃-ГАП – карбонатзамещенный гидроксиапатит

КГАП – кальцийдефицитный гидроксиапатит

ПЭГ – полиэтиленгликоль

Ч.д.а – чистый для анализа

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ИК – инфракрасный

ВМР – bone morphogenetic protein (костный морфогенетический белок)

В/Т – водотвердое отношение

КОЕ – колонеобразующие единицы

КТ – компьютерная томография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ПЛА – полимолочная кислота

ПЛГА – (поли (молочнокисло-ко-гликолевая) кислота)

EDX – energy-dispersive X-ray analysis (энергодисперсионный рентгеновский анализ)

V – ванкомицин

R – рифампицин

F – фосфомицин

Термины, определения

Биосовместимость – свойство материала выполнять свои функции, не вызывая существенных негативных реакций в организме.

Биоактивность – свойство материала вызывать и регулировать биологическую активность окружающей среды.

Биорезорбция – способность материала растворяться в контакте с тканями организма;

Остеокондуктивность — способность материала поддерживать жизнедеятельность остеобластающих клеток и образование новой костной ткани;

Остеоиндуктивность — способность материала вызывать эктопическое (вне кости) формирование костной ткани.

In vivo – в живом организме.

In vitro – вне живого организма.

Остеогенез – процесс образования и формирования костной ткани.

Релиз – высвобождение вещества.

Регенерация – процесс восстановления костной ткани.

Губчатая (трабекулярная) кость – тип костной ткани, который характеризуется пористой, сетчатой структурой.

Кортикальная (компактная кость) – тип костной ткани, который характеризуется плотной, твердой структурой.

Ремоделирование – процесс постоянного обновления и перестройки костной ткани.

Остеокласт – крупная многоядерная клетка, которая отвечает за разрушение костной ткани.

Остеобласт – клетка, отвечающая за образование и минерализацию костной ткани.

Макрофаг – крупная клетка иммунной системы, которая участвует в фагоцитозе — процессе поглощения и разрушения патогенов, мертвых клеток и других чужеродных частиц.

Пролиферация – процесс быстрого размножения клеток, который играет важную роль в различных биологических процессах, таких как рост, развитие, заживление ран и иммунный ответ.

Дифференцировка – процесс, в ходе которого стволовые клетки и предшественники костных клеток превращаются в специализированные клетки костной ткани, такие как остеобласты, остеоциты и остеокласты.

Патоген – микроорганизм или вещество, способное вызывать заболевание у хозяина.

Костномозговой канал – центральный канал внутри кости, который содержит костный мозг.

Инокуляция – процесс внесения микроорганизмов в организм.

Остеотропность – свойство веществ иметь сродство или предпочтение к костной ткани.

Биомиметический – имитирующий биологические системы, структуры или процессы.

Элюирование – процесс вымывания или выделения веществ из твердой фазы жидкостью.

Введение

Актуальность проблемы

По статистике, в мире проводится 20 млн. ортопедических операций в год, 70 % из которых требуют использования остеопластических материалов, которые способны служить материалом для реконструкции костной ткани, заполняя дефекты, вызванные различными заболеваниями или с целью их профилактики и для доставки функциональных веществ локально.

По данным анализа Data Bridge Market Research, рынок заменителей костной ткани, объем которого в 2021 году составил 3 млрд. долларов США, к 2029 году, как ожидается, достигнет 5,15 млрд. долларов США при среднегодовом темпе роста 7% в прогнозируемый период с 2022 по 2029 год. С возрастанием числа высокоэнергичных травм, в том числе полученных на СВО, применение заменителей костной ткани продолжает увеличиваться, что ставит задачи по продолжению научно-технологического поиска более совершенных решений.

Кальцийфосфатные цементы близки по составу с минеральной составляющей костной ткани, биосовместимы, биоактивны, влияют на адгезию, пролиферацию и формирование новой костной ткани и применяются в медицине в качестве остеопластических материалов. Цементы хорошо срастаются с костью, постепенно растворяясь и замещаясь новообразованной костной тканью. Их можно вводить в организм в виде цементной пасты, в том числе инъекцией через шприц, или в форме заранее сформованных матриц: блоков и гранул из предварительно затвердевшего цемента.

Достоинства матриц, полученных по цементной технологии, обусловлены низкотемпературными процессами, благодаря которым они обладают повышенной скоростью резорбции по сравнению с матриксами, полученными при высокотемпературной обработке и могут быть объемно инкорпорированы функциональными веществами (протеинами, факторами роста, антибактериальными субстанциями) на стадии смешения компонентов как в лиофилизированном виде, так и с раствором затвердения с возможностью изменения кинетики высвобождения.

Функционализация кальцийфосфатных цементах представляют большой клинический интерес для лечения или профилактики различных заболеваний костной ткани. Пролонгированное высвобождение и отсутствие взаимного отрицательного влияния функционального вещества и матрикса на свойства друг друга – основные требования к системам доставки функциональных веществ.

Значительным преимуществом кальцийфосфатных цементах является широкий диапазон изменения свойств матриксов, влияющих на релиз функциональных веществ и процесс восстановления костной ткани.

Проблема регулирования свойств цементного камня изменением исходного состава и функционализацией являются фундаментальными задачами, на решение которых направлена данная работа.

Актуальность исследований по теме диссертации обусловлена потребностью реконструктивной хирургии в синтетических остеопластических материалах с регулируемой скоростью резорбции и с возможностью пролонгированного выделения фармацевтических субстанций; необходимостью эффективно предотвращать развитие и хирургически корректировать гнойные осложнения костной системы человека.

Степень разработанности темы исследования

В 1983 году Brown и Chow (США) создали первый кальцийфосфатный цемент, что открыло новую эру в использовании фосфатов кальция в качестве заменителя костной ткани. Всплеск научной активности в середине 1990-х годов связан с внедрением в практику двух успешных составов кальцийфосфатных цементах. Наибольший вклад в разработку составов внесли такие ученые как Bohner M. (США), Constantz B.R. (США), Fernandez E. (Испания), Barralet J.E. (Канада), Takagi S. (США), Ginebra M.P. (Испания), Gbureck U. (Германия).

В нашей стране ведутся исследования по созданию кальцийфосфатных цементах и модификации их свойств различными научными группами: в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова (Путляев В.И., Сафронова Т.В., Кнотько А.В.), г. Москва, в Институте металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН (Баринов С.М., Комлев В.С.,

Фадеева И.В.), г. Москва, в Институте химии ДВО РАН (Грищенко Д.Н., Медков М.А.), г. Владивосток.

В последнее время основное внимание исследователей направлено на функционализацию кальцийфосфатных цементах активными веществами (костные морфогенетические белки, факторы роста, антибактериальные субстанции, противоопухолевые препараты), что представляют большой клинический интерес для лечения или профилактики различных заболеваний костной ткани. Инкорпорирование функциональных субстанций обеспечивает пролонгацию их выхода в месте имплантации, что концептуально открывает новые подходы и идеи в разработке систем доставки лекарственных препаратов. Выдающиеся ученые в настоящее время активно исследуют взаимодействия между антибактериальными веществами и цементной матрицей, что подтверждается публикациями в ведущих научных журналах, например, подготовленная под руководством Dr. U. Gbureck в 2025 г. и рецензируемая автором диссертации, рукопись в журнале «Acta Biomaterialia» под названием «Interaction Mechanisms Between Antibiotics and Calcium Phosphate Cements as Pharmacologically Active Bone Graft Substitutes».

Несмотря на большое количество публикаций, связанных с разработкой и функционализацией кальцийфосфатных цементах, отсутствуют работы по анализу возможности управления резорбцией цементного камня с использованием подхода изменения концентраций исходных компонентов в многокомпонентных цементных системах, малоизученными остаются закономерности скорости высвобождения активных веществ от составов и полностью отсутствуют работы, связанные с научным решением создания макропористых матриц, содержащих инкорпорированные функциональные вещества.

Цель работы – разработка научных основ получения кальцийфосфатных биоцементов с управляемыми резорбцией и высвобождением функциональных веществ для повышения эффективности устранения костных дефектов и лечения воспалительных заболеваний костной ткани.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие **задачи**:

- исследовать зависимость фазового состава цементного камня от соотношения исходных компонентов системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O с возможностью прогнозирования для оптимизации конечного состава;
- установить влияние фазового состава цементного камня на его физико-технические, физико-химические, физико-механические свойства и поведение *in vivo*;
- разработать условия получения макропористых блоков по цементной технологии с возможностью сохранения водорастворимых инкорпорированных функциональных веществ;
- исследовать скорость высвобождения антибиотика из кальцийфосфатных гранул, полученных по цементной технологии, в зависимости от фазового состава цементного камня и природы антибактериальной субстанции, их эффективность в лечении гнойно-септических воспалений костной ткани;
- установить кинетические особенности выхода антибиотика в зависимости от его концентрации и макропористости кальцийфосфатных матриц и изучить поведение *in vivo*;
- разработать серию высокорезорбируемых брушитно-ньюберитных цемента и выявить закономерности свойств и кинетических особенностей их резорбции *in vitro* и *in vivo* в зависимости от исходного состава;
- изготовить опытную партию медицинского изделия на основе кальцийфосфатного цемента для проведения в аккредитованных лабораториях технических, токсикологических и клинических исследований в рамках регистрации медицинского изделия в Росздравнадзоре.

Научная новизна полученных результатов заключается в следующих положениях:

Установлена зависимость фазового состава цементного камня от исходного состава цемента в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O и определены условия возможных ионных замещений и наличия метастабильных фаз в составе.

Выявлены и представлены в виде диаграмм «состав-свойство» закономерности изменения основных физико-химических, физико-технических и физико-механических характеристик в зависимости от состава в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O , определен механизм управления скоростью резорбции цементного камня.

Установлена корреляция между данными, полученными в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, что позволило подтвердить зависимость и обосновать выдвинутую гипотезу о биологическом поведении цементов сложного состава, полученных в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O .

Установлена зависимость кинетики гидратации подпрессованного цемента в диапазоне температур 20–80 °С от размера частиц исходного α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и наличия порообразователя, природа которого в совокупности с температурными и влажностными условиями гидратации, определяет свойства макропористых матриц. Доказано, что управление резорбцией, макропористостью кальцийфосфатных цементов позволяет влиять на кинетические особенности выхода антибактериальной субстанции, с учетом вклада химической природы антибиотика в антимикробную эффективность материалов, полученных по цементной технологии.

Установлено, что скорость резорбции брушитно-ньюберитных высокорезорбируемых цементов переменного состава и выхода антибиотика для эффективного лечения септических воспалений костной ткани в локациях с высоким остеогенным потенциалом определяется соотношением ионов $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ в $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ($x=0-3$).

Теоретическая значимость. Расширены представления о закономерностях формирования метастабильных фаз и ионных замещений в составе цементного камня, полученного в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O , подтверждающая гипотезу о возможном управлении биологическим поведением кальцийфосфатных цементов. Изменение концентраций исходных компонентов системы влияет на фазовый состав

конечного продукта, увеличение метастабильных фаз и ионных замещений в котором увеличивает резорбируемость и скорость восстановления костной ткани.

Получены новые данные для создания макропористых матриц с объемно инкорпорированными антибактериальными веществами, позволяющий сохранить активность субстанций, внедрение которого вносит значительный вклад в развитие локальных систем доставки лекарственных средств.

Практическая значимость диссертационной работы состоит в следующем:

1. Разработаны составы и фазовая диаграмма состава в цементной системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O , позволяющая конкретизировать фазовый состав твердых растворов цементного камня, что позволит управлять составом продукта.

2. Разработаны диаграммы состав-свойство для цементной системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O , что позволит получать медицинские изделия с прогнозируемыми свойствами.

3. Созданы новые антимикробные кальцийфосфатные материалы на основе цементов с регулируемой скоростью высвобождения антибактериальной субстанции, эффективные для лечения гнойно-септических воспалений костной ткани.

4. Разработаны технологические основы получения по цементной технологии макропористых кальцийфосфатных материалов, обладающих антибактериальным эффектом, с равномерным распределением и контролируемой скоростью выхода лекарственного вещества.

5. Экспериментально подтверждена гипотеза о биологическом поведении материалов, полученных в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O , в том числе в условиях гнойно-септических воспалений, в аспекте изменения фазового состава посредством ионных замещений и наличия метастабильных фаз, что открывает новые перспективы для их применения в клинической практике.

6. Впервые представлена методика получения по цементной технологии макропористых матриц, обладающих антибактериальной активностью, путем

экстракции из цементного камня неводными растворителями и сверхкритическими флюидами органического порообразователя, позволяющая сохранить активность и концентрацию инкорпорированной функциональной субстанции.

7. Разработан диапазон составов высокорезорбируемых брушитно-ньюберитных цементов, которые позволяют контролировать скорость резорбции и выход антибиотика для лечения и профилактики гнойно-септических воспалений костной ткани в областях с высоким остеогенным потенциалом, что способствует повышению эффективности лечения и сокращению сроков восстановления пациентов.

8. Разработаны технические условия (ТУ9391-002-45194881-2016 «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций», пройдены технические, токсикологические и клинические испытания и получено регистрационное удостоверение на медицинское изделие №РНЗ 2017/5739 от 22.05.2017 г.

9. Разработанные антибактериальные материалы в настоящее время успешно применяются в ветеринарных клиниках для лечения и восстановления костной ткани у домашних животных.

Методы исследования. Применялись современные методы исследования, такие как стандартные методики определения физико-механических характеристик цементов, рентгенофазовый анализ, высоко эффективная жидкостная хроматография, сканирующая электронная микроскопия с энергодисперсионным анализом, ИК-спектрометрия с Фурье преобразованием, волюметрическое, калориметрическое, спектрофотометрическое исследования, микро-КТ, микробиологическое и морфологическое исследования, определение гранулометрического состава, потенциометрический метод, гранулометрический анализы, спектроскопия ядерного магнитного резонанса ЯМР ^1H .

Методология диссертационной работы. В основу методологии диссертационной работы положена рабочая гипотеза о том, что изменением концентраций исходных компонентов в многокомпонентной цементной системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$ возможно управление

биологическим поведением цементного камня посредством ионных замещений, наличия метастабильных фаз и скоростью выхода антибактериальных субстанций, объемно наполняющих цементный камень, что повышает эффективность устранения костных дефектов и лечения воспалительных заболеваний костной ткани.

Положения, выносимые на защиту:

1. Положение о зависимости фазового состава цементного камня от исходного состава цемента в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O и условиях ионных замещений фосфат-ионов на карбонат-ионы и наличия метастабильной фазы дикальцийфосфата дигидрата в составе.

2. Положение о закономерности изменения основных физико-химических, физико-технических и физико-механических характеристик в зависимости от состава в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O и механизме управления скоростью резорбции цементного камня за счет более быстрой резорбции метастабильной фазы и увеличения концентрации Ca^{2+} , провоцирующей формирование новой кости.

3. Положение о корреляции между данными, полученными в экспериментах *in vitro* и *in vivo* и возможном управлении биологическим поведением цементов сложного состава, полученных в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O .

4. Положение о технологии получения макропористых кальцийфосфатных матриц по цементной технологии, основанной на экстракции из цементного камня неводными растворителями и сверхкритическими флюидами органического порообразователя, позволяющем сохранить активность, концентрацию инкорпорированной функциональной субстанции и возможность влияния на кинетику выхода через управление резорбцией и макропористостью с учетом вклада химической природы антибиотика в антимикробную эффективность материалов, полученных по цементной технологии.

5. Положение о закономерностях состава и свойств высокорезорбируемых брушитно-ньюберитных цементов, полученных путем

замещения Ca^{2+} на Mg^{2+} в ортофосфате – исходном компоненте цементной системы для эффективного лечения септических воспалений костной ткани в локациях с высоким остеогенным потенциалом.

Степень достоверности полученных в ходе исследования экспериментальных данных и обоснованность положений и выводов, выносимых на защиту, обеспечена использованием современных методов анализа фазового состава, структуры, морфологии, и физико-механических свойств материалов, использованием современного оборудования, статистической обработкой измерений, согласованностью полученных результатов с литературными данными.

Апробация работы. Результаты диссертации представлены на международных и всероссийских конференциях, в том числе на Международных конференциях молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2014», «МКХТ-2017», «МКХТ-2018» (2014, 2017, 2018 гг., Москва); X Научно-практическая конференция (с международным участием) «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации» (2019 г., г. Ростов-на-Дону); III и IV Международная научно-практическая конференция «Фундаментальная наука для практической медицины» (2023, 2025 гг., г. Нальчик); II-я Международная конференция «Механика биомедицинских материалов и устройств» (МБМУ-2025) (2025 г., г. Пермь); XX, XXI Международная научно-практическая конференция имени профессора Л. П. Кулева студентов и молодых ученых (2019, 2020 гг., г. Томск); Международный научный форум «Наука и инновации – современные концепции» (2020 г., г. Москва); Международный молодежный научный форум «Ломоносов-2022» (2022 г., г. Москва); VIII mezinárodní vědecko – praktická konference. - Dny vědy – 2012. Chemie a chemická technologie (2012 г., Прага); III Всероссийское совещание «Биоматериалы в медицине» (2013 г., г. Москва); Всероссийская конференция молодых ученых «Актуальные проблемы неорганической химии» «АПНХ-2018», «АПНХ-2019», «АПНХ-2020», «АПНХ-2021» (2018, 2019, 2020, 2021 гг., г. Москва); IV, VI Национальный конгресс по регенеративной медицине «Гены и Клетки» (2019 г., г. Москва, 2024 г., г. Санкт-Петербург); XI Конференция молодых ученых по

общей и неорганической химии (2021 г., г. Москва); XI Всероссийский Приоровский форум (2024 г., г. Москва).

Личный вклад автора

Автор проводил поиск и анализ литературных данных, ставил задачи, планировал эксперимент, осуществлял выбор составов для определения физико-химических основ системы и влияния соотношения компонентов на состав, синтез исходных материалов и получение цементного камня и медицинских материалов на его основе, определение характеристик всех представленных в работе материалов, планирование и участие в проведении медико-биологических исследований. Экспериментальные исследования проводились собственноручно или с непосредственным участием автора. Автор проводил интерпретацию, анализ и обобщение полученных результатов, осуществлял написание научных статей, отчетов, патентов и докладов на научных конференциях. Опытная партия образцов и документация для регистрации медицинского изделия в Росздравнадзоре России была подготовлена автором.

Публикации. Результаты диссертационной работы достаточно полно изложены в 27 статьях в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов диссертационных исследований, в том числе 3 статьях в научных изданиях первого (Q1) и 11 статьях второго (Q2) квартилей, индексируемых в базах данных Scopus, Web of Science, РИНЦ, 34 тезисах докладов, 5 патентах на изобретения (№2490031 от 20.08.2013 г., №2619870 от 18.05.2017 г., №2756020, 24.09.2021 г., №2795082, 28.04.2023 г., №2813599 от 13.02.2024 г.).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 7 глав, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 379 наименований, и приложений. Материал изложен на 394 страницах машинописного текста и содержит 72 таблицы, 156 рисунков и 2 приложения.

Благодарности

Автор диссертации выражает глубокую благодарность к.т.н. проф. Сивкову С.П., к.м.н. Зайцеву В.В. за огромную поддержку при выполнении работы; за помощь и содействие на разных этапах выполнения работы Бионышева-Абрамова Л.Л., Смоленцева Д.В. (НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова), к.т.н. Котова С.В. (НИИЖБ им. А.А. Гвоздева), всех сотрудников кафедры химической технологии композиционных и вяжущих материалов, особенно д.т.н. Потапову Е.Н., к.т.н. Бурлова И.Ю. и д.т.н. профессора кафедры химической технологии керамики и огнеупоров РХТУ им. Д.И. Менделеева Белякова А.В.

Автор также благодарен коллегам и соавторам: к.б.н. Сережниковой Н.Б. (Сеченовский университет); д.т.н. Гаврюшенко Н.С. (НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова), к.ф.-м.н. Фомину Л.Л. (МГУ), к.т.н. Сафроновой Т.В. (МГУ), к.х.н. Путляеву В.И. (МГУ), Челмодееву Р.И. (МГТУ им. Н.Э. Баумана), д.х.н. Нифантьеву И.Э. (ИНХС РАН), к.б.н. Сенягину А.Н. (РУДН), к.х.н. Тавторкину А.Н. (ИНХС РАН); д.х.н. Крутько Д.П. (МГУ); д.х.н., Леменовскому Д.А. (МГУ), Пановой Л.В. (МГУ); Панову Ю.М. (МГУ); Тошеву О.У. (МГУ).

1 НАУЧНЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ОБЛАСТИ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ ЦЕМЕНТОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ И ЛЕЧЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

Костная ткань является частью опорно-двигательного аппарата человека и выполняет механическую, биологическую функции, участвует в обмене веществ [1–4] и поддержания надлежащего уровня кальция [5, 6].

Способность кости эффективно регенерировать, поддерживать минерализацию и восстанавливаться после повреждения зависит от ее способности к динамическому ремоделированию. Однако регенеративный процесс ограничен способностью к самовосстановлению: при превышении критического размера дефекта возникает остеогенная недостаточность, и дефект заполняет волокнистая соединительная ткань. Дефекты кости, в том числе значительные по протяженности участки, могут быть вызваны различными причинами и связаны с различными патогенными состояниями и клиническими исходами, включая травмы (переломы), инфекции (остеомиелит), опухоли, остеопороз и многие другие заболевания костей [7].

Костная ткань не способна без остеопластических материалов самопроизвольно восстанавливать дефекты, если они больше критического размера (наименьший костный дефект в конкретной кости определенного вида живого организма, который не заживает самопроизвольно или показывает менее 10% костной регенерации в течение его жизни) [8].

В настоящее время в области травматологии и ортопедии применяются кальцийфосфатные материалы в виде порошков, гранул, блоков, цемента, покрытий поверхностей имплантатов.

Фосфаты кальция биосовместимы, поскольку они могут растворяться в жидкостях организма и присутствуют в больших количествах в твердых формах и биоактивны, поскольку наиболее близки по химическому и фазовому составу минеральной части костной ткани или способны образовывать такие вещества на

своей поверхности в результате биомиметических процессов взаимодействия с окружающими тканями и жидкостями организма.

Фосфаты кальция влияют на адгезию, пролиферацию и формирование новой костной ткани. Для проявления этих биоактивных свойств важны деградация и высвобождение ионов фосфатов кальция. Высвобождение ионов Ca^{2+} в процессе резорбции способно влиять на дифференцировку остеогенных клеток, уровень воспалительных цитокинов. Эти явления увеличивают локальную концентрацию ионов кальция и фосфата и стимулируют образование костных минералов. Фосфаты кальция играют важную роль в адгезии клеток и формировании тканей, влияя на адсорбцию белков внеклеточного матрикса на поверхности, в регенерации костей влияя на минерализацию.

Таким образом, кальцийфосфатные цементы являются перспективными остеопластическими материалами.

1.1 Состав, структура, причины поражения костной ткани

Кость представляет собой высокоорганизованный композитный материал, состоящий на 50–70 % из неорганических компонентов (преимущественно гидроксиапатита (далее – ГАП), на 20–40 % из органических компонентов, на 5–10 % из воды и на 3 % из липидов [9]. Т.е., костная ткань структурно представляет из себя композит из армирующей и матричной фаз. Армирующая фаза в основном состоит из кристаллов гидроксиапатита и обеспечивает прочность и жесткость, в то время как матричная фаза в основном состоит из коллагеновых фибрилл, которые обеспечивают гибкость и упругость кости [10]. Органическая часть состоит из коллагена в основном I типа, 10% неколлагеновых белков, липидов, молекул протеогликанов, остеопонтина, остеонектина, остеокальцина, сиалопротеинов, морфогенетические белков, фосфопротеинов. Существует более чем 200 видов неколлагеновых белков, среди которых 12 видов составляют большую часть [10]. Белки костного матрикса также играют жизненно важную роль в механической прочности и адгезивных характеристиках тканей. Остеобласты синтезируют остеоид (неминерализованная органическая часть костного матрикса,

которая образуется до созревания костной ткани) и участвуют в его минерализации. Минерализация остеоидов происходит за счет появления в остеоиде матричных везикул, выделяемых остеобластами, которые содержат ионы Ca^{2+} и фосфатазы, образующие аморфный фосфат кальция на поверхности с последующим формированием из него кристаллов гидроксиапатита. Гидроксиапатит является наиболее важной неорганической фазой в кости (молекулярная формула $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (рисунок 1.1), которая содержит примесные ионы, такие как CO_3^{2-} , Cl^- , F^- , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} и Pb^{2+} [11]. В настоящее время известно более 30 остеотропных микроэлементов. Средние значения основных остеотропных элементов в составе костной ткани указаны в таблице 1.1.

Гексагональная структура биологического гидроксиапатита относится к пространственной группе $\text{P6}_3/\text{m}$ [12]. В одной элементарной ячейке две позиции атомов кальция: из 10 атомов Ca в элементарной ячейке шесть находятся в позиции CaII и четыре в позиции CaI. Ионы кальция в первой позиции лежат в плоскости длинной диагонали элементарной ячейки, образуя колонки вдоль оси «с». Позиция CaII образует равносторонний треугольник. OH-ионы находятся в колонках, параллельных оси «с», причем оси колонок проходят через центры кальциевых треугольников. Кальциевые треугольники соседних плоскостей повернуты относительно друг друга на 60° относительно оси «с».

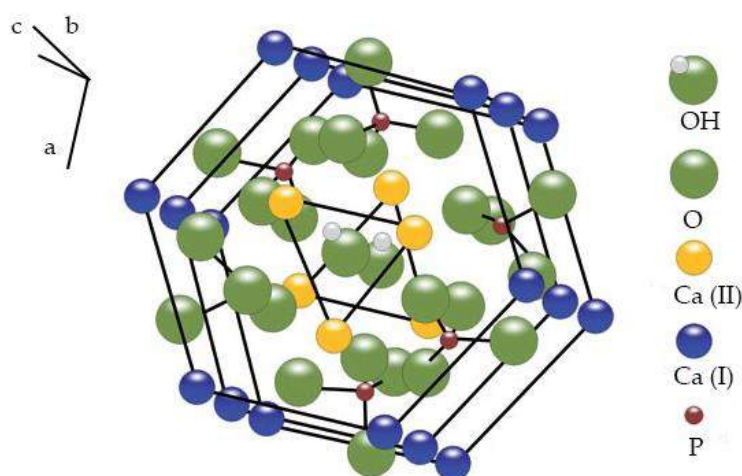


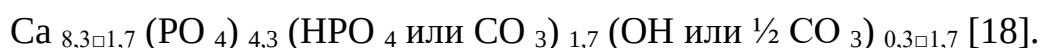
Рисунок 1.1 – Ионная структура и схема элементарной ячейки гидроксилапатита [13]

Таблица 1.1 – Состав костной ткани [14]

Состав	Кол-во, мас. %
Всего органических веществ	25
Вода	10
Всего неорганических веществ:	65
Кальций	34,8
Фосфор	15,2
Натрий	0,9
Магний	0,72
Калий	0,03
Карбонат	7,4
Фторид	0,03
Хлорид	0,13
Пирофосфат	0,07
Ca/P (мольное соотношение)	1,71
Продукты термообработки (800 °С)	ГАП + СаО

Ионы CO_3^{2-} , весовая доля которых может достигать $\sim 5\text{--}9\%$ в костном минерале, могут занимать позиции PO_4^{3-} (замещение Б-типа) и/или OH^- (замещение А-типа) в кристаллической решетке гидроксиапатита. Кроме того, узлы решетки PO_4^{3-} могут быть также заняты ионами гидрофосфата (HPO_4^{2-}). Как следствие, общепринято, что «дефицит отрицательного заряда, вызванный заменой PO_4^{3-} либо на CO_3^{2-} , либо на HPO_4^{2-} , может быть компенсирован потерей положительного заряда, например, путем удаления Ca^{2+} из решетки» [15].

Кроме того, HPO_4^{2-} могут присутствовать в костях в составе различных иных минеральных фаз, таких как аморфный фосфат кальция, октакальцийфосфат и дикальцийфосфат дигидат [11]. Карбонатные группы, выстраиваясь в структуру гидроксиапатита, образуют фазу карбонатсодержащего нестехиометрического гидроксиапатита, общая формула которого $\text{Ca}_{10-x-y/2}(\text{HPO}_4)_x(\text{CO}_3)_y(\text{PO}_4)_{6-x-y}(\text{OH})_{2-x}$ [16, 17]. Средняя химическая формула, предложенная Legro с соавторами в 1987 году для зрелого кортикального костного минерала:



Исследование локализации и количественной оценки ионов HPO_4^{2-} в костном минерале были проведены Von Euw и соавторами, в результате которого был определен средний химический состав кортикального костного минерала методами ядерного магнитного резонанса и спектроскопии ИК-Фурье, формула которого: $\text{Ca}_{7,5}(\text{PO}_4)_{2,8}(\text{HPO}_4)_{2,6}(\text{CO}_3)_{0,6}(\text{OH})_{0,2}$, причем локализацией ионов HPO_4^{2-} являются наружные слои зрелых костных минеральных частиц вдоль оси «с», внутренний слой которых представляет собой карбонатзамещенный гидроксиапатит, не содержащий замещений на ионы HPO_4^{2-} [19].

Кристаллы гидроксиапатита выстроены вдоль оси волокон коллагена и усиливают основу коллагена, образуя очень прочный и жесткий композит. Костная ткань имеет сложную многофазную, гетерогенную, анизотропную микроструктуру [1]. В силу своей неоднородности и анизотропности иерархическая структура естественной кости подразделяется на несколько различных уровней от нано-, макро- до уровня цельной кости [10, 20]. В литературе встречается деление на 4, 7 или 9 уровней [10, 20–22] (рисунок 1.2). Неравномерность костной структуры во многом зависит от того, сколько уровней в шкале оценки и какой уровень используется для анализа.

На макроскопическом или мезоскопическом уровне кость в основном образована внешней кортикальной костью и внутренней губчатой костью [10]. Компактная и губчатая макроскопические структуры имеют плавный структурный переход внутри кости и составляют 80 % и 20 % общей костной массы соответственно [23]. Основной функцией кортикальной кости, как плотной костной ткани, является стабилизация и поддержка внутренней пористой структуры, губчатая трабекулярная кость обеспечивает благоприятную среду для тканевого метаболизма и кроветворения костной системы [24, 25].

В норме кость постоянно ремоделируется. Перестройка костной ткани – естественный непрерывный управляемый процесс разрушения и одновременного воссоздания материальной структуры костной ткани с целью адаптации костей скелета к предстоящим механическим нагрузкам.

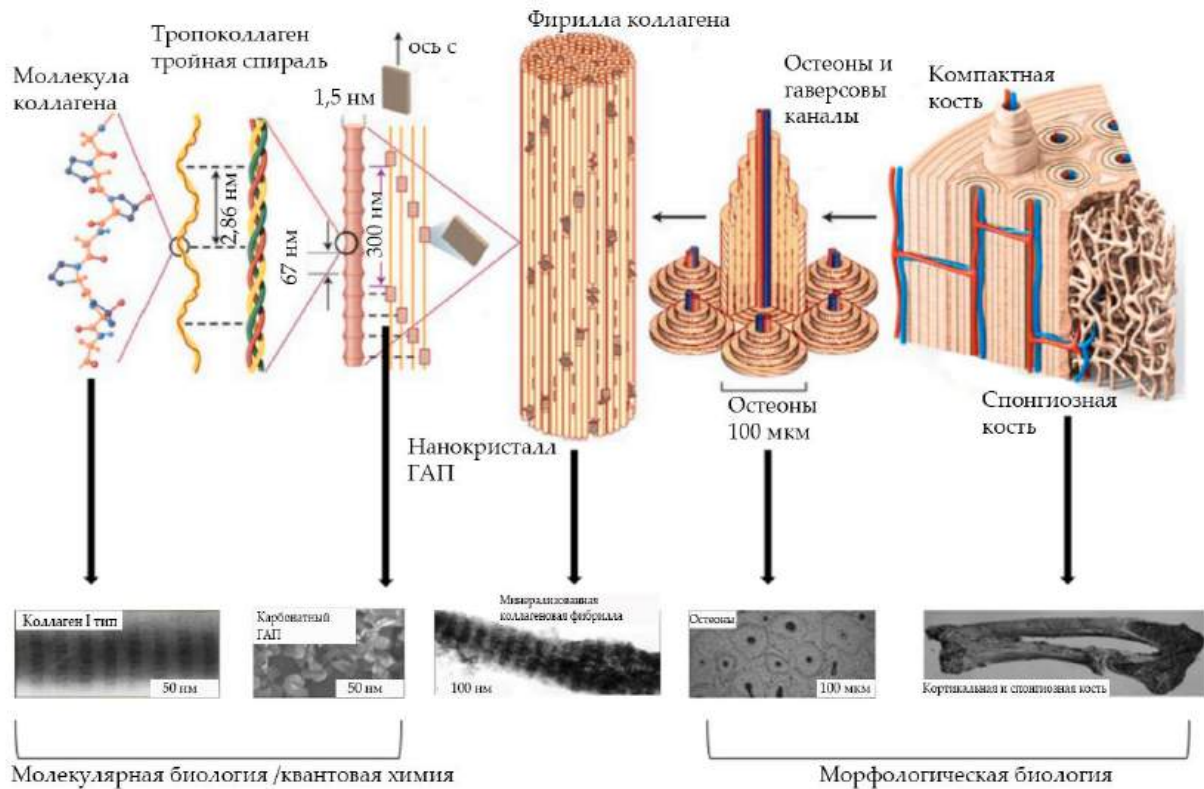


Рисунок 1.2 – Иерархическая структура человеческой кости. Схема, показывающая межмасштабное иерархическое строение человеческой кости. Соответствующие изображения СЭМ различных уровней от нано- до микромасштаба, показаны под схемой [10]

Костная линия включает в себя разнообразную группу клеток, которые поддерживают и восстанавливают кость во время гомеостаза и травмы соответственно. Эта линия клеток включает остеобласты, остециты и хондроциты. Эти типы скелетных клеток в основном участвуют в формировании костей и хрящей, тогда как клетки, которые отвечают за резорбцию костей, известные как остеокласты, происходят из гемопоэтической линии. Нормальный костный гомеостаз поддерживается за счет баланса между активностью остеобластов и остеокластов. Клетки линии остеобластов, такие как остеобласт (который является неминерализованной частью костного матрикса), секретируют гидроксиапатит и кальций для содействия минерализации костей и образованию остецитов. Клетки линии остеокластов резорбируют кость [26] (рисунок 1.3).

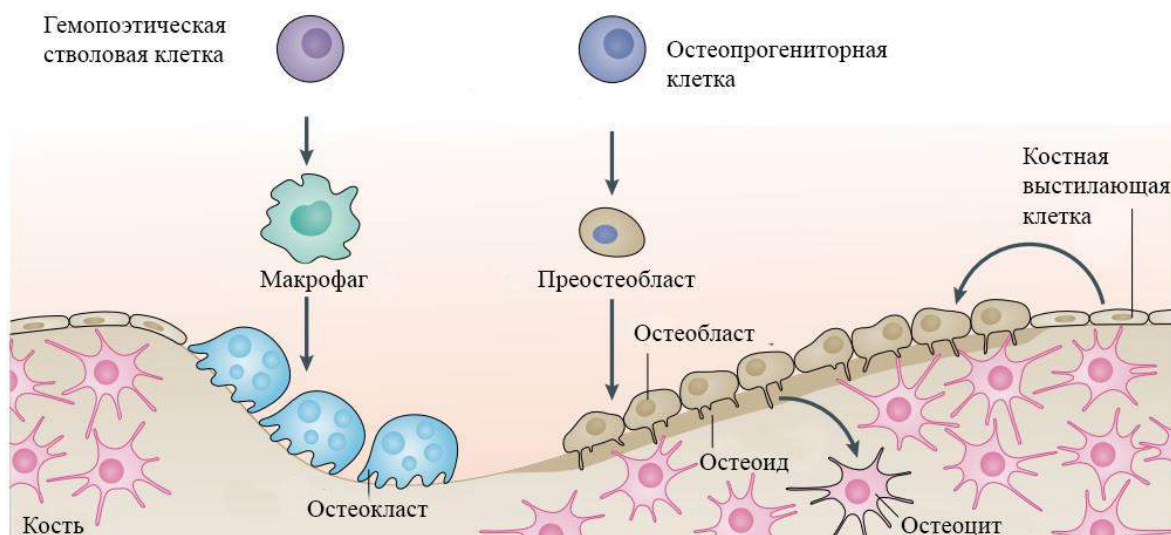


Рисунок 1.3 – Гомеостаз костей [26]

Минерализация, которая происходит при образовании новой костной ткани, приводит к перемещению кальция из внеклеточного пространства во вновь сформировавшуюся кость [27, 28].

Механические свойства кортикальной кости на макроуровне тесно связаны с ее микроструктурой и составом. Модуль упругости, прочность уменьшаются с увеличением пористости или площади остеонов. Факторами, влияющими на физико-механические свойства кортикальной кости, являются изменение содержания минералов, например, в результате старения, и накопление микротрещин из-за снижения активности ремоделирования [29].

В связи с различным содержанием неорганических и органических веществ, компактная и губчатая кость обладают различными механическими свойствами [30, 31]. В большом количестве исследований сообщалось о значениях эластичности кортикального слоя кости [32]. Средний модуль Юнга вдоль диафиза составляет около 14–20 ГПа [29, 33], перпендикулярно диафизу – около 11 ГПа [34]. Средний модуль сдвига, соответствующий эксперименту по кручению вокруг оси, параллельной диафизу, составляет около 4–6 ГПа [29, 34]. Прочность на сжатие кортикальной кости вдоль диафиза составляет 188–222 МПа, перпендикулярно диафизу – 110–152 МПа, а на изгиб 119–151 МПа и 42–64 МПа, соответственно [11]. Прочность трабекулярной кости составляет 1–12 МПа при

модуле упругости 0,022–0,702 ГПа и значительно отличается у позвонка и трубчатых костей [11].

Повреждения костей могут вызваны не только травмой, но и рядом заболеваний, среди которых септическое воспаление, опухоль, остеопороз (таблица 1.2).

Таблица 1.2 – Причины заболевания костной ткани

Название	Определение	Ссылка
Травма	нарушение анатомической целостности костной ткани, возникающее в результате внешнего воздействия	[35], [36]
Септическое воспаление, остеомиелит	воспаление костной ткани (а также окружающих кость мягких тканей), вызванное проникновением инфекции	[37], [38], [39], [40]
Опухоль	группа злокачественных и доброкачественных новообразований, возникающих из костной либо хрящевой ткани	[41], [42]
Остеопороз, остеомалация	метаболическое заболевание костей, характеризующееся снижением плотности костной массы или низким значением отношения минерального компонента к костному матриксу	[43], [44]

При лечении септических осложнений костной ткани системная антибактериальная терапия неэффективна, поскольку антибиотики не могут достичь инфицированной ткани в связи с наличием аваскулярной области или плохо васкуляризированной рубцовой ткани [37, 45]. В случае лечения опухолей комбинация высоких системных доз противоопухолевых препаратов ограничено серьезными побочными эффектами [41].

Местные пролонгированные системы доставки лекарств в эффективных терапевтических дозах в очаг заболевания костей, могут способствовать эффективному лечению различных заболеваний костной ткани с меньшим неблагоприятным эффектом.

Кальцийфосфатные цементы могут быть использованы в качестве носителей противоопухолевых, антибактериальных, радиоактивных, анаболических,

антирезорбтивных, противовоспалительных, остеоиндуктивных препаратов, обеспечивая выход функциональных веществ в месте имплантации (рисунок 1.4). Их биологические свойства способствуют остеогенезу.

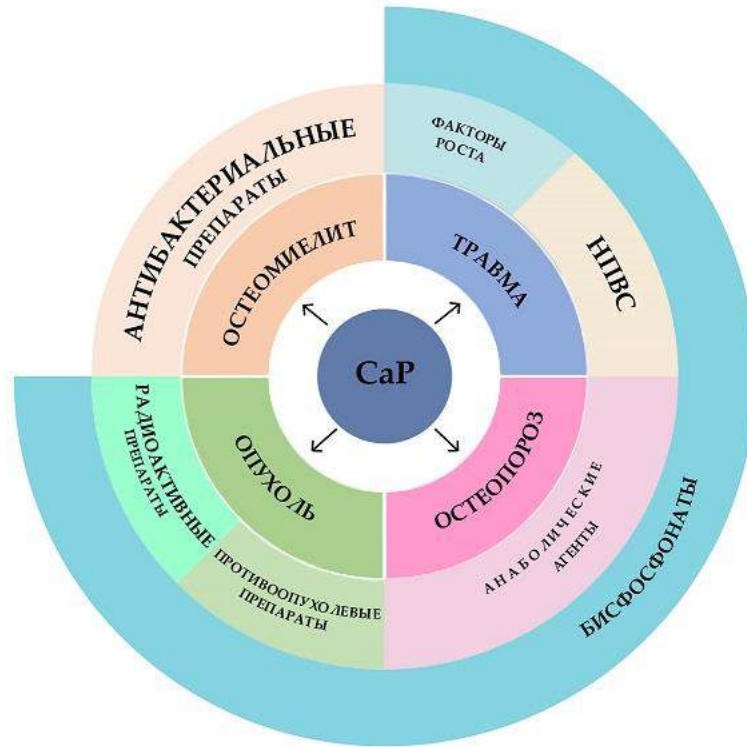


Рисунок 1.4 – Диаграмма применимости кальцийфосфатных цемента

1.2 Возможность использования кальцийфосфатных цемента для лечения костной ткани

Костная ткань способна самопроизвольно заживлять переломы или дефекты, однако регенерация ограничена небольшими участками дефекта. Критическим размером дефекта костной ткани принято считать наименьший костный дефект в конкретной кости определенного вида живого организма, который не заживает самопроизвольно или показывает менее 10% костной регенерации в течение его жизни [8]. Когда размер дефекта слишком велик для естественной способности кости к заживлению, для облегчения процесса восстановления необходимы костные заменители. Кальцийфосфатные цементы имеют аналогичную химическую формулу костного минерала и могут идеально адаптироваться к форме

дефекта и поэтому являются удобным вариантом в качестве синтетических костных заменителей.

Кость является основным местом хранения ионов кальция и других ионов в организме. Переломы костей, особенно при хирургическом лечении, связаны с изменениями гомеостаза микроэлементов [46]. Введение кальция эффективно для снижения риска послеоперационной гипокальциемии [47–49] и, вместе с другими ионами, такими как магний, оказывают положительное влияние на заживление переломов костей [50].

Кальцийфосфаты биоактивны, что проявляется в адгезии, пролиферации и формировании новой костной ткани остеобластами на их поверхности при увеличении локальной концентрации ионов кальция и фосфат-ионов во время растворения [51–53]. Эти ионы также влияют на экспрессию маркеров остеобластической дифференциации, таких как коллаген I типа, щелочная фосфатаза, костный морфогенетический белок (bone morphogenetic protein – BMP), остеопонтин, остеокальцин, костный сиалопротеин, остеонектин и связанный с Runt транскрипционный фактор 2. Фосфаты кальция играют важную роль в адгезии клеток и формировании тканей, влияя на адсорбцию белков внеклеточного матрикса на поверхности [14].

Ионы кальция выполняют три функции при восстановлении костной ткани. Первая – минерализация внеклеточного матрикса [54], вторая – клеточная сигнализация [55, 56], третья – формирование и регулирование резорбтивной функции остеокластов [57].

Ca^{2+} является важным хоуминг-сигналом, который объединяет различные типы клеток, необходимые для инициации ремоделирования кости. Высокая концентрация Ca^{2+} способна индуцировать пролиферацию остеобластов [58], продолжительность их жизни [59] и хемотаксис посредством связывания с внеклеточным рецептором, чувствительным к кальцию, связанным с G-белком [55, 56].

Фосфор в форме фосфата (PO_4^{3-}) оказывает большое влияние на формирование и рост тканей [60]. Фосфат регулирует дифференциацию и рост

остеобластов и остеобластической линии через пути инсулиноподобный фактор роста и киназа, регулируемая внеклеточным сигналом, а также увеличивает экспрессию костных морфогенетических белков BMP [61]. Кроме того, фосфат отрицательно влияет на связь между рецепторным активатором ядерного фактора каппа-B (RANK-лиганд) и его рецепторной сигнализацией и регулирует соотношение RANK-лиганд/остеопротегерин для ингибирования дифференциации остеокластов и резорбции кости [62].

Цитокины С-реактивный белок, интерлейкины IL-1 β , IL-6 и фактор некроза опухоли-альфа TNF- α , играющие провоспалительную роль, являются важными медиаторами иммунного ответа и воспалительной реакции. Неупорядоченная экспрессия IL-1 β , IL-6 и TNF- α считается эффективным биомаркером воспаления, связанным с развитием и процессом переломов [63]. Повышение содержания Ca и Mg, снижение воспалительных цитокинов наблюдаются после кратковременного лечения микроэлементами, добавление которых может быть эффективным способом борьбы с воспалением, что способствует восстановлению переломов костей [48].

Кальцийфосфатные материалы относятся к остеокондуктивным материалам. Остеокондуктивность – способность материала служить подложкой для роста новообразованной костной ткани, тогда как остеиндуктивность – способность побуждать клетки-предшественники дифференцироваться в остеобластические линии. Однако некоторые исследователи относят кальцийфосфаты к остеиндуктивным материалам за счет влияния характеристик материалов на два ключевых события-предшественника остеобластической дифференцировки: адсорбции белка (которая происходит сразу после имплантации кальцийфосфата в организм) и клеточной адгезии (которая следует за адсорбцией белка) [64].

Эффекты ионов Ca²⁺ и фосфата на пролиферацию и дифференциацию клеток, по-видимому, сильно зависят от их внеклеточных концентраций. Например, Lui и др. продемонстрировали, что 1,8 ионов Ca²⁺ и 0,09 мМ ионов фосфата способствовали пролиферации и дифференцировке мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (marrow-derived mesenchymal stem cells – BMSC) кролика.

Апоптоз клеток наблюдался при более высоких концентрациях фосфата, в то время как дифференцировка клеток не менялась. Напротив, более высокие концентрации Ca^{2+} ингибировали дифференцировку клеток (что было продемонстрировано снижением продукции щелочной фосфатазы и экспрессии мРНК коллагена/остеокальцина I типа), но способствовали минерализации матрикса [65].

Гидрофильность кальцийфосфатных материалов является положительным фактором в регуляции остеогенеза. Гидрофильные поверхности необходимы для адсорбции клеток [66], адгезии и пролиферации остеобластов [67, 68].

Кальцийфосфатные материалы можно применять для укрепления тел позвонков, пораженных остеопорозом [69], в черепно-и челюстно-лицевой хирургии [70, 71], переломах и ревизиях, главным образом, для заполнения дефектов, возникающих в результате хирургического удаления кист и опухолей, травм, остеолитических дефектов или хирургического лечения инфекций [72].

Резорбируемые кальцийфосфатные цементы, приготовленные по низкотемпературной технологии, содержащие лекарственные средства или другие биологически активные вещества и клетки, могут потенциально действовать как многофункциональные носители и системы доставки лекарств [73–76]. На рисунке 1.5 представлен процесс замещения костных дефектов при имплантации кальцийфосфатного материала в форме блока, гранул или цементного теста.

В настоящее время в области травматологии-ортопедии применяются кальцийфосфатные материалы в виде порошков, гранул, блоков, цемента, покрытий на металлических имплантатах [77–80]. Из-за высокой прочности ионных связей кальцийфосфатные материалы являются хрупкими и не могут нести большие нагрузки. Их используют в качестве остеопластических материалов в небольших дефектах или при дополнительном использовании конструкций, на которые перекладывается нагрузка.

Кальцийфосфатные цементы являются остеокондуктивными, биоактивными, интегрируются в костную ткань без образования соединительнотканной капсулы [81–83], обладают резорбируемостью, способностью к формованию и простотой манипулирования.

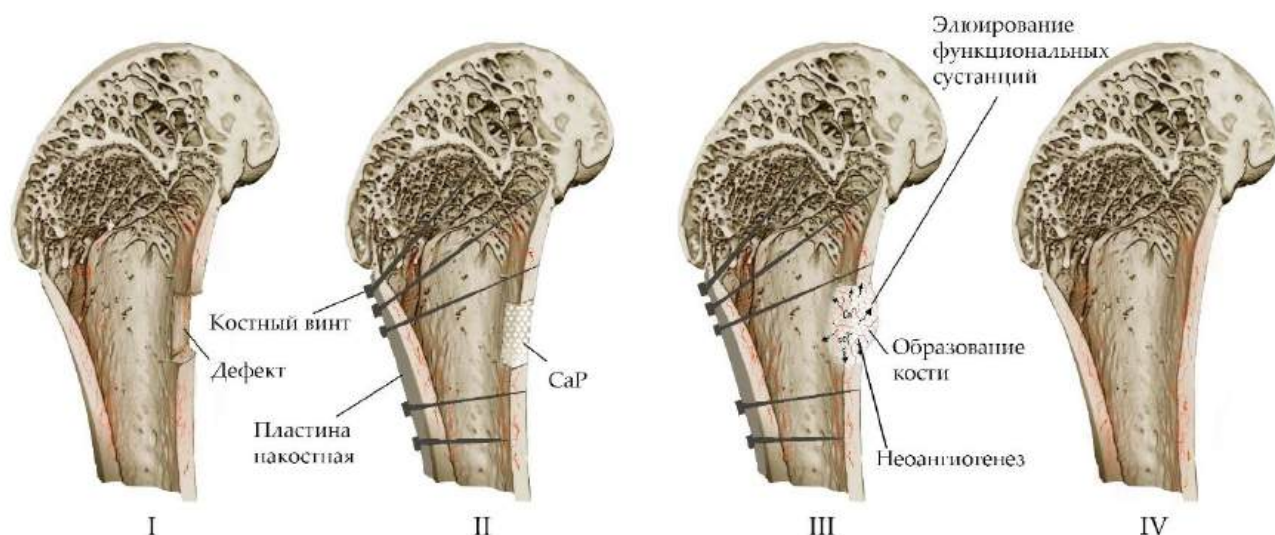


Рисунок 1.5 – Схема замещения костных дефектов с помощью кальцийфосфатных материалов:

- I – Формирование дефекта по границам жизнеспособных тканей (резекция скомпрометированных участков при высокоэнергетической травме, воспаленных участков при остеомиелите, опухолевых поражений и т.д.);
- II – Установка металлоконструкции, обеспечивающей механическую прочность на период заживления и остеопластического материала для закрытия дефекта;
- III – Перестройка остеопластического материала в дефекте, резорбция, биодеградация и формирование регенерата кости;
- IV – Ремоделирование кости

Кальцийфосфатные цементы можно вводить инъекционно в костные полости в условиях ограниченного хирургического доступа, с возможностью полного заполнения трещин (дефектов) *in situ* в операционной, минимизируя операционное вмешательство. Они обеспечивают хорошую фиксацию и тесный контакт между костью и материалом [84]. Цементы затвердевают, приобретая собственную механическую прочность [79].

1.3 Получение и свойства кальцийфосфатных цемента

1.4.1 Концепции создания кальцийфосфатных цемента

Кальцийфосфатные цементы являются перспективными материалами для восстановления дефектов костной ткани в силу схожести по составу с минеральной составляющей костной ткани, высокой удельной поверхностью, повышенной

скоростью резорбции по сравнению с матриксами, полученными при высокотемпературной обработке.

Кальцийфосфатные цементы получают обычно из порошков одного или нескольких фосфатов кальция и водного раствора. При смешении порошков фосфатов кальция и водного раствора получается паста, которая затвердевает в течение нескольких минут. Другой формой применения кальцийфосфатного цемента являются предварительно смешанные компоненты цемента в виде паст. Существует три основных подхода, используемых для приготовления предварительно смешанных цементов: 1) однокомпонентный цемент в виде пасты фосфата кальция в неводной жидкости (твердение при смешении с биологическими жидкостями); 2) двух- и более компонентный цемент в виде паст (твердение при смешивании); 3) однокомпонентный цемент в виде пасты фосфата кальция в водной жидкости с последующим замораживанием (твердение при размораживании). Такая форма подачи представлена в коммерческих продуктах VitalOs от CalciphOs / Produits Dentaires SA и VELOX от InnoTERE GmbH [85].

Постоянный объем затвердевания цементов и небольшое тепловыделение (незначительная экзотермичность при невысокой скорости выделения тепла) [86–88] является положительным свойством для использования.

Повышению механической прочности способствует выделение частиц неравноосной морфологии (пластинчатых, игольчатых), обеспечивающих механическое зацепление. Цементы хорошо срастаются с костью, постепенно растворяясь и замещаясь новообразованной костной тканью.

Цементы обладают возможностями объемного инкорпорирования функциональными веществами на стадии смешения компонентов с возможностью изменения кинетики высвобождения, в отличие от поверхностного импрегнирования высокотемпературных кальцийфосфатных материалов [89–91, 87, 92].

Кальцийфосфатные блоки и гранулы – перспективная и удобная форма подачи полученных в результате твердения цементов. Блоки или матриксы могут быть образованы отливкой цементного теста в формы, за счет взаимодействия

подпрессованных исходных компонентов в водной среде за счет схватывания и твердения, 3D-печатью, которые могут служить в качестве подложки в тканной инженерии и являются отличной платформой для инкорпорирования функциональных веществ [93–96].

Порошки, гранулы и блоки цемента могут быть стерилизованы γ -излучением без потери биосовместимости и биоактивности [97]. Также в литературе упоминают о паровой стерилизации, стерилизации этанолом, окисью этилена с полной дегазацией после стерилизации [90, 96, 98]. При стерилизации цементных составов используют гамма-излучение для порошковых компонентов и ультрафильтрацию для стерилизации жидких компонентов [99].

1.4.2 Получение кальцийфосфатных цемента

Несмотря на большое количество возможных способов получения, кальцийфосфатные цементы можно разделить на две категории по конечному продукту [79, 87, 100, 101]: 1) на основе гидроксилapatита; 2) на основе дигидрата дикальцийфосфата (брушита).

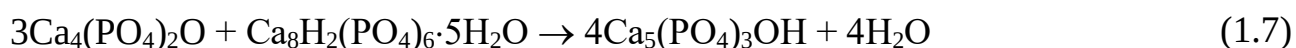
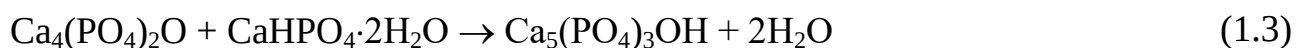
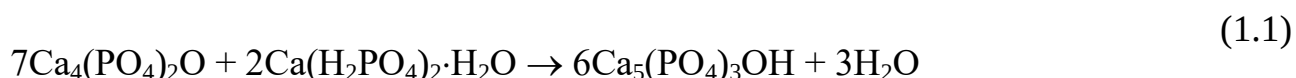
Значительная часть коммерческих цементных материалов, используемых в медицине для лечения дефектов костной ткани, содержат в своем составе минералы, принадлежащие системе $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$ [102]. При получении кальцийфосфатных цементных материалов обычно реализуют два сценария, два химических процесса: кислотно-основное взаимодействие и гидролиз. В качестве основных компонентов цемента и конечных продуктов выступают фосфаты кальция (таблица 1.3).

Таблица 1.3 – Основные фосфаты кальция и их свойства [94, 103, 104]

Ca/P	Название	Формула	pH стабильности в водных растворах при 25°C	Растворимость при 25 °C, г/л		ρ , г/см ³
				$-\log(K_s)$	г/л	
0,5	МКФМ (Монокальцийфосфат моногидрат)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0-2	1,14	~18	2,22

Ca/P	Название	Формула	рН стабильности в водных растворах при 25°C	Растворимость при 25 °C, г/л		ρ, г/см ³
				-log(Ks)	г/л	
1	ДКФА (Дикальцийфосфат ангидрат, монетит)	CaHPO ₄	2-5,5 (>80 °C)	6,9	0,048	2,929
1	ДКФД (Дикальцийфосфат дигидрат, брушит)	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	2-6	6,59	0,088	2,319
1,33	ОКФ (Октакальцийфосфат)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ · 5H ₂ O	5,5-7	96,6	0,0081	2,673
1,5	α-ТКФ (α- трикальцийфосфат)	α -Ca ₃ (PO ₄) ₂	только при T >1125 °C	25,5	0,025	2,814
1,5	β-ТКФ (β- трикальциевый фосфат)	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	только при T >800 °C	28,9	0,0005	3,067
1,2- 2,2	АФК (Аморфный фосфат кальция)	Ca _x H _y (PO ₄) _z ·nH ₂ O, n = 3–4,5, 15%– 20% H ₂ O	~5–12	-	-	-
1,5- 1,67	КГАП (кальций дефицитный гидроксиапатит)	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} (0 < x < 2)	6,5–9,5	85	0,0094	-
1,67	ГАП (гидроксиапатит)	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	9,5–12	116,8	0,0003	3,155
2	ТетКФ (Тетракальцие- вый фосфат)	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	только при T >1300 °C	38-44	0,0007	3,056

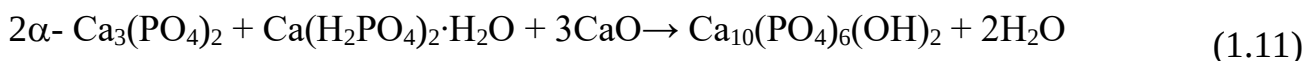
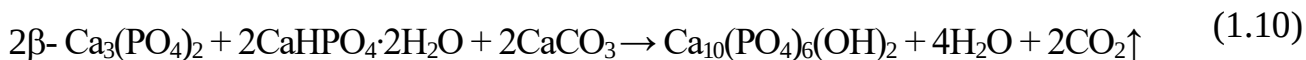
Цементы на основе гидроксиапатита (Ca/P=1,67) получают в основном взаимодействием тетракальцийфосфата (Ca/P=2) с другими фосфатами кальция (Ca/P=0,5-1,33) без образования кислых или основных со-продуктов [105–110]:





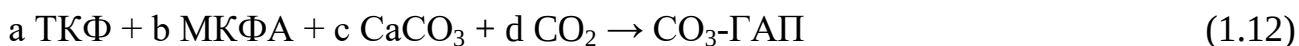
Получение гидроксиапатита и кальцийдефицитного гидроксиапатита по реакциям 1.7 – 1.9 неудобно для производства цементных материалов, поскольку такие комбинации имеют низкий уровень насыщения, и, соответственно, реакции твердения протекают очень медленно [105].

Образование осажденного гидроксиапатита в системе, не содержащей тетракальцийфосфат, может быть достигнуто ведением дополнительных источников кальция $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , CaO к смеси фосфатов кальция с отношением $\text{Ca/P} < 1,67$ [105, 111–113]:



Если вместо CaO в данной системе использовать CaCO_3 (реакция 1.11), то в такой системе на начальном этапе образуется дигидрат дикальцийфосфата, а конечным продуктом является даллит $(\text{Ca}_{8,8}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{PO}_4)_{4,5}(\text{CO}_3)_{0,7}(\text{OH})_{1,3})$, карбонатный гидроксилапатит [105, 114, 115]. Такая система использована компанией Synthes (США) в продукте Norian SRS.

Fernandez и соавт. [116] определили стехиометрические условия, при которых происходит образование кальцийдефицитного карбонатзамещенного гидроксиапатита $(\text{Ca}_{9-x}(\text{HPO}_4)_{1-1,5x}(\text{PO}_4)_{5-2,5x}(\text{CO}_3)_{3,5x}(\text{OH})_{1-1,5x})$ в порошковой смеси $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 в соответствии с уравнением:



Параметры a , b , c и d представляют собой молярные стехиометрические коэффициенты соответствующих химических веществ, где a , b и $c > 0$. Обнаружено, что стехиометрические коэффициенты зависят от процентного содержания карбонат-ионов, теоретически включенных в структуру гидроксиапатита, а также от количества CO_2 , выделяющегося в ходе реакции, в

соответствии с системой уравнений, полученной в результате уравнивания различных видов ионов:

$$a = 3 - 1,25x + 0,5\lambda \quad (1.13a)$$

$$b = -0,75x - 0,5\lambda \quad (1.13б)$$

$$c = 3,5x - \lambda \quad (1.13в)$$

$$d = \lambda \quad (1.13г)$$

где x – стехиометрический коэффициент. В результате была получена область стабильности, при которой различные начальные пропорции в порошковой смеси (a , b и c) должны давать один и тот же продукт реакции (x =фикс.) при выделении в раствор достаточного количества CO_2 (λ). Это поле устойчивости определяется площадью, заключенной в пределах $\lambda = -1,5x$, $\lambda = -6 + 2,5x$ и плоскостью $x=0$ в ортогональной системе координат (x, λ) (рисунок 1.6).

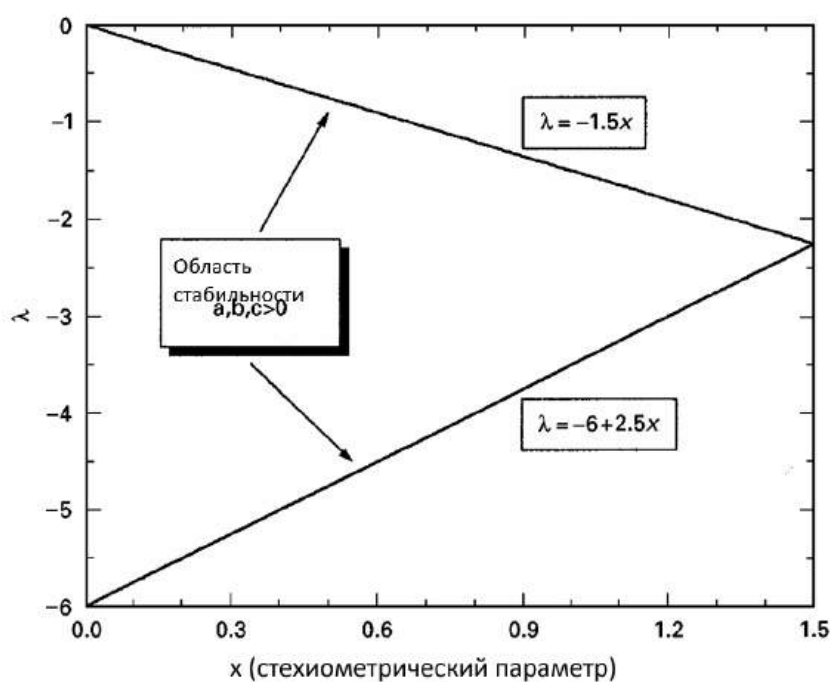
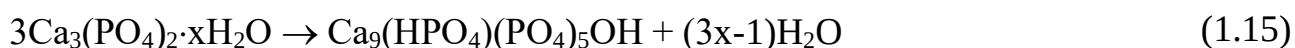


Рисунок 1.6 – Область стабильности даллита в порошковой смеси α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCO_3

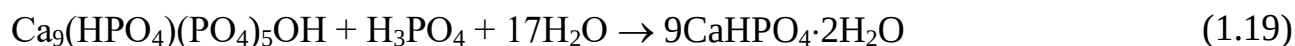
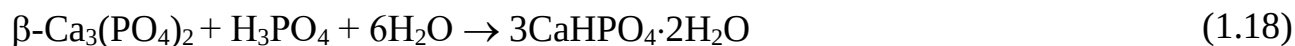
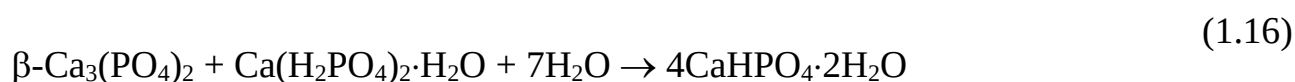
Для цемента состава Norian SRSTTM $x = 0,18$, формула $\text{Ca}_{8,82}(\text{HPO}_4)_{0,73}(\text{PO}_4)_5(\text{CO}_3)_{0,63}(\text{OH})_{1,27}$, в связи с чем в качестве конечного продукта схватывания образуется карбонатзамещенный кальцийдефицитный гидроксипатит.

В реакции гидролиза участвует только одно соединение-прекурсор, которое при смешивании с жидкой фазой становится гидратированным. Так, в случае гидролиза α -трикальцийфосфата (α -ТКФ) или аморфного фосфата кальция (АФК), реакция протекает с растворением ионов PO_4^{3-} и Ca^{2+} и образованием на поверхности частиц осажденных кристаллов кальцийдефицитного гидроксиапатита.

Гидролиз фосфатов кальция как кислых, так и основных, происходит с образованием со-продуктов в виде фосфорной кислоты или гидроксида кальция, которые необходимо удалять, что вызывает дополнительные сложности [87, 105]. Для клинического применения подходит только α -трикальцийфосфат и аморфный фосфат кальция, которые гидролизуются в кальций дефицитный гидроксиапатит в растворе с $\text{pH} > 7,5$ [117, 118].



Цементы на основе дигидрата дикальцийфосфата получают осаждением [94, 105, 111, 119–121] в ходе взаимодействия относительно кислого фосфата кальция с относительно основным с получением относительно нейтрального продукта:



Продуктом взаимодействия при получении брушитного цемента может являться монетит (дикальцийфосфат ангидрит – CaHPO_4 , ДКФА), который образовывается в условиях дефицита воды и при низком pH [83, 122, 123].

Примеры сочетаний основных исходных компонентов при получении кальцийфосфатных цементов – коммерческих продуктов указаны в таблице 1.4.

Таблица 1.4 – Основные компоненты коммерческих составов кальцийфосфатных цемента

Комбинация основных компонентов	Продукт	Коммерческое название продукта
ТетКФ, ДКФД	Апатит	HydroSet™, Bonesource, Rebone
ТетКФ, ДКФА	Апатит	Cerapaste, Rebone Gutai, DirectInject
α -ТКФ, ДКФА, CaCO_3 , ГАП	Апатит	Calcibon®
α -ТКФ	Апатит	SKaffold™
α -ТКФ, CaCO_3 , МКФМ	Апатит	Norian ®SRS, Norian ®CRS
α -ТКФ, ТТКФ, ДКФД, ГАП, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	Апатит	Biopep®-R
α -ТКФ, $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, MgHPO_4 , SrCO_3	Апатит	KyphOs™
β -ТКФ, ДКФД	Брушит	JectOS®
β -ТКФ, ДКФД, $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Брушит	ChronOS™ Inject
β -ТКФ, ДКФД, МКФМ, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3PO_4	Брушит	VitalOs
β -ТКФ, H_3PO_4	Брушит	Eurobone®
* вспомогательные компоненты (полимеры, регуляторы твердения) не показаны в таблице		

1.4.3 Сроки схватывания кальцийфосфатных цемента

Апатитовый и брушитовый цементы значительно отличаются сроками схватывания, механической прочностью, скоростью резорбции в организме, значениями pH, в связи с чем подходы к улучшению свойств цемента отличаются.

Khairoun и соавт. сформулировали клинические требования к кальцийфосфатным цементам с точки зрения времени схватывания на основе практического опыта работы с клиницистами [115]:

$$3 \leq t_{\text{н.с}} < 8,$$

$$t_{\text{н.с}} - t_{\text{ког.}} \geq 1,$$

$$t_{\text{к.с}} \leq 15,$$

где $t_{\text{н.с}}$ – начало схватывания (мин), $t_{\text{к.с}}$ – конец схватывания (мин), $t_{\text{ког.}}$ – время начала когезии (мин).

Апатитовые цементы – долготвердеющие, сроки схватывания (без регуляторов схватывания) не ранее 30 мин. При длительном твердении возможно уменьшение когезии при контакте с кровью. Частичное перемешивание с ней приведет к потере качества или миграции с места имплантации [124–126]. В работе

[127] авторы утверждают, что, несмотря на частичное разложение цементной пасты при контакте с кровью во время твердения, твердеет цемент стабильно, но быстротвердеющие цементы могут быть менее чувствительны к контакту с кровью.

Для цементов размер частиц, степень кристалличности сильно влияют на степень реакционной способности и, как следствие, скорость и интегральную полноту протекания реакции [84, 128]. Аморфный фосфат кальция (АФК) наиболее реакционноспособный, поскольку он имеет наименее стабильное строение структуры, за ним следует α -ТКФ и, наконец, β -ТКФ [129]. Уменьшение размера частиц приводит к увеличению площади поверхности, повышению реакционноспособности [130], скорости протекания реакции [109].

Введение затравки кристаллизации увеличивает скорость гидратации и твердения [109–111]. Затравка играет роль подложки для гетерогенного зародышеобразования. Подложка должна быть идентична зарождающемуся кристаллу, так как в этом случае не существует барьера зародышеобразования.

Брушитовые цементы быстротвердеющие, сроки схватывания менее 1 мин., растворимые, обладают высокой биорезорбируемостью и биосовместимостью, значения pH низкие, около 4.

Увеличение времени схватывания цемента возможно за счет введения в систему добавок или за счет ионных замещений. Например, увеличение времени схватывания и прочности при сжатии наблюдали при замещении магнием кальция в составе ТКФ при получении брушитового цемента, причем начальные сроки схватывания увеличивались до 33 мин. при содержании магния до 10 % в составе исходного ТКФ [131]. Изменение размера частиц исходных компонентов влияет на сроки схватывания и прочность цемента.

Наиболее распространенными и эффективными регуляторами схватывания брушитовых цементов являются добавки веществ, содержащих $P_2O_7^{4-}$ пирофосфат- и $C_6H_5O_7^{3-}$ цитрат-ионы [132–135]. Они образуют малорастворимые соединения на частицах исходных компонентов, адсорбируются на зернах новообразований, уменьшают электростатическое притяжение, что тормозит реакцию.

Основной добавкой-ускорителем твердения апатитовых цементов являются гидрофосфаты натрия (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4). Khairoun и соавт. варьировали соотношение В/Т (0,3; 0,32; 0,35; 0,40) в цементах составов 64 % α -ТКФ, 27 % CaHPO_4 , 9 % осажденный ГАП и 58 % α -ТКФ, 25 % CaHPO_4 , 8,5 % осажденный ГАП и 8,5 % CaCO_3 , и концентрацию ускорителя – раствора Na_2HPO_4 (от 0 до 4%) для соответствия требованиям по срокам начала схватывания, когезии, конца схватывания (см. выше) и прочности не менее 30 МПа [115]. Авторы отмечают, что добавление карбоната кальция в цемент ускоряет схватывание, позволяет получить составы, наиболее точно соответствующие требованиям.

1.4.4 Пористость и особенности пор кальцийфосфатных цементов

Кальцийфосфатные цементы обычно имеют пористость 30–60% по объему в зависимости от состава цемента. Пористость в основном открытая. Размер пор цементов от нескольких нанометров до нескольких микрометров [136, 137] не обеспечивает врастание костной ткани, резорбция происходит с поверхности материала. Пористость кальцийфосфатных цементов обусловлена избытком воды затворения. Уменьшение количества воды уменьшает пористость и, следовательно, улучшает механические свойства, но приводит к снижению скорости резорбции и ухудшению реологических свойств [87].

Наличие микропористости в кальцийфосфатных цементах является преимуществом в связи с тем, чем микропористость создает микрорельеф поверхности для удержания клеток, улучшая остеогенез [138–142]. Кроме того, микропористость является положительным фактором при использовании кальцийфосфатных цементов в качестве систем доставки функциональных веществ.

Медленно резорбируемые апатитовые цементы требуют формирования макропористости, которая увеличивает площадь поверхности и скорость резорбции. Поры обеспечивают поступление жидкости (перфузию в случае взаимосвязанной пористости), миграцию и пролиферацию остеобластов в цементах, а также прорастание сосудов (васкуляризацию). Кроме того, наличие пор

улучшит стабильность интерфейса ткань-имплантат, поскольку клетки имеют большую площадь поверхности для пролиферации и регенерации новой ткани [79].

Поры в кальцийфосфатном цементе могут быть классифицированы в зависимости от их размера, а именно, микропоры (диаметр пор <1 мкм), мезопоры (диаметр пор 1–100 мкм) и макропоры (диаметр пор >100 мкм) [79]. Размер остеобластов составляет порядка 10–50 мкм [143], однако остеобласты предпочитают более крупные поры (100–200 мкм) для регенерации минерализованной кости после имплантации. Это позволяет макрофагам проникать, уничтожать бактерии и вызывать инфильтрацию других клеток, участвующих в колонизации, миграции и васкуляризации *in vivo* [144]. Адсорбция белка увеличивается, когда размер пор составляет 20–500 мкм, а также при увеличении пористости [145–147]. Как правило, для образования новой кости и васкуляризации требуется размер пор ≥ 300 мкм, в то время как минимально допустимый размер составляет ≈ 100 мкм [79, 148, 149]. Размер пор <100 мкм препятствует ангиогенезу [150]. Однако в порах <100 мкм образуется костная ткань, что подтверждается многими исследованиями [79, 149, 151]. Мелкие поры благоприятствуют гипоксическим состояниям и индуцируют остеохондральное образование до остеогенеза, в то время как крупные поры с хорошей васкуляризацией могут приводить к прямому остеогенезу (без предшествующего образования хряща) [149].

Поры более 300 мкм хорошо снабжаются кислородом и питательными веществами, что способствует васкуляризации в новой костной ткани и, соответственно, остеогенеза [149, 150, 152–154].

Другим важным параметром, касающимся пористости кальцийфосфатных цементов, является взаимосвязанность пор. Пористость может быть открытая и закрытая. Открытая пористость имеет преимущество. Взаимосвязанная открытая микропористая система обеспечивает хорошую пропитку материала биологическими жидкостями, диффузию кислорода, создает шероховатость поверхности, которая играет важную роль для адсорбции и удержания остеогенных клеток на поверхности имплантата. Макропоры облегчают инфильтрацию клеток

и их миграцию в каркас, ангиогенез, остеointеграцию [155–158]. Макропористость усиливает активную (клеточно-опосредованную) и пассивную (растворимость) резорбцию цементов, позволяя клеткам мигрировать и пролиферировать в матрикс, обеспечивает легкий доступ клеток (воспалительных, стволовых) и растворимых белков, включая сигнальные молекулы и остеогенные факторы роста [158].

Наличие взаимосвязанной макропористости является необходимым, но не достаточным требованием. Форма, архитектура пор играют большое значение для поведения цементных скаффолдов *in vivo*. Сферическая вогнутая поверхность пор различных видов материалов оказывает положительное влияние на поведение *in vivo* [158–160]. Треугольные, прямоугольные и эллиптические по форме поры поддерживают ангиогенез и обеспечивают более быструю миграцию клеток из-за наличия ограниченного пространства внутри них в противовес порам в открытой сетчатой структуре, образованной, например, с помощью 3Д-печати [152]. Такие макропоры с вогнутой поверхностью обеспечивают замкнутые пространства, которые действуют как ниши для дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты благодаря наличию кальция и фосфата вблизи каркаса и удержанию остеоиндуктивных факторов роста. Такая микросреда не могла бы быть в открытой структуре, где ионы и белки легко диффундируют [158].

Так, скаффолды на основе кальцийдефицитного гидроксиапатита со сферическими, вогнутыми макропорами, образованными благодаря выделению CO_2 в процессе образования цементного камня, вызывали значительно большее интенсивное эктопическое формирование кости при внутримышечной имплантации, чем каркасные скаффолды, напечатанные на 3D-принтере, с выпуклыми, призматическими макропорами. Эктопический остеогенез в скаффолдах, напечатанных на 3D-принтере, присутствовал только в углах, где образовывалась вогнутая поверхность. Скорость локального роста ткани, образующейся в вогнутых пространствах, пропорциональна кривизне вогнутости. Причем разницы в ангиогенезе не наблюдали при разной форме пор [158].

Большое количество исследований направлено на получение макропористых цементов путем добавления в состав цемента растворимых солей, полимеров в виде

гранул, волокон: сахарозы, NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , KCl , маннита, желатина, частиц замороженного раствора Na_2HPO_4 , полиглактина [161–166]. Можно выделить два основных механизма образования пористости: за счет выделения CO_2 в процессе протекания химической реакции и за счет введения предпочтительно невзаимодействующих вымываемых добавок солей или полимеров с формированием макропор размером, соответствующим размеру (как правило, коммерчески доступному) вводимых частиц. На растворение порообразующих добавок в цементном камне требуется от нескольких часов до нескольких месяцев для разных по химическому составу добавок [167]. Эффективность указанных методов доказана увеличением макропористости самосхватывающихся композиций, однако в литературных источниках кинетика растворения и остаточное содержание порообразующих добавок к определенному моменту времени не рассматривали. Недостатком использования частиц высокорастворимых в воде солей, является неуправляемость размером и количеством пор [168]. Трудность удаления порообразователя из внутреннего объема матрикса делает процесс малоконтролируемым. Удаление органических порообразователей требует использования органических растворителей [169].

Для получения скаффолдов по технологии цементов используется механизм уменьшения микропористости за счет подпрессовки, что увеличивает прочность [170], а в сочетании с удаляемыми наполнителями для формирования макропористости позволяет в меньшей степени снизить прочность [95, 96]. Другим подходом к уменьшению пористости, является уменьшение размеров частиц исходных компонентов [136].

Влияние на пористость могут оказывать ионные замещения. Например, использование кремнийбета-трикальцийфосфата ($\text{Si-}\beta\text{-TCP}$) при получении брушитога цемента уменьшало пористость прямо пропорционально количеству Si от микро- до наноразмеров, увеличив площадь поверхности [171].

Макропористость обеспечивает доступ крови к контактными поверхностям, ангиогенез [138, 161]. Проблему отсутствия макропористости решают введением удаляемых до имплантации или после нее (*in vivo*) добавок.

1.4.5 Прочность кальцийфосфатных цемента

В разных работах приводятся значения прочности на сжатие апатитовых цемента 20–83 МПа, брушитовых – 1–24 МПа. Все типы кальцийфосфатных цемента являются хрупкими материалами с низкой прочностью на изгиб и низкой ударной вязкостью при разрушении по сравнению с костной тканью, что ограничивает использование цемента дефектами, не несущими нагрузок [172]. Расширение применения кальций-фосфатных цемента для устранения несущих дефектов, например, при вертебропластике или кифопластике [173, 174], требует менее хрупких цемента с повышенной трещиностойкостью. Механическая прочность цементного камня является прямым результатом переплетения кристаллов: чем больше контактов между кристаллами, тем выше прочность. Конечную прочность цементного камня определяют несколько факторов, таких как степень превращения, фазовый состав и пористость.

В соответствии с литературными данными, снижение пористости цемента с 50% до 31% может увеличить прочность на сжатие почти на порядок [175]. Пористость в биоцементе преимущественно возникает из-за присутствия непрореагировавшей жидкости, оставшейся после гидратации цемента, расположенной в пустотах между запутанной кристаллической матрицей.

Пористость значительно снижает прочность и жесткость (модуль Юнга) цементной матрицы в обратной экспоненциальной зависимости между пористостью цемента и прочностью на сжатие [175]:

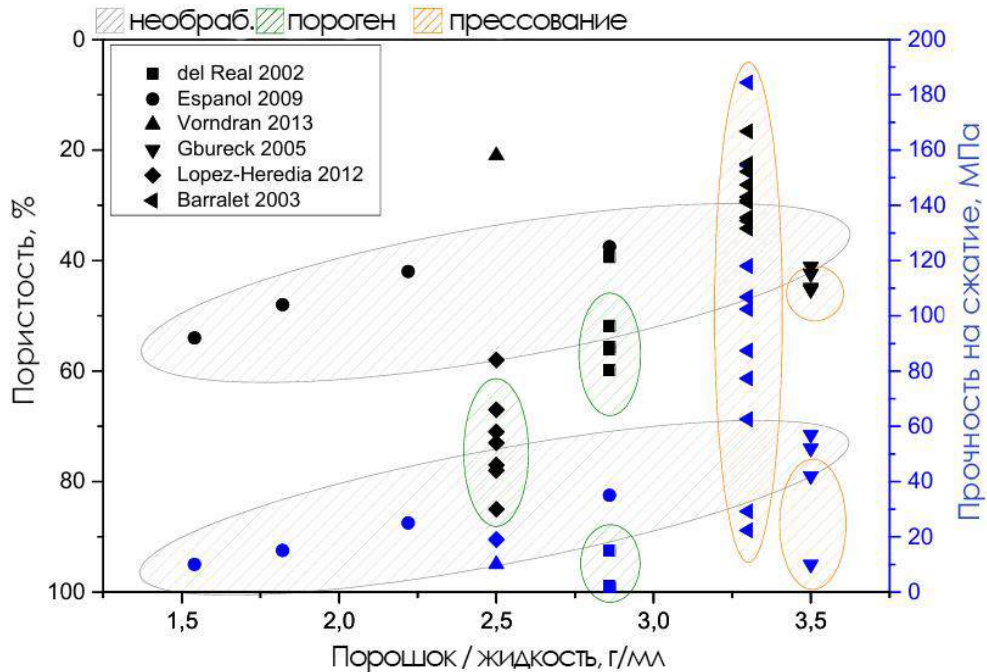
$$CS = CS_0 \exp^{-2KP},$$

где CS – прочность на сжатие при заданной пористости; CS_0 – максимальная теоретическая прочность материала; K – постоянная величина; P – пористость.

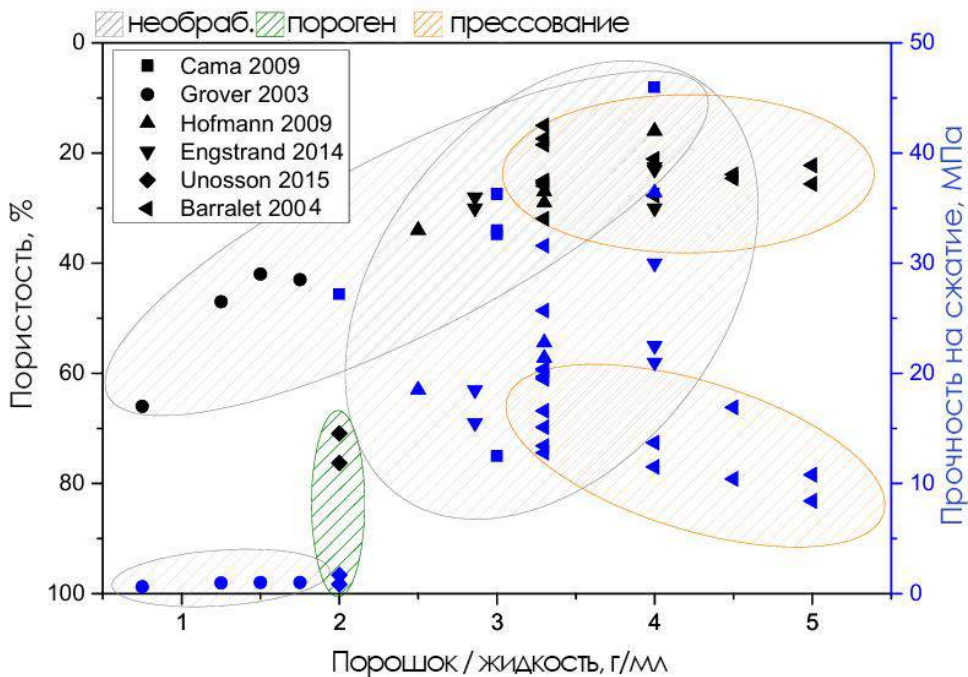
Поскольку любой избыток воды, используемой для замешивания пасты, который не расходуется во время реакции схватывания, создает пористость, основным параметром, влияющим на общую пористость цемента, является водотвердое отношение (V/T). Многие авторы, работающие в области биоцементов, используют не традиционное для цемента отношение V/T , а

обратное ему отношение (PLR – power liquid ratio) – отношение порошок / жидкость. Это отношение используется Geffers и коллегами.

Geffers и соавторы определили зависимость пористости / прочности от В/Т на основе литературных данных (рисунок 1.7) [137].



а



б

Рисунок 1.7 – Корреляция между соотношением порошок / жидкость и пористость/прочность на сжатие цемента, взятые из различных исследований для цемента: а – гидроксиапатитового, б – брушитового. Данные были получены из следующих источников: а – del Real 2002 [176], Espanol 2009 [136], Vorndran 2013 [177], Gbureck 2005 [178], Lopez-Heredia 2012 [179], Barralet 2003 [180]; б – Cama 2009 [181], Grover 2003 [182], Hofmann 2009 [82], Engstrand 2014 [183], Unosson 2015 [184], Barralet 2004 [170]

В работе Geffers и соавторов в цементы либо добавлялись порообразователи для создания искусственной макропористости (на рисунке обозначено как «пороген»), либо были предварительно подпрессованы (на рисунке – «прессование»), либо схватывались без использования указанных методов (на рисунке – «необраб.») [137].

Такие данные получены по результатам измерения прочности при разных условиях. Максимальными значениями прочности обладают цементные образцы, высушенные на воздухе или при некотором повышении температуры. Поскольку нет стандартов для измерения прочности биоцементов, сравнение прочностных характеристик по различным литературным данным является затруднительным.

1.4.6 Стратегии повышения прочности кальцийфосфатных цементов

Среди способов повышения прочности цементов снижение водотвердого отношения жидкое/порошок (В/Т) при получении цементного теста, введение добавок, изменение размера частиц [82, 132], введение инертных по отношению к цементному камню наполнителей (волокон, гранул). В качестве наполнителей могут служить гранулы или волокна неорганических соединений β -ТКФ, ГАП, гипса, биостекла, углерода, кремнезема, волластонита, диоксида циркония, которые являются биосовместимыми, нерезорбируемыми или плохорезорбируемыми соединениями [185–188]. Резорбируемыми из них являются β -ТСР, гипс и некоторые биостекла.

Волокна и гранулы из рассасывающихся полимеров, таких как полимолочная кислота (ПЛА) [189], полилактид-ко-гликолид (ПЛГА) [190], поливиниловый спирт [191], желатин или хитозан [138, 192], могут не только повышать начальную прочность, но и создавать со временем пористость, изменять характеристики цементного камня и влиять на поведение материала *in vivo*. Такие наполнители можно отнести к добавкам-модификаторам цементов. Жидкие полимерные добавки, такие как коллаген [75, 193] или растворенный мономер, сшивающийся одновременно со схватыванием цемента [194].

Таким образом, стратегии повышения прочности цементного камня можно разделить на внутренние и внешние модификации (рисунок 1.8) [137].

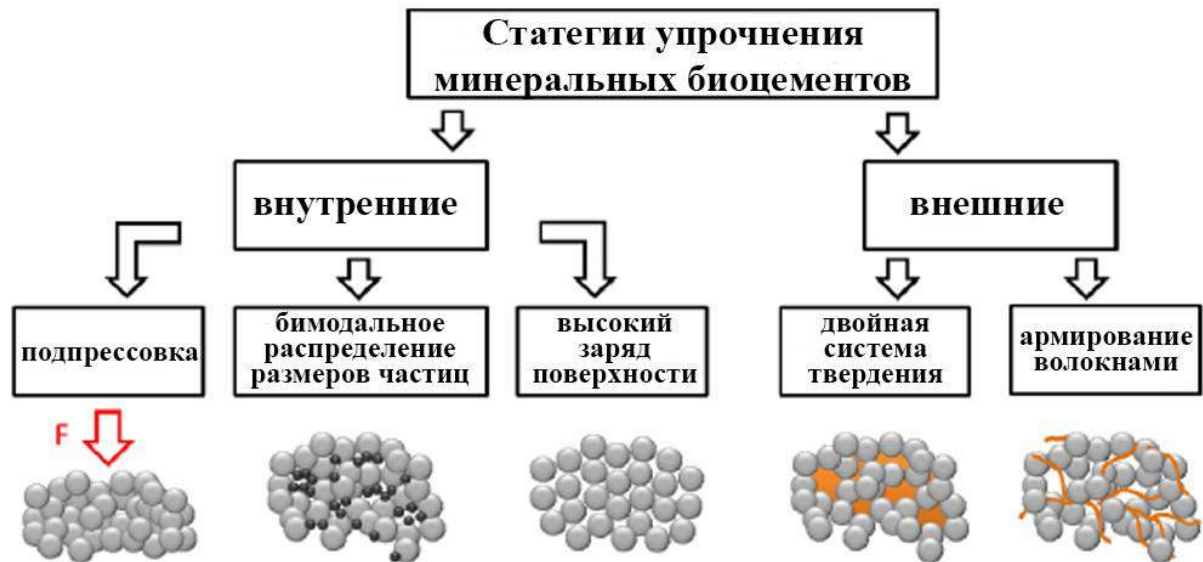


Рисунок 1.8 – Стратегии упрочнения минеральных биоцементов [137]

Уменьшение пористости за счет уменьшения количества жидкости затворения является ключевым параметром для повышения прочности цементного камня. Однако, это уменьшение ограничено необходимостью достижения пластичности, необходимой для формования цемента и требующей минимальное количество жидкости, достаточной для смачивания частиц цементного порошка и заполнения пространства между частицами [195].

С целью повышения прочности матриц, полученных по цементной технологии, может проводиться подпрессовка цементной пасты [196–198]. В процессе подпрессовки удаляется вода, количество которой влияет на микропористость, увеличивается количество контактных связей.

Эффективный метод снижения пористости цемента основан как на создании бимодального распределения цементных частиц цементной смеси по размерам, так и на создании высокого поверхностного заряда (дзета-потенциала) частиц. При бимодальном распределении частиц по размерам более мелкие частицы заполняют пространство между частицами более крупными, обычно занимаемое водой [137].

Возможность уменьшения пористости была продемонстрирована как для гидроксиапатита [178], так и для брушита [82, 183], образующих биоцементы. Высокий поверхностный заряд (дзета-потенциал) влияет на диспергирование агломератов частиц мелкого размера за счет уменьшения сил притяжения между частицами. На дзета-потенциал можно повлиять, используя несколько заряженных ионов в качестве добавок к цементной жидкости, например, тартраты, цитраты, лимонная, фитиновая кислоты [199], которые адсорбируются на поверхности частиц и увеличивают дзета-потенциал.

Одновременное применение указанных двух методов при получении гидроксиапатитового цемента из α -трикальцийфосфата с мономодальным распределением частиц по размерам ($d_{50} \sim 9,8$ мкм) и 13–33 мас. % CaHPO_4 с частицами $d_{50} \sim 1,16$ мкм позволили повысить отношение порошок / жидкость с 3,5 до 5,0 г/мл при затворении 0,5 М раствором тринатрийцитрата. Пористость при этом снизилась с 37% до 25%, прочность увеличилась с 50 до 79 МПа [178].

Еще одним важным условием для улучшения механических характеристик материала является температура, при которой происходит набор прочности. Например, при изменении температуры выдержки от 40 до 80 °С при гидролизе подпрессованного α -трикальцийфосфата (α -ТКФ) прочность увеличивается и достигает значений 95 МПа при давлении подпрессовки 400 МПа [196].

Механические свойства армированных волокнами цементов зависят как от состава и прочности матрицы, объемной доли волокна, ориентации его в матрице, размерных соотношений, так и от свойств границы раздела между матрицей и волокном. Прочность на изгиб увеличивается с приблизительно 10–15 МПа для чистого цемента до максимальной прочности 45 МПа для армированного волокнами полилактина и до 60 МПа для армированного углеродными волокнами. От диаметра волокна напрямую зависит площадь интерфейса между волокнами и матрицей. Когда композит нагружается, различия между модулями Юнга волокна и матрицы приводят к дополнительной деформации вблизи интерфейса, в основном в более мягком материале [137]. Нагрузка в основном передается посредством касательных напряжений на боковой поверхности волокон. Эффекты

армирования наблюдаются только в том случае, если длина волокна превышает критическое значение длины, которое прямо пропорционально прочности на разрыв и обратно пропорционально напряжению сдвига на границе раздела.

Большинство биомедицинских композитов армируются прерывистыми волокнами. Их длина и диаметр имеют большое значение, поскольку значительная нагрузка должна передаваться от матрицы к волокну через интерфейс для армирующего эффекта. Прочность увеличивается с соотношением длины к диаметру волокон, тогда как возникновение агрегации волокон, приводящей к неоднородностям в распределении волокон, является верхним пределом в соотношения сторон.

Большинство исследований, посвященных армированным цементам, касаются как нерезорбируемых волокон, что приведет при резорбции цементной матрицы к замуровыванию волокон в новообразованную ткань. Использование резорбируемых волокон приведет к снижению прочности из-за резорбции самих волокон [185].

Введение в цемент нереакционноспособных полимеров (например, производных коллагена, хитозана, гиалуроновой кислоты, целлюлозы), которые обычно используется для улучшения когезии цемента или его биологических характеристик, приводит к незначительному улучшению механических характеристик цемента [191, 200–204]. Альтернативным подходом является использование реакционноспособных мономерных систем, которые растворяются в цементной жидкости и одновременно вступают в реакцию во время схватывания цемента в процессе гелеобразования-полимеризации [137]. В результате в течение нескольких минут образуется гидрогелевая матрица с внедренными частицами цемента, которые впоследствии превращаются в цементный камень в результате и, в результате взаимосвязанная гидрогелевая матрица оказывается внутри структуры пористого цемента. В качестве гидрогелевой матрицы используются триэтиленгликоль-диметакрилат, бисфенол-А-диметакрилат, акриламид-полиакрилат аммония-N,N,N', N'-тетраметилэтилендиамид-персульфат аммония [194, 205]. К недостаткам этого метода упрочнения можно отнести токсичность

непрореагировавшего мономера и уменьшение степени превращения цемента в связи с низким содержанием воды в жидкости затворения и адсорбцией гидрогеля на частицах цемента.

1.4.7 Резорбируемость кальцийфосфатных цемента

Основным различием между конечными продуктами апатитовых и брушитовых кальцийфосфатных цемента является их растворимость и скорость резорбции. Апатитовые цементы относительно нерастворимы в водных растворах при нейтральном pH, но растворимость повышается при кислых значениях pH, поскольку их собственные значения pH соответствуют физиологическим значениям. Брушитовые цементы более растворимы, чем апатитовые, метастабильны при физиологических значениях pH [206–208], и, следовательно, быстрее резорбируются *in vivo* [121, 209]. В идеале скорость биодеградации кальцийфосфатных цементных должна быть почти такой же, как скорость образования новой кости, чтобы обеспечить постепенное восстановление механических свойств новой костной ткани. Хотя апатитовый цемент резорбируется быстрее, чем спеченный ГАП, резорбция может занимать от нескольких лет до десятилетий [81].

Резорбция обоих типов цемента протекает от периферии к центру (ползучее замещение) на границе кость-цемент [81]. Остеокластоподобные клетки, присутствующие на поверхности раздела, резорбируют цементный камень. В местах резорбции формируется новая костная ткань в идеале без потери целостности между костным ложем и цементом (остеотрансдуктивное свойство цемента) [210].

Резорбция *in vivo* происходит двумя различными путями: 1 – пассивная резорбция путем растворения цементного камня во внеклеточной жидкости и 2 – активная резорбция вследствие активности клеток [79].

Скорость пассивной резорбции внеклеточной жидкостью зависит от свойств цемента: соотношения В/Т, пористости, площади поверхности, фазового состава (ионных замещений, введение дополнительных компонентов цементного

порошка), соотношения Ca/P; кристалличности и свойств микросреды: pH, перфузии жидкостями организма; а также наличием и количеством добавок [211, 212]. Химическая растворимость стехиометрического гидроксиапатита 0,2–0,3 мг/л. Межклеточная жидкость ($[Ca^{2+}] \sim 0,1$ г/л (2,5 ммоль/л), $[HPO_4^{3-}] \sim 0,1$ г/л (0,1 ммоль/л)) пересыщена по отношению к гидроксиапатиту, что отрицательно влияет на скорость пассивной резорбции. Расчетная растворимость брушита 41–48 мг/л, монетита – 85–88 мг/л [213], в связи с чем пассивная резорбция вносит большой вклад в общую скорость резорбции, что подтверждается растворимостью при подкожной имплантации [122].

Активная резорбция кальцийфосфатных цемента опосредуется гигантскими клетками и остеокластами с поглощением макрофагами фрагментированных частиц цемента [214, 215]. Макрофаги являются одними из первых клеток, которые попадают в место перелома, и долгое время считалось, что они способствуют начальному воспалению и санации места повреждения [2]. Основная роль макрофагов заключается в регуляции регенерации кости при нормальном гомеостазе и при заживлении переломов. В дополнение к макрофагам близкородственные клетки миелоидного происхождения, такие как остеокласты, играют сложные роли в росте и регенерации кости [216, 217]. Плотнo прикрепляясь к минеральной поверхности, зрелый остеокласт снижает pH локально вблизи биоматериала и растворяет находящийся под ним неорганический фосфат кальция [218].

Скорость резорбции кальцийфосфатных цемента влияет на клеточную пролиферацию посредством связывания выделившегося кальция с внеклеточным рецептором, чувствительным к кальцию, связанным с G-белком [55, 56]. В связи с этим клеточная пролиферация выше у апатитовых цемента с замещенными ионами CO_3^{2-} на PO_4^{3-} [92], чем у цемента без замещений. Стабильные и малорастворимые фосфаты кальция демонстрируют низкий ионный обмен с окружающей средой и медленную скорость рекристаллизации на поверхности, тем самым определяя концентрацию и конформацию белка посредством электростатического взаимодействия на заряженном участке. С другой стороны,

фосфаты кальция с высокой растворимостью легко изменяют локальный pH и концентрацию ионов, так что это влияет на адгезию белка. Адгезия белка вызывает адгезию клеток и определяет эффективность регенерации кости [219–221].

В отличие от апатитовых цемента, резорбция которых происходит преимущественно за счет остеокластов, брушитовые цементы обладают более высокой скоростью резорбции, однако существует вероятность перекристаллизации брушита в низкорастворимые фазы [219–221]. Регулирование скорости резорбции брушитового цемента в зависимости от целей его использования (восстановление костной ткани, система доставки лекарственных средств) проводится в сторону увеличения или уменьшения. Высокая скорость резорбции может быть достигнута предотвращением превращения брушитового цемента в низкорастворимые фазы, такие как апатит [222] и введением в состав более резорбируемых фаз, например, ньюберита [122]. Замедление скорости резорбции возможно добиться ингибированием резорбции, опосредованной остеокластами, например, введением симвастатина для стимуляции образования костной ткани и ингибирования резорбции цемента [215].

Увеличение скорости резорбции возможно и за счет образования дополнительной фазы ньюберита $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, помимо основной фазы брушита $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Ньюберит образуется в составе кальцийфосфатного цемента при введении высоких концентраций ионов Mg^{2+} . Его растворимость при 25°C - $\log(K_{\text{sp}})$ составляет 5,51-5,82, тогда как растворимость брушита $-\log(K_{\text{sp}})=6,59$ [131, 206, 222–225].

Химический подход к улучшению клеточной адгезии и остеогенной дифференцировки направлен на создание функциональных групп на поверхности матриц, например $-\text{COOH}$ и $-\text{NH}_2$. Через функциональные группы поверхность связывается с белками с помощью водородных связей [226].

Увеличения скорости резорбции апатитового цемента возможно за счет наличия макропористости. Известно, что наличие макропористости может усиливать активную и пассивную резорбцию кальцийфосфатных цемента, позволяя клеткам мигрировать и пролиферировать в матрицу, а также увеличивая

площадь поверхности [84]. Введение частиц поли(D,L-молочная-со-гликолевая кислота) (ПЛГА) увеличивает скорость растворения цементного матрикса не только за счет образования макропористости, но и наличием кислых мономеров (молочной и гликолевой кислот), которые еще больше усиливают разрушение матрицы [227].

Структура макропор влияет не только на формирование кости, но и на резорбцию материала. Матрикса, имеющие вогнутые макропоры обладают более высокой клеточно-опосредованной резорбцией, чем выпуклые призматические за счет микросреды внутри этих пор, влияющих на остеокластическую активность [158].

Другой подход к повышению скорости резорбции апатитовых цемента и образованию новой кости включает их химическую модификацию, в частности, ионные замещения. Резорбция карбонатзамещенного гидроксиапатита CO_3 -ГАП увеличивается прямо пропорционально содержанию карбонат-ионов в структуре гидроксиапатита и является более заметной, чем при уменьшении кристалличности [228–230].

Скорость резорбции материала влияет на концентрацию ионов кальция и фосфора в области, окружающей материалы, влияя на рост и дифференцировку клеток, участвующих в ремоделировании кости. Внеклеточная стимуляция ионами Ca^{2+} остеобластов индуцирует более высокую пролиферацию клеток в зависимости от концентрации Ca^{2+} [56, 231–235]. Введение кальция эффективно для снижения риска послеоперационной гипокальциемии [47, 48] и, оказывает положительное влияние на заживление переломов костей [48]. Низкокристаллический CO_3 -ГАП увеличивает остеобластическую дифференциацию клеток костного мозга по сравнению с гидроксиапатитом за счет более высокой экспрессии генов, включая мРНК типа I COL типа, щелочной фосфатазы, остеопонтина и остеокальцина [50] и остеокластогенез [228], показывает высокую адгезию фибробластов, что способствуют восстановлению соединительной ткани [236].

В экспериментах *in vivo* синтетический CO_3 -ГАП показал безопасность и эффективность, а также более быстрое формирование кости, чем

депротеонизированная костная ткань, представляющая собой биологический гидроксиапатит [230, 237, 238].

Кроме модификации целевой фазы, еще одним вариантом увеличения резорбции костного заменителя является получение дополнительных метастабильных фаз в конечном продукте. Материалы на основе дикальцийфосфата дигидрата (ДКФД) быстрее резорбируются *in vivo* по сравнению с материалами на основе апатита [239].

Различные исследователи сообщали об эффективности двухфазных заменителей кости [240–242]. Например, Tsuchiya и коллеги смешивали заранее изготовленные гранулы из карбонатного гидроксиапатита с кислыми фосфатными растворами на основе натрия (Na-H-PO_4) и на основе кальция (Ca-HPO_4), что приводило к образованию макропористых блоков за счет образования ДКФД на поверхности гранул и связыванию гранул. Однако прочность на растяжение таких блоков составляет не более 140 кПа. Shariff с коллегами [241] наносили дигидрат дикальцийфосфат на гранулы β -ТКФ путем воздействия на их поверхность кислым раствором фосфата кальция, меняя количество покрытого ДКФД регулированием временем реакции между гранулами и раствором. Гистоморфометрический анализ показал, что гранулы β -ТКФ, покрытые ДКФД показали наибольшее образование новой кости по сравнению с гранулами непокрытыми гранулами. В исследовании Tsuchiy и коллег [242] подтвердили возможность снижения скорости резорбции гранул на основе гипса и увеличение остеокондуктивности за счет образования апатита на их поверхности.

Во всех этих случаях различные характеристики, такие как растворимость и остеокондуктивность различных фосфатов кальция, вызывают улучшение активности остеобластов и образование новой кости.

Доклинические исследования кальцийфосфатных цементов однозначно подтверждают их биосовместимость, биоактивность, резорбируемость. Однако скорость резорбции зависит не только от большого количества технологических параметров приготовления цементов (методы синтеза прекурсоров – температура обжига, размер частиц, кристалличность; параметры цементного теста и

цементного камня – наличие и количество добавок, прочность, пористость, когезия, фазовый и химический состав, распределение фаз, pH), но и различный остеогенез у разных животных, и место имплантации. Костный метаболизм овец, свиней (1,2–1,5 мм/день), собак (1,5–2,0 мм/день), коз, более точно имитируют физиологию костей человека с точки зрения костного метаболизма (1,0–1,5 мм/день), размеров длинных костей и условий механической нагрузки в отличие от быстрого костного метаболизма и способности к регенерации у грызунов и кроликов [101], но есть много иных отличающихся показателей.

Сложность предсказания клинического результата при имплантации кальцийфосфатных цемента заключается и в индивидуальных особенностях пациентов, таких как возраст, пол, обмен веществ, сопутствующие заболевания (например, остеопороз или воспалительные заболевания). Тем не менее, доклиническая оценка важна для исследования поведения материала, в том числе в сравнительном аспекте с существующими коммерческими медицинскими изделиями.

1.4.8 Остеогенные ионные замещения в кальцийфосфатном цементе

Кальций гидроксиапатита и брушита может замещаться следующими катионами: магнием, радием, стронцием, барием, натрием, алюминием, цинком, медью, серебром и др. Фосфат-ионы гидроксиапатита могут замещаться карбонат-, силикат- или фтор-ионами. В настоящее время известно более 30 остеотропных микроэлементов, недостаток или избыток которых способен вызывать заболевания костной ткани. Отсутствие различных видов ионов, таких как, например, Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} и др. отличает стехиометрический гидроксиапатит от биологического. Следовательно, введение некоторых из этих ионов в структуру гидроксиапатита может эффективно улучшить его биологические характеристики с точки зрения остеоиндуктивности, деградируемости и биоактивности.

Замещения ионами Mg^{2+} , CO_3^{2-} в уже используют при получении некоторых коммерческих продуктов. Например, в Calcibon® (Norian) карбонат кальция использовали для получения карбонатного гидроксиапатита в качестве целевой

фазы. При смешивании с α -ТСР, карбонат кальция участвует в процессе гидролиза, способствуя встраиванию ионов CO_3^{2-} в кристаллическую решетку [Ginebra, 2004]. При замене PO_4^{3-} на CO_3^{2-} или HPO_4^{2-} образуется дефицит отрицательного заряда, который компенсируется дефицитом по кальцию или заменой ионов Ca^{2+} на Na^+ . В Kurphon (KurphOs™) использовали карбонат стронция и фосфат и гидрофосфат магния для получения гидроксиапатитового цемента с соответствующими замещениями.

Известно, что присутствие биоактивного иона Mg^{2+} в структуре фосфатов кальция играет существенную роль в биологическом процессе и стимулирует формирование кости [222, 224, 243–245]. Магний является облигатным кофактором щелочной фосфатазы и многих ферментативных реакций, ингибирует образование остеокластов, участвует в синтезе костного коллагена в клеточной пролиферации и дифференцировке, взаимодействии клетки с матриксом [246–248].

Стронций по своей природе очень близок к кальцию и потому тесно связан с ним в обменных процессах костной ткани. Стронций накапливается преимущественно в новообразованной кости и в зонах оссификации, входя в состав трабекул. Ионы Sr^{2+} могут быть заменены Ca^{2+} в составе цемента. Sr^{2+} доказал свою эффективность в стимуляции остеогенеза, в лечении остеопоротических переломов костей. Он действует как ингибитор резорбции кости и как стимулятор формирования кости [245, 249].

Значительно способствует образованию новой кости без воспалительной реакции замещение ионов кальция на ионы Zn^{2+} , при введении которого в состав цемента значительно стимулируется пролиферация первичных мезенхимальных стволовых клеток человека, повышается активность щелочной фосфатазы [250, 251]. Другим известным ионом, который показал значительное влияние на остеогенную дифференциацию и минерализацию, является кремний. Кремний находится в активных участках кальцификации в костях и участвует в процессе минерализации роста костей [252]. Совместное введение ионов Si и Zn значительно увеличивает скорость резорбции кальцийфосфатного цемента, ангиогенез и

остеогенез из-за синергетического действия Si и Zn на биостимуляцию и иммунорегуляцию [253].

Таким образом, дополнительные ионы отвечают за множество биохимических функций, которые важны для различных этапов регенерации костей, поскольку они влияют на равновесие между остеобластами, остеокластами и остеоцитами. Влияние ионов металлов на процессы, происходящие при восстановлении костной ткани показаны на рисунке 1.9 [254].

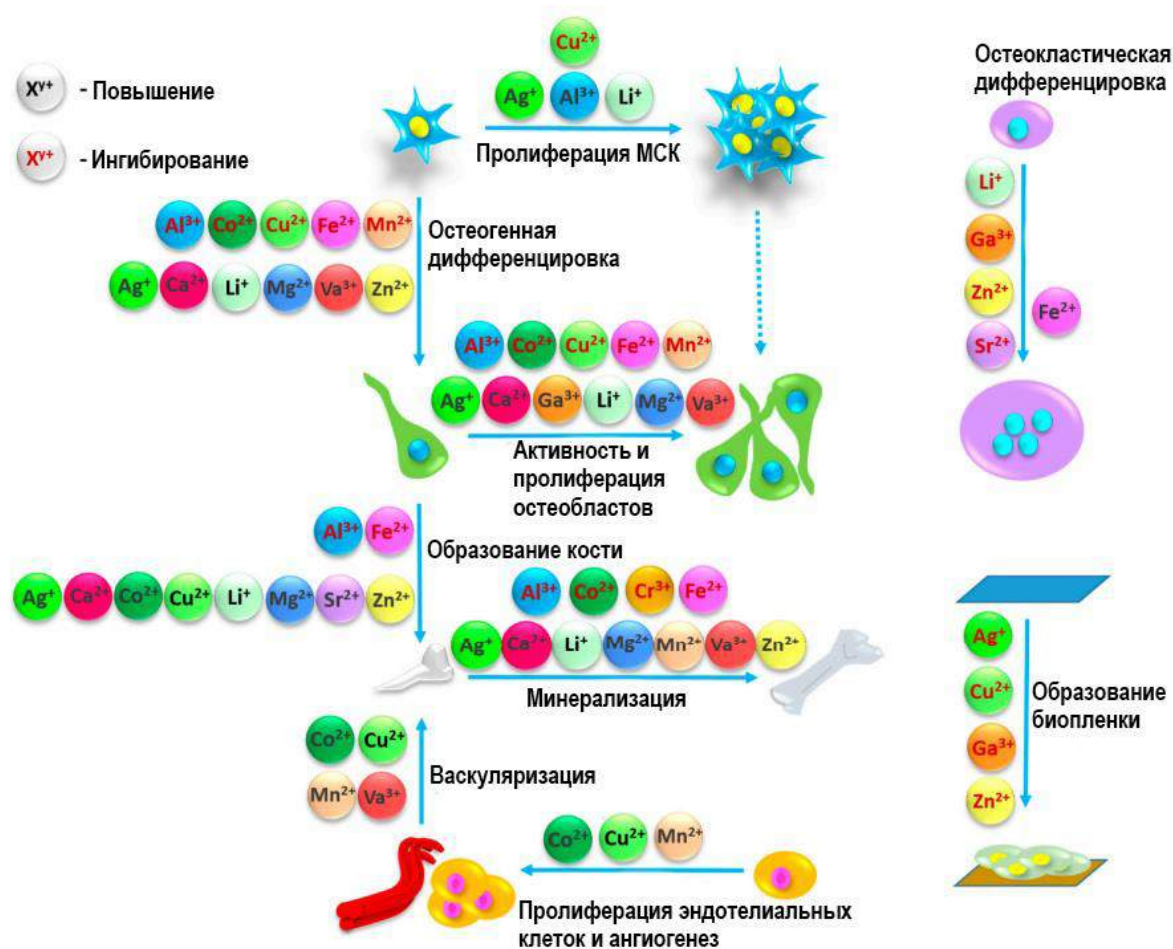


Рисунок 1.9 – Влияние ионов металлов на различные процессы, участвующие в регенерации костей [254]

Различные замещения ионами могут проводиться внесением дополнительных соединений в состав цемента [253] или путем допирования одного из исходных компонентов [122, 171, 251, 255].

Помимо щелочноземельных металлов, ионы других биоактивных металлов, таких как Cu^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} и Ga^{3+} в низких дозах также могут ускорять

восстановление костной ткани [86]. Cu^{2+} допированный цемент обладает антибактериальными свойствами и стимулирует ангиогенез, дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC) и минерализацию кости. Co^{2+} изначально стимулирует ангиогенный ответ, который также может способствовать остеогенному процессу. Тем не менее, его механизм не до конца выяснен. Фактически, питательная среда с добавлением кобальта не показывает положительной остеогенной индукции, а скорее ухудшение остеогенной дифференциации [256]. Cr^{3+} , положительно влияет на формирование кости, поддерживая как пролиферацию клеток-предшественников остеогенеза, так и резорбцию остеокластов, Ga^{3+} - на синтез зрелого организованного коллагена и ингибирующее действие на остеокласты [86].

Доказано ингибирующее действие на патогенную кишечную палочку кальцийфосфатных цементов, легированных Ag^+ [255].

Ионные замещения, чаще всего бруситового цемента, используют для улучшения его свойств при лечении рака костной ткани. Среди таких ионов ионы гольмия (Ho) и самария (Sm), совокупность ионов марганца (Mn), лантана (La), стронция (Sr), кобальта (Co) и ионы железа (Fe), включая оксид железа и магнетит [257].

Медицинское воздействие любых микроэлементов должно быть оценено для каждого состава в связи с различными свойствами самих материалов, чтобы установить токсические пороги. Например, применение высоких доз стронция вызывает дефекты минерализации костей [258], высоких доз цинка – замедление восстановления кости [259], Cu^{2+} – цитотоксичность [86]. Несмотря на то, что медь является эссенциальным микроэлементом, избыток меди имеет крайне неблагоприятные последствия для организма, с нарушениями гомеостаза меди связан патогенез различных нейродегенеративных заболеваний. Избыточная концентрация свободного цинка в крови оказывает нейротоксическое действие. Интоксикация кадмием может приводить к массивному срыву регуляторных процессов. В основе токсичности ионов тяжелых металлов (Ag^+ , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Tl^+ , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{3+} , Cr^{3+} , Sr^{2+}) лежит ферментотоксическое (инактивация

ферментов), мембранотропное действие (изменение свойств и функциональной активности мембраносвязанных белковых молекул) и окислительный стресс (генерирование свободных радикалов кислорода). Химическую основу токсичности тяжелых металлов составляет их способность связывать функциональные группы биологически важных веществ организма (прежде всего сульфгидрильные группы ферментов), вытеснять эссенциальные металлы из металлсодержащих комплексов, а также генерировать активные формы кислорода. Механизмы токсичности не взаимоисключают друг друга и могут проявляться одновременно [260].

Накопление в костях ряда тяжёлых и токсичных металлов (цинк, медь, ртуть, кадмий, свинец, железо, марганец) приводит к усилению катаболических процессов, дезорганизации и разрушению микроархитектоники с истончением, деструкцией и рассасыванием костных пластинок [261].

Таким образом, учитывая тот факт, что многие микроэлементы металлов необходимы для минерализации костей и метаболизма, при их использовании в составе цемента необходимо ориентироваться на предельные пороги концентраций, выше которых возможно проявление токсических действий на организм.

1.4.9 Магнийсодержащие кальцийфосфатные биоцементы

Mg^{2+} является четвертым по распространенности катионом в организме человека и вторым после Ca^{2+} остеотропным элементом по концентрации его в костной ткани, наиболее распространенным на начальных стадиях остеогенеза в новообразованной костной ткани (~6 мол. % замещения) [262]. В связи с превосходной ролью магния в клеточных функциях, материалы на основе магния рассматриваются как перспективные остеопластические материалы из-за способности стимулировать дифференциацию костных клеток *in vitro* [263] и формирование костной ткани *in vivo* [264, 265].

Костные цементы на основе фосфата магния имеют широкий спектр медицинского применения в качестве остеопластических материалов с связи с их

высокой начальной прочностью, биосовместимостью, высокой адгезией, скоростью резорбции и способностью к регенерации костной ткани [266, 267].

Магнийфосфатный цемент, состоящий из порошков оксида магния (MgO) и фосфата аммония ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), реагирующих в присутствии воды с образованием струвита ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) в качестве конечного продукта, является еще одним видом минерального цемента со свойствами, схожими на кальцийфосфатными цементами [268]. Струвитные цементы, используемые для биомедицинских целей, имеют высокую прочность на сжатие до 50 МПа, подходящее для использования *in situ* время схватывания 3–10 мин, высокую скорость растворения и способствуют активной резорбции остеокластами [269]. К недостаткам струвитного цемента можно отнести присутствие ионов аммония в цементах, что может привести к нежелательному выделению аммиака в организме человека [270], высокая экзотермическая реакция во время схватывания цемента, которую можно контролировать добавлением буры [271, 272], и высокие значения pH в диапазоне 9–10, что может вызывать неблагоприятные и воспалительные реакции *in vivo* [271].

Другой тип магниевых цемента может быть образован путем взаимодействия соединений магния (MgO или $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) с кислыми фосфатами (дигидрофосфат) или фосфорной кислотой с образованием ньюберита ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) [222]. Считается, что эти магнийфосфатные цементы разлагаются как химическим растворением, так и остеокластической активностью в организме, аналогично брушитным цементам.

Опираясь на данные научной работы Klammert и коллег, струвитные и ньюберитные цементы растворяются быстрее и могут трансформироваться в витлокит или фаррингтонит после имплантации *in vivo*. Они резорбируются *in vivo* объемно в отличие от поверхностной резорбции брушита при использовании модели подкожной имплантации на крысах [222].

Разработка цемента, содержащего одновременно фосфаты магния и кальция, привела к материалам, которые сочетают в себе преимущества обоих компонентов: высокую прочность за счет фосфата магния, отсутствие цитотоксичности и

улучшенные поверхностные свойства матрицы за счет присутствия фосфатов кальция [273]. Цементные композиты на основе магний-кальцийфосфатов обладают хорошей биоактивностью для формирования апатитового слоя на поверхности цемента [274]. Фосфаты магния при использовании в сочетании с плохо резорбируемыми гидроксиапатитовыми цементами увеличивают резорбцию и остеогенный потенциал последних [275]. Примером такого цемента может служить смесь в соотношении 1:1 порошка кальцийфосфатного цемента, состоящего из ТТКФ и ДКФА, с порошком магнийфосфатного цемента, состоящего из оксида магния и дигидрофосфата аммония ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). В отличие от струвитного цемента, цемент на основе ньюберита/брушита после схватывания с порошковой цементной смесью, состоящей из фаррингтонита $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ или станфилдит ($\text{Ca}_3\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_4$) с 0,5 М лимонной кислотой имеет прочность при сжатии до 40 МПа, что превышает известные значения такого класса цемента по прочностным характеристикам [247]. Смеси цемента станфилдита и фаррингтонита, частично преобразованные в струвит во время твердения, достигли только около 10 МПа к 1 сут. и 6 МПа – к 30 сут. твердения, соответственно, из-за быстрого растворения [270].

Ионы Mg^{2+} в апатитовом цементе могут сократить время схватывания, а в брушитовом увеличить, что является благоприятным фактором для обоих цемента [132, 245]. Магний-замещенный гидроксиапатит проявляет высокую биоактивность и повышенную остеоинтеграцию [276]. Включение магния в структуру гидроксиапатита уменьшает размер кристаллов вдоль оси «с» и кристалличность за счет замены кальция на магний [267].

Одной из важных особенностей присутствия иона магния Mg^{2+} в составе брушита при замещении иона кальция Ca^{2+} является стабилизация фазового состава [223, 277, 278]. Ионы магния подавляют образование менее растворимых фосфатов кальция (гидроксиапатита, трикальцийфосфата, октакальцийфосфата) *in vivo* в брушитных материалах [278–280], поскольку магний действует как сильный ингибитор роста кристаллов менее растворимых фосфатов кальция. В связи с этим не происходит перекристаллизация магний-кальцийфосфатного цемента со

временем, как это происходит с брушитом при длительном эксперименте *in vivo*, что сохраняет высокую скорость резорбции на длительное время [222, 281]. Также известно, что замена кальция магнием в брушитных цементах на основе ТКФ увеличивает время схватывания и улучшает механические свойства фосфатов кальция [131].

В брушитных цементах, так же, как и в апатитных, увеличение скорости резорбции возможно и за счет образования дополнительной фазы ньюберита $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, помимо основной фазы брушита $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Ньюберит образуется в составе брушитного цемента при введении высоких концентраций ионов Mg^{2+} . Его растворимость при 25 °C $-\log(K_{\text{sp}})$ составляет 5.51-5.82, тогда как растворимость брушита $-\log(K_{\text{sp}})=6.59$.

Klammert et al. [222] сообщили, что значительное улучшение свойств брушитного цемента достигается за счет использования магнийзамещенного β -трикальцийфосфата (общая формула $\text{Mg}_x\text{Ca}_{3-x}(\text{PO}_4)_2$ с $0 < x < 3$). Такой цемент обладает высокой биосовместимостью и улучшает механические свойства по сравнению с брушитным цементом. Ионы магния замедляют реакцию схватывания брушита, а также образуют ньюберит ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) в качестве второго продукта схватывания.

1.4.10 Влияние добавок-модификаторов на свойства цемента

Неорганические и полимерные добавки оказывают большое влияние на свойства цемента и являются необходимыми для получения медицинских изделий, пригодных для использования в области травматологии и ортопедии (таблица 1.5).

Таблица 1.5 – Добавки и их влияние на цемент

Добавка	Форма подачи	Тип цемента	Влияние на цемент	Год	Ссылка
Гликолевая кислота	Водный раствор	Брушит	Замедление схватывания	2007	[282]
$\text{Na}_x\text{H}_{3-x}\text{PO}_4$ (Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4)	Водный раствор	Апатит	Повышение прочности, уменьшение сроков схватывания	1995 2003	[127] [109]
NaHCO_3	Частицы	Апатит	Macroporosity	2001	[161]

Добавка	Форма подачи	Тип цемента	Влияние на цемент	Год	Ссылка
Na_2HPO_4	Частицы	Апатит	Macroporosity	2001	[161]
Пирофосфатные ионы ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$)	Водный раствор	Брушит	Замедление схватывания	2009 2000 1989 1999	[82] [133] [132] [134]
Сульфатные ионы (SO_4^{2-})	Водный раствор	Брушит	Замедление схватывания	2009 2000 1989 1999	[82] [133] [132] [134]
Цитратные ионы ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$)	Водный раствор	Брушит	Замедление схватывания, снижение pH, повышение прочности	2007 2009 2000 1999 2004	[282] [82] [133] [134] [170]
Хлорид натрия	Частицы	Апатит	Макропористость	2009	[92]
Молочная кислота	Водный раствор	Апатит	Повышение инъекционной способности, уменьшение времени схватывания	1999	[204]
Глицерофосфат натрия	Водный раствор	Апатит	Повышение инъекционной способности	1999	[204]
Гиалуроновая кислота, гиалуронат натрия	Водный раствор	Апатит	Повышении прочности, остеоиндуктивности	2021	[201]
Альгинат натрия	Водный раствор	Брушит	Повышение прочности, пролиферации клеток, уменьшение инъектируемости и значения pH	2021	[202]
Эфир целлюлозы	Водный раствор	Апатит	Повышает когезию, инъекционную способность, снижает скорость резорбции	2016	[203]
Полиэтиленгликоль	Частицы	Апатит	Макропористость	2022	[95]
Хитозан	Водный раствор	Апатит	Повышение инъекционной способности, уменьшение времени схватывания, повышение прочности	1999	[204]
Хитозан	Волокна	Апатит	Повышение прочности	2007	[192]
Глицерин	Водный раствор	Апатит	Повышение инъекционной способности, увеличение времени схватывания	1999	[204]

Добавка	Форма подачи	Тип цемента	Влияние на цемент	Год	Ссылка
Коллаген	Водный раствор	Брушит	Повышение прочности, когезии, клеточной адгезии	2008	[283]
ПЛА	Частицы/ Волокна	Апатит	Увеличение прочности, пористости	2010	[189]
ПЛГА	Частицы/ Волокна	Апатит	Повышение прочности, задержка роста клеток	2014	[190]
ПЛГА	Частицы/ Волокна	Апатит	Макропористость, увеличение скорости резорбции	2011 2016	[227] [203]
Сахароза	Частицы	Апатит	Макропористость	2001 2002	[161] [176]
D-маннитол	Частицы	Апатит	Макропористость	1996	[284]
Желатин	Частицы	Брушит	Макропористость, увеличение сроков схватывания, уменьшение прочности	2003	[138]
Поли(N-винилпирролидон)	Частицы	Апатит	Макропористость, увеличение инжецируемости, когезии	2020	[139]
Поли(N-винилпирролидон)	Водный раствор	Апатит	Увеличение когезии	1999	[285]
Поливиниловый спирт	Частицы/ Волокна	Апатит	Повышение прочности	2019	[97]
Биосурфактанты	Водный раствор	Апатит	Макропористость, снижение прочности	2023	[98]

1.4 Кальцийфосфатные цементы как носители функциональных веществ

Включение активных молекул в кальцийфосфатный цемент может быть достигнуто путем растворения его в жидкой фазе, путем смешения с порошковой фазой или одновременном смешении с порошковой и жидкой фазами [286], в том числе с гранулами резорбируемых наполнителей. Другим возможным подходом является поверхностная адсорбция лекарств на поверхности цемента путем инкубации каркаса в растворе лекарства: кинетическое высвобождение лекарств зависит от функционализации, микроструктуры и резорбируемости матрицы кальцийфосфатных цементов [93, 74]. Поверхностная импрегнация для цементов крайне редко встречается.

Инкорпорирование антибактериальных субстанций обеспечивает пролонгацию их выхода в месте имплантации по сравнению со скоростью выхода при пропитке продукта. Авторы [156] установили, что скорость выхода гентамицина из пропитанных кальцийфосфатных гранул значительно выше, чем из цементов, что связано с технологией инкорпорирования: процедура смешивания дает более однородное распределение лекарственного средства, чем адсорбция лекарственного средства на неровной пористой поверхности. Динамика выхода антибиотика зависит от состава и пористости кальцийфосфатного цемента и составляет, по литературным данным, от 17 до 78% к 7 сут. [38, 156] с пролонгацией более 8 недель [287].

Постепенное высвобождение лекарственных препаратов обеспечивается гомогенным распределением в объеме цементного камня и может быть эффективным в лечении различных заболеваний костной ткани, таких как опухоли, остеопороз или остеомиелит [73]. Клетки, инъекционные кальцийфосфатные цементы и функциональные вещества, применяемые по отдельности или в комбинации, могут способствовать регенерации тканей минимально инвазивным способом для восстановления функции, снижения риска, меньшего количества осложнений и снижения стоимости лечения [288].

Функционализация кальцийфосфатных цементов представляют большой клинический интерес для лечения или профилактики различных заболеваний костной ткани и основным требованием к ней для всех материалов-носителей является пролонгированное элюирование. Релиз функциональных веществ зависит от многих факторов:

- скорость резорбции (зависит от кристалличности, пористости, фазового состава, наличия добавок, шероховатости поверхности, водотвердого отношения, метода формования, условий твердения, геометрической формы и размера матрикса);
- размер и распределение пор по размерам (зависит от фазового состава, наличия и концентрации добавок и их природы, водотвердого отношения, метода формования, условий твердения);

- pH цементного камня (зависит от фазового состава, растворимости);
- растворимость функционального вещества (зависит от типа, химической природы и окружающей среды);
- возможность взаимодействия функционального вещества с матриксом (зависит от химической формулы);
- размер молекулы функционального вещества;
- количество и однородность распределения иммобилизованного функционального вещества;
- метод иммобилизации функционального вещества;
- вид подачи кальцийфосфатного цемента (паста или цементный камень).

Кроме факторов релиза, относящихся к функционализированному матриксу, следует обратить внимание на условия окружающей среды. Специфические взаимодействия между ионами, образующимися при растворении лекарственного средства, с ионными частицами, уже присутствующими в солевых буферных растворах, могут играть важную роль в определении механизмов и формирования их профиля высвобождения [289]. Солевые буферные растворы, такие как PBS или SBF, могут способствовать осаждению апатита и его отложению на поверхности цемента, что действует как барьер для диффузии лекарств из объема, тем самым снижая скорость высвобождения [100].

Условия окружающей среды различны в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, что находит отражение в релизе. Сообщалось, что количество ванкомицина, высвобожденного *in vivo* в два раза меньше количества, которое высвобождалось *in vitro* [290]. Необходимо учитывать возможное отрицательное влияние на остеогенез при высоких концентрациях антибиотика. Сообщалось, что высокие концентрации гентамицина сульфата ингибировали продукцию щелочной фосфатазы клетками [291].

Кинетика высвобождения функциональных веществ из кальцийфосфатных матриксов контролируется диффузией, поскольку матриксы резорбируются медленнее, чем происходит высвобождение функционального вещества. В случаях

с более высокорезорбируемыми брушитовыми цементами к механизму диффузии может подключиться механизм резорбции материала [292, 293].

Математические модели, учитывающие различные внутренние и внешние параметры, используются для определения кинетики высвобождения лекарственных средств из систем доставки (таблица 1.6) [294].

Таблица 1.6 – Математические модели для определения кинетики высвобождения лекарственных средств

Модель	Математическое уравнение	Применение
Нулевого порядка (Zero order)	$M_t = M_\infty - Kt$	для описания химических реакций, в которых скорость не зависит от концентрации реагентов, т.е. реакция протекает с постоянной скоростью, независимо от того, сколько реагента присутствует
Первого порядка (First order)	$\ln(1 - \frac{M_t}{M_\infty}) = -Kt$	для описания химического процесса, в котором скорость преобразования вещества прямо пропорциональна его концентрации. При уменьшении концентрации скорость уменьшается
Хиксон-Кроуэлл (Hixson – Crowell)	$M_\infty^{1/3} - M_t^{1/3} = Kt$	описывает высвобождение лекарственного средства из системы, в которой происходит изменение площади поверхности и диаметра частиц или таблеток (эрозия)
Хигучи (Higuchi)	$f_1 = K\sqrt{t};$ $\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^{1/2}$	для описания высвобождения препаратов из твердой матрицы; фокусируется на механизмах, контролируемых диффузией
Вейбулл (Weibull)	$W = 1 - e^{-(\frac{t}{T_a})^b}$	для описания высвобождения лекарственных веществ из пролонгированных лекарственных форм; характерна линейная зависимость степени растворения от времени: в единицу времени высвобождается одинаковое количество вещества
Корсмейер – Пеппас (Korsmeyer- Peppas)	$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n$	для описания кинетики высвобождения лекарственных веществ из полимерных систем, когда процесс растворения трудно предсказать или включает комбинацию различных процессов
Хопфенберг (Hopfenberg)	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \left[1 - \frac{K_0 t}{C_0 a_0}\right]^n$	для описания кинетики высвобождения лекарственного вещества из лекарственных форм с плоской, сферической и цилиндрической поверхностью по механизму эрозии

Модель	Математическое уравнение	Применение
		через поверхность полимера, сохраняющуюся постоянной на протяжении всего эксперимента
Бейкер – Лонсдейл (Baker-Lonsdale)	$f_1 = \frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt$	описывает выход вещества из монолитных матриц доставки лекарств, в которых активный фармацевтический ингредиент изначально диспергирован по всей инертной диффузионной матрице
Гомперц (Gompertz)	$X(t) = X_{max} \exp[-\alpha e^{\beta \log t}]$	для описания высвобождения хорошо растворимых веществ при незамедлительном высвобождении.
M_t – количество высвободившегося лекарства в момент времени t, M_∞ – общее количество лекарства, которое может быть высвобождено (предельное значение), K – кинетическая константа, t – время,		

Кривые высвобождения функциональных веществ из кальцийфосфатных матриц чаще всего показывают бимодальное распределение, при этом типичный первоначальный выброс происходит в течение первых 24 ч, после чего следует устойчивый медленный выход [131, 295].

В соответствии с литературными данными выход лекарственных средств из цементного камня чаще всего описывается моделями Хигучи, Корсмейера – Пеппаса [296–298]. Модель Higuchi, которая описывает релиз функциональных веществ из матричных систем как процесс диффузии, основанный на законе Фика и зависящий от квадратного корня времени, является наиболее подходящей моделью в соответствии с литературными данными, поскольку адекватно описывает высвобождение водорастворимого препарата из твердой матрицы. Всплеск высвобождения в начальный период времени отражает легкую диффузию функциональных веществ из поверхностного слоя. По истечении этого периода времени диффузия с внутренней поверхности матрикса несколько затруднена, что замедляет выброс функциональных веществ и пролонгирует тем самым их выход.

Многоступенчатые профили высвобождения потенциально обладают гораздо большими преимуществами по сравнению с монотонной кинетикой элюирования лекарственного средства. Быстрое начальное высвобождение способно эффективно остановить патологический процесс, в то время как его более

продолжительная вторая фаза высвобождения постепенно поддержит процесс лечения [299].

Адсорбция является единственным механизмом загрузки лекарственного средства при инкорпорировании [297]. На основе предыдущих исследований [300, 301] как скорость адсорбции, так и скорость десорбции для большинства органических веществ зависят от кристалличности минерального носителя.

Скорость высвобождения функциональных веществ зависит от морфологии частиц цементного камня, так как приводит к разной степени адсорбции вещества на внутренней поверхности. Десорбция функциональных веществ с поверхности кальцийфосфатов, обладающих игольчатой морфологией кристаллов, выше по сравнению с десорбцией при их пластинчатой форме [302].

Поверхностный заряд молекул функциональных веществ увеличивает адсорбцию с поверхностью кальцийфосфатного цемента за счет электростатического притяжения. Положительно заряженные функциональные вещества связываются с поверхностью фосфата кальция, богатой отрицательно заряженными ионами фосфата и гидроксида. Отрицательно заряженные функциональные вещества связываются с поверхностью фосфата кальция, обогащенной ионами кальция [303], как, например в случае с цефаклора и ципрофлоксацина, обладающими карбоксильными группами [304]. Функциональные группы ВМР-2 (гидроксильные, аминовые и карбоксильные), обладают высоким сродством к фосфатам кальция.

Однако сообщалось, что присутствие цефалексина ингибирует рост кристаллов гидроксиапатита, что связано со способностью молекул карбоновой кислоты адсорбироваться на поверхностях исходных компонентов и зарождающихся кристаллов, ингибируя рост целевой фазы, что приводит к уменьшению размера кристаллов [305].

Несмотря на отрицательный дзета-потенциал поверхности фосфатов кальция, значения различаются в зависимости от расположения атомов на двух типах кристаллических плоскостей вдоль оси (a) и вдоль оси (c) [303]. Плоскость (a) богата положительно заряженными ионами кальция, а плоскость (c) богата

отрицательно заряженными ионами фосфата и гидроксида [306]. Различный габитус кристаллов фосфатов кальция определяет разный дзета-потенциал поверхности за счет различного расположения атомов: на игольчатые кристаллы с развитыми (а)-плоскостями легко адсорбируются отрицательно заряженные функциональные вещества, на пластинчатые с развитыми с-плоскостями адсорбируются положительно заряженные [302]. Нейтральные функциональные вещества в меньшей степени адсорбируются и легче десорбируются с поверхности кальцийфосфатов, например, метронидазол [304] или ди(этилендиаминплатина)медронат [302]. Кристаллы irregularной формы обладают промежуточными значениями дзета-потенциала и различно ориентированными плоскостями [303].

Низкая кристалличность, большая удельная поверхность иммобилизует большее количество функциональных веществ [307].

Например, в работе Cabrejos-Azama et.al [308] было замечено, что высвобождение лекарственного средства зависело от количества введенного в состав исходного β -ТКФ Mg^{2+} для получения брушитового цемента. Наиболее быстрое высвобождение наблюдалось при 26,67 мол. % Mg -ТКФ и более медленное при более высоком содержании Mg^{2+} (66,67 мол. %), что авторы связывают с более низкой пористостью и удельной поверхностью цемента.

Увеличение открытой пористости приводит к увеличению поверхности и более быстрому элюированию функциональных веществ из цементного матрикса, поскольку раствор лекарственного средства высвобождается посредством явления капиллярного течения [309], согласно которому, чем больше диаметр пор, тем быстрее вымывается вещество, так как скорость раствора в капилляре пропорциональна радиусу капилляра. При сопоставимых размерах пор с размерами молекул функциональных веществ, влияние размера пор более интенсивно, чем в случае, когда поры значительно крупнее молекул функциональных веществ. В этом случае молекулы могут свободно диффундировать из поры, и высвобождение контролируется в большей степени диффузией, чем структурными факторами [310]. Этот аспект крайне важен при инкорпорировании гигантских молекул

некоторых белковых факторов роста, например, костного морфогенетического белка (BMP).

Выход функциональных веществ из инъекционных составов отличается еще более высокой скоростью в связи с периодом схватывания и начального времени твердения, пока структура цементного камня не сформирована. Кинетика зависит от времени схватывания, когезии, микросреды, условий твердения [311, 312]. Так, высвобождение лекарственного средства из брушитового цемента после 3 мин. и 1 ч твердения показало взрывное высвобождение в течение первых 8 ч. и более медленный выход в течение 4 сут. При этом через 3 мин. в составе были обнаружены исходные вещества, через 1 ч большая часть реагентов превратилась в брушит, а в интервале от 1 до 15 ч морфология кристаллов брушита незначительно менялась, что подтверждается значениями общей пористости и коэффициента извилистости [313].

В системах доставки функциональное вещество не должно ухудшать физические свойства цементов, а цемент не должен изменять активное начало функционального вещества [286]. Брушитовые цементы обладают высокой концентрацией ионов и кислой реакцией схватывания, свойствами, которые могут снижать или ингибировать действие некоторых лекарств [286].

В частности, антибиотики группы тетрациклинов имеют тенденцию хелатировать ионы Ca^{2+} , которые влияют на первичное образование зародышей кристаллизации брушитового цемента, препятствуют осаждению минералов и ингибируют минерализацию, задерживая реакцию схватывания и приводя к увеличению времени схватывания [314, 315].

С другой стороны, функциональные вещества, загруженные в виде солей в цементный камень, могут оказывать влияние на структуру цементного камня, например, добавление гидрохлорида лидокаина увеличивает размер игольчатых и пластинчатых кристаллов КГАП в цементном камне на основе ТКФ [289]. Увеличение размера кристаллов обеспечивает хорошее взаимодействие между препаратом и поверхностью кристаллов цемента. Иглы и пластины большего размера обеспечивают большую адсорбцию, большее химическое связывание и

большее растворение гидрохлорида лидокаина с поверхности кристаллов цемента, тем самым увеличивая скорость высвобождения, не изменяя фазового состава цемента [289, 316].

Вспомогательные вещества, входящие в состав функциональных веществ и обеспечивающие определенную форму, консистентные, прочностные и деградационные свойства, могут влиять на свойства цементного камня, например, стеарат натрия ингибирует конденсацию α -ТКФ и замедляет реакцию схватывания, тем самым способствуя увеличению скорости релиза функционально вещества на первой стадии [100].

Установлено, что активность гентамицина не снижается при замешивании в кальцийфосфатные цементы различных составов, а динамика его выхода зависит от состава и пористости [156]. При введении хлоргексидина в бруштитовый цемент фазовый состав цементного камня не изменяется, антибиотик остается в виде отдельной твердой фаз, распределяясь по порам [86].

Матрицы на основе цементного камня являются перспективным типом каркасов для лечения костной ткани в силу не только схожести по составу с минеральной составляющей костной ткани, высокой удельной поверхности, но и повышенной скорости резорбции по сравнению с матриксами, полученными при высокотемпературной обработке. Матрицы, образованные за счет взаимодействия подпрессованных исходных компонентов в водной среде за счет схватывания и твердения и являются отличной платформой для инкорпорирования функциональных веществ на стадии смешения с возможностью изменения кинетики высвобождения и стимуляции остеогенеза. Однако необходимо учитывать, что при создании макропористости за счет вымывания добавок, функциональные вещества должны оставаться в матриксе. В связи с этим удаление порогена выжиганием или вымыванием в водной среде растворимых в воде солей неприемлемо для матриксов, полученных по цементной технологии, с инкорпорированными антибактериальными агентами, поскольку приведет к улетучиванию или вымыванию антибиотика. Поэтому единственным решением создания макропористых матриксов по цементной технологии является вымывание

порогена органическими растворителями, в которых не растворяются антибактериальные вещества.

Одним из вариантов изменения кинетики выхода функционального средства является инкапсуляция в биodeградируемый полимер, в результате чего кинетика элюирования лимитируется диффузией из полимера. Результаты для системы с лекарственным средством, загруженным через микросферы ПЛГА, показали пролонгированное высвобождение и уменьшенное резкое высвобождение на начальной стадии по сравнению с составом с прямой загрузкой лекарственного средства [317].

Количество лекарственного средства при релизе в контактный раствор может быть получено с помощью нескольких хорошо зарекомендовавших себя методов: ультрафиолетовая-видимая спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и флуоресцентный поляризационный иммуноанализ. Pasqual и коллеги позиционируют спектроскопию электрохимического импеданса в качестве метода определения количества лекарственного средства без необходимости отбора аликвоты, как того требуют традиционные методы [289].

В таблице 1.7 представлен анализ научной литературы за последние 5 лет по кальцийфосфатным цементам – носителям функциональных веществ для лечения костной ткани.

Таблица 1.7 – Анализ литературы по кальцийфосфатным цементам как носителям функциональных веществ для лечения костной ткани

Модифицирующий агент	Тип цемента	In vivo/ in vitro	Резюме	Год	Ссылка
Доксициклин	Апатит	In vitro	Цемент с раствором хитозана, содержащим доксициклин CPC + DOX), имел сильный антибактериальный эффект, с 4-логарифмическим снижением колониеобразующих единиц против <i>S. aureus</i> и <i>P. gingivalis</i> . Активность щелочной фосфатазы, синтез минералов и экспрессия остеогенных генов для группы CPC + DOX 5 мг были намного выше, чем в контрольной группе.	2021	[318]

Модифицирующий агент	Тип цемента	In vivo/ in vitro	Резюме	Год	Ссылка
			Альгинатные микросферы, инкапсулирующие стволовые клетки, совместно культивировались с защищенными клетками цемента во время схватывания цемента. DOX не нарушал остеоиндукцию		
Ванкомицин	Апатит + сульфат кальция	In vivo	Было проведено сравнение цемента на основе фосфата кальция с ванкомицином (CPC/V) и цемента на основе полиметилметакрилата с ванкомицином (PMMA/V) в модели остеомиелита. Более выраженное улучшение заживления кости было продемонстрировано в группе CPC/V, что еще раз доказало преимущества CPC/V над PMMA/V в качестве носителя антибиотиков для области ортопедии	2019	[319]
Ванкомицин	Апатит	In vivo	Были исследованы кальцийфосфатный цемент с ванкомицином (CPC/V) и полиметилметакрилатный цемент с ванкомицином (PMMA/V). CPC/V высвобождал более высокие концентрации ванкомицина в течение более длительного периода времени в течение 24 недель, чем PMMA/V. Концентрации ванкомицина, высвобожденного из кальцийфосфатного цемента в 1,4–26,1 раза больше, чем из полиметилметакрилатного.	2021	[157]
Гентамицин	Апатит + биоактивное стекло	In vitro	Матрикс на основе цемента с добавлением 10 мас.% биостекла с иммобилизованным на его поверхности гентамицином прессовались под давлением 0,7 МПа. Матрикс обладал антибактериальными свойствами, гентамицин не вызывал существенной задержки схватывания цемента.	2022	[320]
Гентамицин	Апатит	In vitro	Исследован инъекционный рентгеноконтрастный цемент, содержащий BaSO ₄ и сульфат	2020	[321]

Модифицирующий агент	Тип цемента	In vivo/ in vitro	Резюме	Год	Ссылка
			гентамицина в виде твердых липидных микрочастиц (диапазон 75-250 мкм), полученных распылительным охлаждением и содержащих 20% сульфата гентамицина. Благодаря использованию распыленных твердых микрочастиц сульфат гентамицина можно добавлять в цементный состав без удлинения сроков схватывания и ухудшения прочности на сжатие, наблюдаемых при загрузке препарата непосредственно в цементный порошок.		
Гентамицин	Апатит	In vitro	Цемент, содержащий сферические шарики из сшитых желатин-альгинатных гидрогелей, импрегнированных гентамицином сульфатом, обладает длительным антибактериальным эффектом, высокой клеточной адгезией и хорошей биосовместимостью. Композиты имеют пониженную прочность, а количество фазы гидроксиапатита снижено в цементном камне из-за свойств гидрогеля	2021	[291]
Ванкомицин	Апатит	In vivo (клинически)	Девяносто восемь пациентов с хроническим остеомиелитом были случайным образом распределены в исследовательскую или контрольную группы. Кальцийфосфатный цемент с ванкомицином (CPC-V) имплантировали 49 пациентам в случае одноступенчатого лечения после дебридмента. Одноступенчатая имплантация CPC с ванкомицином заполняет очаги остеомиелита, позволяет пациентам продолжать бороться с инфекцией, вызывает остеогенез костных дефектов, снижает рецидив хронического остеомиелита и является эффективным методом лечения хронического остеомиелита	2021	[322]
Амикацин + Ванкомицин + фосфосерин	Апатит	In vitro In vivo	Антибактериальный кальцийфосфатный цемент, содержащий фосфосерин и	2023	[323]

Модифицирующий агент	Тип цемента	In vivo/ in vitro	Резюме	Год	Ссылка
			антибактериальные препараты, амикацин и ванкомицин, продемонстрировал непрерывный характер высвобождения до 60 и 90 дней соответственно. Исследования in vivo на модели стернотомии у крыс, инфицированных <i>S. aureus</i> и <i>E. coli</i> , продемонстрировали значительную ингибирующую активность по сравнению с инфицированной контрольной группой.		
Ванкомицин	Апатит	In vitro In vivo	На основе прессованного карбонатзамещенного гидроксиапатитового цемента, содержащего ванкомицин (CPC/V), разработан способ получения макропористых матриц, сочетающих биорезорбируемость, остеокондуктивность. Показана активность CPC/V в областях ингибирования роста бактериальных культур. Матрикс является терапевтически эффективным носителем антибактериальных веществ при лечении септических гнойных воспалений костных тканей.	2022	[95]
Ципрофлоксацин + пептидный гидрогель	Апатит	In vitro	Биокомпозитные скаффолды, включающие самоорганизующийся пептидный гидрогель AcN-RADARADARADA-CONH ₂ (RADA), кальцийфосфатный цемент и ципрофлоксацин (RADA-CPC-C), предотвращают бактериальную инфекцию и одновременно усиливают пролиферацию, дифференциацию и минерализацию остеобластов. Количество ципрофлоксацина, высвобождаемого из RADA-CPC-C, было выше, чем у CPC-C in vitro, особенно в первые 24 часа, что может помочь предотвратить ранние инфекции в послеоперационном периоде.	2021	[324]
Гентамицин	Апатит	In vitro	Инъекционный нецитотоксичный кальцийфосфатный цемент с	2022	[325]

Модифицирующий агент	Тип цемента	In vivo/ in vitro	Резюме	Год	Ссылка
			раствором карбоксиметилцеллюлозы, содержащим сульфат гентамицина, показал подходящие свойства схватывания и механические свойства, а также инъекционность около 87%. Антибиотик, высвобождаемый не менее 14 дней, высокоэффективен против <i>S. epidermidis</i> , но также проявляет некоторую антибактериальную активность против <i>S. aureus</i> .		
Доксициклин	Апатит	In vivo	Доказано, что более высокая эффективность макропористого кальцийфосфатного цемента, загруженного доксициклина гиклатом, по сравнению с микропористым цементом, загруженным доксициклином гиклатом, обеспечивает более высокое высвобождение доксициклина гиклата и способствует активности костных клеток, васкуляризации и лучшему распределению антибиотика.	2019	[311]
Рифампицин + ситафлоксацин	Брушит	In vivo	Остеокондуктивный матрикс на основе кальцийфосфатного цемента, полученный методом 3D-печати, с рифампицином и ситафлоксацином гидратом демонстрирует более эффективные результаты по угнетению бактериальных колоний и росту костной ткани при одноэтапной ревизии по сравнению с полиметилметакрилатным цементом, нагруженным гентамицином и требующим двухэтапной ревизии. Значительное увеличение образования костной ткани наблюдалось для кальцийфосфатного матрикса с включением рифампина на 3 и 10 неделях	2019	[94]
Гентамицин	Брушит	In vitro	Исследован кальцийфосфатный костный цемент на основе брушита содержащий пористые	2019	[326]

Модифицирующий агент	Тип цемента	In vivo/ in vitro	Резюме	Год	Ссылка
			гранулы β -трикальцийфосфата и гидроксиапатита, насыщенные сульфатом гентамицина. Гранулы в цементе высвобождали антибиотик с разной скоростью в концентрации, превышающей минимальную ингибирующую концентрацию для стафилококка.		
5-фторурацил	Апатит	In vitro	Различные оптимизированные полимерные растворы (как гидрофильный Soluplus (SOL), так и полиэтиленгликоль (PEG) и их комбинация), содержащие модельный противораковый препарат 5-фторурацил (5-FU), использовались для однородного покрытия различных 3D-печатных каркасов на основе кальцийфосфатных цементов (диаметром 5 мм) с взаимосвязанными порами. Исследования растворения in vitro показали, что почти 100% препарата высвобождается в течение 2 часов для всех каркасов. Исследования противораковых клеток подтвердили эффективную способность этих покрытых 5-FU каркасов кальцийфосфатных цементов убивать клетки.	2020	[93]
Магнетитовый порошок	Монетит	In vitro	Разработаны композиции кальцийфосфатных цементов на основе магнитного монетита (CaHPO_4) для лечения опухолей костей методом гипертермии. Эта биоактивная цементная композиция генерирует тепло в диапазоне 40–45 °C при приложении электромагнитного поля. Генерируемого тепла достаточно, чтобы убить опухолевые клетки, не разрушая здоровые клетки. Исследования in vitro также подтвердили, что композиция биосовместима с клетками преостеобластов.	2020	[327]
Доксорубицин	Апатит	In vivo	Цемент, состоящий из аморфного фосфата кальция, фолиевой кислоты и загруженные доксорубицином частицы	2021	[328]

Модифицирующий агент	Тип цемента	In vivo/ in vitro	Резюме	Год	Ссылка
			карбонатного нанокристаллического апатита, был исследован, как средство локального высвобождения. Предварительные данные in vivo на модели инвазивной остеосаркомы у крысы показали положительный эффект на метастатические образования без признаков токсичности.		
Доксорубицин, цисплатин, этопозид и SF2523	Апатит	In vitro	Химиотерапевтические агенты, включая доксорубицин, цисплатин, этопозид и SF2523, смешивали с цементом. Было отмечено значительное снижение пролиферации клеток ES-клеток через 48 ч после воздействия. Была отмечена синергическая эффективность цемента при комбинировании нескольких противоопухолевых агентов.	2023	[329]
Золендроновая кислота	Апатит	In vitro	Цемент на основе метилцеллюлозы/желатина/фосфат а кальция (CPC) был загружен золендроновой кислотой (ZOL) для индукции противоостеопорозных и противораковых свойств, а оксид графена был включен в цемент для улучшения физических свойств образцов. CPC, загруженный ZOL и оксидом графена, показал клинически подходящие свойства с контролируемым высвобождением ZOL, значением pH и ионов PO_4^{3-} . В исследованиях клеток in vitro наблюдалось как ингибирующее действие цемента на клетки линии клеток рака молочной железы человека (MCF-7), так и пролиферативное действие на клетки остеобластов.	2021	[330]
Кверцетин	Брушит	In vitro In vivo	Были подготовлены скаффолды из брушитного цемента (CPC), содержащего липидные наночастицы кверцетина. Тесты in vitro доказали, что добавление комплекса кверцетина-фосфолипида в наноструктурированные липидные	2023	[331]

Модифицирующий агент	Тип цемента	In vivo/ in vitro	Резюме	Год	Ссылка
			носители (QT-NLC) не ухудшает свойства CPC: время схватывания, прочность и пористость. При использовании модели дефекта бедренной кости крысы, было показано, что скаффолд QT-NLC/CPC обладает превосходным потенциалом заживления кости.		
Хитозан, пептид CGRP	Апатит	In vitro	Разработан стронцийсодержащий кальцийфосфатный цемент (Sr-CPC) с хитозаном и генно-связанным пептидом (CGRP). Результаты показали, что CGRP/хитозан-Sr-CPC может высвобождать CGRP и усиливать пролиферацию эндотелиальных клеток пупочной вены человека через рецепторы CGRP, значительно повышая экспрессию фактора роста эндотелия сосудов	2019	[332]
Полилактоглик оид, белки GDF5, BB-1, BMP-2	Брушит	In vitro	Кальций-фосфатный цемент (CPC) на основе брушита смешивали со стабилизирующими волокнами поли(1-лактид-со-гликолид) кислоты (PLGA) и костными морфогенетическими белками (GDF5, BB-1 и BMP-2). Значительные доли BMP высвобождались из CPC в течение 31 дня; присутствие волокон PLGA значительно усиливало высвобождение BMP в течение 14 дней. Высвобождаемые BMP демонстрировали биоактивность, в некоторых случаях усиленную добавлением 10% волокон PLGA.	2019	[333]
Белок BMP-2	Апатит	In vivo (clinical)	Исследование было направлено на выявление клинического остеогенного эффекта рекомбинантного человеческого костного морфогенетического белка-2 (rhBMP-2), загруженного в кальцийфосфатный цемент (rhBMP-2/CPC). Количество новой костной ткани в экспериментальной группе было больше, чем в контрольной группе. rhBMP-2/CPC обладают остеогенным потенциалом в заживлении	2022	[334]

Модифицирующий агент	Тип цемента	In vivo/ in vitro	Резюме	Год	Ссылка
Стволовые клетки жировой ткани человека	Апатит	In vitro	Инъекционный нанокристаллический кальцийфосфатный цемент был создан в качестве системы доставки волокон желатина, нагруженных стволовыми клетками. В СРС были образованы свободные каналы при растворении желатина. Пролиферация и прикрепление клеток наблюдались внутри каналов. Наблюдалась остеогенная дифференциация клеток, доставленных волокнами желатина.	2022	[335]

Антибактериальные вещества, используемые для лечения септических воспалений костной ткани, выбираются исходя из результатов микробиологического исследования. Поскольку основными возбудителями костных инфекций являются грамположительные кокки, в том числе золотистый стафилококк, используемые антибиотики активны в отношении грамположительных микроорганизмов (ванкомицин) [296] или обладают широким спектром действия, в том числе в отношении некоторых грамотрицательных микроорганизмов (рифампицин, фосфомицин) [336, 337].

1.5 Выводы. Постановка цели и задач исследования

Проведенный анализ научной литературы позволяет сделать вывод о том, что создание кальцийфосфатных цементов для восстановления дефектов и лечения различных заболеваний костной ткани требует разработки механизма управления скоростью резорбции, одновременно с функционализацией антибактериальными субстанциями матриксов, полученных по цементной технологии, что обуславливает необходимость поиска новых подходов.

Наиболее перспективными подходами к повышению скорости резорбции цементов и, соответственно, образованию новой кости, является химическая модификация, в частности, ионные замещения и получение метастабильных фаз в

конечном продукте. Резорбция карбонатного гидроксиапатита (далее – CO_3 -ГАП) увеличивается прямо пропорционально содержанию карбонат-ионов в структуре гидроксиапатита. Литературные данные, касаемые повышения растворимости гидроксиапатитов за счет замещения ионов PO_4^{3-} на CO_3^{2-} крайне ограничены в аспекте создания гидроксиапатитовых цементов и не определяют количественно такие замещения и их влияние на резорбцию цементного камня.

Известно, что повышение скорости резорбции возможно за счет образования более растворимых фаз в составе цементного камня. Известен факт высокой резорбционной способности ДКФД, в том числе в виде брушитного цемента. Получение двухфазного продукта рассматривалось в научной литературе либо за счет смешивания двух сухих цементных смесей, либо за счет связывания готовых гранул одного состава другим при образовании цемента на поверхности.

Однако ранее в научной литературе не рассматривались вопросы образования цементного камня с широким диапазоном регулирования скорости резорбции за счет одновременно ионных замещений и образования высокорезорбируемых метастабильных фаз в составе. В представленной работе предложена система $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O-Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}$, которая может быть перспективна и целесообразна для изучения с точки зрения получения многофазного цементного камня. С фундаментальной точки зрения в этой системе интересна разработка многофазных продуктов, определение возможности и эффективности применения одновременно двух способов повышения скорости резорбции в единой системе и возможность прогнозирования поведения в организме в зависимости от исходного состава. По предлагаемой гипотезе, в случае многофазного цемента, содержащего CO_3 -ГАП и ДКФД в качестве метастабильной фазы, возможно увеличение скорости резорбции цементного камня за счет быстрого высвобождения ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} с увеличением площади поверхности, стимулирующим дальнейшее растворение.

Наиболее часто цемент применяется в виде двухкомпонентного продукта: порошок / жидкость затворения, который подлежит замешиванию и заполнению дефекта полученным цементным тестом интраоперационно. Образованный

цементный камень обладает исключительно микропористостью, что делает невозможным проращение в него сосудов и новообразованной костной ткани. Такие формы подачи, как макропористые блоки и гранулы из предварительно затвердевшего кальцийфосфатного цемента, являются перспективным типом матриц для восстановления дефектов костной ткани, поскольку обладают порами или межгранулярным пространством, что обеспечивает высокий остеокондуктивный потенциал таких материалов.

Получение блоков путем сцепления гранул за счет взаимодействия раствора с поверхностью гранул с образованием цемента является малоперспективным направлением, поскольку добиться приемлемой прочности для сохранения формы блоков при укладке в дефект, крайне сложно. Получение макропористых цементных блоков за счет вымывания водорастворимых добавок – перспективный подход, ограничением которого является химическая природа растворимых гранул, состав которых при неполном удалении может оказывать негативный эффект при имплантации или влиять на фазовый состав цементного камня при гидратации. В диссертационной работе кальцийфосфатные цементы представлены в форме гранул и макропористых блоков, снижение механической прочности которых при получении скомпенсировано использованием подпрессовки. Разработанная технология получения макропористых блоков позволяет сохранить инкорпорированные на стадии смешения компонентов функциональные вещества, что является одним из основных достоинств кальцийфосфатных цемента. Схватывание и твердение цемента с небольшим или нулевым экзотермическим эффектом позволяют сохранять термочувствительные терапевтические молекулы.

Функционализация кальцийфосфатных цемента, полученных по низкотемпературной технологии с пролонгацией высвобождения, представляет большой клинический интерес для лечения или профилактики различных заболеваний костной ткани, в частности, септических воспалений. В научной литературе рассматривается инкорпорирование различных антибактериальных субстанций в цемент, однако функционализация цемента антибактериальными веществами и возможность их использования для лечения гнойно-септических

воспалений с учетом фазового состава цементного камня не рассматривалась комплексно в научной литературе, а функционализация макропористых блоков на основе цемента объемным инкорпорированием антибиотиков – новое перспективное направление исследований.

На основании проведенного анализа литературных данных сформулирована **цель диссертационной работы:** разработка кальцийфосфатных биоцементов с управляемыми резорбцией и высвобождением функциональных веществ для повышения эффективности устранения костных дефектов и лечения воспалительных заболеваний костной ткани.

В соответствии с поставленной целью в представленной работе рассматривались следующие **задачи:**

1. Исследование зависимости фазового состава цементного камня от соотношения исходных компонентов системы $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O-Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}$ с возможностью прогнозирования для оптимизации конечного состава;
2. Установление влияния фазового состава цементного камня на его физико-технические, физико-химические, физико-механические свойства и поведение *in vivo*;
3. Разработка условия получения макропористых блоков по цементной технологии с возможностью сохранения водорастворимых инкорпорированных функциональных веществ;
4. Исследование скорости высвобождения антибиотика из кальцийфосфатных гранул, полученных по цементной технологии, в зависимости от фазового состава цементного камня и природы антибактериальной субстанции, их эффективность в лечении гнойно-септических воспалений костной ткани;
5. Установление кинетических особенностей выхода антибиотика в зависимости от его концентрации и макропористости кальцийфосфатных матриц и изучение поведения *in vivo*;

6. Разработка серии высокорезорбируемых брушитно-ньюберитных цементов и выявление закономерности свойств и кинетических особенностей их резорбции *in vitro* и *in vivo* в зависимости от исходного состава;

7. Изготовление опытной партии медицинского изделия на основе кальцийфосфатного цемента для проведения технических, токсикологических и клинических исследований в рамках регистрации медицинского изделия в Росздравнадзоре.

2 МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика исходных материалов

Для проведения работы необходимо рассмотреть исходные материалы для синтеза веществ, используемых при исследовании процессов лечения костных тканей.

2.1.1 Карбонат кальция

В работе использовался коммерческий карбонат кальция (ч.д.а) структуры кальцита, термообработанный при 400 °С в течение 3 часов. Процесс термообработки обусловлен необходимостью снижения суммарного содержания водорастворимых нитратной $N-NO_3^-$ и аммонийной $N-NH_4^+$ форм азота в материале, присутствие которого связано с возможным конверсионным способом получения карбоната кальция при взаимодействии $Ca(NO_3)_2$ и $(NH_4)_2CO_3$. При температуре 400 °С степень удаления по ионам NO_3^- и NH_4^+ составляет 40-50% [338].

По результатам дифференциально-термического анализа используемого в работе карбоната кальция в температурном диапазоне от 250 до 400 °С потери массы составляют 0,083% (рисунок 2.1). Потеря массы при в температурном диапазоне от 560 до 910 °С составляет 43,964%, потеря массы в данном температурном диапазоне объясняется процессом разложения карбоната кальция с выделением газообразного CO_2 . Таким образом содержание основного компонента ($CaCO_3$) в исследуемом карбонате кальция составляет 99,92% масс.

По данным РФА коммерческий $CaCO_3$, термически обработанный при температуре 400 °С, является однофазным [072-1937 PDF-2]. Площадь поверхности $CaCO_3$ $S_{пов-ти} = 2,2683$ м²/г, средний размер частиц $[D4,3] = 8,82$ мкм, что подтверждается данными сканирующей электронной микроскопии (рисунок 2.2).

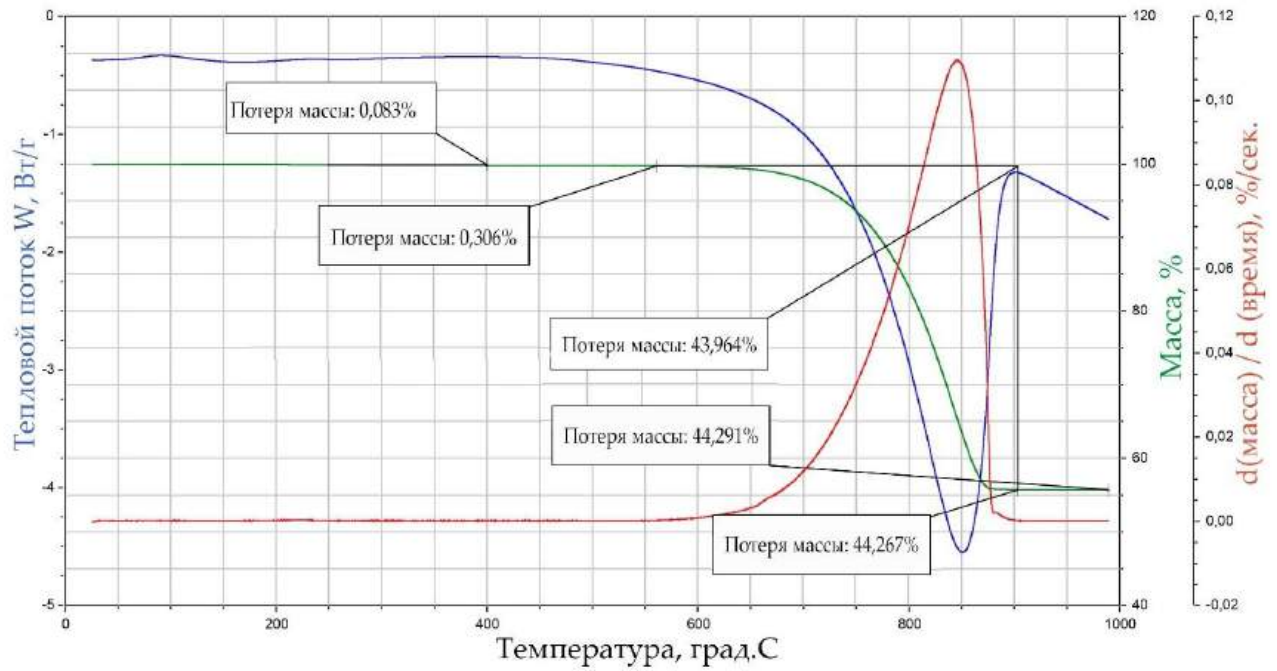


Рисунок 2.1 – Дериватограмма CaCO_3 :

синей линией обозначен тепловой поток (Вт/г); зеленой – масса (%); красной – производная массы образца по времени, выраженную в процентах от начальной массы в сек. (%/сек.)

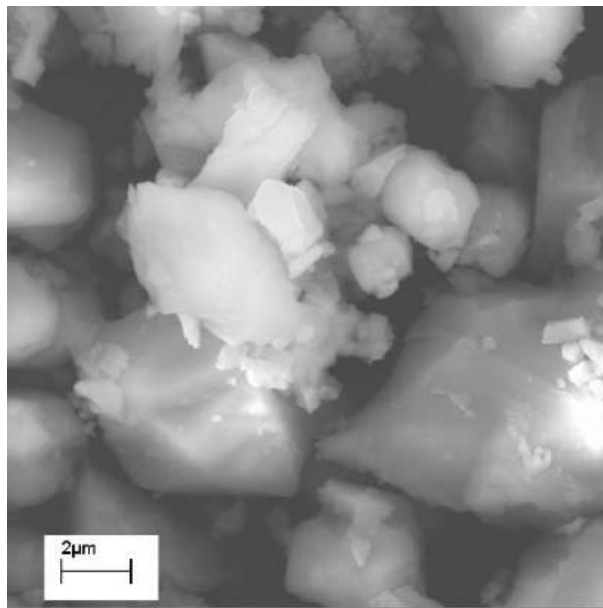
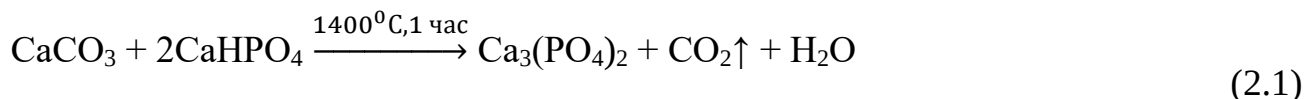


Рисунок 2.2 – Микроструктура CaCO_3 . Увеличение X1000

2.1.2 α -трикальцийфосфат

α -трикальцийфосфат (α -ТКФ) был получен в ходе твердофазного синтеза в соответствии с реакцией:



CaHPO_4 получали растворным синтезом при взаимодействии $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ с $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ с последующей сушкой при 250°C в течение 7 часов:

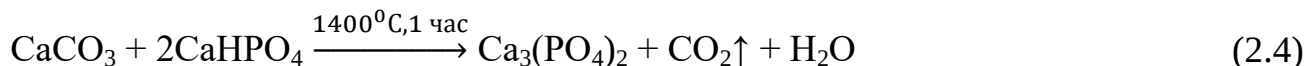


ТКФ имеет три полиморфные формы (β , α и α'), из которых α' является стабильной только при температуре выше 1430°C . Переход β в α , согласно диаграмме Крейдлера и Хаммеля [339] происходит при 1125°C .

Много работ посвящено влиянию метода охлаждения на обратный частичный фазовый переход β -модификации ТКФ в α . В некоторых работ сообщается о необходимости быстрого охлаждения для предотвращения перехода β в α [340–343]. В других – что при скорости охлаждения $5^\circ/\text{мин}$, полиморфного превращения не происходит [344–346]. Если рассматривать этот вопрос, не затрагивая наличия примесных элементов, которые являются стабилизаторами той или иной модификации (Si, Mg, Sr), то, в соответствии с исследованиями авторов [128], три формы α -ТКФ, полученные при разных способах охлаждения, отличаются кристалличностью и содержанием β -ТКФ: охлаждением со скоростью $10^\circ/\text{мин}$; охлаждением струей холодного воздуха и охлаждением ударами по материалу молотком из нержавеющей стали. Наиболее быстрое охлаждение позволяет получить менее кристаллическую форму α -ТКФ и меньшее содержание β -ТКФ в конечном составе (4,4% против 7% в работе Moreno [128]).

Поскольку растворимость β -модификации ТКФ ниже растворимости α -модификации, с целью достижения более высокой степени конверсии ТКФ в кальцийдефицитный ГАП (КГАП) и, соответственно, более высокой прочности, необходимо уменьшать количество β -ТКФ.

При твердофазном синтезе при температуре 1400 °С и выдержки 1 час в одну ступень в соответствии с реакцией:



был получен двухфазный продукт, содержащий 87% α -модификации ТКФ [070-0364 PDF-2] и 13% β -модификации [070-2065 PDF-2] (расчет проводился по корундовым числам присутствующих фаз) от общей смеси компонентов (рисунок 2.3).

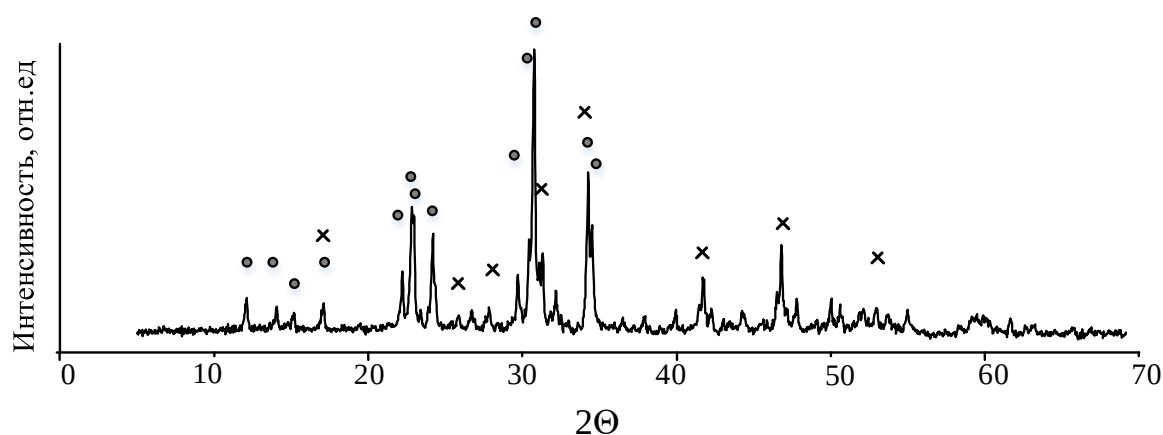


Рисунок 2.3 – Дифрактограмма ТКФ: ● α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; × β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

С целью предотвращения обратного перехода α -ТКФ в β -ТКФ использовалось резкое охлаждение материала на воздухе.

Скорость охлаждения обратно пропорциональна кристалличности [128], которая влияет на реакционную способность и, как следствие, интегральную полноту протекания реакции [84]. При гидролизе α -ТКФ образование кальцийдефицитного гидроксипатита (КГАП) начинается с растворения аморфной фазы ТКФ, позже присоединяется растворение кристаллической фазы, причем образование КГАП отстает от растворения кристаллического ТКФ, что, как предполагают Hurler и коллеги, связано с образованием первоначально аморфной фазы, похожей на так называемые кластеры Познера [347], являющимися структурными единицами КГАП. Таким образом, аморфная фаза способна уменьшить начальные сроки схватывания цемента, что является положительным моментом. Кроме того, более быстрое растворение частиц, пересыщение и образование кристаллических зародышей способствует осаждению более мелких

кристаллов, количество контактов между которыми сказывается на прочности цементного камня. Однако более быстрое растворение частиц происходит и при уменьшении размера частиц исходных компонентов, что оказывает положительное влияние на реакционную способность, полноту протекания реакции и, как следствие, прочность [348].

В данной работе не рассматривали вопросы влияние скорости охлаждения и содержания аморфной фазы на процесс структурообразования, но изучали влияние гранулометрического состава исходного α -ТКФ на свойства цемента.

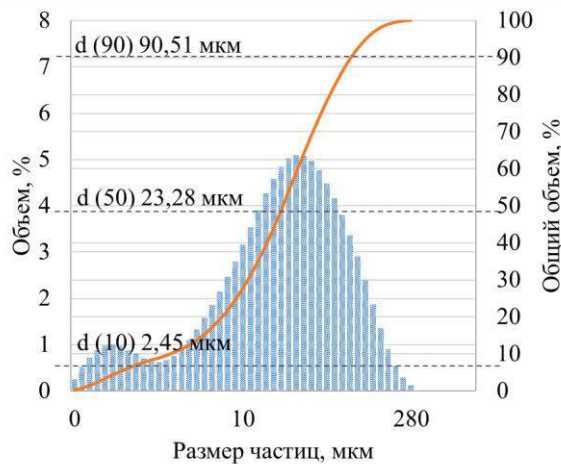
Для изучения влияния грансостава на свойства цемента полученный в ходе твердофазного синтеза спеки α -ТКФ были измельчены в шаровой мельнице 30 мин. (далее – α -ТКФ_ш), и 5 мин. (далее – α -ТКФ₅), 15 мин. (далее – α -ТКФ₁₅) и 30 мин. (далее – α -ТКФ₃₀) в мельнице планетарного типа в среде ацетона (квалификация «ч.д.а») с последующей сушкой материала при 50 °С. Для измельчения были использованы цилиндрические барабаны с шарами из диоксида циркония при соотношении масса порошка/масса шаров = 1/3. Общий объем шаровых загрузок в обеих мельницах составляет 50 % от рабочего объема барабанов. В шаровой мельнице объемом барабана 3 л, диаметр шаров 30 мм. В планетарной мельнице объем барабана 0,5 л, диаметр шаров 10 мм.

Площадь поверхности измельченного при разных режимах α -ТКФ и средний размер его частиц определяли с помощью лазерного дифракционного анализатора Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd (Великобритания) (характеристики указаны в разделе 2.2). Результаты определения гранулометрического состава представлены в таблице 2.1. Средний размер сферы, эквивалентной по объему измеряемой реальной частицы $D[4,3]$ – средний размер частиц, и удельная площадь поверхности уменьшается при использовании планетарной мельницы в дополнение к шаровой и при увеличении времени измельчения.

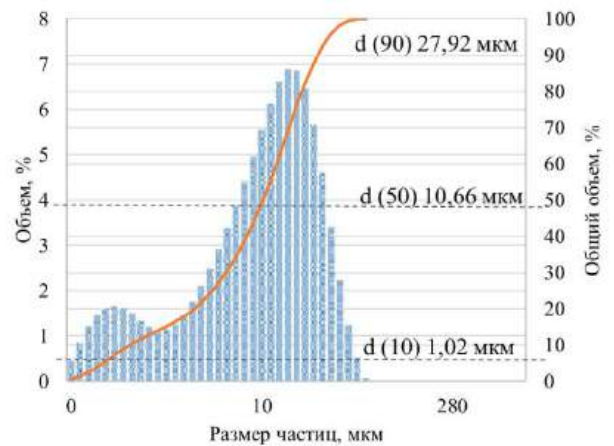
Таблица 2.1 – Площадь поверхности, средний размер частиц α -ТКФ при разных режимах измельчения

Параметр \ Время, мин	τ измельчения α -ТКФ, мин.			
	в шаровой мельнице (α -ТКФ _ш)	в планетарной мельнице		
		5 (α -ТКФ ₅)	15 (α -ТКФ ₁₅)	30 (α -ТКФ ₃₀)
$S_{\text{пов-ти}}, \text{м}^2/\text{г}$	1,1080	1,8119	2,1921	3,1503
$D[4,3], \text{мкм}$	37,02	12,95	9,54	6,12

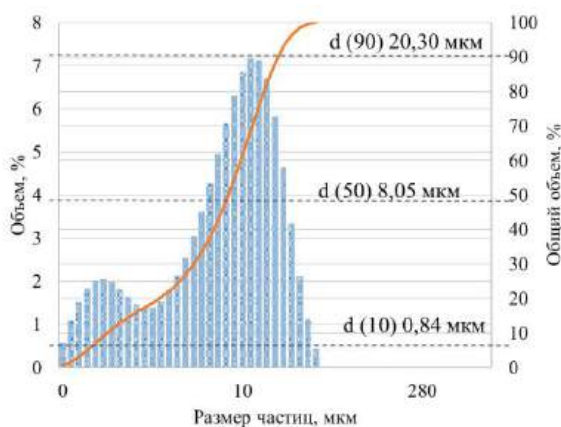
α -ТКФ, измельченный в течение разного времени, имеет бимодальное распределение во всех вариантах. При измельчении в мельнице планетарного типа в течение 5 мин. (α -ТКФ₅), характеристики распределения частиц по размерам значительно меняются по сравнению с α -ТКФ_ш (рисунок 2.4).



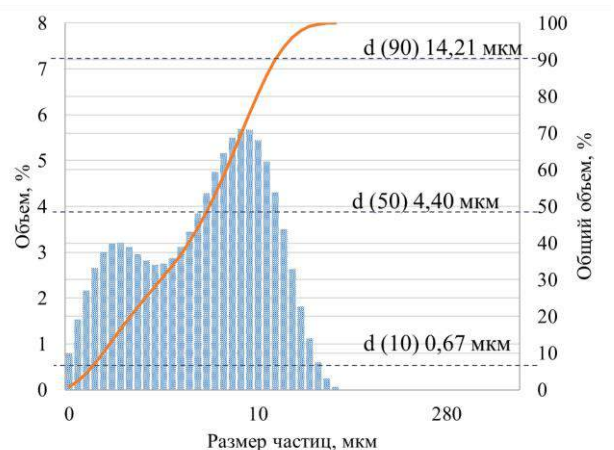
а



б



в



г

Рисунок 2.4 – Распределение частиц по размерам после измельчения: а – в шаровой мельнице 30 мин.; б-г – в планетарной мельнице в течение: 5 мин. (б), 15 мин. (в) и 30 мин. (г)

Максимумы распределения частиц по размерам, смещаются в сторону меньших значений, происходит сужение распределения. В следующие 10 мин. измельчения (α -ТКФ₁₅) распределение меняется в меньшей степени. При измельчении в течение 30 мин. (α -ТКФ₃₀) соотношение максимумов уменьшается.

Синтезированный и измельченный α -ТКФ является в основе своей кристаллическим, поскольку на дифрактограмме присутствуют четкие пики, что не исключает присутствия незначительного количества аморфной фазы. Микроструктура α -ТКФ представлена на рисунке 2.5.

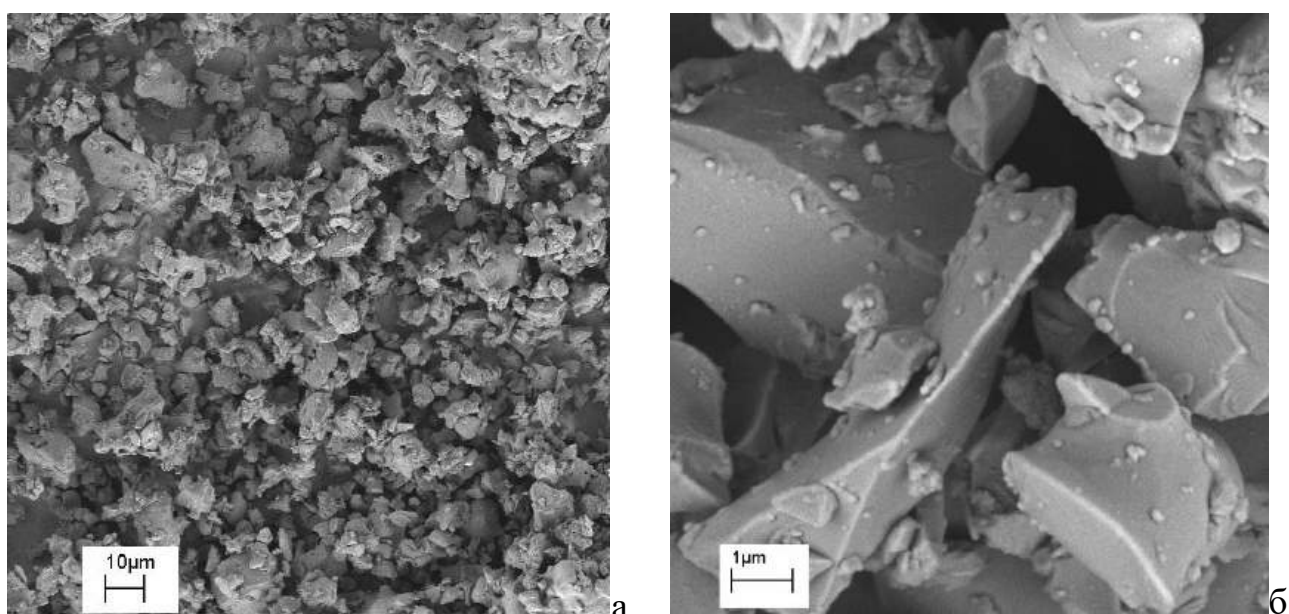


Рисунок 2.5 – Микроструктура ТКФ: а – увеличение X1000; б – увеличение X18000

2.1.3 Монокальцийфосфат моногидрат

В работе использовался коммерческий монокальцийфосфат моногидрат (МКФМ) (ч.д.а). По результатам рентгенофазового анализа все обнаруженные пики соответствуют одной фазе – монокальцийфосфата моногидрата [075-1521 PDF-2] (рисунок 2.6).

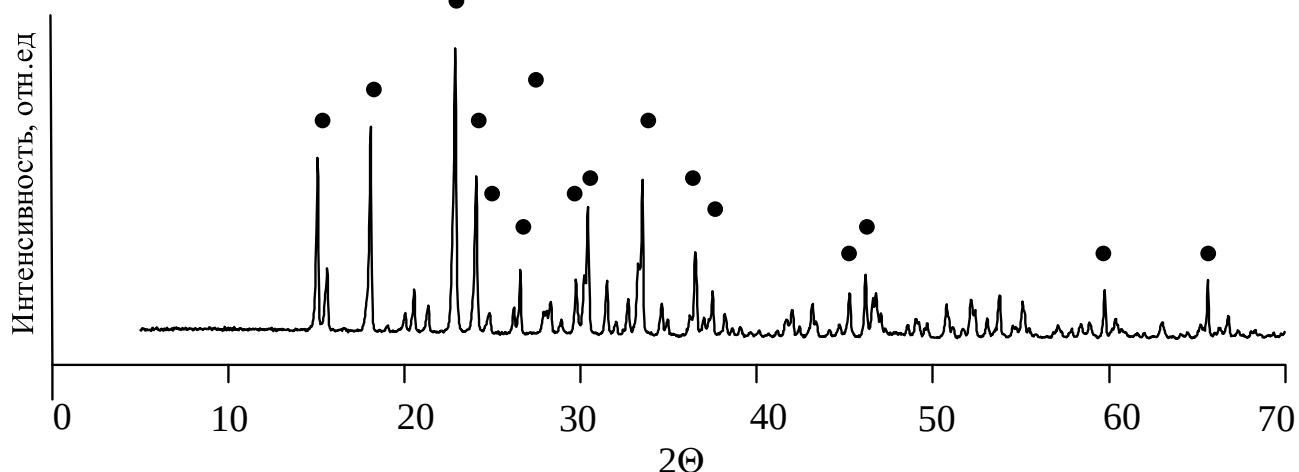


Рисунок 2.5 – Дифрактограмма МКФМ: • - МКФМ

2.1.4 Магнийзамещенный трикальцийфосфат $\text{Mg}_x\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$

$\text{Mg}_x\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ был получен в ходе твердофазного синтеза гомогенной смеси предшественников CaHPO_4 , CaCO_3 , $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ в соответствии с Таблицей 2.2 при температуре 1000 °С в течение 6,5 часов. Спеченный материал измельчали шариками из диоксида циркония в планетарной или шаровой мельнице в среде ацетона (квалификация «ч.д.а») с последующей сушкой материала при 50 °С. Для измельчения были использованы цилиндрические барабаны с шарами из диоксида циркония при соотношении масса порошка/масса шаров = 1/3. Общий объем шаровых загрузок в обеих мельницах составляет 50 % от рабочего объема барабанов. В шаровой мельнице объемом барабана 3 л, диаметр шаров 30 мм. В планетарной мельнице объем барабана 0,5 л, диаметр шаров 10 мм.

Таблица 2.2 – Соотношение исходных компонентов для получения $\text{Mg}_x\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$

Обозн. состава	x в формуле	Количество исходных компонентов, моль			
		CaHPO_4	CaCO_3	$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$	$\text{Mg}(\text{OH})_2$
Mg0	0	2	1	0	0
Mg0.75	0,75	3	1,5	0,5	0,5
Mg1.5	1,5	1	0,5	0,5	0,5
Mg2.25	2,25	1	0,5	1,5	1,5
Mg3	3	0	0	1,5	1,5

Продуктами твердофазного синтеза являются магний-кальцийфосфаты переменного состава с общей формулой $\text{Mg}_x\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ с $x=0$ (Mg_0), $x=0,75$ ($\text{Mg}_{0.75}$), $x=1,5$ ($\text{Mg}_{1.5}$), $x=2,25$ ($\text{Mg}_{2.25}$) и $x=3$ (Mg_3). На рисунке 2.7 показаны дифрактограммы порошков фосфата магния и кальция. Дифрактограмма $\text{Mg}_x\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ Mg_0 соответствует β -трикальцийфосфату (72-7587 PDF-2), $\text{Mg}_x\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ Mg_3 – тримагнийфосфату (79-8260 PDF-2), $\text{Mg}_{1.5}$ – магнийкальцийфосфату $\text{Mg}_3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_4$, имеющего структуру минерала стенфилдита (73-1182 PDF-2). Дифрактограмма $\text{Mg}_{0.75}$ содержит пики, характерные для β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, имеющего структуру минерала витлокита (87-1582 PDF-2), и пики, характерные для $\text{Mg}_3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_4$. Наряду с пиками $\text{Mg}_3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_4$ (73-1182 PDF-2) дифрактограмма $\text{Mg}_x\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ $\text{Mg}_{2.25}$ содержит пики, характерные для тримагнийфосфата $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ (79-8260 PDF-2).

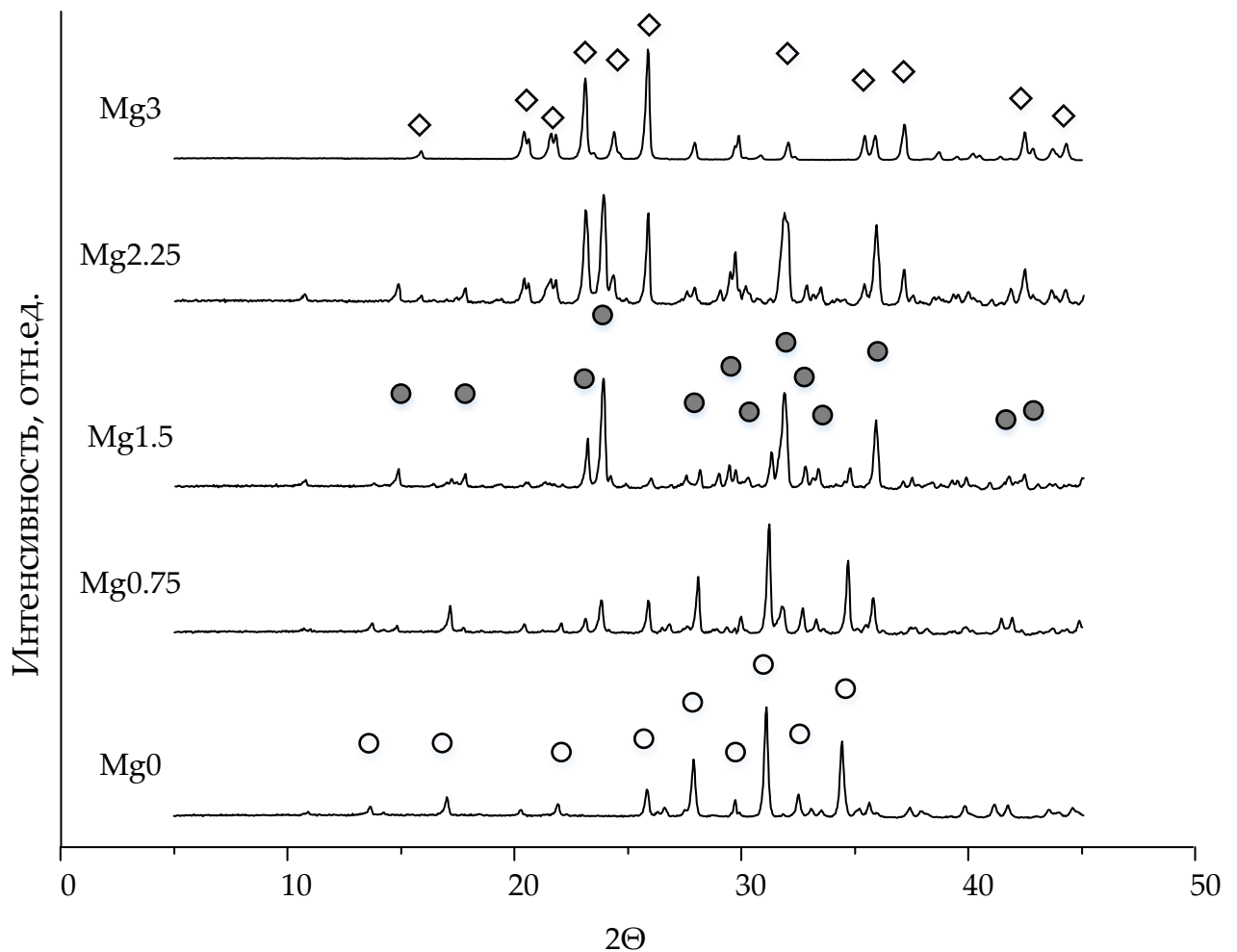


Рисунок 2.7 – Дифрактограммы порошков $\text{Mg}_x\text{Ca}_{3-x}(\text{PO}_4)_2$ для Mg_0 , $\text{Mg}_{0.75}$, $\text{Mg}_{1.5}$, $\text{Mg}_{2.25}$, Mg_3 , где $\circ$ β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; $\bullet$ $\text{Mg}_3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_4$; $\diamond$ $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$

Средний размер частиц полученных порошков (точнее интегральное значение объемной доли частиц, имеющих меньший диаметр составляет 50%), согласно динамическому анализу цифровых изображений в соответствии со стандартом ISO 13322-2, полученному с помощью анализатора размера и формы частиц CAMSIZER ® X2, 11,9-15,8 мкм (таблица 2.3). Удельная площадь поверхности представляет собой отношение поверхности всех частиц к массе всех частиц при заданной плотности материала. Результаты определения размера частиц и площади поверхности были выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения трехкратных определений.

Таблица 2.3 – Площадь поверхности, средний размер частиц порошка $\text{Mg}_x\text{Ca}_{3-x}(\text{PO}_4)_2$ для Mg0, Mg0.75, Mg1.5, Mg2.25, Mg3

Параметр	Mg0	Mg0.75	Mg1.5	Mg2.25	Mg3
Площадь поверхности, $\text{см}^2/\text{г}$	1858,5	1846,1	2026,0	1771,9	2023,1
Средний размер частиц, мкм	13,43 $\pm$ 0,2	14,56 $\pm$ 0,22	11,91 $\pm$ 0,19	14,46 $\pm$ 0,21	15,78 $\pm$ 0,17

Замещение ионов кальция на ионы магния при получении прекурсора цемента $\text{Mg}_{0.75}\text{Ca}_{2.25}(\text{PO}_4)_3$ привело к смещению дифракционных пиков в сторону более высоких значений 2θ , что было связано с меньшим размером ионов магния (0,72 Å) по сравнению с размерами ионов кальция (0,100 Å) [369], что согласуется с литературными данными [131].

2.2 Методы исследования кальцийфосфатных цемента

Рентгенофазовый анализ (РФА) проводился с использованием:

- рентгеновского дифрактометра ARL Equinox 1000 (Thermo Fisher Scientific INEL SAS, Франция). Съемка была проведена в режиме отражения с использованием излучения $\text{CuK}\alpha$ (интервал углов 2θ : от 5° в 45° или 68° , шаг 2θ 0.03°). Время экспозиции составляло 5 с/шаг;

- рентгеновского дифрактометра D/Max-2500 с вращающимся анодом (Rigaku). Съемка была проведена в режиме отражения с использованием $\text{CuK}\alpha$

(интервал углов $2\theta = 2 - 70^\circ$, шаг по 2θ $0,02^\circ$, скорость регистрации спектров $1^\circ/\text{мин}$).

При качественном анализе полученных рентгеновских дифрактограмм использовалось программное обеспечение WinXPOW и база данных ICDD PDF-2.

При количественном анализе использовался метод эталонного отношения интенсивности (с отношением интенсивности I/I_c наиболее сильных линий вещества и корунда ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) в смеси, содержащей 50 мас. % обоих компонентов). (Метод Чанга) [Hubbard, 1976]. Массовую долю рассчитывали с использованием соотношения:

$$\omega_A = \frac{I_{iA} / (I / I_c(A) \cdot I_{iA}^{rel})}{\sum I_{iK} / (I / I_c(K) \cdot I_{iK}^{rel})}$$

где I_{iA} - измеренная интенсивность i -го отражения от фазы А; I_{iA}^{rel} - относительная интенсивность этого отражения в базе данных; $I/I_c(A)$ - корундовое число для определяемой фазы А; и I_{iK} , I_{iK}^{rel} , $I/I_c(K)$ - соответствующие величины для всех компонентов смеси (включая А). Расчет проводился по характерным линиям, на которые не накладываются линии других фаз. Рентгеновские измерения для всех исследованных композиций повторяли два или три раза в двух или трех независимых образцах. Результаты определения РФА были выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения трехкратных определений в экспериментах *in vitro* и двухкратных определений в экспериментах *in vivo*.

Микроструктуры изучали на сканирующих электронных микроскопах:

- LEO SUPRA 50VP (Carl Zeiss) с автоэмиссионным источником. Хром напыляли на образцы с помощью автоматической напылительной установки Quorum Q150T ES;

- Phenom XL G2 (Thermo Fisher Scientific). Ускоряющее напряжение 15кВ. Серебро напыляли магнетронным напылителем Cressington 108auto (Cressington Scientific Instruments Ltd).

Элементный анализ проводился посредством специального детектора (энергодисперсионного спектрометра), обработка – в программе INCA – Point&ID.

Результаты определения EDX были выражены в виде значения однократного определения.

ИК-спектры были сняты в ИК-спектрометре с Фурье преобразованием Perkin Elmer Spectrum One в режиме пропускания в диапазоне 4000–400 см^{-1} с разрешением 1 см^{-1} . Для съемки ИК спектров в режиме пропускания была использована методика прессования образца с KBr. 0,3–0,5 мг исследуемого образца тщательно растирали и перемешивали с 50 мг порошка KBr в агатовой ступке. Образец прессовали с помощью ручного пресса в пресс – форме, сводя рукоятки пресса максимально близко.

Гранулометрический состав изучали с помощью анализатора размера и формы частиц CAMSIZER ® X2 (MICROTRAC RETSCH GmbH, Германия). Принцип работы анализатора – оптический, диапазон показаний размеров частиц от 0,8 мкм до 3 мм. Пределы допускаемой относительной погрешности для D50 (средний диаметр половины всех частиц – или точнее диаметр, определяющий границу, для которой интегральное значение объемной доли частиц, имеющих меньший диаметр составляет 50%) $\pm 15\%$.

или с помощью Лазерного дифракционного анализатора Malvern Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd (Великобритания). Принцип действия основан на расшифровке дифракционной картины, образующейся в результате рассеяния лазерного излучения на исследуемых микрочастицах (в диапазоне 0,3–300 мкм). Специальный многоэлементный детектор измеряет угловое рассеяние и соответствующее ему распределение интенсивности, которое с помощью компьютерной программы пересчитывается в распределение частиц по размерам. Погрешность $\pm 2\%$.

Результаты определения размера частиц и площади поверхности были выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения трехкратных определений.

Волюметрическое исследование основано на измерении выделенного углекислого газа в результате действия раствора соляной кислоты 1:1 ($\rho=1,19$) на цемент с помощью кальциметра.

Содержание CO_2 , мг, рассчитывается по формуле:

$$\text{CO}_2 = CV,$$

где V – объем высвобождаемого CO_2 , мл;

C – масса 1 мл CO_2 при температуре и атмосферном давлении эксперимента, мг.

Калориметрическое исследование проводили на изотермическом микрокалориметре TAM Air (TA Instruments, США). Температура съемки 25 °С.

Энтальпии образования веществ и ионов, используемые для расчета энтальпий образования реакций, в соответствии со справочными данными, представлены в Таблице 2.4.

Таблица 2.4 – Энтальпии образования веществ и ионов, используемые для расчета энтальпий образования реакций

Вещества и ионы	Энтальпия образования, кДж/моль
$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-4129
$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-4120,8
$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	- 3790,28
$\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	-2638,8
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-3410
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-2404
H^+	0
Ca^{2+}	-543,1
H_2PO_4^-	-1303,4
H_2O	-286
HPO_4^{2-}	-1290,6
$\text{CO}_2 \text{ г.}$	-393,51
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	-13686,6
Mg^{2+}	-468,1
CaCO_3	-1207,68
PO_4^{3-}	-1284,93

Для расчета стехиометрических формул составов в фигуративных точках 1 г цементного камня был растворен в 20 мл 1н HCl с последующей нейтрализацией 1н раствором NaOH . Концентрация ионов кальция оценивалось на спектрофотометре PE540054005400 НА (Экрос, Россия) при длине волны 570 нм при образовании окрашенного комплекса ионов кальция с о-крезолфталеиновым

комплексом в щелочной среде. Концентрация ионов фосфора оценивалось на спектрофотометре PE540054005400 НА (Экрос, Россия) при длине волны 340 нм при образовании фосфорномолибденового комплекса ионов фосфора с молибдатом аммония в кислой среде.

Растворимость оценивали путем измерения концентрации ионов кальция в физиологическом растворе (0,9%-ный раствор NaCl). Образцы цементного камня погружали в физиологический раствор с соотношением массы твердого вещества и жидкости 1 г/10 мл. Их выдерживали в шейкере-инкубаторе IKA KS 3000 (IKA ® -Werke GmbH & Co. KG, Германия) при температуре 37°C и скорости вращения 120 rpm в течение срока измерения. При выборе аликвоты она была заменена свежим раствором. Концентрацию ионов кальция в физиологическом растворе определяли на спектрофотометре PE540054005400 НА (Экрос, Россия) при длине волны 570 нм при образовании окрашенного комплекса ионов кальция с о-крезолфталейновым комплексом в щелочной среде. Результаты определения концентраций кальция и магния в растворе были выражены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения трехкратных определений.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса ЯМР ^1H выполнялась на спектрометре «Bruker Advance-400» (рабочая частота 400 МГц) при комнатной температуре в CDCl_3 . Образцы для ЯМР готовили путем 4-х кратной экстракции измельченного материала в хлористом метиле в ультразвуковой бане без нагревания в течение 10 мин., центрифугирования и упаривания экстракта в вакууме. Остаток растворяли в 0,6 мл CDCl_3 .

Хлористый метилен при определении остаточного парафина использовался в количестве 6 мл, при определении ПЭГ – 3 мл. При определении содержания групп CH_2 и CH_3 значения химических сдвигов были измерены относительно тетраметилсилана. Соотношение $[\text{CH}_2]/[\text{CH}_3]$ определяли интегрированием сигналов с $\delta = 1.25$ м.д. и $\delta = 0.88$ м.д. соответственно.

При исследовании полноты удаления ПЭГ использовали в качестве внутреннего стандарта фенантрен.

Механическую прочность материалов определяли на образцах 10x10x30 мм посредством универсальной испытательной машины LFV 10-50T (Walter + Bai AG) при скорости нагружения 8 мм/мин.

Предел прочности при изгибе ($R_{изг.}$) вычисляют по формуле:

$$R_{изг.} = \frac{3 \cdot Pl}{2bh^2}$$

где P – нагрузка, МПа; l – расстояние между роликами нижней изгибающей пластины; b – ширина образца, см; h – толщина образца, см².

Предел прочности при сжатии ($R_{сж.}$) вычисляют по формуле:

$$R_{сж.} = \frac{P}{F}$$

где P – нагрузка, МПа; F – площадь поперечного сечения образца, к которой приложена нагрузка.

Открытая (кажущаяся) пористость $\Pi_{откр.}$ определялась на образцах-балочках размером 10x10x30 мм путем гидростатического взвешивания в инертной жидкости (керосине) и рассчитывалась по формуле:

$$\Pi_{откр.} = \frac{m_1 - m}{m_1 - m_2} \cdot 100$$

где m – масса высушенного цементного камня, г; m_1 – масса цементного камня, насыщенного керосином, измеренная на технических весах, г; m_2 – масса цементного камня, насыщенного керосином, определенная методом гидростатического взвешивания на аналитических весах, г.

Закрытая пористость $\Pi_{закр.}$ рассчитывалась по формуле:

$$\Pi_{закр.} = \Pi_{общ.} - \Pi_{откр.}$$

Общая пористость $\Pi_{общ.}$ рассчитывалась по формуле:

$$\Pi_{общ.} = \frac{\rho - \rho_0}{\rho} \cdot 100,$$

где ρ_0 – объемная масса цементного камня, г/см³; ρ – истинная плотность цементного камня, г/см³.

Объемную массу (ρ_0) определяют по формуле:

$$\rho_0 = \frac{m \cdot \rho_{кер.}}{m_1 - m_2}$$

где $\rho_{\text{кер.}}$ – плотность керосина, г/см³.

Истинная плотность цементного камня определяется пикнометрическим способом и рассчитывается по формуле:

$$\rho = \frac{(m_2 - m_1) \cdot \rho_{\text{кер.}}}{(m_2 - m_1) + (m_4 - m_3)} \cdot 100$$

где m_1 – масса пустого пикнометра, г; m_2 – масса пикнометра с навеской, г; m_3 – масса пикнометра с навеской и жидкостью, г; m_4 – масса пикнометра с жидкостью, г; $\rho_{\text{кер.}}$ – плотность керосина, г/см³.

Микро-КТ образцов цементного камня для визуализации пористости, выполняли на рентгеновском микротомографе Bruker SkyScan 1172 (Бельгия) с шагом вращения 0,4 градуса, разрешением 9 мкм, с помощью программного обеспечения SkyScan. В результате сканирования был получен набор теневых проекций образцов. На основе полученных теневых проекций произведена реконструкция в программе NRecon по алгоритму Фельдкампа. Были выбраны необходимые сечения, параметры реконструкции и динамический диапазон для достижения оптимальной контрастности изображения. Изображения объемных моделей образцов получены с помощью программы CTvox, входящей в пакет программного обеспечения для томографа. Для построения объемных моделей использовался алгоритм Marching Cube, который является алгоритмом построения поверхности на основе модели явного задания шестигранных вокселей, разработанной Лоренсеном и Клайном (1987).

pH среды, контактирующей с материалами, определяли с помощью лабораторного pH-метра Seven Compact S210 (Mettler-Toledo GmbH, Швейцария). Отношение массы гранул цементного камня к массе дистиллированной воды составляло 1:10. pH контактной среды измеряли через 10 мин. выдержки образцов в дистиллированной воде при 37°C и скорости вращения 120 об/мин. Результаты определения pH представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения пятикратных определений.

Определение динамики выхода ванкомицина проводилось одним из следующих методов:

- метод высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Thermo Ultimate 3000RS (колонка Agilent Poroshell 120 El-C18, 3.0x50mm 2.7-micron) (блоки). Методика проведения теста: в коническую колбу емкостью 100 мл, снабжённую магнитной мешалкой (750 оборотов/мин), помещают матрикс размером 10x10x30 мм и прибавляют 100 мл дистиллированной воды. В определенное время производят отбор 500 мкл раствора для анализа, общий объем в колбе восполняют 500 мкл дистиллированной воды. Количественное содержание высвободившегося ванкомицина определяют методом ВЭЖХ-УФ на длине волны 229 нм.

- спектрометрический метод (магнийкальцийфосфатные цементы). Динамику выделения ванкомицина из образцов магнийкальцийфосфатного цемента диаметром 4 мм и высотой 2 мм оценивали путем измерения концентрации ванкомицина в дистиллированной воде. Соотношение массы образцов к жидкости составляло 1/10 мл. Их выдерживали в инкубаторе-шейкере IKA KS 3000 (IKA® - Werke GmbH & Co. KG, Германия) при температуре 37°C и 120 оборотах в минуту в течение 4 дней. При выборе аликвоты она была заменена свежим раствором. Концентрацию ванкомицина в дистиллированной воде определяли на спектрофотометре PE5400 HA (Across, Россия) при длине волны 280 нм.

Для определения спектрометрическим методом исходного содержания ванкомицина в магнийкальцийфосфатных материалах на 1 г цементного камня образцы, изъятые из раствора при последнем измерении, были высушены, измельчены до размера менее 60 мкм и выдержаны в дистиллированной воде при аналогичных условиях в течение 2 суток для полного выхода ванкомицина.

По данным литературы, ванкомицин можно обнаружить с помощью УФ-спектроскопии на длине волны 280 нм [349]. Для подтверждения возможности использования указанной в литературе методики проводилось аналогичное исследование с заменой контактной жидкости со сбалансированного солевого раствора на дистиллированную воду. Обнаружили, что при замене контактной жидкости при длине волны 280 нм также образуется прямолинейная зависимость оптической плотности от концентрации ванкомицина в диапазоне от 31,25 до

500 мкг/мл (рисунок 2.8) и вывели уравнение зависимости по аппроксимирующей калибровочной прямой.

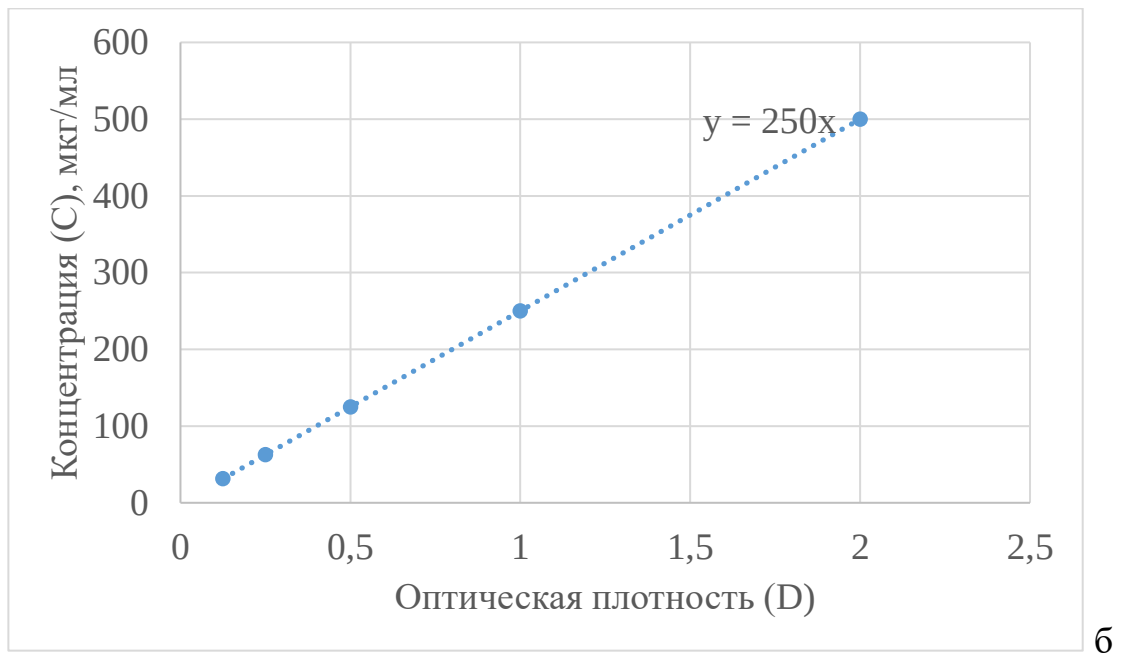
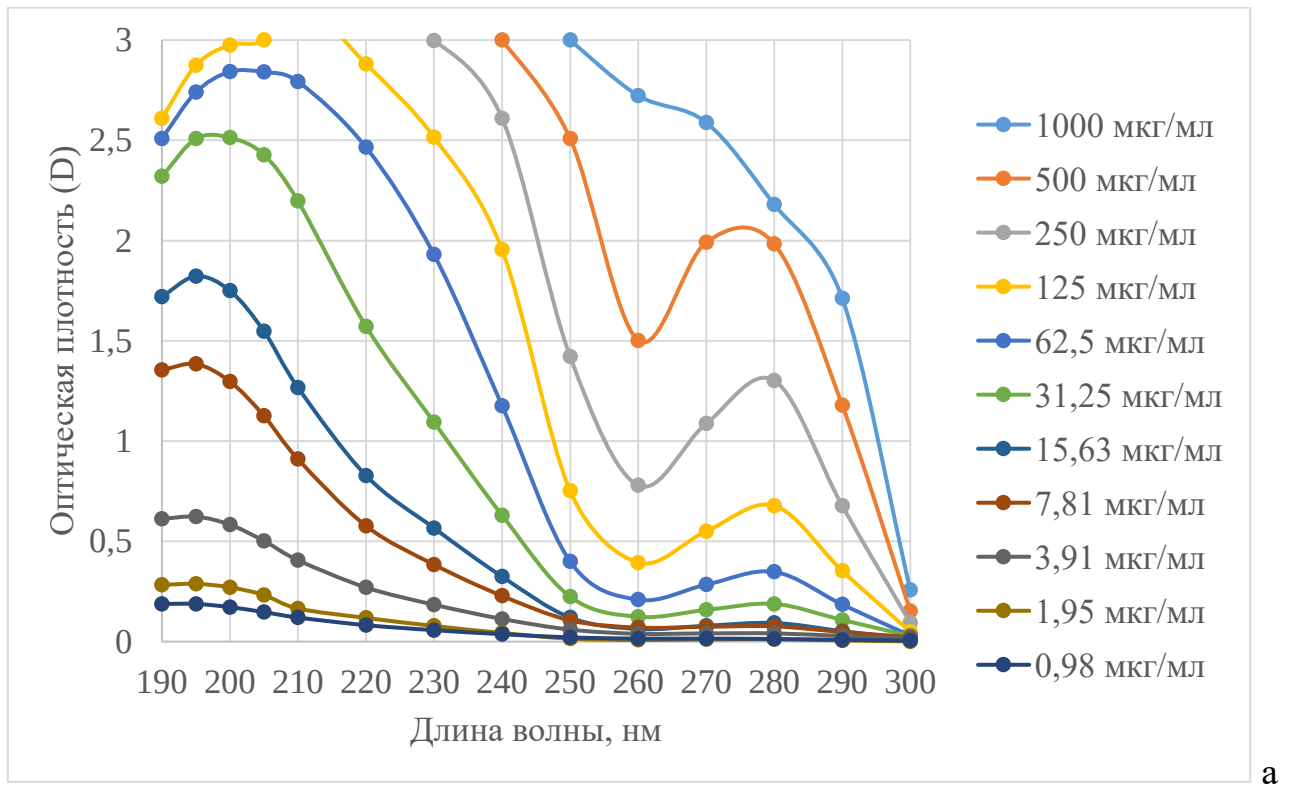


Рисунок 2.8 – Экспериментальные спектры оптического поглощения при варьировании концентрации ванкомицина в дистиллированной воде (а) и Калибровочная зависимость концентрации ванкомицина в растворе воды от оптической плотности (D) (б)

Для построения калибровки в качестве калибровочных растворов применяли стандартные растворы ванкомицина в воде. Для этого был взят лиофилизат (порошок) ванкомицина гидрохлорида для инъекций, в дозе 10 мг. Лиофилизат разводился в 10 мл дистиллированной воды до концентрации $C=1000$ мкг/мл под контролем аналитических весов HR-250AZG (AND, Япония). Далее из раствора полученной концентрации удалялось 5 мл жидкой фракции, которые замещались 5 мл BSS. Таким образом, получался раствор с уменьшенной вдвое концентрацией, после чего производилась серия последующих разведений с последовательным двукратным уменьшением концентрации раствора. В итоге было получено 11 растворов объемом 5 мл с $C=1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91; 1,95$ и $0,98$ мкг/мл. Полученная при аппроксимации градуировочная функция линейная $C=250 \cdot D$.

Адсорбция ванкомицина на исходных компонентах цемента и цементном камне. Для определения количественной адсорбции лекарственного средства на исходных компонентах цемента и конечном составе цементного камня фигуративной точки 5, по 500 мг α -ТСР, CaCO_3 и цементного камня, измельченного и просеянного через сито 80 мкм, смешивали с 5 мл исходного раствора гидрохлорида ванкомицина в концентрации 0,2 мг/мл с помощью вортекс-миксера (Bio RS-24 Mini Rotator, BioSan, Рига, Латвия) ($n = 5$) с непрерывным вращением в течение 1 ч. После этого твердую и жидкую фазы разделяли центрифугированием (SL 40R, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс, США) в течение 15 мин при 4500 об/мин. Концентрацию препарата в надосадочной жидкости определяли методом ультрафиолетовой спектроскопии на спектрофотометре PE5400 НА (Across, Россия) при длине волны 280 нм. На основании концентрации препарата в надосадочной жидкости можно было рассчитать долю адсорбированного препарата.

Определение антибактериальной активности проводилось путем замера диаметра зон задержки роста бактериальных культур. Для имитации физиологических условий выхода была выбрана модель экспозиции 150 мг материала в 1 мл раствора натрия хлорида в концентрации 0,9% (0,9% NaCl) и

инкубацией при температуре 37°C в течении 24 часов. После 24 часов раствор отбирали и вносился свежий раствор. Отобранный объем шел в опыт лунко – диффузного определения чувствительности бактерий к антибиотику (диффузный метод с применением лунок в толще агара). Размер лунки: $d = 5\text{ мм}$, $V = 15\text{ мкл}$.

В качестве испытуемых бактериальных культур использовали музейные референс штаммы медицинского института РУДН им. Патриса Лумумбы из перечня:

- 1) золотистого стафилококка *S. aureus* ATCC 6538 (Гр+),
- 2) кишечной палочки *E. coli* ATCC 25982 (Гр-),
- 3) синегнойной палочки *P. aeruginosa* 3057 (Гр-).

Культивация бульонной культуры бактериальных штаммов проводилась после размораживания, объемом 100 мкл / 1 депонатор вносили в 10 мл сердечно-мозговой бульон (HIMEDIA® M210, Индия). Культивировали 24 часа при температуре 37°C.

После культивирования, бульонную культуру объемом 1,5 мл центрифугировали в течение 10 минут – 2400 rpm (центрифуга ELMi SkyLine CM-6M). Бактериальную суспензию для посева готовили из микробного осадка в соответствии стандарту мутности 0,5 (McFarland, HIMEDIA), в 5 мл физиологического раствора (0,9% NaCl). Полученную бактериальную суспензию объемом 100 мкл засеивали методом «газона» на агар Мюллера – Хинтона (HIMEDIA® M211, Индия) – 15 мл среды, чашка 90 мм. После посева, в агаре стерильным металлическим пробойником изготавливали лунки.

Раствор после 24-часовой инкубации при 37°C от опытного образца вносили объемом 15 мкл в лунку. В качестве отрицательного контроль использовали 15 мкл раствора натрия хлорида в концентрации 0,9% (К-), инкубированного в тех же условиях, что и опытные образцы (инкубирование 1 мл раствора NaCl без образцов). В качестве положительного контроля использовали – тест – диск с Ципрофлоксацин (CIP³⁰ – Ciprofloxacin, 30 µg, SD142. HiMedia, Индия) (К₁+) или тест - диск с цефтазидим с клавулоновой кислотой 30 мкг / 10 мкг (CAC, 30/10 мкг/диск/ HIMEDIA®, Индия) Дополнительный положительный контроль

присутствовал в исследовании при необходимости. После 24-часовой инкубации при температуре 37°C чашки извлекали из термостата и измеряли радиус / диаметр зон задержки роста вокруг лунок с образцами и контролями.

Доклиническая оценка разработанных материалов проводилась на 57 самцах крысы линии «Wistar» массов тела 250-300 г. Животных анестезировали последовательным внутримышечным введением 7 мг/кг тилетамина/золазепама (Zoletil ®, лаборатории Virbac, Каррос, Франция) и 13 мг/кг ксилазина гидрохлорида (Merck, Дармштадт, Германия); операционное поле было выбрито и продезинфицировано антисептиком.

В зависимости от используемого матрикса для имплантации в костный дефект или подкожно самцы крыс были распределены на 8 групп: по 3, 9 или 12 особей в каждой группе (число особей указано в результатах доклинических исследований для каждой группы материалов).

Использовались 3 модели оперативного вмешательства, являющиеся хорошо отработанными и общепризнанными методами, позволяющими оценить биосовместимость, резорбируемость и остеокондуктивные свойства остеопластического материала:

- подкожная имплантация. В подкожной клетчатке вдоль позвоночника путем разреза и раздвигания тканей формировались карманы, в которые имплантировались образцы материалов;

- модель костной перфорации критического размера (2/3 диаметра) большеберцовой кости. Во всех случаях материал имплантировался точно в область дефекта, утрамбовывался в костномозговой канал с небольшим избытком за пределами кости;

- модель костной перфорации критического размера (2/3 диаметра) большеберцовой кости с предварительно сформированным гнойно-септическим воспалением с помощью инокуляции золотистого стафилококка $1,5 \times 10^6$ КОЕ в костномозговой канал большеберцовой кости лабораторного животного за 1,5 мес. до имплантации материалов.

Все хирургические процедуры и условия содержания животных соответствовали этическим правилам проведения экспериментов с животными, включая Европейскую директиву FELASA-2010. Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями Локального этического комитета по медицинской и биологической этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова» Минздрава России локального биоэтического комитета (протокол №4 от 5 мая 2021 г. протокол №2, от 2 февраля 2022 г.) при их постановке руководствовались документом «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и № 701 от 24.07.1978 г., «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г. и ГОСТ ISO 10993-2-2011.

Микро-КТ животных и аутопсийного материала проводили на рентгеновском микротомографе Bruker Sky-Scan 1178 (Kontich, Бельгия) при напряжении 65 кВ и токе 615 Ма с фильтром Al 0.5 мм. Пространственное разрешение составляет 84 микрона/пиксель. Реконструкция срезов проводилась с помощью программного обеспечения NRecon v1.6.10.4, денситометрические измерения проводились в программе CTAп v.1.20.3.0. Томографическое исследование проводилось прижизненно после хирургического вмешательства и посмертно.

Оценка резорбции пористых матриксов при имплантации в костную ткань проводилась посредством томографического исследования с определением объема имплантата по ортогональным проекциям зоны интереса с помощью программы FEI Avizo 9.0.1.

Количество потери плотности материала (%) при подкожной имплантации оценивалось по рентгеновской плотности (радиоденсивности) по шкале Хаунсфилда (HU).

Для морфологического исследования при подкожной имплантации образцы капсул соединительной ткани фиксировали в нейтральном забуференном формалине (10%), обезживали и заливали парафином. Были подготовлены срезы

(толщиной 4 мкм) и окрашены гематоксилин-эозином. Изучали при стандартной световой и фазово-контрастной микроскопиях в микроскопе Leica DM 4000 B LED с камерой Leica DFC 7000. В программе ImageJ измеряли толщину капсул (при увеличении 50х) и относительную площадь сосудов (при увеличении 200х). Зрелость рубцовой ткани вокруг образцов оценивали по ее толщине и относительной площади кровеносных сосудов. Высокая зрелость соответствует минимальному воспалению в тканях малой толщины с небольшим количеством сосудов. В программе ImageJ толщина капсул (при 50-кратном увеличении) и относительная площадь сосудов (при 200-кратном увеличении) были измерены по микрофотографиям гистологических срезов. Статистический анализ результатов был проведен с использованием непарного t-критерия Стьюдента, одностороннего ANOVA-теста с последующим сравнительным тестом Тьюки. Результаты считались достоверными при $p \leq 0,05$. Процедура проводилась с помощью GraphPad Prism 7.00. Результаты были представлены в терминах среднего $\pm$ стандартного отклонения.

Для морфологического исследования при использовании модели костной перфорации образцы фиксировали в нейтральном формалине, декальцинировали, обезвоживали, заливали в парафин, получали срезы толщиной 4 микрона. Гистологическое исследование морфологических изменений изучали с помощью стандартной световой микроскопии, фазово-контрастной, поляризационной микроскопиях и микроскопии темного поля в микроскопе Leica DM 4000 B LED с камерой Leica DFC 7000 T. Шлиф-срезы окрашивались гематоксилином и эозином или пикросириусом красным. В программе ImageJ на микрофотографиях при увеличении 50х оценивали относительную площадь остатков имплантата и площадь новообразованной кости. Статистический анализ экспериментальных данных проводился с использованием программного обеспечения GraphPadPrism 10.00 для Windows (GraphPad Software, США). Нормальность распределения определяли с помощью теста Шапиро-Уилка ($\alpha > 0,05$). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного анализа ANOVA с тестом множественного сравнения Тьюки, р-значения $\leq 0,05$ считались

статистически значимыми. Результаты статистического анализа были представлены в виде гистограмм средних значений и ошибок среднего.

При предварительно сформированным гнойно-септическим воспалением проводилась морфологическое исследование биоптатов, взятых с места последующей имплантации материала.

В биоптатах и в аутопсийном материале оценивались морфологические признаки воспаления, некроза и регенерации в области дефекта по 5-балльной шкале в соответствии с таблицей 2.5 (0 – нет, 4 – максимальная интенсивность) (модифицированная шкала по Smeltzer [350]):

Таблица 2.5 – Оценка морфологических признаков

Параметр	Критерий оценки	Баллы
Внутрикостное острое воспаление	отсутствует	0
	от минимального до слабого без формирования абсцесса	1
	от среднего до сильного без формирования абсцесса	2
	от минимального до слабого с формированием абсцесса	3
	от среднего до сильного с формированием абсцесса	4
Внутрикостное хроническое воспаление	отсутствует	0
	от минимального до слабого без выраженного фиброза	1
	от среднего до сильного без выраженного фиброза	2
	от минимального до слабого с выраженным фиброзом	3
	от среднего до сильного с выраженным фиброзом	4
Некроз костной ткани	отсутствует	0
	одиночный фокус некроза без формирования секвестров	1
	множественные фокусы некроза без формирования секвестров	2
	одиночный секвестр	3
	многочисленные секвестры	4
Регенерация костной ткани	отсутствует	0
	слабая регенерация костной ткани	1
	умеренная регенерация костной ткани	2
	выраженная регенерация костной ткани: примерно половина области дефекта занята новообразованной костной тканью	3
	почти вся область дефекта занята новообразованной костной тканью	4

Для статистического анализа нормальность распределения проверялась с помощью критерия Шапиро–Уилка. Были использованы односторонний дисперсионный анализ и сравнительный тест Тьюки. Уровень значимости составил

$p \leq 0,05$. Статистические данные были обработаны в Origin Pro 2021. Результаты были представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартного отклонения. Компактный буквенный дисплей использовался для отображения статистической разницы ($p < 0,05$) между различными материалами в один момент времени.

2.3 Методология проведения исследований

В основу методологии диссертационной работы положены рабочие гипотезы о том, что изменением концентраций исходных компонентов в многокомпонентной цементной системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O возможно управление биологическим поведением цементного камня посредством ионных замещений, наличия метастабильных фаз и скоростью выхода антибактериальных субстанций, объемно наполняющих цементный камень, что повышает эффективность устранения костных дефектов и лечения воспалительных заболеваний костной ткани.

Методология представленной работы включала следующие этапы:

1. Установление зависимости свойств и биологического поведения кальцийфосфатных цементов системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O от исходного состава.

1.1 Исследование фазового состава цементного камня, образованного в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O , систематизируя результаты на фазовой диаграмме состава.

1.2 Исследование свойств цементного камня, полученного в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O в контексте диаграммы «состав-свойство» для управления составом и прогнозирования свойств.

1.3 Медико-биологическое исследование *in vivo* составов цементного камня в сравнительном анализе с результатами исследований *in vitro* для установления зависимостей и возможных корреляций.

2. Разработка технологии создания пористых матриксов на основе цемента.

2.1 Исследование влияния условий гидратации на кинетику образования и свойства цементного камня.

2.2 Сравнительное исследование эффективности применения парафиновых и полиэтиленгликолевых гранул в технологии получения макропористых блоков, основанной на экстракции из цементного камня неводными растворителями и сверхкритическими флюидами органических порообразователей, и доказательство эффективности в экспериментах *in vivo*.

3. Исследование возможности функционализации кальцийфосфатных цемента антибактериальными субстанциями и эффективность их применения в лечении септических воспалений костной ткани.

3.1 Исследование взаимного влияния антибактериальных субстанций и цементной матрицы переменного состава в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}\text{-Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

3.2 Исследование применимости разработанной цементной технологии создания макропористых матриц в качестве системы доставки антибактериальных субстанций для лечения септических воспалений.

4. Исследование возможности управления скоростью резорбции и функционализации высокорезорбируемых брушитно-ньюберитных цемента в системе $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ для эффективного лечения или профилактики септических воспалений костной ткани в локациях с высоким остеогенным потенциалом.

4.1 Исследование возможности регулирования фазового состава цементного камня варьированием соотношения ионов $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ в исходном компоненте $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$.

4.2 Сравнительное исследование свойств различных составов брушитно-ньюберитного цемента в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

3 СИНТЕЗ КАРБОНАТСОДЕРЖАЩЕГО ГИДРОКСИАПАТИТОВОГО ЦЕМЕНТА

Кальцийфосфатные цементы получают из водного раствора одного или нескольких фосфатов кальция. После смешения порошков фосфатов кальция и водного раствора получается паста, которая затвердевает в течение нескольких минут с сохранением объема. Цементы затвердевают, приобретая собственную механическую прочность. Повышению механической прочности способствует выделение частиц неравноосной морфологии (пластинчатых, игольчатых), обеспечивающих механическое зацепление.

Возможно два типа реакций осаждения. Реакции осаждения первого типа проводятся с помощью кислото-основной реакции, т.е. относительно кислый реагирует с относительно основным фосфатом кальция, в ходе чего получается относительно нейтральный. Второй тип реакции осаждения – гидролиз. Хотя реакции образования кальцийфосфатных цементов являются экзотермическими, скорость выделения тепла мала.

Цементы на основе дикальцийфосфата дигидрата обладают значительно большей скоростью резорбции, чем цементы на основе гидроксиапатита, что связано с химической растворимостью этих солей. Растворимость ортофосфатов при физиологическом значении pH 7,4 снижается в следующем порядке $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O} > \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 > \text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Дикальцийфосфат дигидрат является метастабильным при pH 7,4 и, соответственно, более растворимым, чем гидроксиапатит.

Увеличение скорости резорбции гидроксиапатитового цемента за счет химической модификации и получения многофазного цементного камня с разной скоростью растворения фаз, является перспективным способом регулирования скорости резорбции.

В случае двухфазного цемента на основе CO_3 -ГАП и ДКФД или CO_3 -ГАП и CaCO_3 возможно увеличение скорости растворения за счет быстрого

высвобождения ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} при разложении более растворимых фаз карбоната кальция или дикальцийфосфата дигидрата.

Система $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{CaCO}_3 - \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}$ является вяжущей системой, продуктом которой является цементный камень переменного состава.

Регулирование растворимости цементного камня, образованного в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{CaCO}_3 - \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}$, возможно за счет присутствия в составе более резорбируемой по сравнению с гидроксиапатитом фазы и за счет снижения энергии кристаллической решетки гидроксиапатита. Последнее может быть достигнуто замещением ионов PO_4^{3-} или OH^- на HPO_4^{2-} или CO_3^{2-} , Ca^{2+} на Na^+ [351, 352]. Более резорбируемая фаза дикальцийфосфата дигидрата в составе цементного камня может увеличить растворимость за счет своей метастабильности при pH 7,4.

С целью определения влияния соотношения компонентов в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{CaCO}_3 - \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}$ на конечный состав цементного камня, использовался метод сечений тетраэдра – четырехкомпонентной диаграммы состояния, один из компонентов которой – водный раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. С целью изучения влияния CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ на конечный фазовый состав были выбраны горизонтальные сечения, соответствующие фиксированному массовому количеству $\alpha\text{-ТКФ} = 80, 70$ и 60 мас. %. (рисунок 3.1).

Сечения представляют собой концентрационные треугольники $\text{CaCO}_3 - \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}$ при фиксированном массовом количестве $\alpha\text{-ТКФ}$.

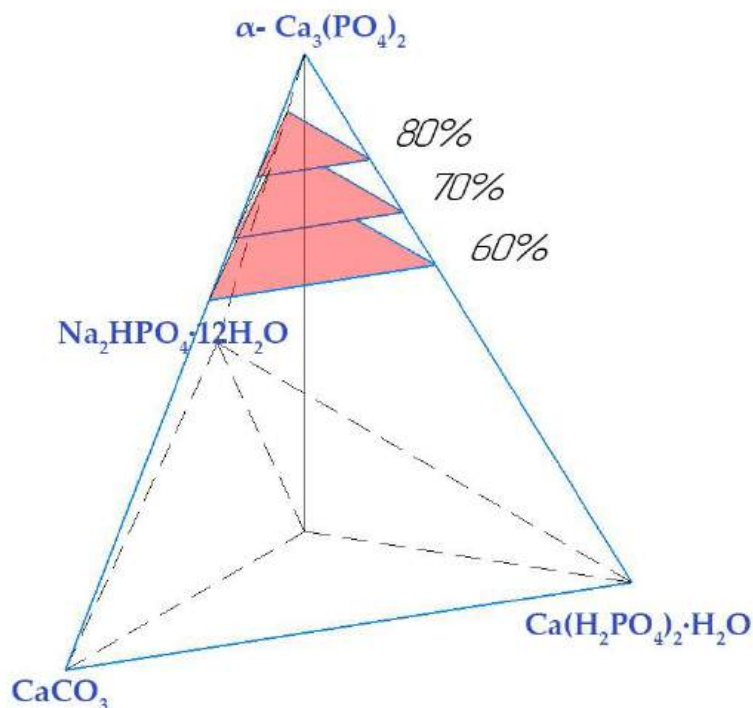


Рисунок 3.1 – Диаграмма состава четырехкомпонентной системы $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}\text{-Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (p-p)

3.1 Состав цементного камня в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}\text{-Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ при $\alpha\text{-ТКФ} = 80$ мас. %

В концентрационном треугольнике системы $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}\text{-Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}\text{-H}_2\text{O}$ при $\alpha\text{-ТКФ} = 80$ мас. % (сечение четырехкомпонентной диаграммы) были рандомно, но с учетом растворимости $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, выбраны двенадцать фигуративных точек в соответствии с рисунком 3.2 и Таблицей 3.1. Фигуративная точка 1 соответствует составу коммерческого цемента Norian (Syntes).

На рисунке 3.2 затемнением обозначена зона с концентрацией $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в растворе, превышающей предельно возможную. Растворимость $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в воде: ~ 218 г/л (20°C).

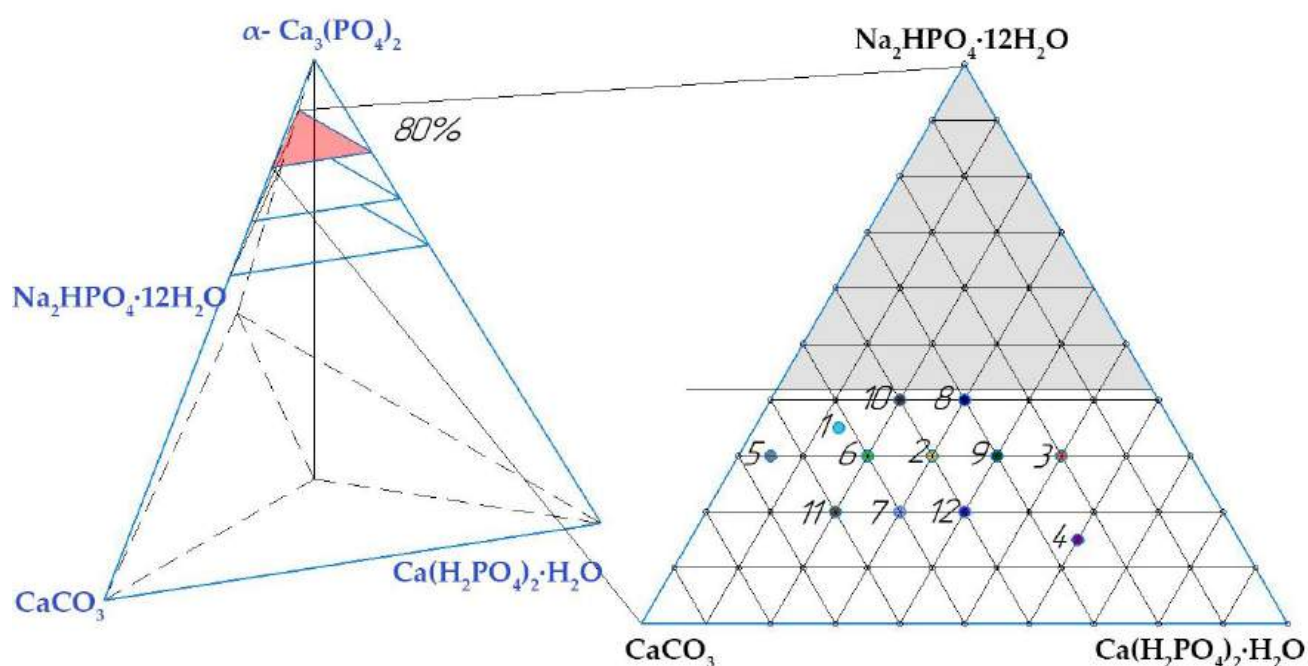


Рисунок 3.2 – Фигуративные точки в сечении диаграммы состава α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при постоянной массе α -ТКФ = 80%

Таблица 3.1 – Содержание компонентов в фигуративных точках

Состав фигуративной точки	Количество, мас. % в фигуративной точке											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CaCO_3	10	8	4	5	13	10	10	6	6	8	12	8
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3	6	10	12	1	4	6	6	8	4	4	8
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7	6	6	3	6	6	4	8	6	8	4	4

Фазовый состав цементного камня, полученного через 28 сут. твердения во влажных условиях, представлен преимущественно карбонатзамещенными гидроксиапатитами переменного состава (CO_3 -ГАП) (например, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_4$ [085-7370], $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_{2,829}(\text{CO}_3)_{0,26}(\text{OH})_{1,59}$ [075-3728], $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,56}(\text{CO}_3)_{0,64}(\text{OH})_{3,668}$ [072-9861]), пики которых практически совпадают, и сложны для идентификации, в том числе связи с искажением кристаллической решетки и смещением пиков. Вероятно, за счет гидролиза образуется кальцийдефицитный гидроксиапатит $\text{Ca}_{8,86}(\text{PO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_2$ (КГАП) [082-1943], основные пики которого накладываются на пики карбонатного гидроксиапатита.

Характеристические пики дикальцийфосфата дигидрата $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [072-0713] (ДКФД) обнаружены на дифрактограмме. β -трикальцийфосфат $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [070-2065] (β -ТКФ), вероятно, останется в составе цементного камня, в связи с его меньшей реакционной способностью при гидролизе, чем α -ТКФ. Присутствие примесной фазы β -ТКФ обусловлено образованием около 8% полиморфной формы β -ТКФ при твердофазном синтезе α -ТКФ. Кроме того, он может частично провзаимодействовать с МКФМ, который находится в дефиците в системе. Пики β -ТКФ совпадают с пиками гидроксиапатитовых фаз (рисунок 3.3). Дифрактограммы для всех двенадцати составов фигуративных точек представлены на рисунке 3.4.

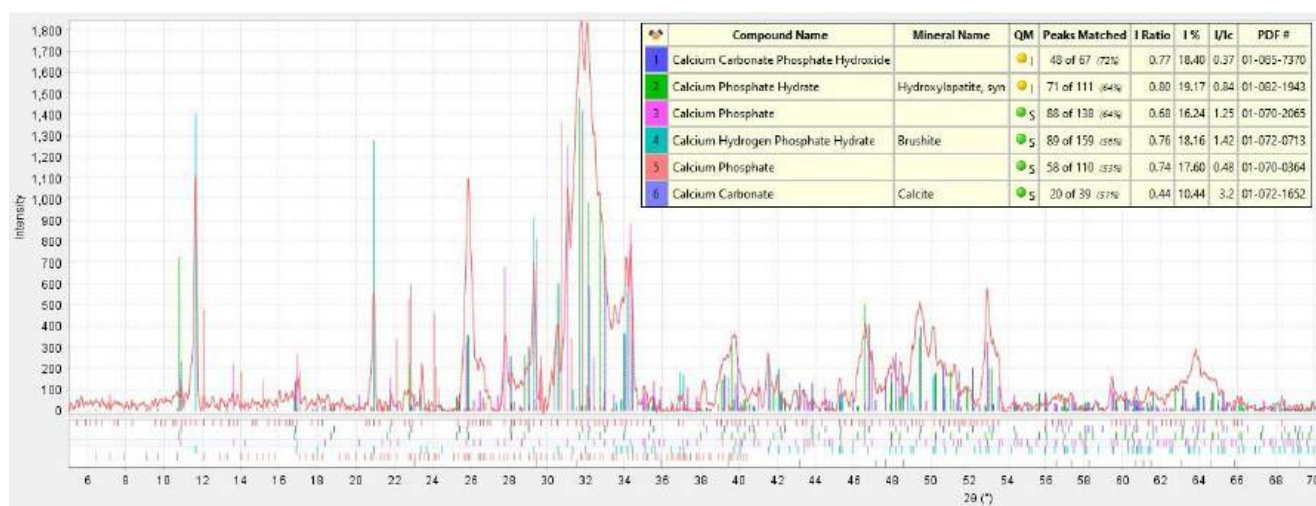


Рисунок 3.3 – Дифрактограмма цементного камня в фигуративной точке состава 4

На дифрактограмме гидроксиапатитные фазы обозначены как одна фаза. Пики при межплоскостном расстоянии 3,38; 3,36 и 2,95, характерные для монетита, образование которого возможно при кислотно-основном взаимодействии в системе, не обнаружены на дифрактограммах составов фигуративных точек. Идентификация карбоната кальция и β -ТКФ методом рентгенофазового анализа невозможна, поскольку отсутствуют характеристические пики (не совпадающие с пиками присутствующих фаз) в указанной системе.

При расчете количественного фазового учитывались только целевые фазы гидроксиапатитные переменного состава, используя карточку [075-3728], и ДКФД [072-0713] и рассчитывалось соотношение фазы ДКФД к ГАП-фазам.

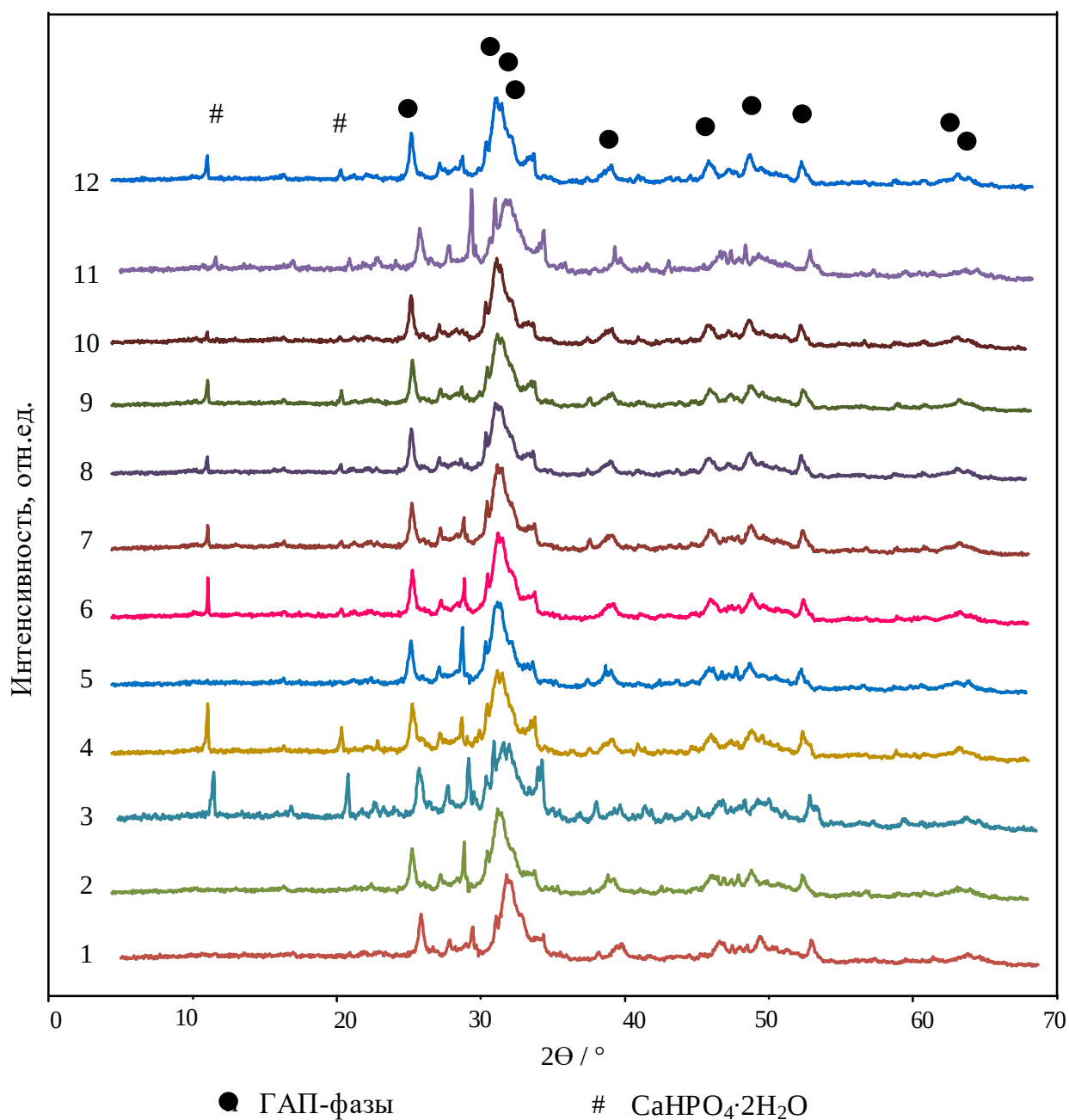


Рисунок 3.4 – Дифрактограммы цементного камня в фигуративных точках составов

Результаты количественного определения фазового состава цементного камня в фигуративных точках представлены в таблице 3.2.

Гидроксиапатит, обнаруженный РФА, имеет переменный состав: количество замещенных ионов PO_4^{3-} , Ca^{2+} , OH^- меняется в пределах цементного камня, образуя серию твердых растворов. Кроме карбонатзамещенных гидроксиапатитов в составе

цементного камня обнаружены более растворимые фазы дикальцийфосфата дигидрата при физиологических значениях pH.

Таблица 3.2 – Фазовый состав продуктов взаимодействия в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$

Состав	Количество, мас. %		Соотношение фаз ДКФД/ГАП
	ДКФД	ГАП-фазы	
1	12,4±0,5	fg*	0,142
2	11,8±0,4	fg	0,134
3	28,2±0,4	a	0,392
4	24,5±1,7	b	0,324
5	11,6±0,5	gh	0,131
6	18,7±0,4	d	0,230
7	17,3±0,4	e	0,209
8	17,7±0,4	de	0,215
9	20,2±0,5	c	0,253
10	13,1±0,4	f	0,151
11	17,0±0,3	e	0,205
12	10,4±0,3	h	0,116

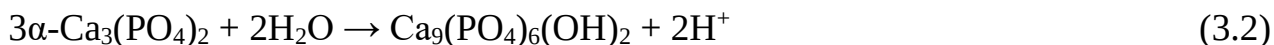
*Тест Тьюки, разные буквы обозначают существенно отличающиеся значения ($p < 0.05$)

При взаимодействии компонентов системы $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$ с водой идет растворение исходных фосфатов кальция, насыщение ионами Ca^{2+} и PO_4^{3-} раствора и осаждение из раствора продуктов реакции. Как только зарождаются кристаллы продуктов реакции, ионы кальция и фосфат-ионы снова насыщают раствор. Одновременно карбонат кальция также разлагается на ионы Ca^{2+} и CO_3^{2-} в водном растворе. Происходит непрерывное осаждение-растворение. В присутствии ионов PO_4^{3-} раствор становится пересыщенным по отношению к КГАП или ДКФД, который может перекристаллизовываться в КГАП. Ионы PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , Ca^{2+} в растворе фосфатной соли осаждаются в виде $\text{CO}_3\text{-ГАП}$, поскольку в таких условиях $\text{CO}_3\text{-ГАП}$ является наиболее термодинамически стабильной фазой [353, 354]:

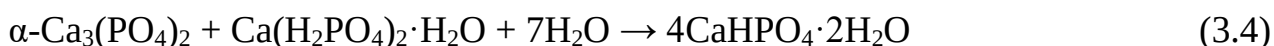


Количество групп в формуле $\text{CO}_3\text{-ГАП}$ варьируется.

При недостатке ионов CO_3^{2-} α -ТКФ гидролизуеться до КГАП:



Предположительно на ранней стадии гидратации происходит образование ДКФД в ходе кислотно-основного взаимодействия карбоната кальция и α -ТКФ с МКФМ:



Газообразный CO_2 , образовавшийся в ходе кислотно-основного взаимодействия, способен образовывать поры в цементном камне и улетучиваться, повышая соотношение $\text{Ca}/(\text{P}, \text{C})$. Избыток по карбонату кальция приводит, предположительно, к встраиванию ионов CO_3^{2-} в гидроксипатит или содержанию карбоната кальция в конечном составе в качестве отдельной фазы. Составы выбранных для исследования фигуративных точек 1 – 12 содержат избыточное количество CaCO_3 по отношению к МКФМ для образования ДКФД, следовательно, в любой точке ионы CO_3^{2-} имеют возможность участвовать в образовании CO_3 -ГАП.

Ионы натрия встраиваются в структуру ГАП, поскольку в нем ионы кальция способны замещаться иными катионами, а ион натрия компенсирует заряд при замещении PO_4^{3-} на CO_3^{2-} .

Кислый МКФМ, растворяясь, снижает рН среды, влияя на термодинамическую стабильность, увеличивает растворимость α -ТКФ и CaCO_3 и приводит к образованию фаз с более низкими значениями Ca/P (рисунок 3.5). Это подтверждается прямолинейной зависимостью между МКФМ и образовавшимся ДКФД. Образование ДКФД приводит к появлению затравки кристаллизации гидроксипатита и более быстрому растворению α -ТКФ. Кристаллы ДКФД образуются на поверхности исходных частиц, которые постепенно растворяются, уступая место новообразованным кристаллам.

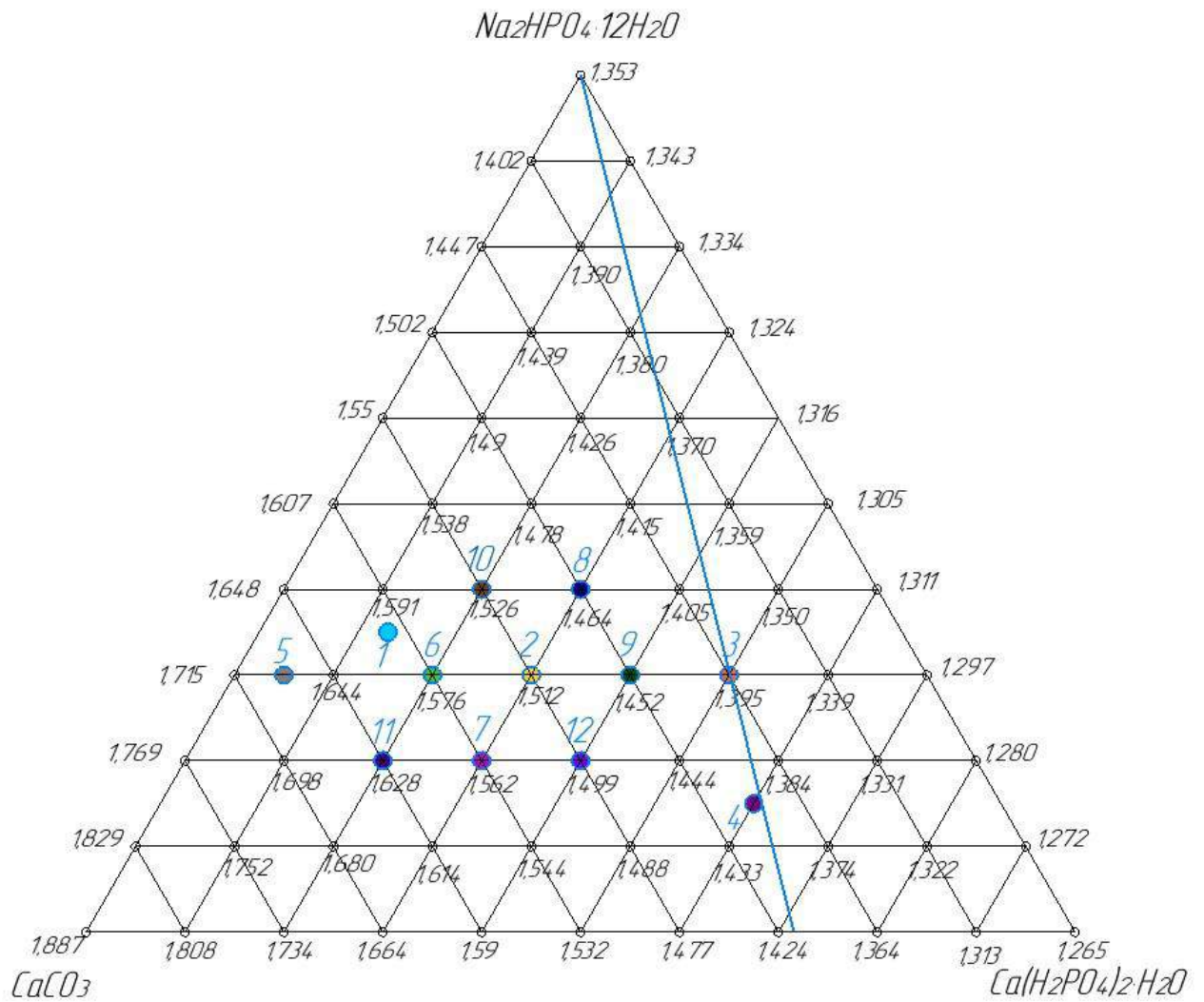


Рисунок 3.5 – Расчетное мольное соотношение Ca/P, стехиометрическая прямая карбоната кальция и монокальцийфосфата моногидрата для образования дикальцийфосфата дигидрата

Отсутствие в составе цементного камня карбоната кальция подтверждается результатами ИК-Фурье спектроскопии. На рисунке 3.6 представлены ИК-спектры составов цементов в фигуративных точках.

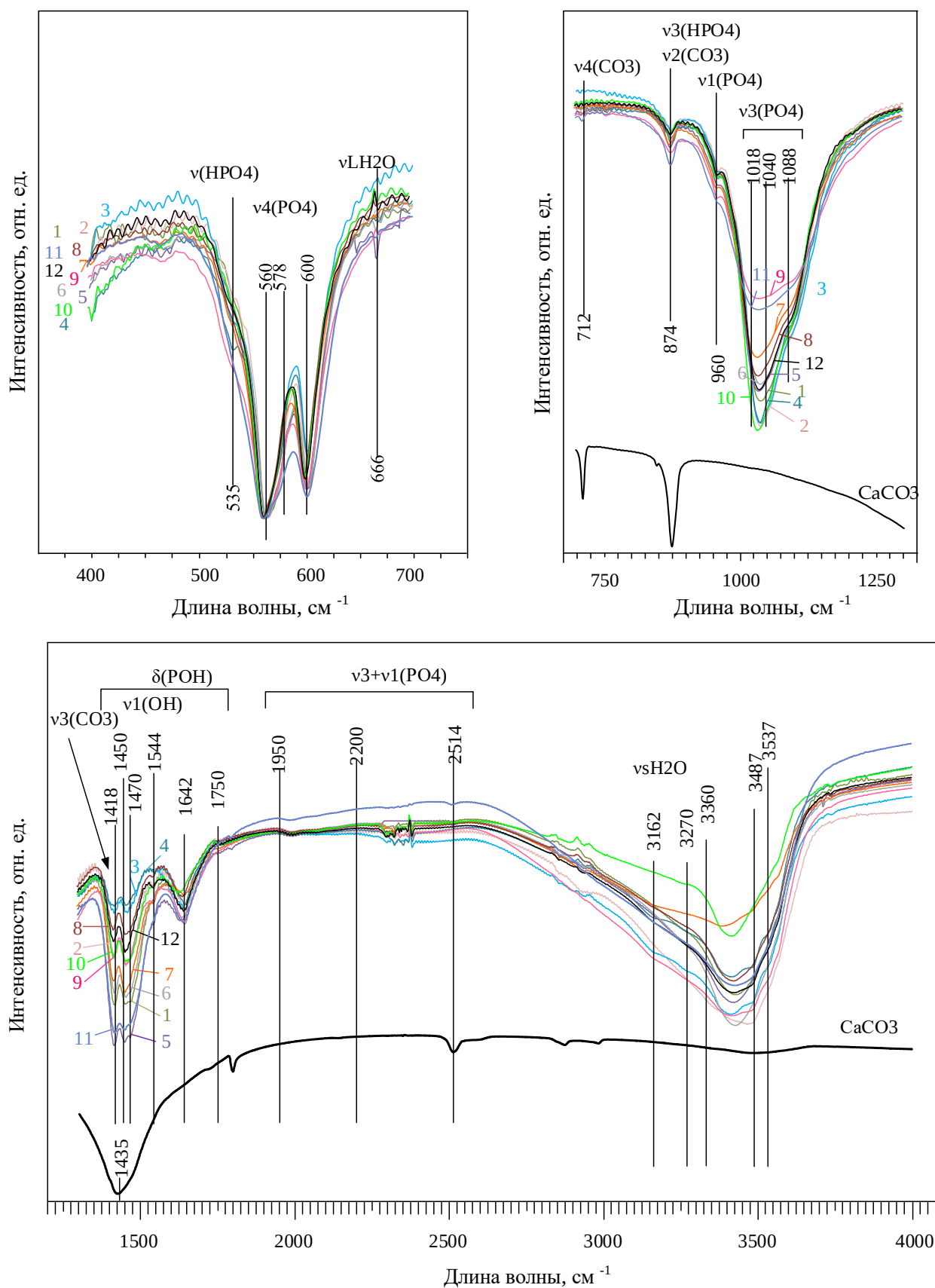


Рисунок 3.6 – ИК-спектры составов цементного камня

Для спектра кальцита наиболее интенсивная и высокочастотная полоса 1435 см^{-1} не является характеристической в ИК-спектрах цементов, поскольку сливается с дублексом при $1409\text{--}1418\text{ см}^{-1}$ и $1449\text{--}1474\text{ см}^{-1}$, относящимися к моде ν_3 антисимметричного растяжения, характерного для ионов CO_3^{2-} . Указанные полосы характерны для карбонат-замещенных гидроксиапатитов. Полоса при 875 см^{-1} , характерная для кальцита, скрыта полосой ионов HPO_4^{2-} . Таким образом, о содержании ионов CO_3^{2-} , относящихся к кальциту, можно судить по значительной полосе при 712 см^{-1} . Она относится к асимметричному (ν_4) деформационному колебанию CO_3^{2-} и отсутствует в спектрах цементов.

Два дублекса, характерных для карбонат-ионов в позициях замещения ионов OH^- (А-тип карбонатного гидроксиапатита) и в позициях замещения ионов PO_4^{3-} (Б-тип карбонатного гидроксиапатита) расположены в диапазонах $866\text{--}880\text{ см}^{-1}$ и $1410\text{--}1544\text{ см}^{-1}$. Моды при 880 см^{-1} и 1546 см^{-1} относятся к CO_3 -ГАП А-типа, при 870 , $1410\text{--}1418$ и 1470 см^{-1} – к CO_3 -ГАП Б-типа. Если принять во внимание факт отсутствие кальцита в составе цементного камня, ориентируясь на отсутствие полосы при 712 см^{-1} , дублекс при $866\text{--}880\text{ см}^{-1}$ все равно нельзя в данном случае отнести к аналитическим пикам для определения типа карбонатного гидроксиапатита в связи с совпадением пика при 874 см^{-1} с полосой, характерной для ионов HPO_4^{2-} , которые также могут относиться к ДКФД. Кроме того, для натрийсодержащего карбонатазамещенного гидроксиапатита характерен дублекс в тех же волновых числах [355].

При длине волны 1450 см^{-1} ν_3 или ν_4 смешанная мода CO_3^{2-} в А- и Б-типах CO_3 -ГАП и $\nu_1\text{ CO}_3^{2-}$ в Б-типе CO_3 -ГАП. Т.е. характеристическими в данном случае можно считать длину волны 1544 см^{-1} для А-типа карбонатного гидроксиапатита и $1410\text{--}1418\text{ см}^{-1}$ и 1470 см^{-1} для Б-типа. И если пики, характерные для Б-типа присутствуют на ИК-спектрах всех составов, то А-тип, не характерен для составов 1, 5, 6, 10 и 11, у которых соотношение $\text{Ca/P} > 1,524$, $\text{CO}_3/\text{P} > 0,13$.

Пики при 600 и $559\text{--}560\text{ см}^{-1}$ характерны для ортофосфорных тетраэдрических ионов в структуре типа гидроксиапатита. Они широкие,

сливающиеся в дуплет. Пики при 578 и 631 см^{-1} соответствуют хорошо закристаллизованному гидроксиапатиту и отсутствуют на спектрах.

Колебания в анионе HPO_4^{2-} в диапазоне 1400–1750 см^{-1} являются характеристическими, но в связи с наложением колебаний δ (РОН) на колебания $\nu_3(\text{CO}_2)$, определяющим считаем колебания в диапазоне 1600–1750 см^{-1} . На спектре четко определяются пики при 1642 см^{-1} , определяющие ионы HPO_4^{2-} кальцийдефицитного гидроксиапатита и дикальцийфосфата дигидрата.

Концентрация ионов CO_3^{2-} была определена двумя взаимно подтверждающими исследованиями: полуколичественный анализ по ИК-спектрам и волюметрическое исследование.

Полуколичественный анализ, основанный на сравнении отношении концентраций ионов CO_3^{2-} к PO_4^{3-} в разных составах, был проведен по нормированным ИК-спектрам посредством нахождения интегралов в диапазоне волновых чисел 1350–1525 см^{-1} для ионов CO_3^{2-} ; 510–640 см^{-1} и 930–1200 см^{-1} для ионов PO_4^{3-} .

Зависимости количества карбонат-ионов от исходного состава цементов были определены по следующей формуле:

$$K_{\frac{\text{CO}_3^{2-}}{\text{PO}_4^{3-}}} = \frac{\int_{1350}^{1525} \frac{dI}{d\lambda}}{\int_{510}^{640} \frac{dI}{d\lambda} + \int_{930}^{1200} \frac{dI}{d\lambda}}.$$

Полученные значения не являются истинными, но по площади пиков можно сравнивать составы между собой, поскольку анализ выполнен в одинаковых условиях.

При волюметрическом исследовании с определением объема выделившегося CO_2 при воздействии на продукт 1н раствором соляной кислоты была определена концентрация ионов CO_3^{2-} в 1 г цементного камня для каждого состава.

Эмпирические значения количества CO_3^{2-} в составе цементного камня согласуются со сравнительными данными полуколичественного анализа, проведенного по площади соответствующих пиков на ИК-Фурье спектроскопии (рисунок 3.7) с достоверностью аппроксимации $R^2 = 0,9344$. Интенсивность пиков

при указанном диапазоне длин волн у разных составах располагается в следующей последовательности: $5 > 11 > 1 > 6 > 7 > 9 > 10 > 2 > 12 > 8 > 3 > 4$.

Таким образом, при взаимодействии МКФМ с карбонатом кальция происходит образование ДКФД с выделением углекислого газа, в связи с чем количество встраиваемых ионов CO_3^{2-} в кристаллическую решетку гидроксиапатита уменьшается. Таким образом, при расположении фигуративных точек ближе к стехиометрическому количеству карбоната кальция и МКФМ, увеличивается количество ДКФД и уменьшается количество CO_3^{2-} . Образующийся карбонат-замещенный гидроксиапатит преимущественно Б-типа. Карбонат кальция в конечном составе цементного камня не обнаружен.

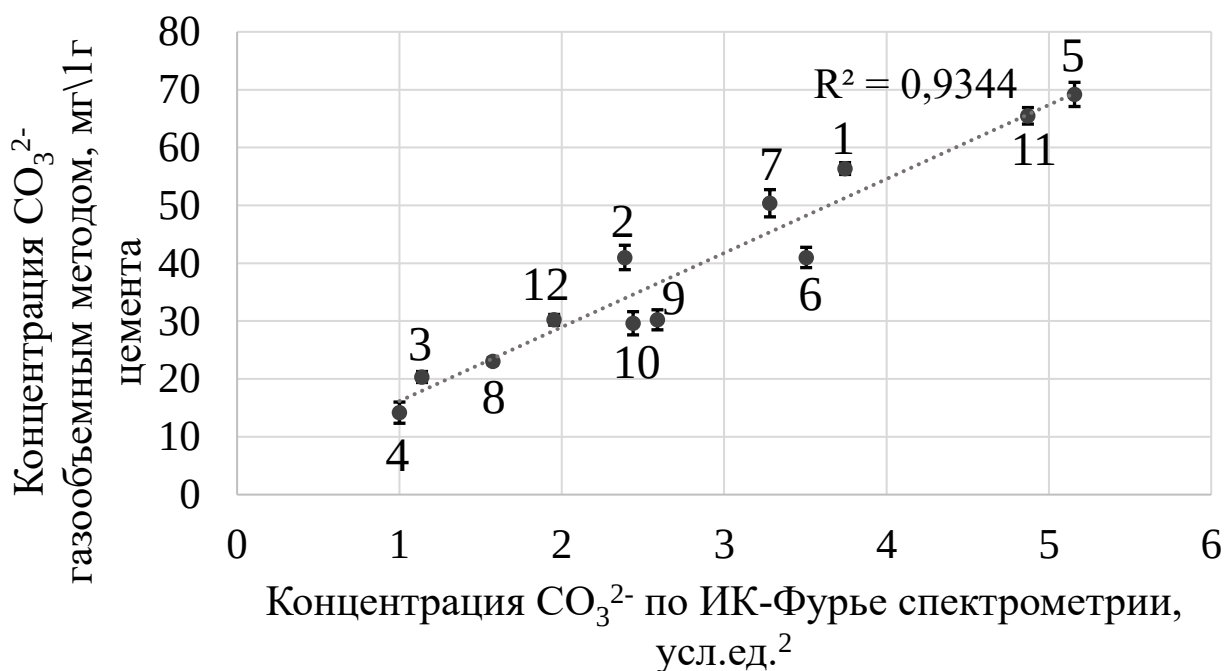
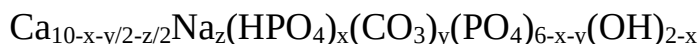


Рисунок 3.7 – Корреляция между значениями CO_3^{2-} , полученными газообъемным методом и значениями CO_3^{2-} , полученными по площади пиков по ИК-Фурье спектроскопии в фигуративных точках состава

На основе данных волюметрического исследования и результатов спектрофотометрического определения кальция и фосфора были выведены стехиометрические формулы составов фигуративных точек цементного камня

(таблица 3.3). Количество ионов $(\text{HPO}_4)^{2-}$, $(\text{PO}_4)^{3-}$ и $(\text{OH})^-$ определялось в соответствии с формулой:



при соблюдении условий:

- нейтральность молекулы;
- количество $\text{Ca}^{2+} = 10 - (\text{HPO}_4)^{2-} - (\text{CO}_3)^{2-}/2 - \text{Na}^+/2$.
- количество $\text{OH}^- = 2 - (\text{HPO}_4)^{2-}$.

Для нахождения стехиометрической формулы необходимо решить систему уравнений с тремя переменными с помощью приложения к электронным таблицам Excel пакета Microsoft Office.

Таблица 3.3 – Стехиометрические формулы составов в фигуративных точках

Состав	Эмпирическая формула
1	$\text{Ca}_{7,9}\text{Na}_{0,3}(\text{HPO}_4)_{1,4}(\text{PO}_4)_{3,5}(\text{CO}_3)_1(\text{OH})_{0,6}$
2	$\text{Ca}_8\text{Na}_{0,3}(\text{HPO}_4)_{1,6}(\text{PO}_4)_{3,6}(\text{CO}_3)_{0,8}(\text{OH})_{0,4}$
3	$\text{Ca}_{7,6}\text{Na}_{0,3}(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_{3,4}(\text{CO}_3)_{0,6}$
4	$\text{Ca}_8\text{Na}_{0,1}(\text{HPO}_4)_{1,7}(\text{PO}_4)_{4,0}(\text{CO}_3)_{0,3}(\text{OH})_{0,3}$
5	$\text{Ca}_8\text{Na}_{0,3}(\text{HPO}_4)_{1,2}(\text{PO}_4)_{3,6}(\text{CO}_3)_{1,2}(\text{OH})_{0,8}$
6	$\text{Ca}_{8,2}\text{Na}_{0,3}(\text{HPO}_4)_{1,2}(\text{PO}_4)_4(\text{CO}_3)_{0,8}(\text{OH})_{0,7}$
7	$\text{Ca}_8\text{Na}_{0,2}(\text{HPO}_4)_{1,5}(\text{PO}_4)_{3,7}(\text{CO}_3)_{0,8}(\text{OH})_{0,5}$
8	$\text{Ca}_{8,2}\text{Na}_{0,4}(\text{HPO}_4)_{1,4}(\text{PO}_4)_{4,1}(\text{CO}_3)_{0,5}(\text{OH})_{0,6}$
9	$\text{Ca}_{7,9}\text{Na}_{0,3}(\text{HPO}_4)_{1,6}(\text{PO}_4)_{3,8}(\text{CO}_3)_{0,6}(\text{OH})_{0,3}$
10	$\text{Ca}_{8,3}\text{Na}_{0,4}(\text{HPO}_4)_{1,2}(\text{PO}_4)_{4,2}(\text{CO}_3)_{0,5}(\text{OH})_{0,8}$
11	$\text{Ca}_{7,9}\text{Na}_{0,2}(\text{HPO}_4)_{1,5}(\text{PO}_4)_{3,4}(\text{CO}_3)_{1,1}(\text{OH})_{0,5}$
12	$\text{Ca}_{8,1}\text{Na}_{0,2}(\text{HPO}_4)_{1,5}(\text{PO}_4)_4(\text{CO}_3)_{0,5}(\text{OH})_{0,5}$

В соответствии с исследованиями Fernandez и соавт. [116] единственная фаза – кальцийдефицитный карбонатзамещенный гидроксипатит среди составов фигуративных точек образуется в т. 1 ($x=0,2$; $\lambda=-0,34$), т. 6 и т. 7 ($x=0,16$; $\lambda=-0,44$) в области стабильности и т. 5 ($x=0,29$; $\lambda=-0,115$), т. 11 ($x=0,28$; $\lambda=-0,14$) вне области

стабильности на графике (см. рисунок 1.10). Расчетные формулы в соответствии с предложенной авторами методикой представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Стехиометрические формулы составов в фигуративных точках в соответствии с методикой Fernandez и соавт. [116]

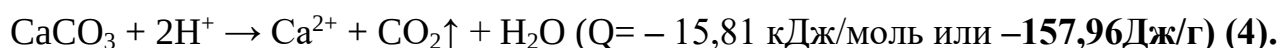
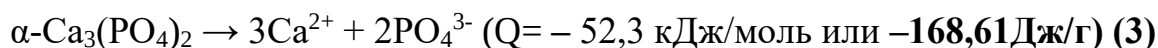
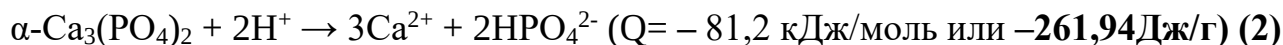
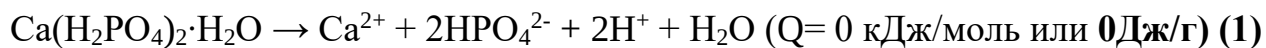
Состав	Эмпирическая формула
1	$\text{Ca}_{8,8}(\text{HPO}_4)_{0,7}(\text{PO}_4)_{4,5}(\text{CO}_3)_{0,7}(\text{OH})_{0,7}$
5	$\text{Ca}_{8,71}(\text{HPO}_4)_{0,565}(\text{PO}_4)_{4,275}(\text{CO}_3)_{1,015}(\text{OH})_{0,565}$
6	$\text{Ca}_{8,84}(\text{HPO}_4)_{0,76}(\text{PO}_4)_{4,6}(\text{CO}_3)_{0,56}(\text{OH})_{0,76}$
7	$\text{Ca}_{8,84}(\text{HPO}_4)_{0,76}(\text{PO}_4)_{4,6}(\text{CO}_3)_{0,56}(\text{OH})_{0,76}$
11	$\text{Ca}_{8,72}(\text{HPO}_4)_{0,58}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_{0,98}(\text{OH})_{0,58}$

Однако авторы определили область стабильности без учета $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, который снижает отношение Ca/P в исходной смеси и влияет на конечный фазовый состав, что ранее не обсуждалось в научной литературе.

Образование различного количества $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в зависимости от состава цемента в фигуративных точках подтверждается данными по кинетике тепловыделения (таблица 3.5).

По результатам калориметрического исследования, в первые 15 мин. зарегистрировано повышение тепловыделения в случае всех составов, что свидетельствует об экзотермической реакции. В связи с высокой скоростью образования $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в ходе кислото-основного взаимодействия, тепловыделение в начальные сроки твердения относится к образованию указанной фазы.

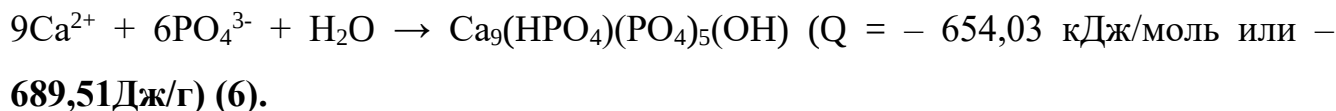
Основные реакции образования ДКФД: растворение моногидрата монокальцийфосфата, растворение α -трикальцийфосфата, растворение карбоната кальция и образование $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Растворение исходных компонентов происходит в основном с выделением тепла:



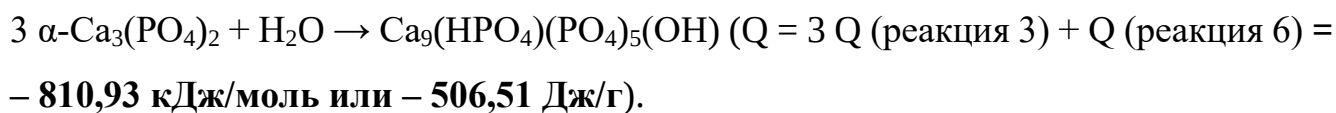
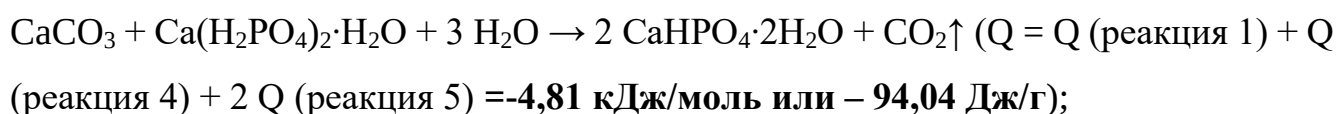
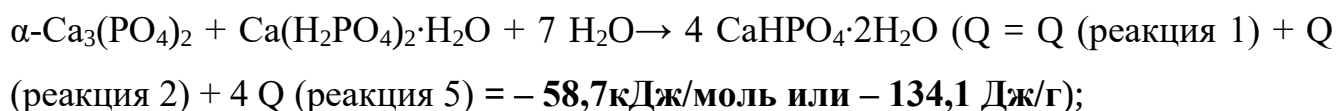
По данным энтальпий образования можно сделать вывод, образование $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ происходит с поглощением тепла при взаимодействии МКФМ с ТКФ и МКФМ с карбонатом кальция:



Образование гидроксиапатита происходит с выделением тепла:



Общее тепловыделение по реакциям составляет:



Указанные расчеты тепловыделения не отражают протекание всей совокупности реакций, в частности, образование карбонатного гидроксиапатита, но являются основными (или приближенными к ним) и дают наибольший вклад в суммарное тепловыделение.

Суммарное тепловыделение к 15 мин. складывается из теплоты образования $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, теплот растворения α -ТКФ и карбоната кальция, на которое оказывает влияние снижение рН цементного теста за счет увеличения содержания

МКФМ, количество которого является лимитирующим фактором в кислотно-основном взаимодействии из-за его недостаточности. В связи с этим, увеличение тепловыделения к 15 мин линейно зависит от соотношения кислого и основных компонентов системы (рисунок 3.8). Образование гидроксиапатитов дает наибольший вклад в общее тепловыделение, однако процесс растворения α -ТКФ и образования гидроксиапатитов растянут по времени, в связи с чем тепловыделение происходит постепенно.

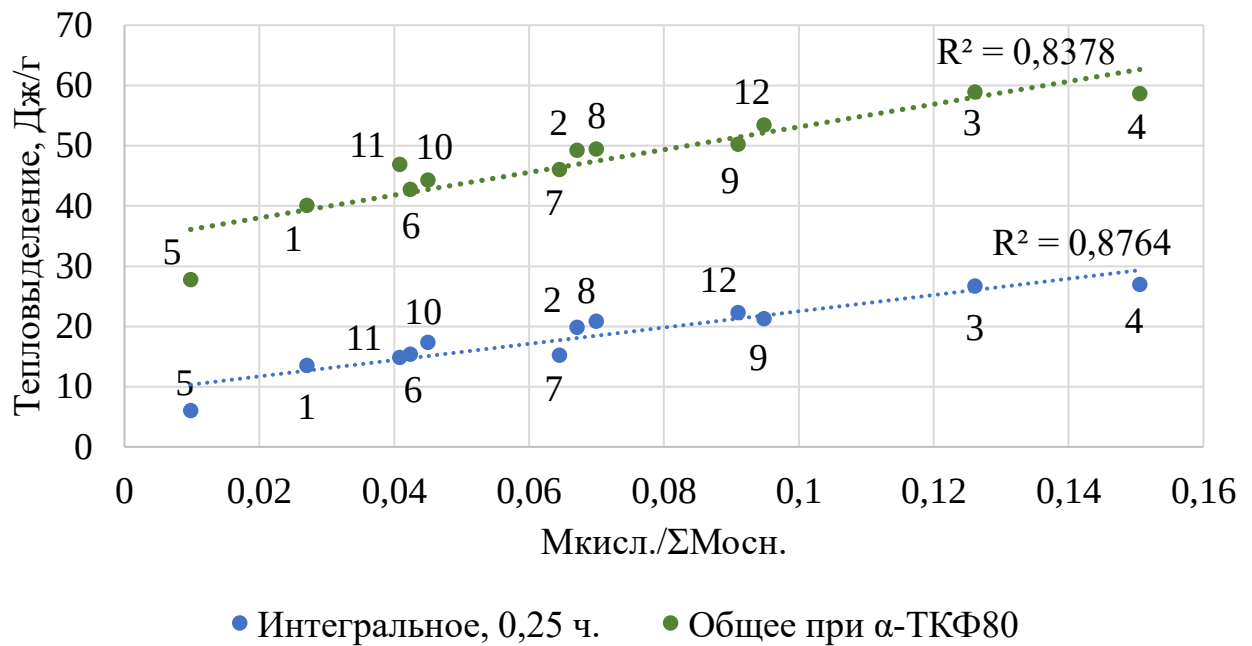


Рисунок 3.8 – Зависимость тепловыделения от соотношения кислого и основных компонентов системы

При использовании раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в качестве жидкости затворения появляется дополнительный источник ионов PO_4^{3-} , соотношение Ca/P смещается в сторону меньших значений и, вероятно, образуются кристаллы ДКФД [357], которые впоследствии перестраиваются в кальцийдефицитный гидроксиапатит. Образование кристаллов ДКФД приводит к увеличению тепловыделения и провоцирует новое растворение ТКФ, повышая скорость образования затвердевшего цемента.

В начальный период гидратации при соприкосновении частиц α -ТКФ с водой начинают идти реакции растворения кристаллов, и жидкая фаза вблизи частиц

насыщается ионами Ca^{2+} , PO_4^{3-} . Происходит пересыщение жидкой фазы ионами и выпадение в осадок конечных соединений.

В соответствии с данными по интегральному тепловыделению количество выделившегося тепла снижается к 1–3 ч, затем незначительно повышается до 24 ч, что, связано с замедлением реакции. На поверхности частиц ТКФ образуются новые кристаллы ДКФД, гидроксиапатита, которые затрудняют диффузию к негидратированной части частиц ТКФ. При разрушении оболочек растущими кристаллами скорость реакции возрастает, тепловыделение возрастает.

Незначительная разница в тангенсах угла наклона линии тренда интегрального тепловыделения на 15 мин и линии тренда общего тепловыделения заключается в том, что всем точкам одной линии характерно постоянное значение α -ТКФ, но увеличение соотношения кислого и основных компонентов системы МКФМ связано со снижением концентрации карбоната кальция в исходном составе, взаимодействие с которым дает наименьший вклад в суммарное тепловыделение.

Микроструктура цементного камня, в соответствии со сканирующей электронной микроскопией (СЭМ) (рисунки 3.9–3.20), соответствующего составу фигуративных точек, имеет гетерогенную структуру, в которой твердые частицы непрореагировавшего или частично прореагировавшего исходного материала (рисунки 3.15 в, 3.16 в) заключены в тонкую матрицу гидроксиапатита, представленную преимущественно иррегулярными наноразмерными кристаллами гидроксиапатитов и образовавшуюся в процессе реакции отверждения путем смешивания твердых и жидких компонентов цемент. В соответствии с СЭМ, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ДКФД) образуется как на поверхности пор (рисунки 3.11 б, 3.14 в, г, 3.20 а, б), так и в объеме цементного камня (рисунки 3.11 в, г, 3.12 б, 3.15 б, 3.17 а). ДКФД кристаллизуется в виде призматических кристаллов (рисунки 3.11 б, в, 3.12 б, 3.14 в, 3.17 а, 3.20 а, б) или тонких чешуйчатых кристаллов (рисунки 3.11 г, 3.14 в, г, 3.15 в, 3.20 а, б).

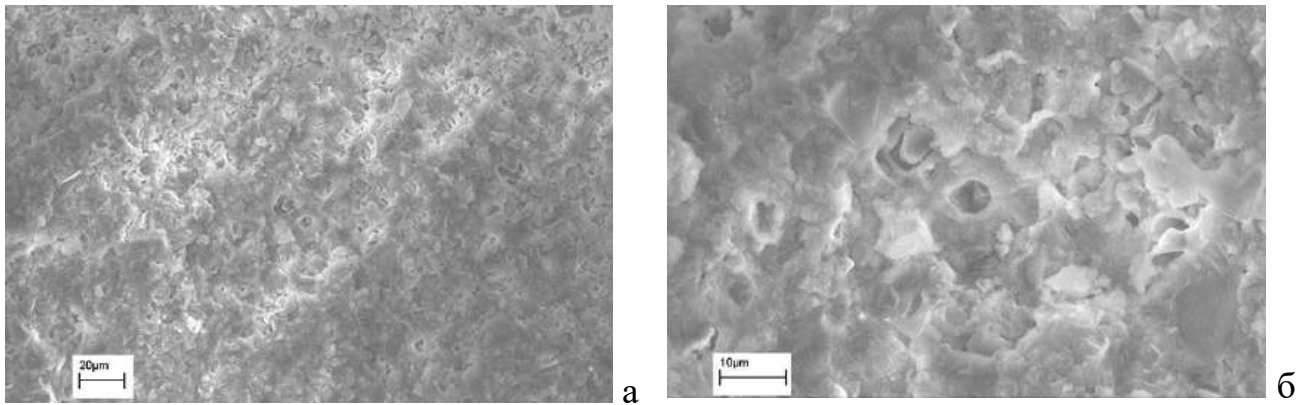


Рисунок 3.9 – Микроструктура цементного камня состава 1. Увеличение: а – $\times 1000$; б – $\times 3000$

Большие кристаллы ДКФД образуются только на поверхности поры или заполняют весь объем поры, имея возможность для роста. Возможно, такие поры образованы на месте растворимых кристаллов МКФМ, которые не успели полностью провзаимодействовать с карбонатом кальция и α -ТКФ до схватывания цемента. В этом случае рН будет локально уменьшаться, провоцируя в этом месте рост кристаллов ДКФД.

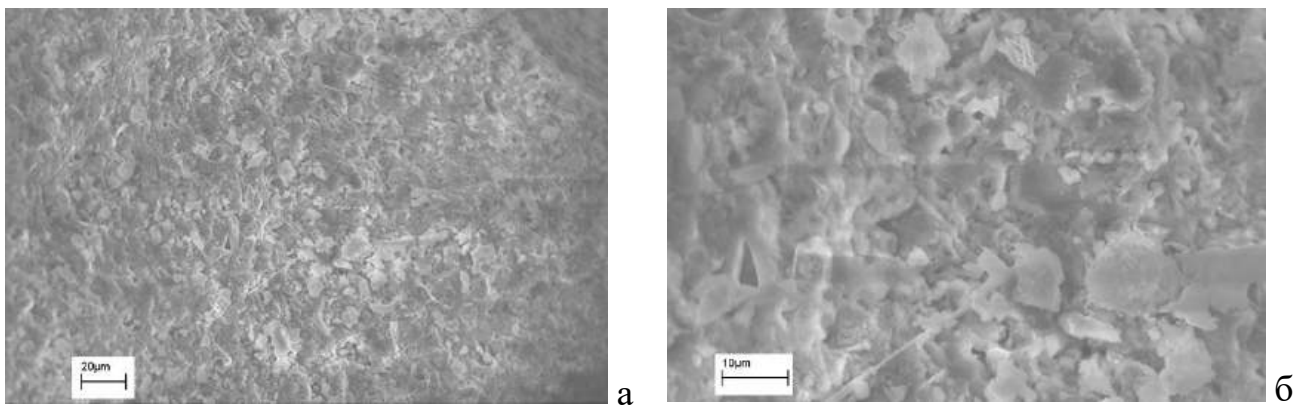


Рисунок 3.10 – Микроструктура цементного камня состава 2. Увеличение: а – $\times 1000$; б – $\times 3000$

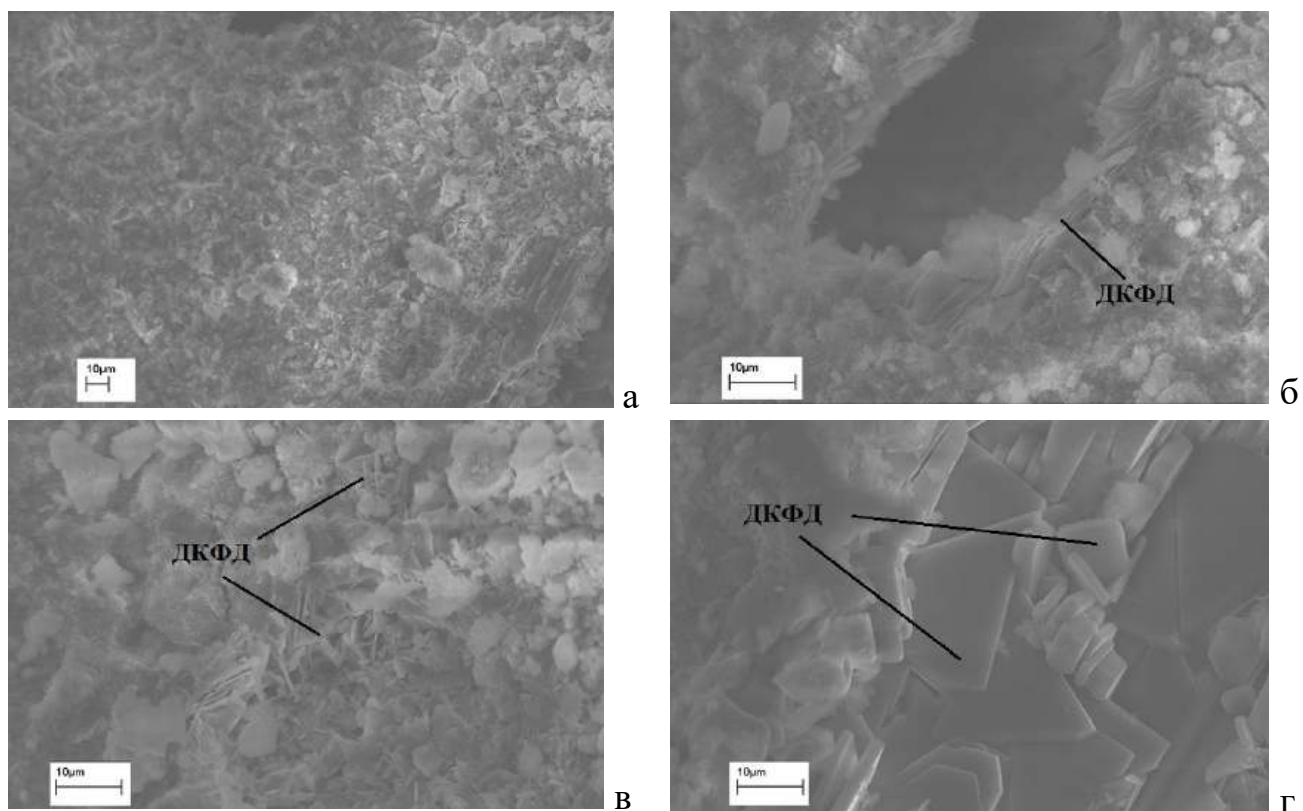


Рисунок 3.11 – Микроструктура цементного камня состава 3. Увеличение: а – $\times 1000$; б–г – $\times 3000$

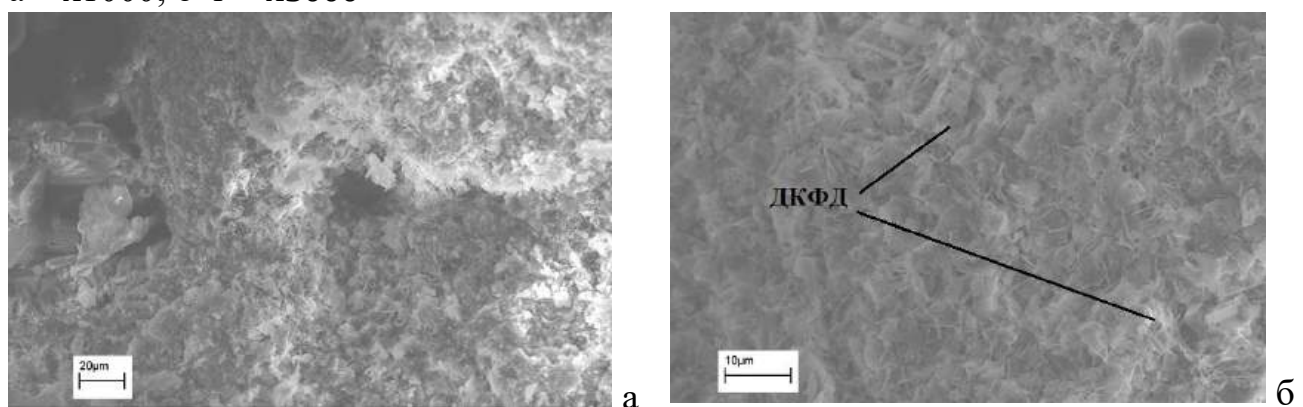


Рисунок 3.12 – Микроструктура цементного камня состава 4. Увеличение: а – $\times 1000$; б – $\times 3000$

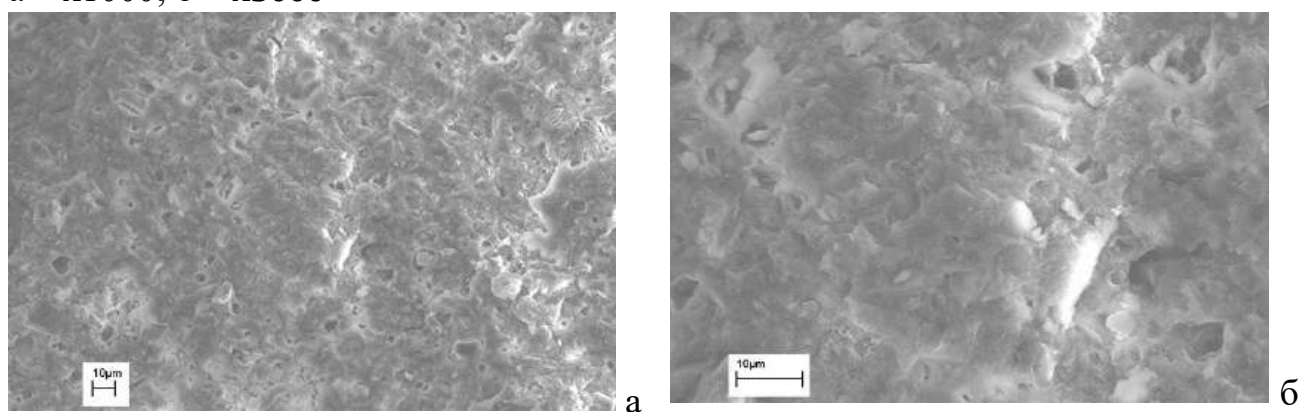


Рисунок 3.13 – Микроструктура цементного камня состава 5. Увеличение: а – $\times 1000$; б – $\times 3000$

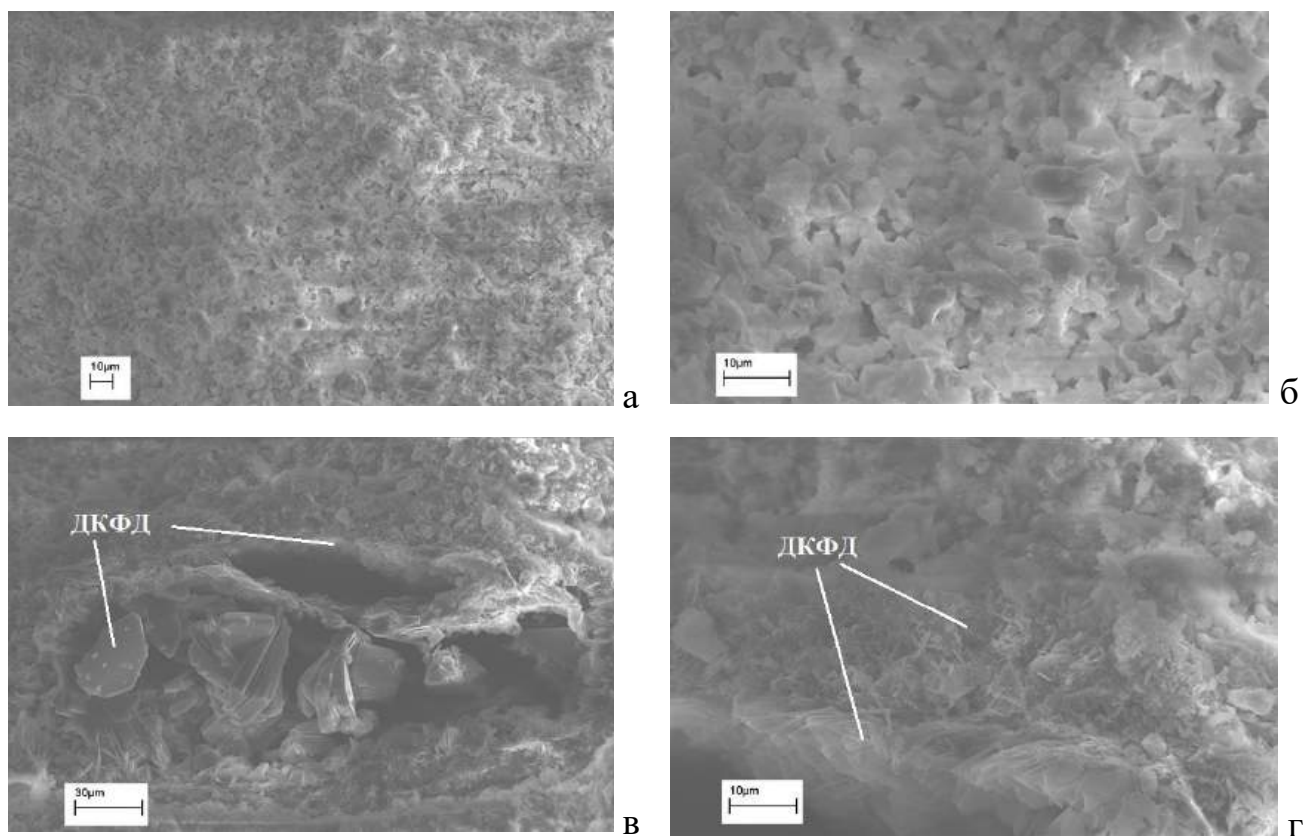


Рисунок 3.14 – Микроструктура цементного камня состава 6. Увеличение: а, в – $\times 1000$; б, г – $\times 3000$

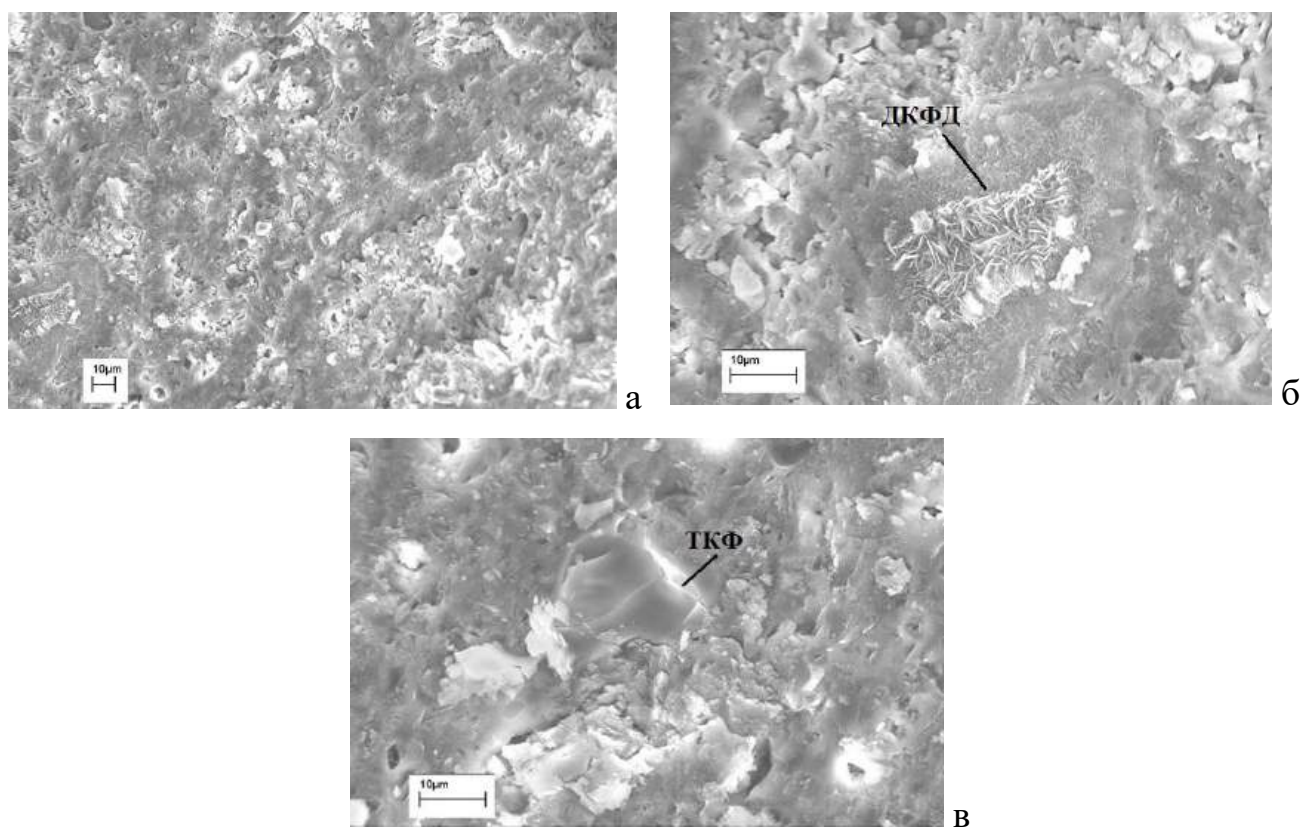


Рисунок 3.15 – Микроструктура цементного камня состава 7. Увеличение: а – $\times 1000$; б, в – $\times 3000$

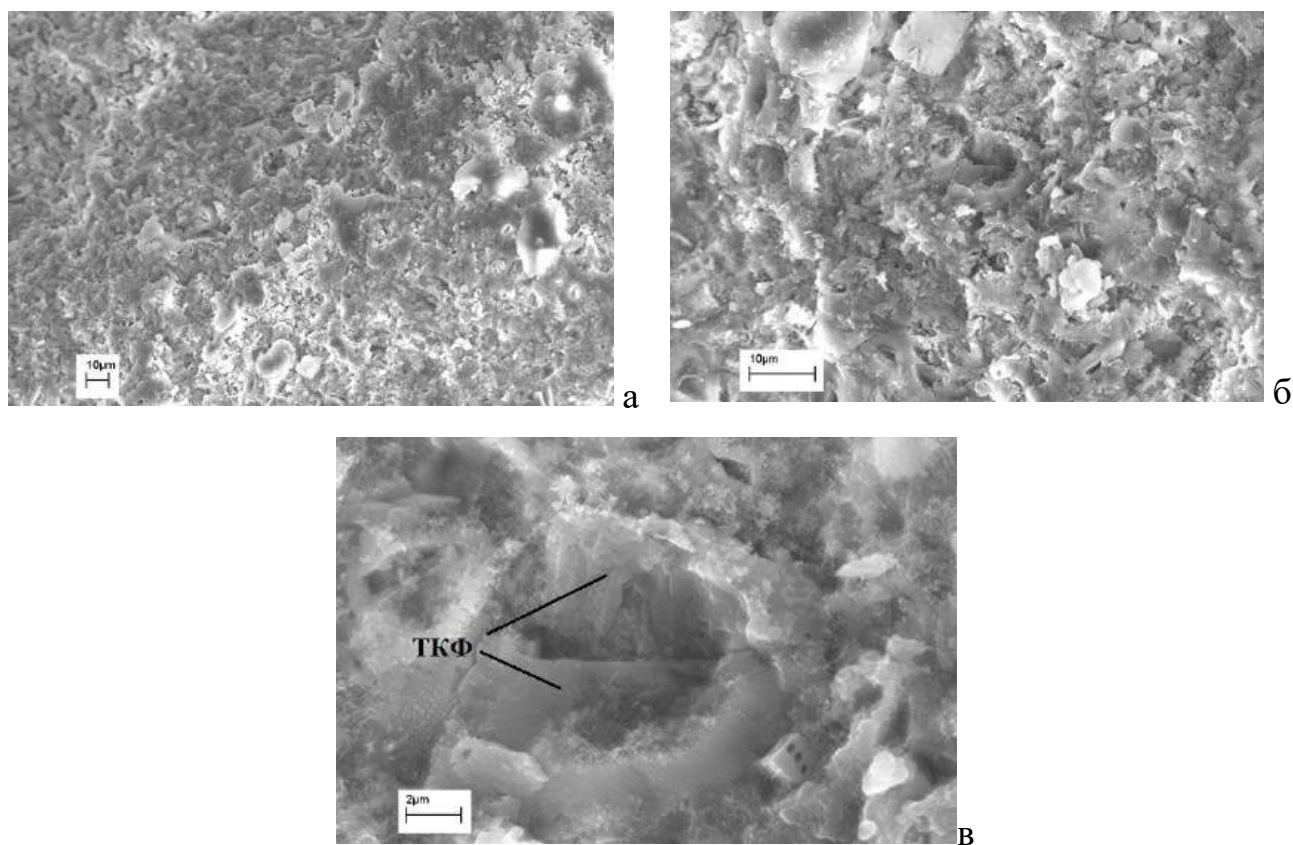


Рисунок 3.16 – Микроструктура цементного камня состава 8. Увеличение: а – $\times 1000$; б – $\times 3000$; в – $\times 12000$

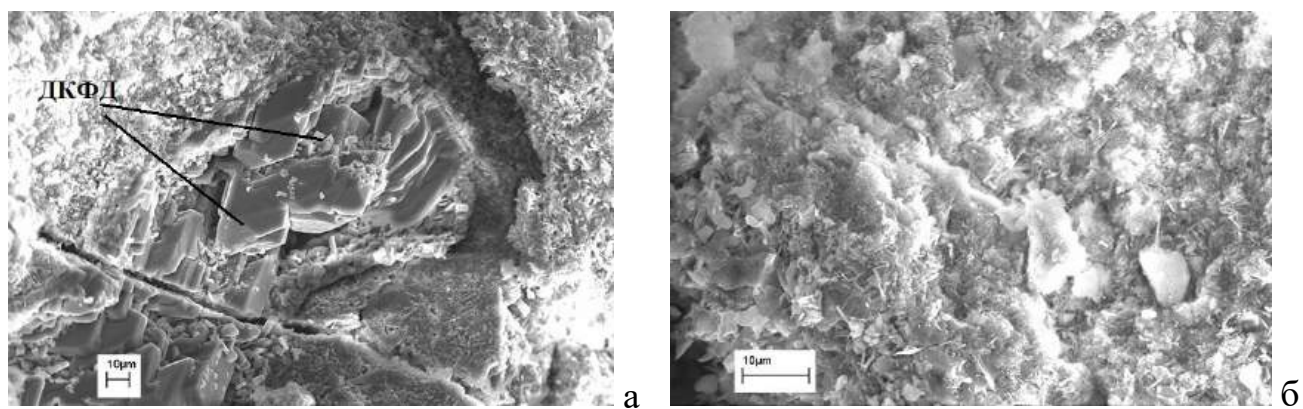


Рисунок 3.17 – Микроструктура цементного камня состава 9. Увеличение: а – $\times 1000$; б – $\times 3000$

Результаты СЭМ хорошо соотносятся с результатами РФА: кристаллов ДКФД обнаружено больше в образцах, где его количество выше, согласно полуколичественному анализу на основе РФА.

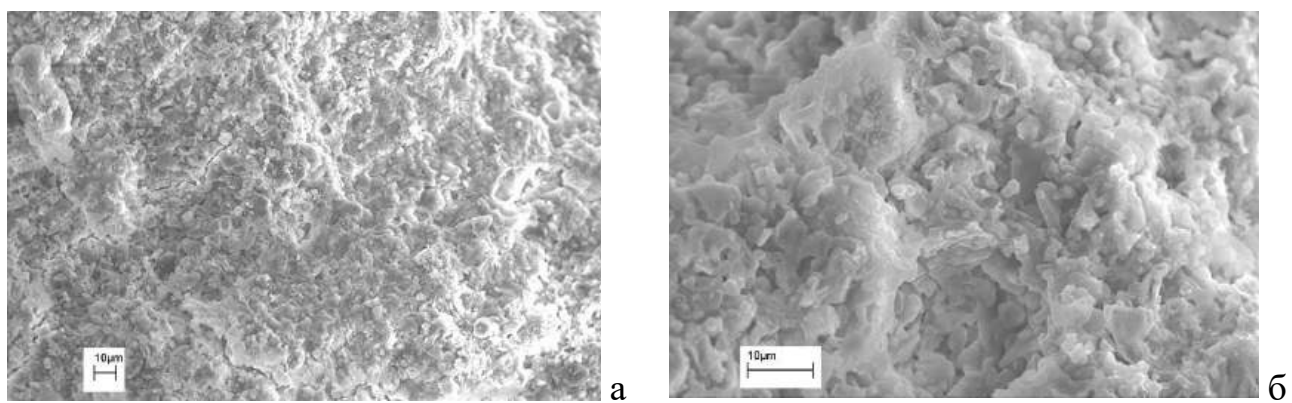


Рисунок 3.18 – Микроструктура цементного камня состава 10. Увеличение: а – $\times 1000$; б – $\times 3000$

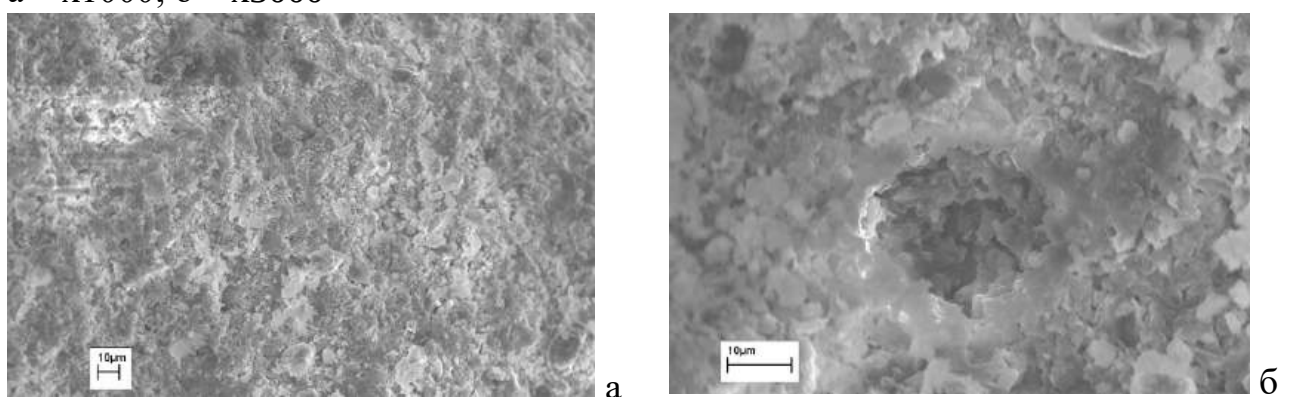


Рисунок 3.19 – Микроструктура цементного камня состава 11. Увеличение: а – $\times 1000$; б – $\times 3000$

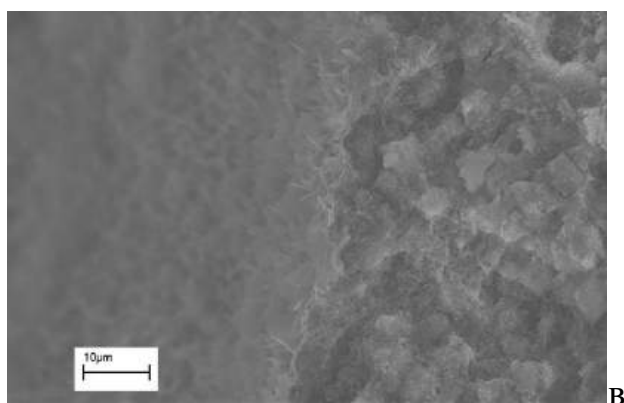
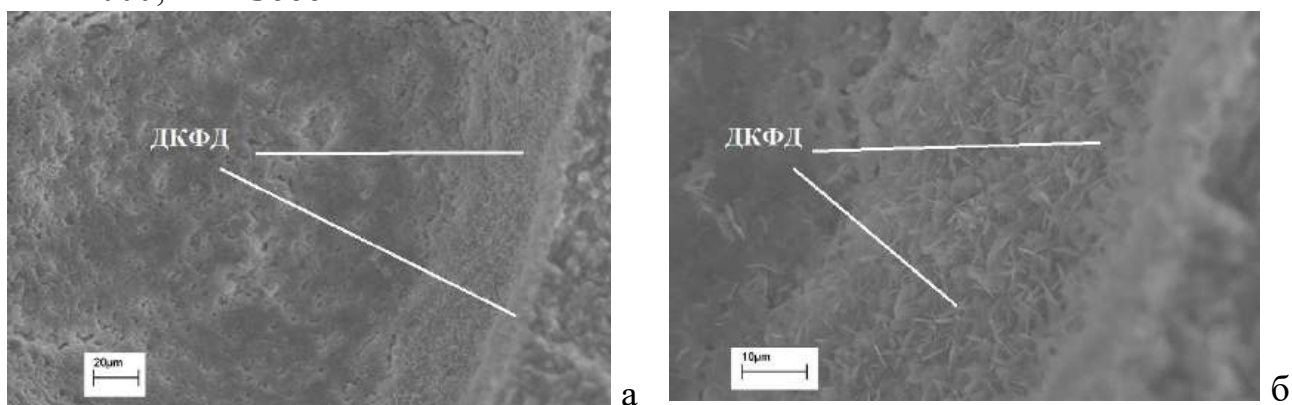
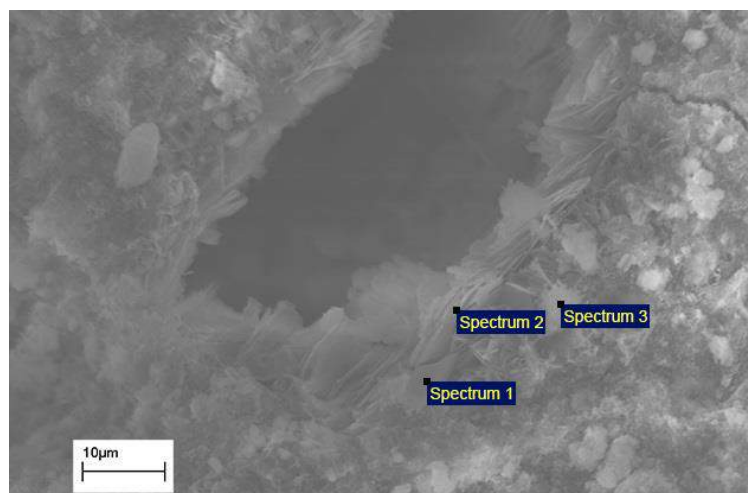


Рисунок 3.20 – Микроструктура цементного камня состава 12. Увеличение: а – $\times 1000$; б – $\times 3000$

Результаты энергодисперсионного рентгеновского анализа (energy-dispersive X-ray analysis – EDX) подтверждают отнесение кристаллов к тем иным фазам цемента по соотношению Ca/P (рисунки 3.21-3.25). Соотношение Ca/P на поверхности поры цементного камня состава 3 близко к 1 (рисунок 3.21). В объеме цементного камня состава 4 соотношение Ca/P=1,23 (рисунок 3.22).



Эле- мент	Спектр, атом.%		
	1	2	3
Na	1,29	2,14	3,81
P	42,26	47,18	45,12
Ca	56,45	50,68	51,07

*пересчет без С и О

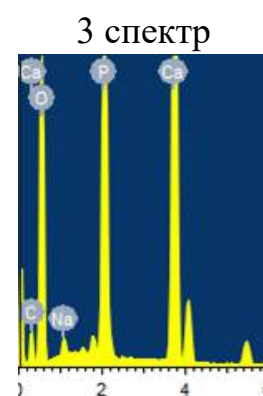
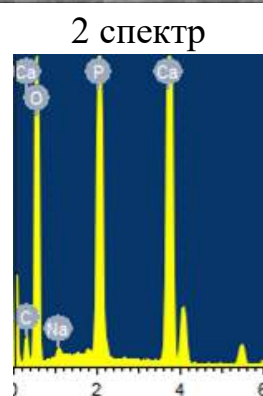
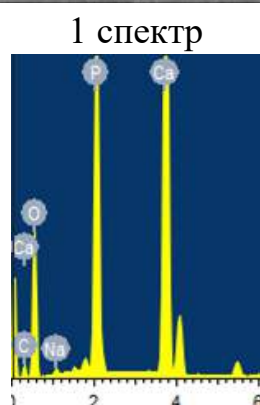
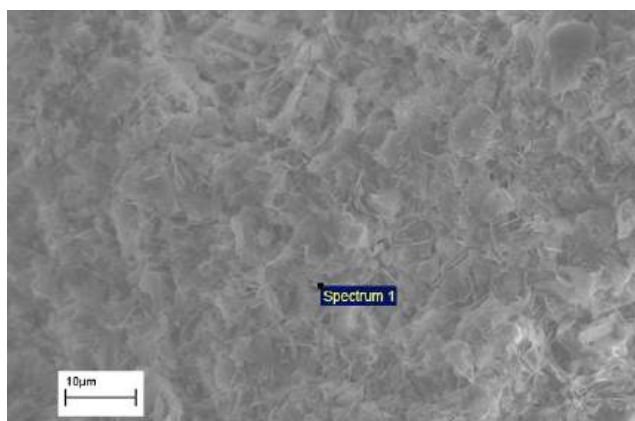


Рисунок 3.21 – Микроструктура и EDX точек цементного камня состава 3



Элемент	Атом.%
P	44,79
Ca	55,21

*пересчет без С и О

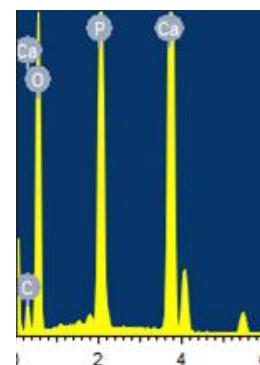
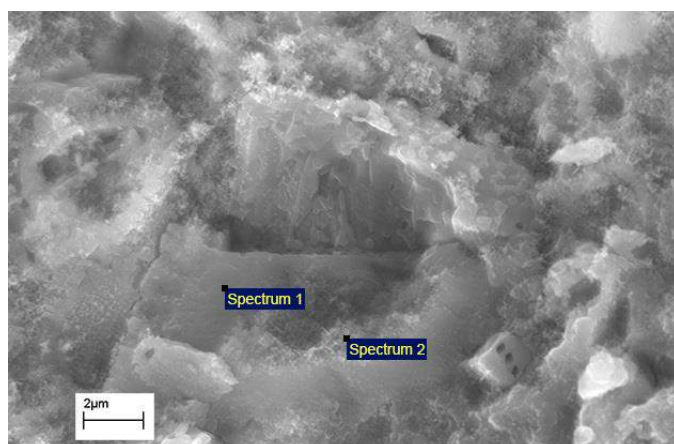


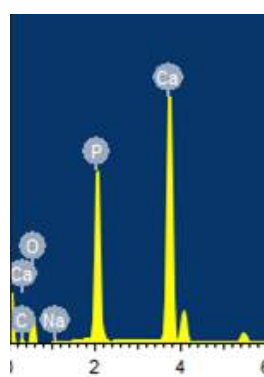
Рисунок 3.22 – Микроструктура и EDX точки цементного камня состава 4

Соотношение Ca/P среднее в двух точках цементного камня состава 8 = 1,54 (рисунок 3.23).

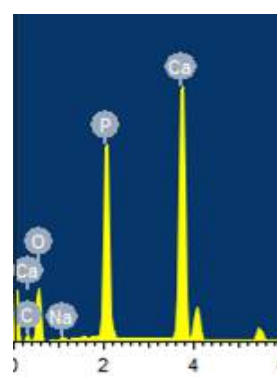


Элемент	Спектр, атм.%	
	1	2
Na	0,95	1,28
P	37,75	40,12
Ca	61,30	58,60

*пересчет без С и О



Спектр 1



Спектр 2

Рисунок 3.23 – Микроструктура и EDX точек цементного камня состава 8

Соотношение Ca/P среднее в четырех точках цементного камня состава 9 = 1,05 (рисунок 3.25). Внутри поры кристаллы брушита.

На Микроструктура цементного камня состава 12 четко видны две области – внутри поры (спектр 2 лежит на границе зон) и область на изломе материала (спектр 1 и 3) (рисунок 3.26). Соотношение Ca/P спектра 2 = 1,18, среднее значение Ca/P спектров 1 и 3 = 1,4.

Надо заметить, что ионы натрия обнаруживаются в составе разных кристаллов практически во всех выбранных для EDX точках, что связано с его равномерным распределением и встраиванием в решетки кристаллов.



Эле- мент	Спектр, атм.%			
	1	2	3	4
P	48,79	49,54	48,89	48,21
Ca	51,21	50,46	51,11	51,79

*пересчет без С и О

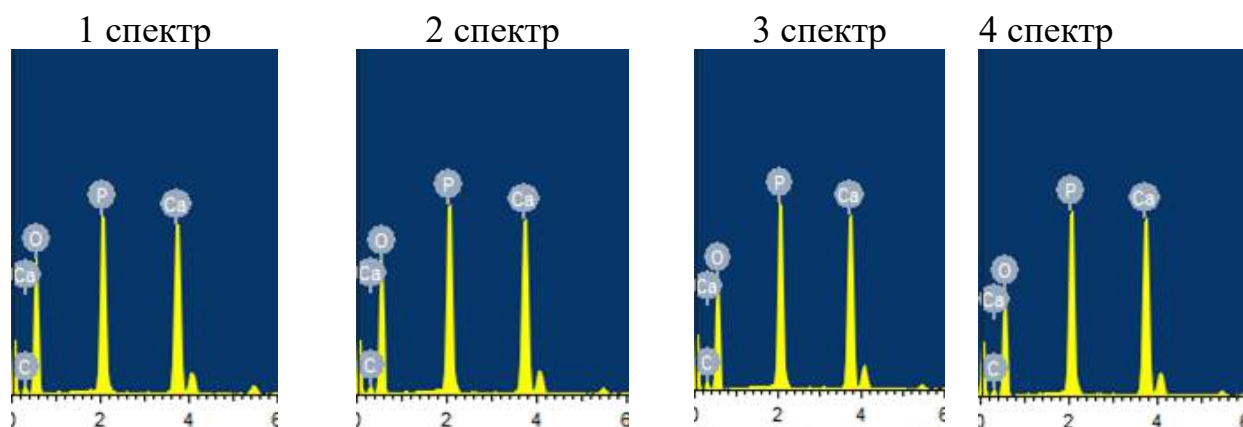
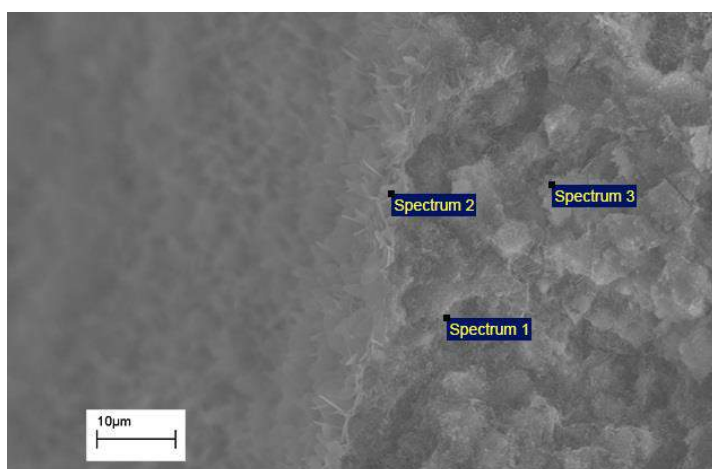


Рисунок 3.25 – Микроструктура и EDX точек цементного камня состава 9



Элемент	Спектр		
	1	2	3
Na	0,72	1,58	1,06
P	40,27	45,22	42,43
Ca	59,01	53,21	56,51

*пересчет без С и О

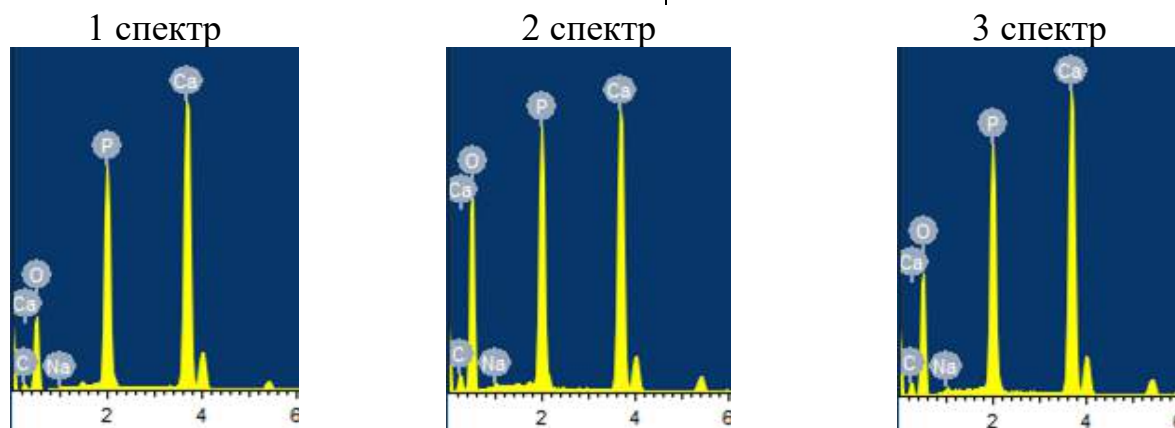


Рисунок 3.26 – Микроструктура и EDX точек цементного камня состава 12

3.2 Свойства цементного камня в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - CaCO_3 - $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - H_2O при α -ТКФ = 80 мас. %

Прочность цементного камня не является одной из наиболее важных характеристик, поскольку цемент позиционируется как материал для восстановления дефектов, в не несущих нагрузку костях. Однако прочность важна для сохранения формы без разрушения при заполнении дефекта и до момента резорбции. По литературным данным прочность при сжатии гидроксипатитовых цементах составляет 20–83 МПа.

Состав исходной цементной смеси влияет на свойства цементного камня. Значения прочности цементного камня на 28 сут. твердения для всех фигуративных точек находятся в диапазонах и 2,9–5,6 МПа при изгибе и 29,2–36,2 МПа на сжатии и не являются статистически значимыми (рисунок 3.27). Однако средние значения прочности при сжатии у составов, содержащих более высокие значения количества ДКФД (составы 3, 4 9), ниже, чем у других составов.

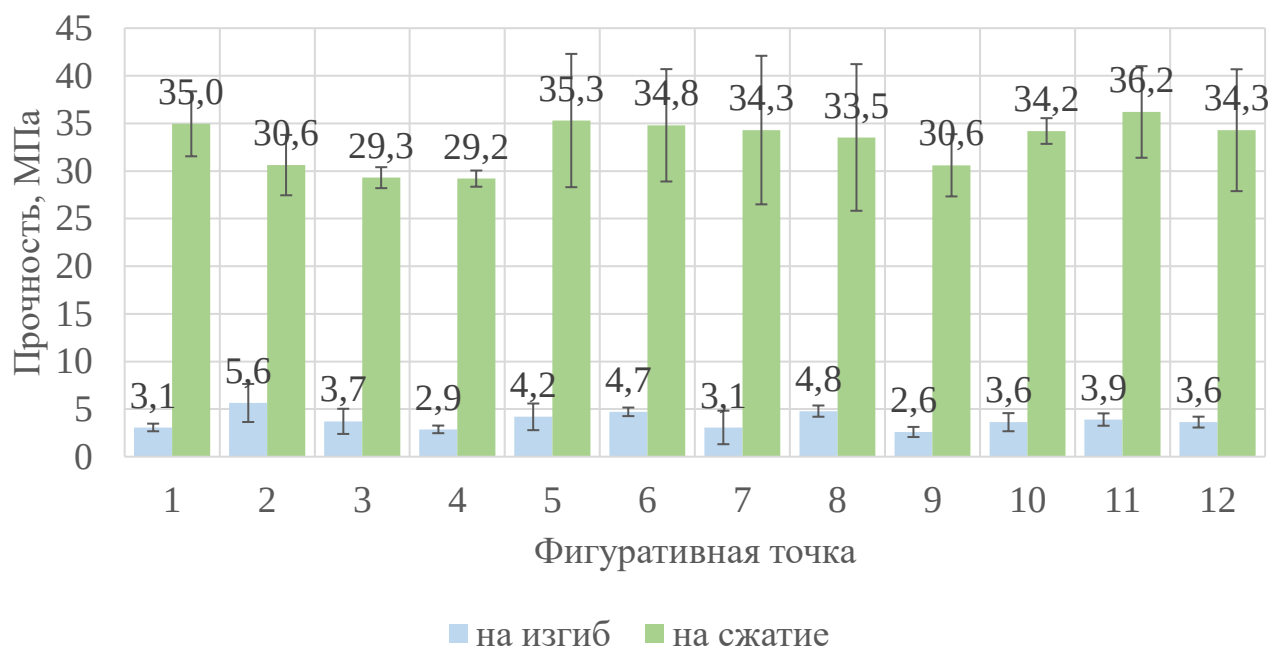


Рисунок 3.27 – Прочность цементного камня

Таким образом, прочность увеличивается при увеличении количества карбоната кальция в составе и уменьшении количества ДКФД (рисунок 3.28).

Количество ДКФД может оказывать влияние на прочностные характеристики цементного камня по трем причинам: 1) крупные кристаллы ДКФД образуют меньшее количество контактов между кристаллами, а, как известно, прочность тонкодисперсных твердых тел определяется не столько прочностью кристаллов, образующих кристаллизационный каркас, сколько прочностью и числом контактов между ними; 2) образование ДКФД в результате реакции между карбонатом кальция и МКФМ приводит к выделению углекислого газа, который повышает пористость цементного камня; 3) образование пор на месте частиц МКФМ, не успевших полностью раствориться до начала схватывания цемента, и вступающих в реакцию при твердении с образованием крупных кристаллов ДКФД на поверхности поры, препятствующих ее заполнению твердыми фазами.

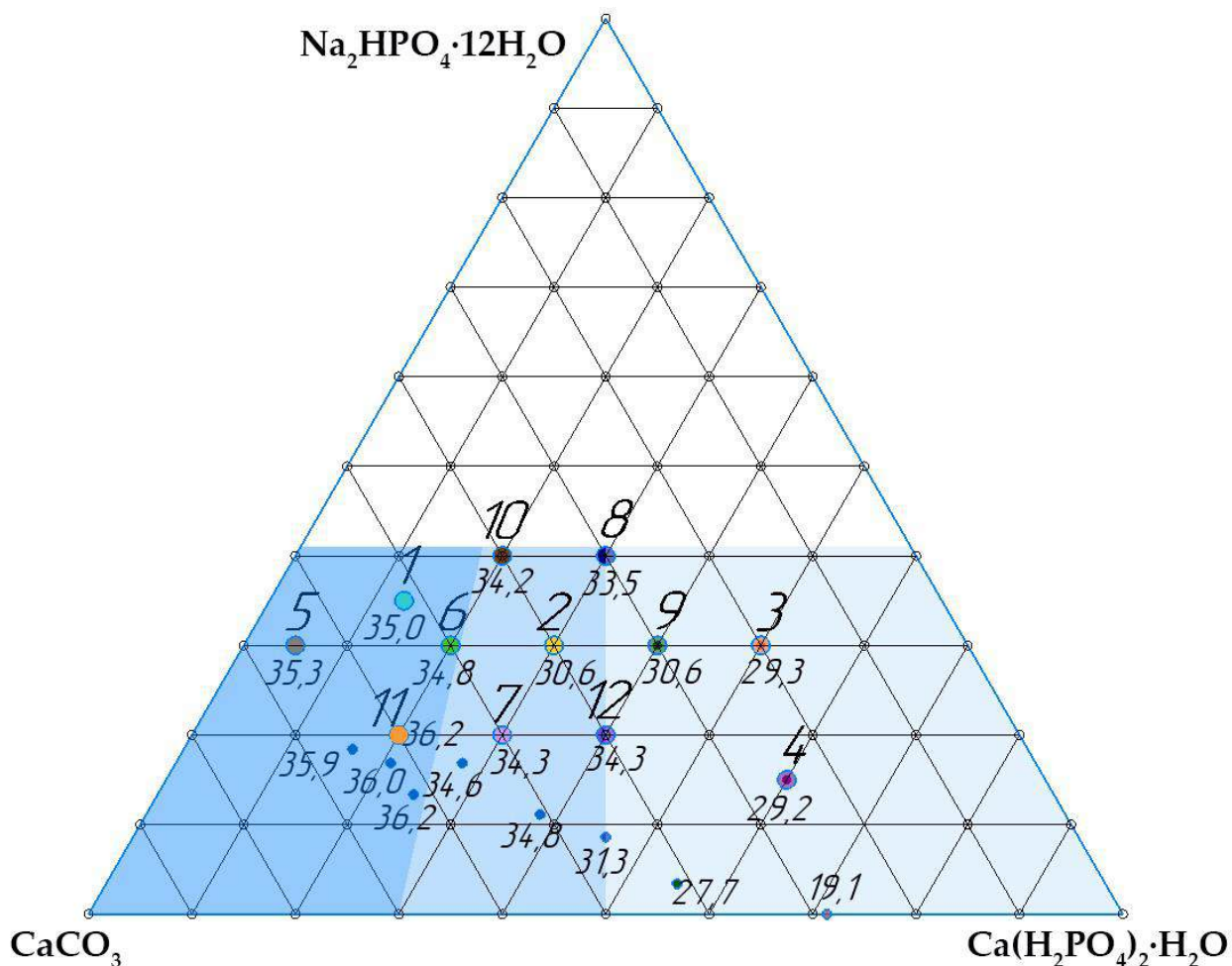


Рисунок 3.28 – Прочность цементного камня при сжатии, образованного в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при фиксированном количестве α -ТКФ = 80 мас. %

Открытая микро- и мезопористость (от нескольких нанометров до микрометров) в диапазоне 30–60% характерны для всех кальцийфосфатных цементов. Пористость влияет на скорость резорбции, обеспечивает пропитку цементного камня окружающими жидкостями, создает микрорельеф поверхности для удержания клеток, улучшая остеогенез, кроме того, определяет скорость диффузии инкорпорированных фармакологических субстанций.

Открытая пористость цементного камня, измеренная на 28 сут. твердения, зависит от количества МКФМ в составе (рисунок 3.29), однако значения отличаются в пределах погрешностей. Поскольку все фигуративные точки находятся слева от стехиометрической прямой карбоната кальция и МКФМ, составы избыточны по карбонату кальция. Кроме того, МКФМ способен взаимодействовать с ТКФ. Учитывая количественное превосходство α -ТКФ относительно других компонентов цемента, вероятность взаимодействия МКФМ с α -ТКФ выше, чем с карбонатом кальция, но не исключает последнего. В связи с отсутствием значимой разницы в исходном соотношении Ca/C и в Ca/C , рассчитанным по стехиометрическим формулам, можно предположить, что CO_2 , при образовывании встраивался в кристаллическую решетку кальцийдефицитного гидроксиапатита, приводя к получению карбонат-замещенного гидроксиапатита в серии твердых растворов.

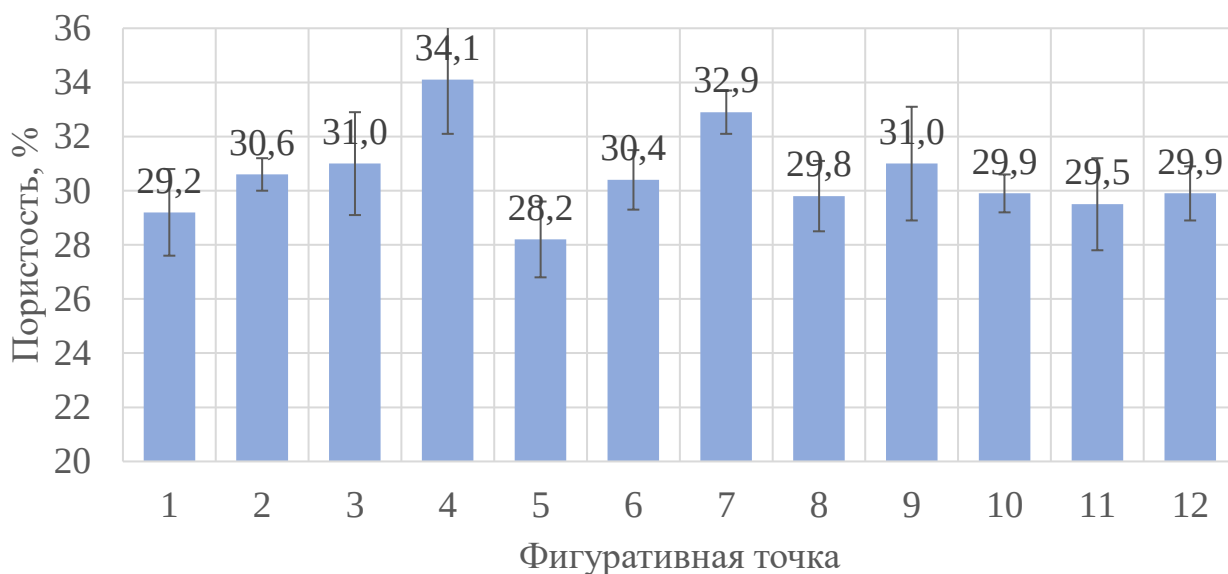


Рисунок 3.29 – Пористость цементного камня

Таким образом, пористость увеличивается при увеличении количества МКФМ в составе (рисунок 3.30), что связано, видимо, с образованием крупных кристаллов ДКФД, в том числе на поверхности пор, образованных растворением частиц МКФМ, что наблюдалось по результатам СЭМ.

Растворимость цементного камня, образованного в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O , зависит от количества ДКФД и карбонат-ионов в структуре гидроксиапатита.

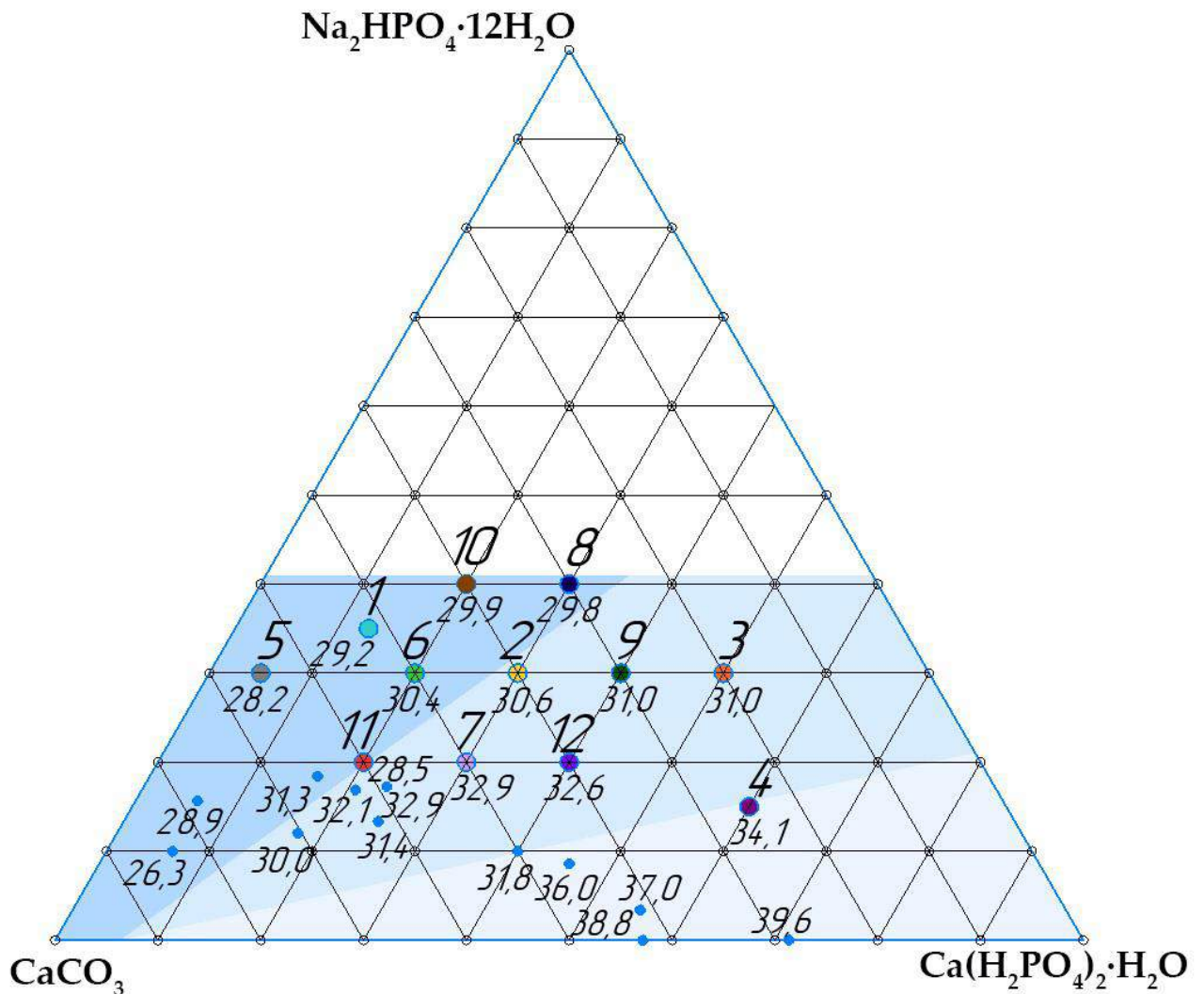
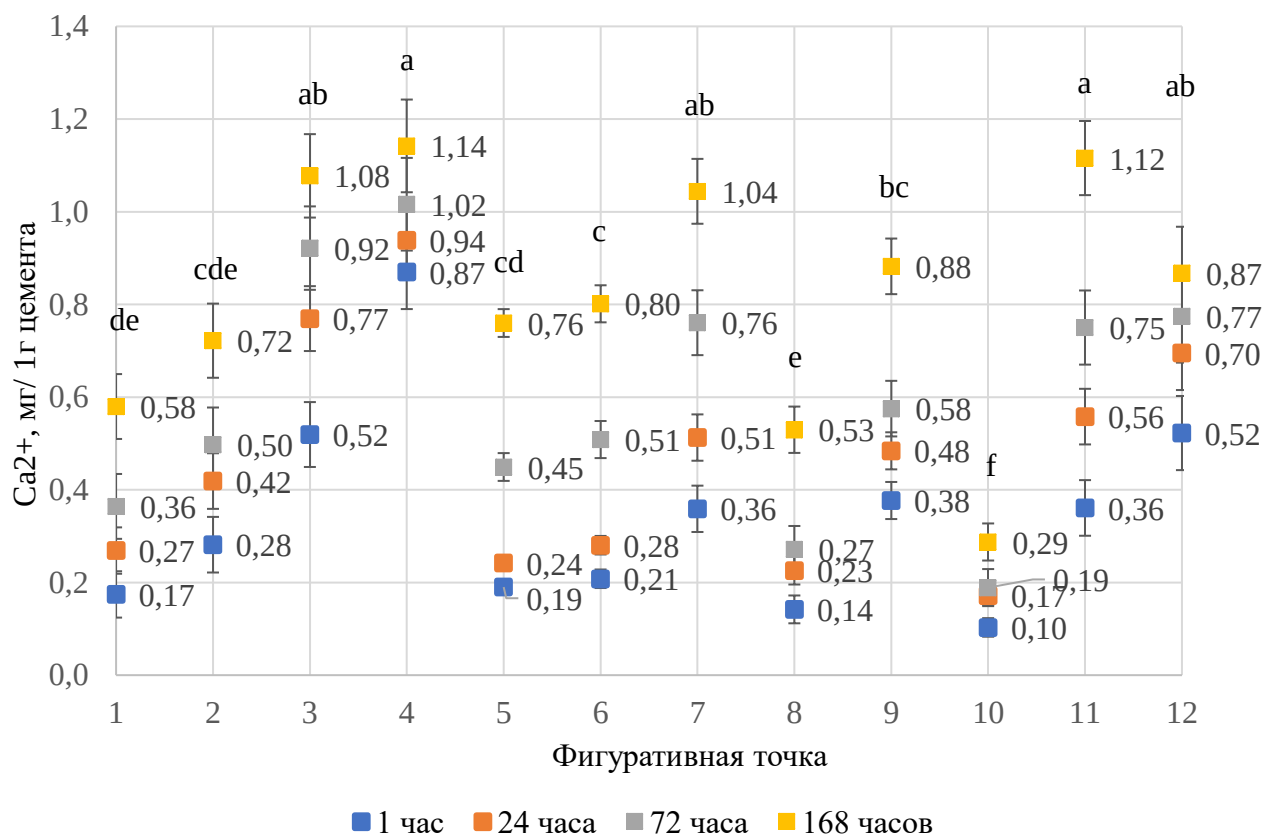


Рисунок 3.30 – Пористость цементного камня, образованного в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при фиксированном количестве α -ТКФ = 80 мас. %

Растворимость гранул цементного камня размером 250–500 мкм оценивалась при физиологических значениях температуры 37 °С и скорости вращения 120 об./мин в физиологическом растворе в течение 7 сут. Диапазон размеров гранул выбиралось в соответствии с наиболее востребованным размером гранулированных остеопластических стоматологических материалов, представленных на международном и отечественном рынках.

Концентрация ионов кальция в физиологическом растворе после выдержки в нем гранул цементного камня, образованного в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O в фигуративных точках, показана на рисунке 3.31.



*Тест Тьюки, разные буквы обозначают существенно отличающиеся значения ($p < 0.05$)

Рисунок 3.31 – Концентрация ионов кальция в физиологическом растворе после выдержки в нем цементного камня, образованного в α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O в фигуративных точках

Наибольшие значения растворимости характерны для составов 3 и 4, которые содержат наибольшие количества ДКФД, а соотношение Са/Р составляет 1,4. Однако невысокое содержание ДКФД в составах компенсируется содержанием значительного количества CO_3^{2-} -ионов, что приводит к более высокой растворимости, чем у составов, имеющих низкое содержание карбонат-ионов при низком содержании ДКФД. На графике зависимости растворимости цементного камня от количества ДКФД и ионов CO_3^{2-} в составе цементного камня цветами обозначено количество ДКФД в соответствии с результатами РФА и количество карбонат-ионов в соответствии с результатами волюметрического исследований (рисунок 3.32).

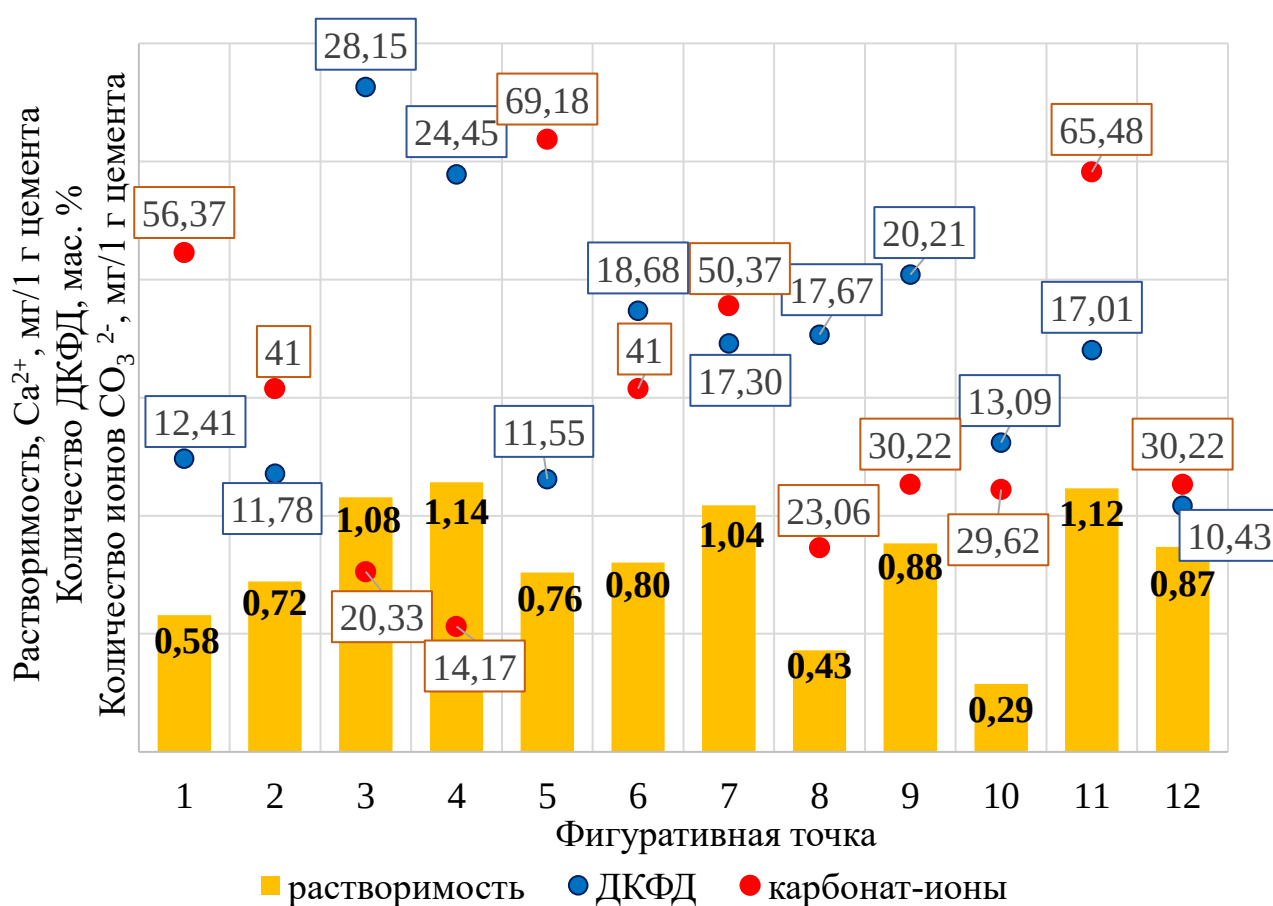
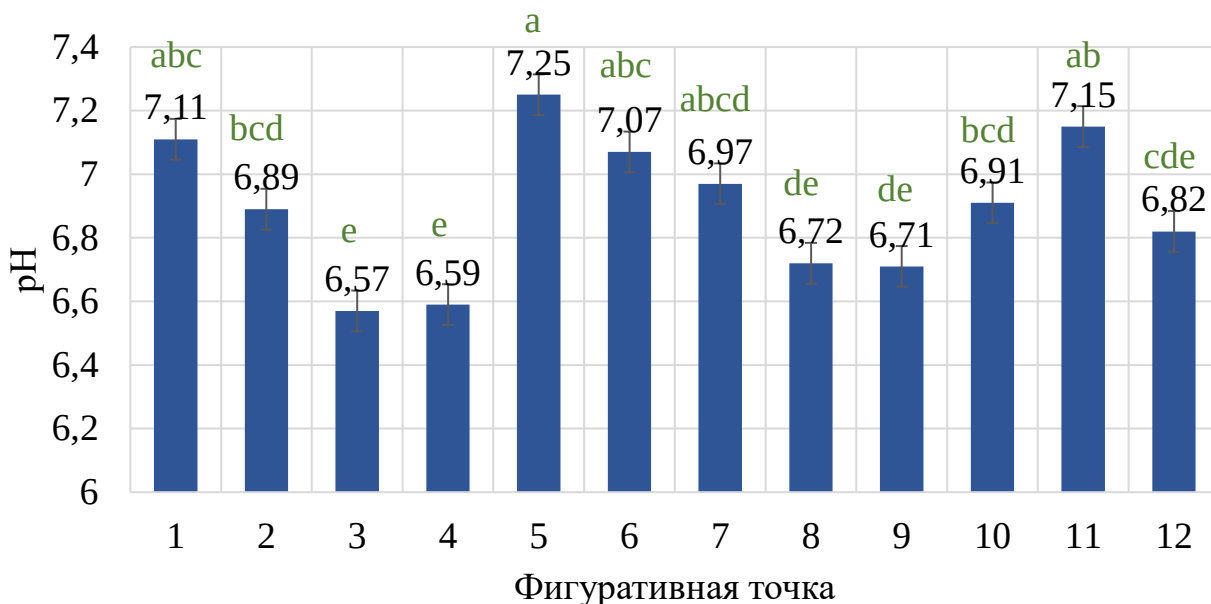


Рисунок 3.32 – Зависимость растворимости от количества ДКФД и ионов CO_3^{2-} в составе цементного камня

Количество ДКФД и ионов CO_3^{2-} в составе цементного камня влияют на значения pH контактной среды при их растворении. Карбонатсодержащий гидроксиапатитовый цемент, полученный в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3$ –

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}$, является рН-нейтральным (измерения рН проводились при контакте с гранулами цементного камня размером 250–500 мкм): рН находится в диапазоне 6,5–7,3 для всех составов (рисунок 3.33). Наименьшие значения рН характерны для составов с высоким содержанием ДКФД, наибольшие – для составов с наибольшим количеством ионов CO_3^{2-} .



*Тест Тьюки, разные буквы обозначают существенно отличающиеся значения ($p < 0.05$)

Рисунок 3.33 – рН цементов

Таким образом, содержание ДКФД и ионов CO_3^{2-} вносит вклад в растворимость, что прослеживается на срезе диаграммы состава в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{CaCO}_3 - \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} - \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} - \text{H}_2\text{O}$ при α -ТКФ = 80 мас. % (рисунок 3.34).

Низкая растворимость составов фигуративных точек 8 и 10, содержащих высокую концентрацию ионов Na^+ , возможно, так же связана с образованием Na-содержащих гидроксиапатитов, растворимость которых может быть ниже. Ионы натрия системы могут встраиваться в структуру карбонатного и кальцийдефицитного гидроксиапатитов, компенсируя разницу в зарядах при замещении ионов PO_4^{3-} на CO_3^{2-} или на HPO_4^{2-} . В соответствии с исследованиями авторов [352] при погружении в водные растворы Na-содержащие

гидроксиапатиты теряют Na^+ , и в открытой системе превращаются в дефицитный по кальцию гидроксиапатит $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)_1(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ в течение примерно 2 мес.

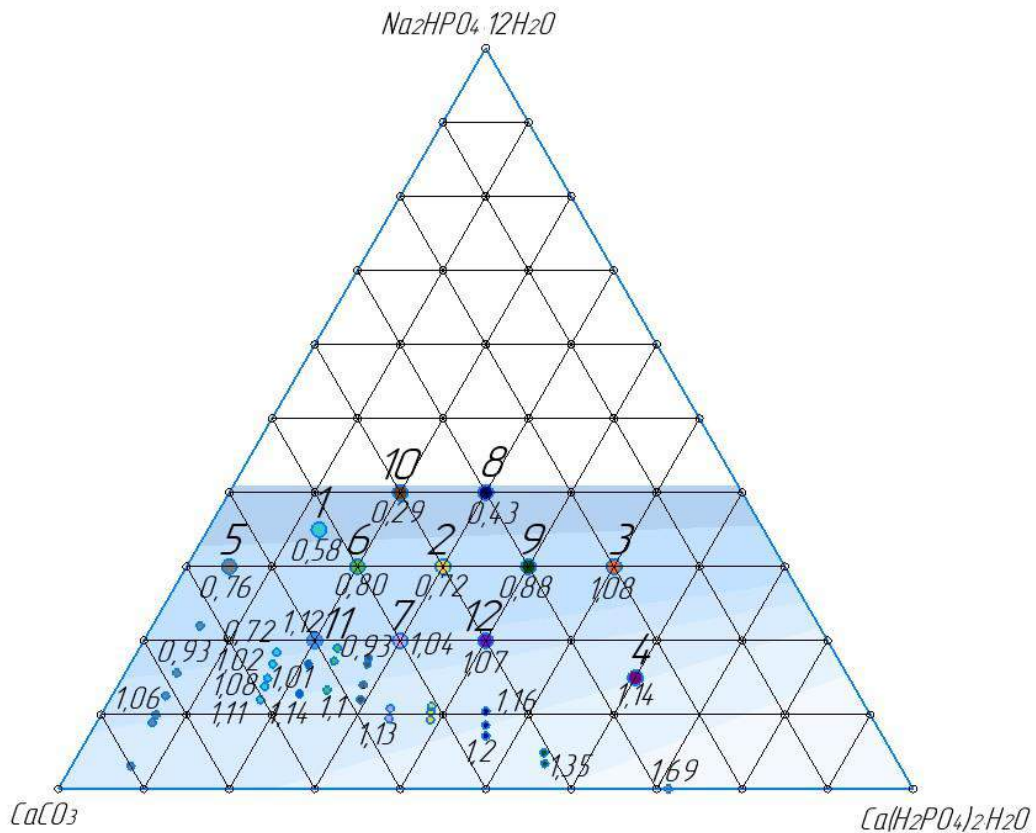


Рисунок 3.34 – Растворимость цементного камня, образованного в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O-Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O-H}_2\text{O}$ при фиксированном количестве $\alpha\text{-ТКФ} = 80$ мас. %

При выдерживании в течение мес. в физиологическом растворе цементного камня состава фигуративной точки 3 его поверхность становится более пористой (размер пор 2–10 мкм), что позволяет предположить о неравномерной резорбции цементного камня, т.е. скорость растворения областей скопления кристаллов ДКФД выше, чем скорость растворения иных фаз (рисунок 3.35).

Характер изменения микроструктуры цементного камня состава фигуративной точки 5, как состава с максимальным содержанием карбонат-групп среди исследуемых составов, после выдержки в физрастворе отличается от состава фигуративной точки 3 (рисунок 3.36). Рельеф поверхности сглаживается, уменьшается размер частиц, в некоторых областях наблюдается повышение

пористости, хотя, возможно, это связано с обнажением исходной структуры при растворении частиц.

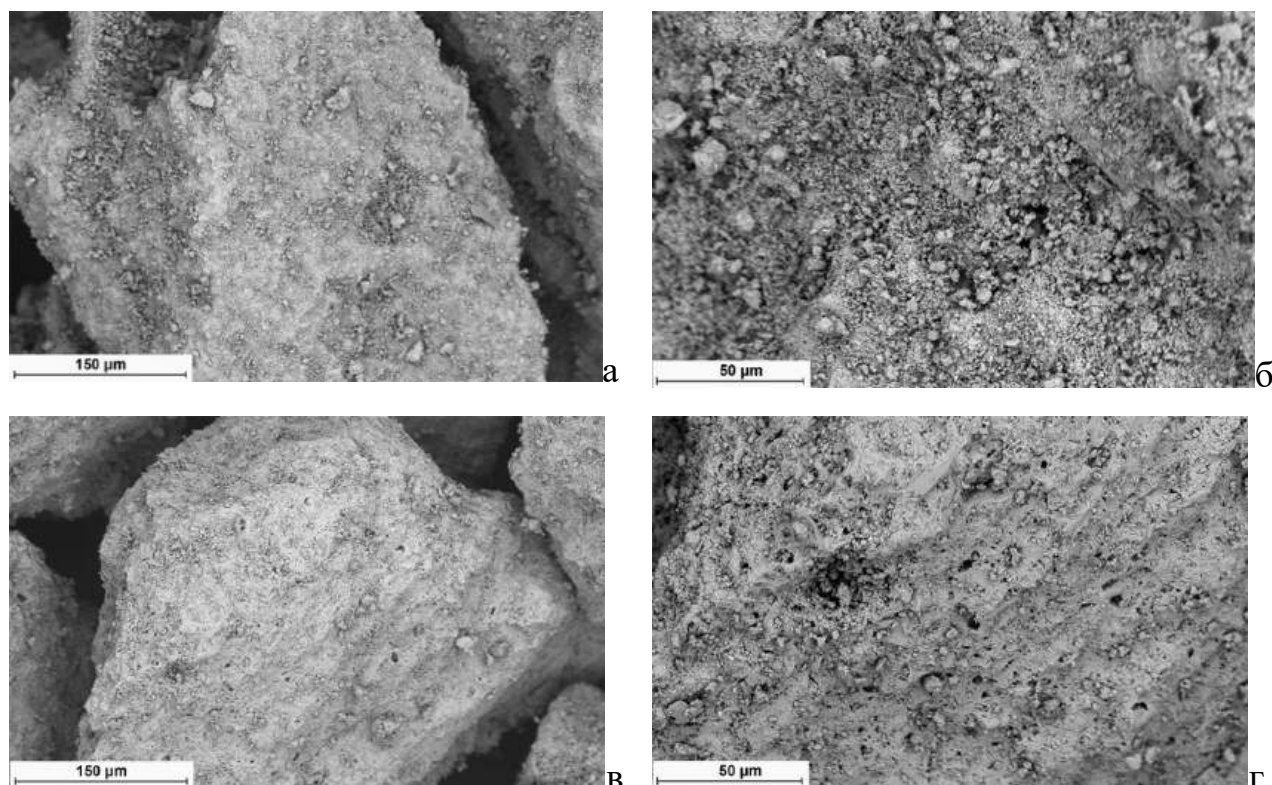


Рисунок 3.35 – Микроструктура цементного камня состава фигуративной точки 4: до погружения в физраствор (а, б); после выдержки в физрастворе (в, г). Увеличение: б, г – $\times 2500$ – б, г; а, в – $\times 1000$

Фазовый состав цементного камня составов фигуративных точек после выдержки в физиологическом растворе, представлен тем же фазовым составом, что и до выдержки в физиологическом растворе: карбонатзамещенным гидроксиапатитом переменного состава и ДКФД. Сравнение дифрактограмм состава фигуративной точки 3 до и после выдержки в физрастворе представлены на рисунке 3.37.

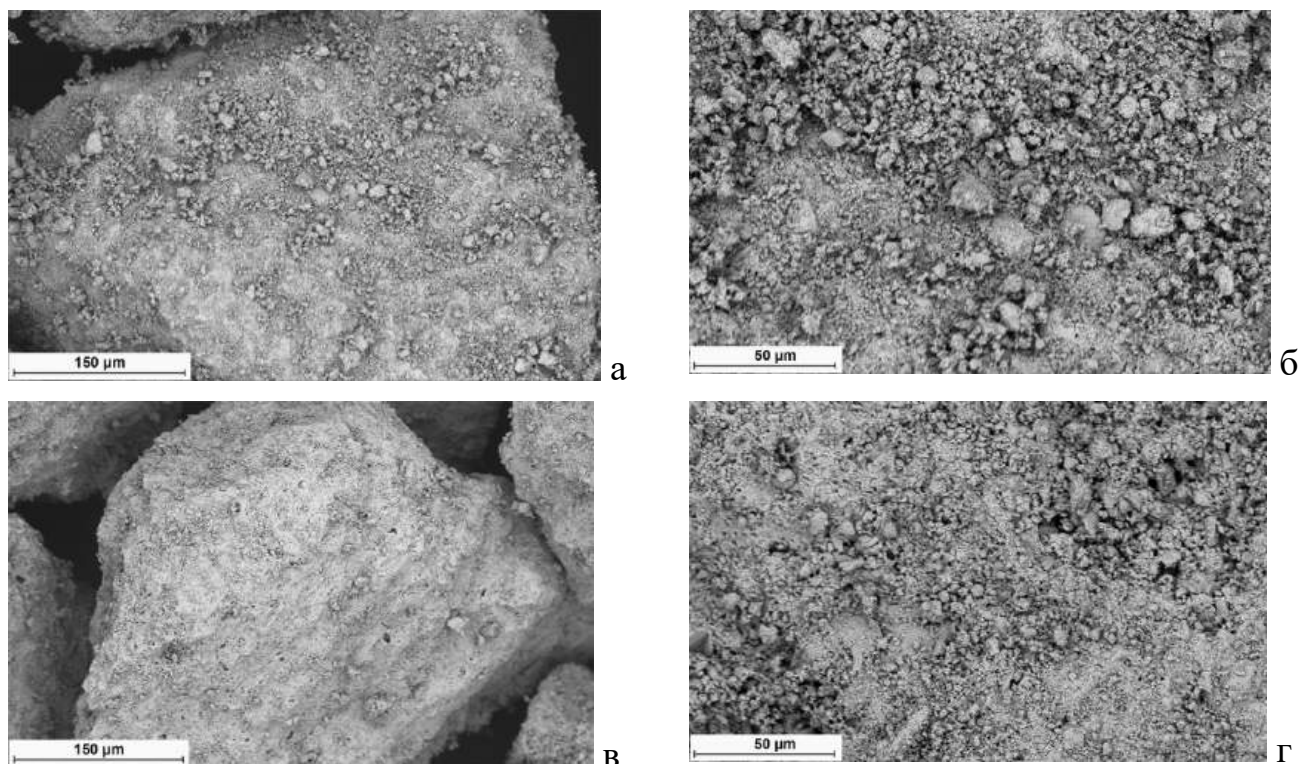


Рисунок 3.36 – Микроструктура цементного камня состава фигуративной точки 5: до погружения в физраствор (а, б); после выдержки в физрастворе (в, г). Увеличение: б, г – $\times 2500$; а, в – $\times 1000$

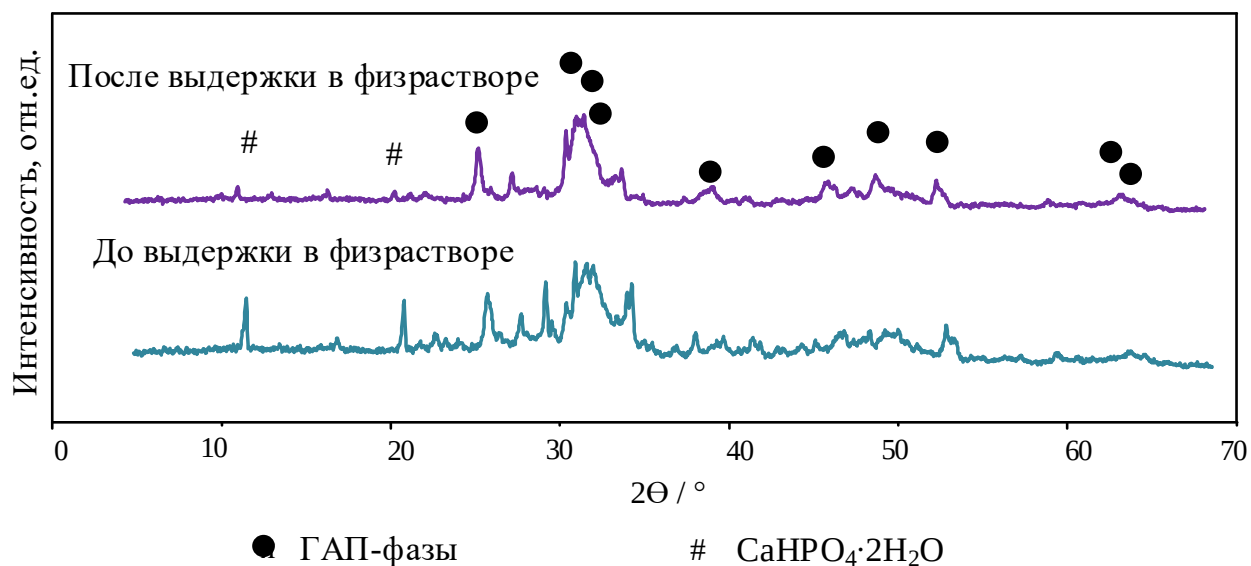


Рисунок 3.37 – Дифрактограммы цементного камня состава фигуративной точки 3 до и после выдержки в физиологическом растворе

Дифрактограммы составов двенадцати фигуративных точек после выдержки в физрастворе представлены на рисунке 3.38. При расчете количественного фазового состава учитывались только целевые гидрок시아патитные фазы переменного состава, используя карточку [075-3728], и ДКФД [072-0713] и рассчитывалось соотношение фазы ДКФД к ГАП-фазам.

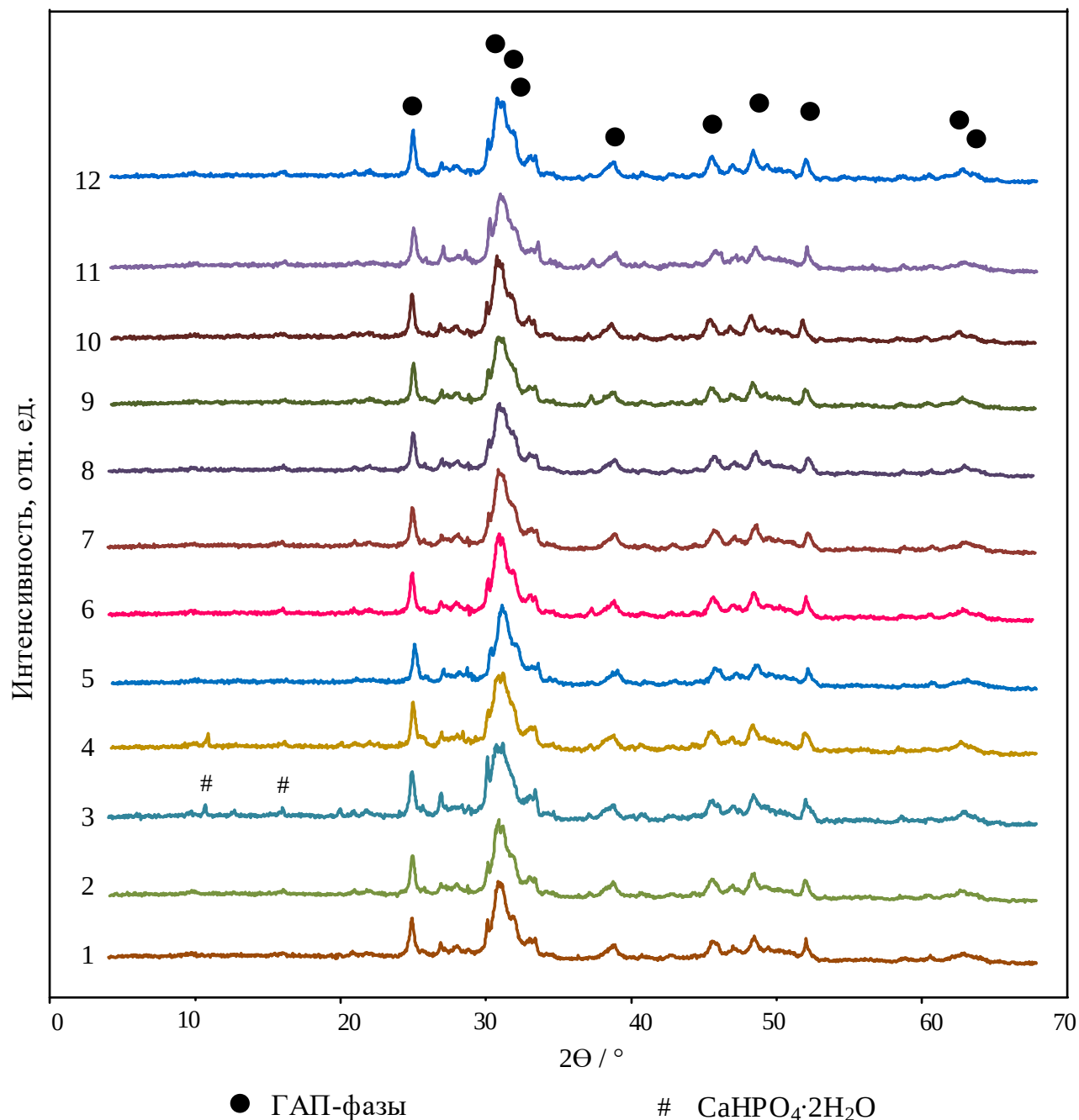


Рисунок 3.38 – Дифрактограммы цементного камня после выдержки в физиологическом растворе в фигуративных точках составов

Уменьшение количества ДКФД подтверждается данными полуколичественного анализа, основанного на расчетах по корундовому числу. Сравнение дифрактограмм состава фигуративной точки 3 до и после выдержки в физрастворе представлены на рисунке 3.38, результаты количественного определения фазового состава цементного камня в фигуративных точках – в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Фазовый состав продуктов взаимодействия α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O

Состав	Количество, мас.%			Соотношение фаз ДКФД/ГАП	
	ДКФД		ГАП-фазы	До выдержки в физрастворе	После выдержки в физрастворе
1	10,3±0,4	f *	89,7±0,4	0,142	0,115
2	10,3±0,4	f	89,7±0,4	0,134	0,115
3	16,5±0,6	a	83,5±0,6	0,392	0,197
4	15,5±0,3	b	84,5±0,3	0,324	0,183
5	10,1±0,3	f	89,9±0,3	0,131	0,112
6	10,6±0,5	ef	89,4±0,5	0,230	0,118
7	11,5±0,4	cd	88,5±0,4	0,209	0,130
8	11,4±0,3	cde	88,6±0,3	0,215	0,129
9	11,9±0,3	c	88,1±0,3	0,253	0,135
10	11,0±0,5	def	89,0±0,5	0,151	0,123
11	11,0±0,6	def	89,0±0,6	0,205	0,132
12	10,4±0,3	f	89,6±0,3	0,116	0,116

Соотношение фаз ДКФД/ГАП снижается. Таким образом, зависимость растворимости цементного камня от содержания ДКФД подтверждается результатами рентгенофазового анализа, в соответствии с которым содержание ДКФД в составе цементного камня после выдержки в физрастворе, снижается.

В связи с влиянием исходного состава на тепловыделение и образование ДКФД в составе цементного камня, цемент на основе которого является быстротвердеющим, сроки схватывания цемента разных составов будут отличаться.

Сроки схватывания важны для перемешивания цементного теста, укладки в форму при применении впоследствии медицинских изделий на основе цементного

камня, и, в большей степени, при использовании цемента в виде инъекционных составов *in situ*. Кроме того, при коротких сроках схватывания образование цементного камня конечного состава будет происходить медленнее за счет быстрого образования на частицах исходных компонентов продуктов реакции.

По литературным данным введение ионов фосфата и/или кальция в жидкость затворения приводит к ускорению реакции в связи с эффектом общего иона [133, 356]. Одним из компонентов системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O является растворимый додекагидрат фосфата натрия, основная задача которого – регулирование сроков схватывания цемента.

Поскольку известно, что КГАП можно получить при pH выше 7 [133], вполне вероятно также, что слегка щелочной pH фосфатного раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ способствует осаждению кальцийдефицитного гидроксиапатита, поскольку $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ является амфолитом по Бренстеду-Лоури, растворам которого характерно pH 9,76 при средних и высоких концентрациях. Т.е. раствор затворяющей жидкости является слабо щелочным.

Предположительно, возможно усиление растворения кислого МКФМ в щелочной среде и ускорение реакции его взаимодействия с карбонатом кальция и α -ТКФ. Ионы натрия скорее всего встраиваются в структуру карбонатного гидроксиапатита, компенсируя разницу в зарядах при замещении ионов PO_4^{3-} на CO_3^{2-} .

Увеличение $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ приводит к уменьшению сроков схватывания, однако по литературным данным, общее время гидратации увеличивается [130, 357].

Оптимальные сроки начала схватывания составляют 5–10 мин. [129, 358–360]. Это клинически оправданное время: оно не слишком короткое (для манипуляций с ним) и не слишком длинное (сокращая длительность процедуры). Цемент со сроком начала схватывания менее 1 мин. является непригодным даже для использования в материалах, заранее сформованных и поступающих в операционную в готовой форме. Конец схватывания у коммерческих цемента приходится на 10–18 мин.

В связи с тем, что $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ является главным образом регулятором твердения в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$, в работе были исследованы составы, соотношения компонентов $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaCO_3 и $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ которых соответствуют соотношениям этих компонентов в фигуративных точках, а количество $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ меняется, что позволяет определить сроки схватывания различных составов, передвигаясь по прямым, проходящим через вершину треугольника состава, соответствующей 100% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

На рисунке 3.39 ломаными линиями показаны составы, начало схватывания которых приходится на 1, 10 или 18 мин. Указанные сроки были выбраны на основе клинически оправданных сроков твердения и по результатам анализа сроков схватывания коммерческих цементов. Однако необходимо учитывать форму подачи остеопатического материала. При изготовлении цементного камня и материалов на его основе в производстве и поступление в клинику в виде блоков или гранул, сроки схватывания должны позволять подготовить цементную пасту и заполнить ею формы, что зависит, кроме прочего, от единовременно используемого количества материала. В связи с этим предложено использовать составы со сроками схватывания от 1 до 18 мин. с предпочтением 10 мин.

На рисунке 3.39 сроки начала схватывания составов в диапазонах менее 1 мин., 1–10 мин., 10–18 мин. и более 18 мин. обозначены разными цветами.

Необходимо заметить, что стехиометрическая прямая образования ДКФД из МКФМ и карбоната кальция проходит через точку 3, и все изучаемые составы расположены в области избытка CaCO_3 по отношению к МКФМ для образования ДКФД.

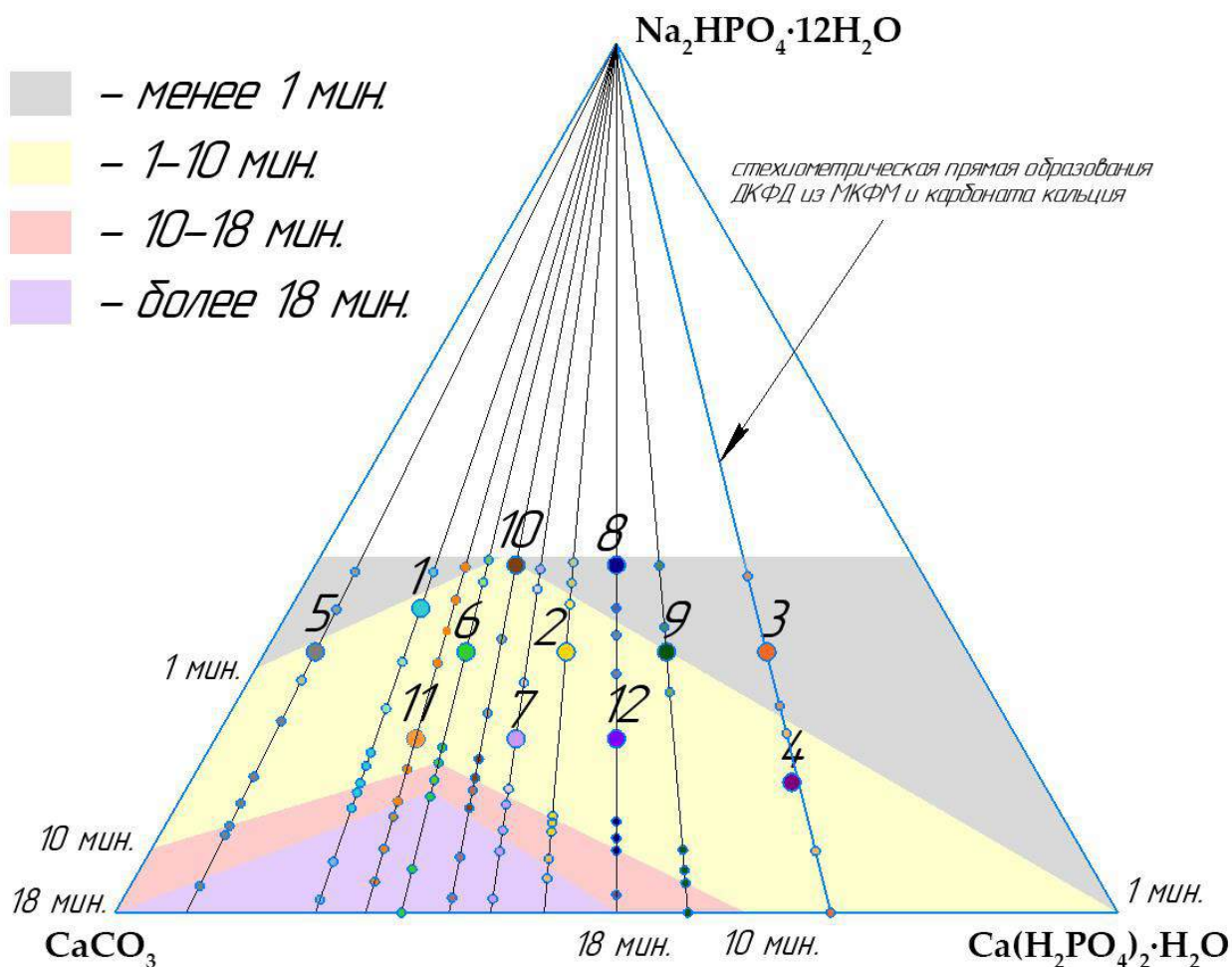


Рисунок 3.39 – Сроки схватывания цементов

Линии составов с определенными сроками начала схватывания представляют собой ломаные линии, вершины которых располагаются на линии составов с мольным соотношением $\text{CaCO}_3 / \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \approx 6,29$. По обе стороны от линии составов с мольным соотношением $\text{CaCO}_3 / \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \approx 6,29$ сроки схватывания уменьшаются. Т.е. уменьшение соотношения $\text{CaCO}_3 / \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ускоряет схватывание за счет увеличения доли МКФМ. Образующиеся кристаллы ДКФД выступают в качестве затравок кристаллизации гидроксиапатитов переменного состава. Увеличение соотношения $\text{CaCO}_3 / \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ уменьшает сроки схватывания цемента, возможно, за счет образования А-типа карбонатного гидроксиапатита, поскольку составы только фигуративных точек 1, 5, 6 и 11 содержат фазу карбонсодержащего гидроксиапатита А-типа (пики ИК-

спектра при 1450 и 1470 см^{-1}), причем через точку 6 и проходит линия состава с мольным соотношением 6,29.

В связи с вышесказанным, для достижения одинаковых сроков начала схватывания для разных составов необходимо закономерно уменьшать количество додекагидрата натрия при отклонении от мольного соотношения $\text{CaCO}_3/\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, что приводит к образованию ломаных линий.

3.3 Результаты доклинических исследований *in vivo* цементного камня составов фигуративных точек

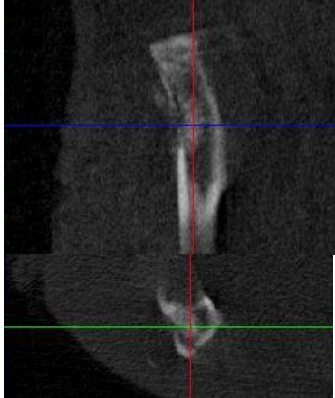
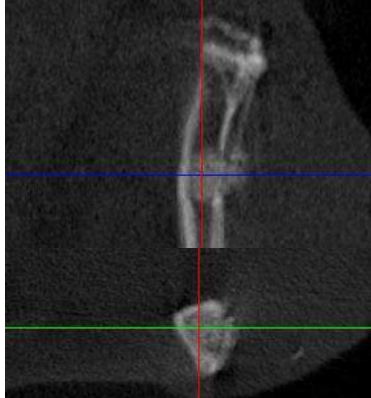
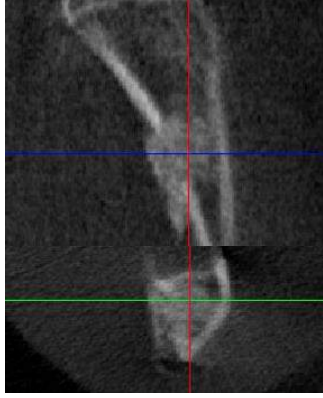
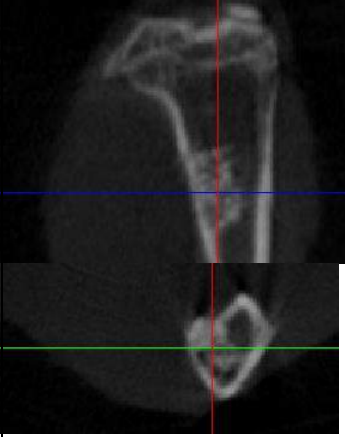
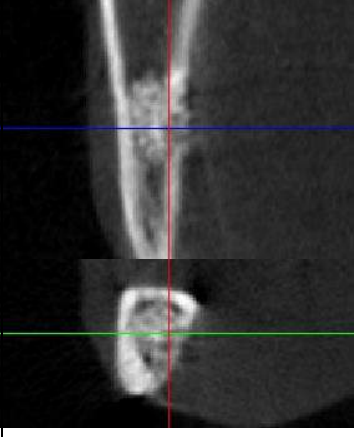
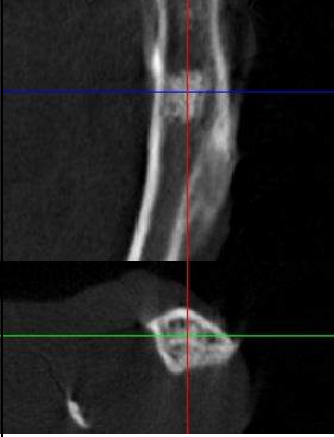
Биосовместимость и резорбируемость были исследованы в экспериментах *in vivo* на 9 самцах крысы линии Wistar в модели перфорации большеберцовой кости. Гранулы размером 250–500 мкм составов фигуративных точек 3, 5 и 8 были устанавливали в костные перфорации критического размера большеберцовой кости.

Через 3 мес. после имплантации, по данным компьютерной микротомографии, происходила частичная резорбция матрикса и формирование новой костной ткани (таблица 3.7).

Через три мес. после имплантации, в случае использования цемента состава 3 отмечалось наилучшее заживление дефекта: полное закрытие трепанационного отверстия с образованием четко рентген-различимой кортикальной кости. Гранулы материала оставались рентгенконтрастными в зоне костномозгового канала, но отмечалось некоторое снижение их плотности, экзостозов не наблюдалось.

Повышение рентгенконтрастности состава 5 по стороне, обращенной к дефекту, свидетельствовала об образовании кортикальных мостиков, углубленных в костномозговой канал, не полностью соединенных между собой и еще не до конца сформированных. Также наблюдалось разрастание кости с границ дефекта в сторону имплантата.

Таблица 3.7 – 3D-модели и ортогональные проекции большеберцовой кости лабораторного животного по результатам микро-КТ

	Фигуративная точка		
	3	5	8
3D-модель и ортогональные проекции исходные			
			
3D-модель и ортогональные проекции после 3 мес. имплантации			
			
3D-модель и ортогональные проекции показаны на одном примере для каждого состава			

Материал точки 8 показал наименее выраженную степень закрытия дефекта кости, наблюдалась яркая костная мозоль в проекции трепанационного отверстия, с разрастанием кости от границ дефекта, вытянутым тонким кортикальным мостиком, но зрелость этого регенерата оценивалась как минимальная, по сравнению с другими составами.

Согласно морфологическому исследованию, через 3 мес. после имплантации гранул в отверстия большой берцовой кости почти во всех случаях наблюдалась хорошая костная регенерация с заполнением области дефекта новообразованной костной тканью (таблица 3.8). При этом воспалительная реакция отсутствовала или была минимальной, остатки имплантата выявлялись в костных дефектах в большинстве случаев. Наиболее интенсивная костная регенерация была характерна для составов фигуративных точек 3 и 5 по сравнению с составом 8, причем новообразованная кость имела достаточно зрелую структуру с большим количеством остеоцитов.

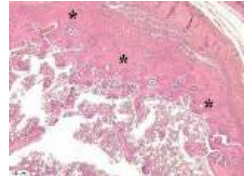
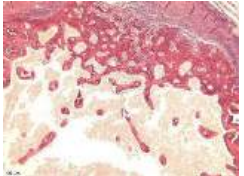
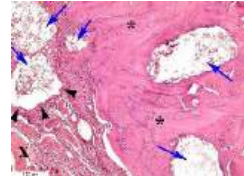
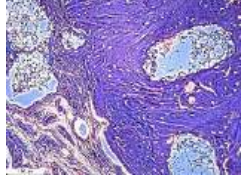
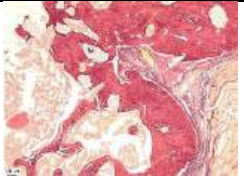
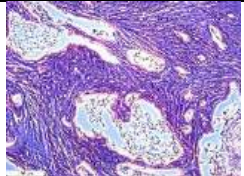
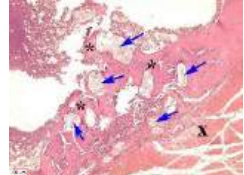
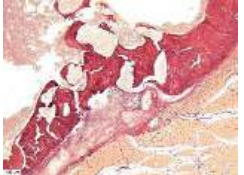
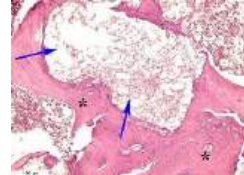
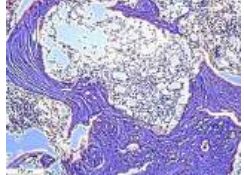
При исследовании образцов разных составов остатки имплантата вблизи области дефекта помимо кости также встречались и в мышцах. В этом случае они были окружены соединительно-тканной капсулой, состоящей из коллагеновых волокон с фибробластами, макрофагами и примесью гигантских многоядерных клеток.

Все исследуемые в экспериментах *in vivo* составы показали высокую биосовместимость, хорошую костную регенерацию с заполнением области дефекта новообразованной костной тканью. Резорбция *in vivo* наблюдалась более интенсивная у составов с большим содержанием ДКФД и карбонат-групп (точек 3 и 5), причем при использовании состава 3 наблюдается образование четко рентген-различимой кортикальной кости.

Необходимо принимать во внимание, что резорбция *in vivo* обусловлена не только химическим растворением цементного камня во внеклеточной жидкости (пассивная резорбция), но и активной резорбцией вследствие активности клеток (остеокластов, гигантских клеток, макрофагов) [79]. Пассивная резорбция (химическое растворение) зависит от свойств цементного камня, в частности,

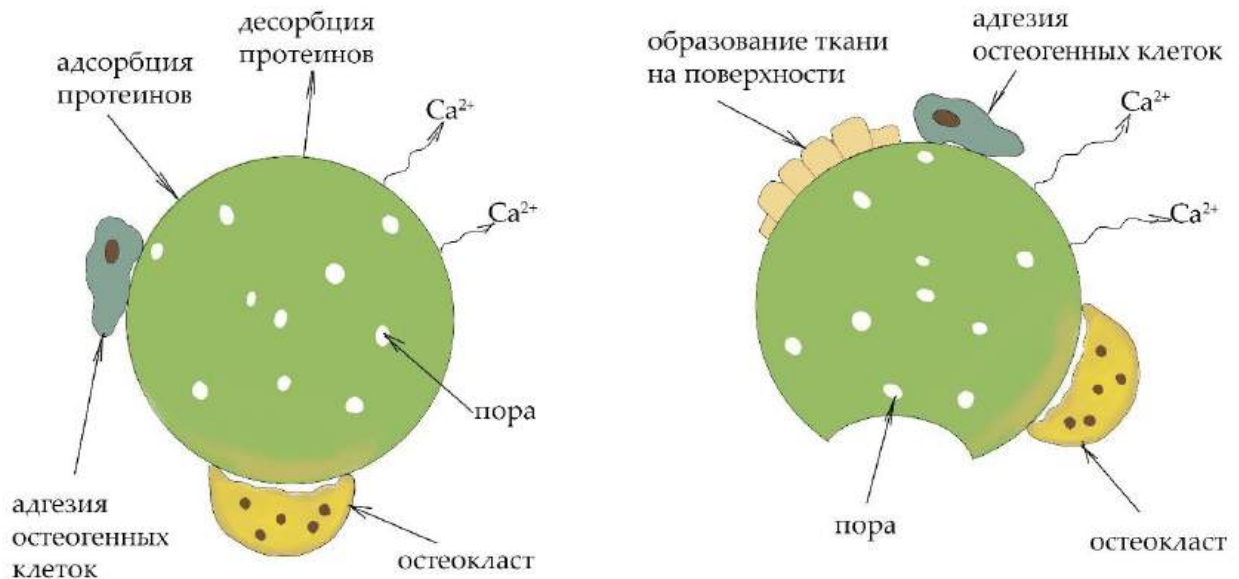
количества ДКФД и карбонат-ионов, и от свойств окружающей среды, в частности pH. Локальное снижение pH возможно при растворении ДКФД, что может незначительно влиять на растворимость карбонатного гидроксиапатита, поскольку pH ДКФД около 4–5.

Таблица 3.8 – Результаты морфологического исследования цемента составов фигуративных точек 3, 5 и 8

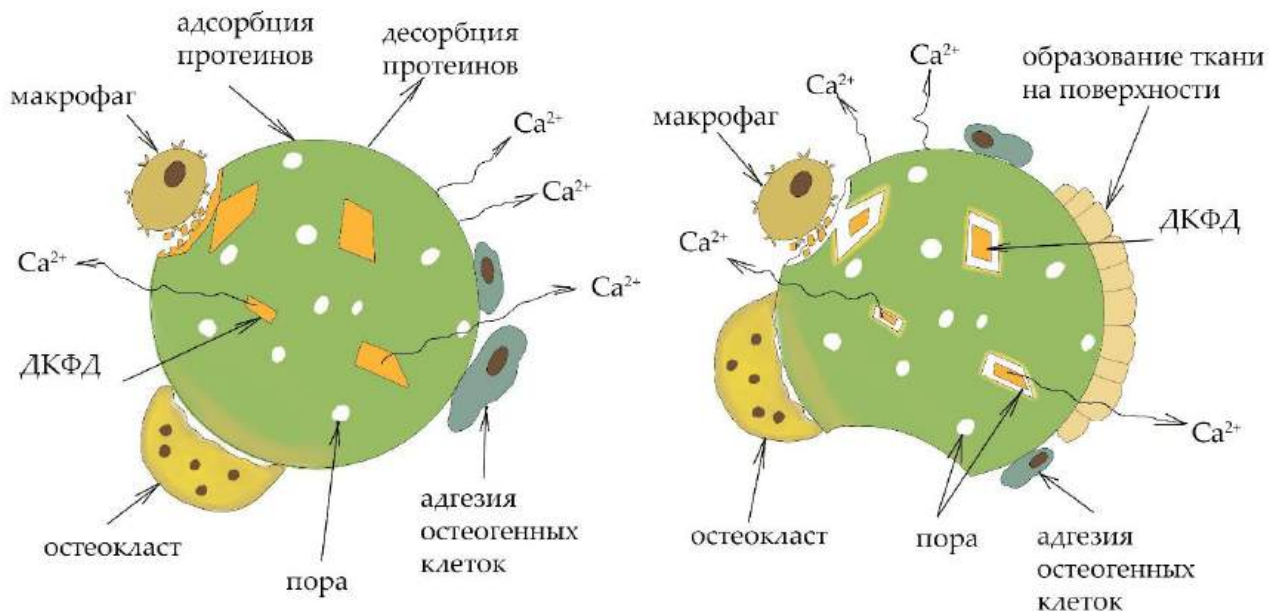
Состав	Тип микроскопии				
	Стандартная световая Окрашивание гематоксилином – эозином. Увел. x50	Стандартная световая Окрашивание пикросириусом красным. Увел. x50	Поляризационная Окрашивание пикросириусом красным. Увел. x50	Стандартная световая Окрашивание гематоксилином – эозином. Увел. x200	Фазово-контрастная Окрашивание гематоксилином – эозином. Увел. x200
3					
5					
8					
* - новообразованная кость, X – мышцы, стрелки – остатки имплантата, кончики стрелок указывают на соединительнотканную капсулу вокруг остатков имплантата					

Активная резорбция кальцийфосфатных цемента опосредуется гигантскими клетками и остеокластами с поглощением макрофагами фрагментированных частиц цемента [214–215]. Остеокласты, плотно прикрепляясь к минеральной поверхности, снижают pH локально вблизи материала и растворяют находящийся под ними неорганический фосфат кальция [216–218].

На рисунке 3.40 представлена схема резорбции частиц кальцийфосфатных цемента в зависимости от состава, которая предлагается по результатам настоящего исследования.



а



б

Рисунок 3.40 – Схема резорбции частиц кальцийфосфатных цемента: а – гидроксиапатитового; б – CO_3 -ГАП с ДКФД

Концентрация Ca^{2+} для провоцирования увеличения пролиферации и дифференцировки должна быть выше физиологической нормы [229, 361]. Следовательно, повышенный уровень Ca^{2+} , поступающий в результате растворения цемента, может быть одним из ключевых факторов формирования новой кости. Скорость резорбции кальцийфосфатных цемента влияет на клеточную пролиферацию посредством связывания выделившегося кальция с внеклеточным

рецептором, чувствительным к кальцию, связанным с G-белком [56]. В связи с этим клеточная пролиферация выше у апатитовых цементов с замещенными ионами PO_4^{3-} на CO_3^{2-} [92], чем у цементов без замещений. Содержание высокорезорбируемой фазы ДКФД тоже является ключевым моментом, влияющим на образование новой костной ткани.

Установленная взаимосвязь скорости резорбции и формирования новообразованной костной ткани с составом в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$ была подтверждена исследованием *in vivo* гранулы размером 250–500 мкм составов точек 5.5.80, 6.2.80 и 9.2.80, расположенных в характерных точках ломанной линии составов со сроками начала схватывания 10 мин. Исследования *in vivo* проводились на 9 самцах крысы линии Wistar массой 250–300 г. Гранулы были установлены в костные перфорации критического размера большеберцовой кости обеих конечностей.

Через 3 мес. после имплантации, по данным компьютерной микротомографии, происходит частичная резорбция матрикса и формирование новой костной ткани (таблица 3.9).

Через 3 мес. после имплантации во всех случаях наблюдали уменьшение площади дефекта и резорбция имплантированного материала. Сохранение гранул материала отмечается в костномозговом канале, больше при использовании материала 6.2.80. Во всех случаях регенерат образовывался от эндоста и имел некоторую деформацию, обращенную в глубину дефекта в зону с наиболее плотной имплантацией материала. В случае с материалом 9.2.80 отмечалось образование уплотненной пластинки, плотностью схожей с кортикальной костью. Признаков воспаления, миграции и других нежелательных явлений не обнаружили.

Согласно морфологическому исследованию, через 3 мес. после имплантации гранул в отверстия большой берцовой кости почти во всех случаях наблюдали хорошую костную регенерацию с заполнением области дефекта новообразованной костной тканью (таблица 3.10). Воспалительная реакция в кости отсутствовала. В мягких тканях редкие остатки имплантата были окружены тонкими микрокапсулами из макрофагов и гигантских многоядерных клеток.

Таблица 3.9 – 3D-модели и ортогональные проекции большеберцовой кости лабораторного животного по результатам микро-КТ

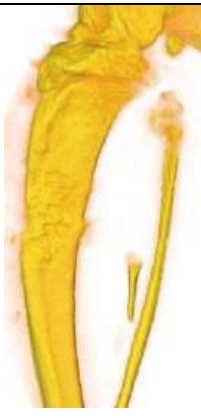
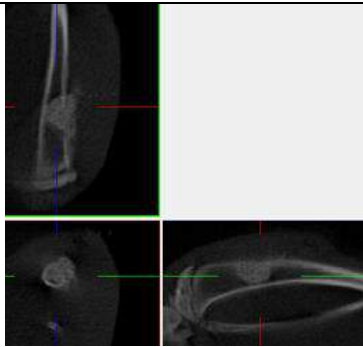
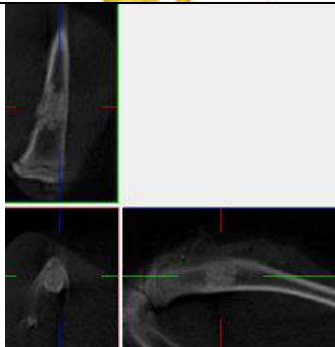
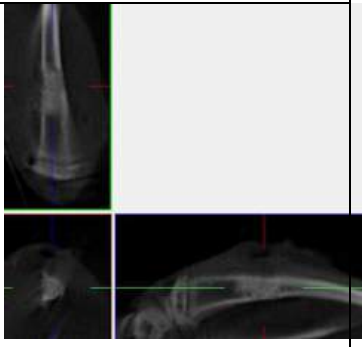
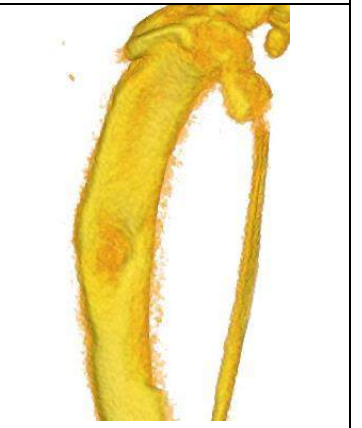
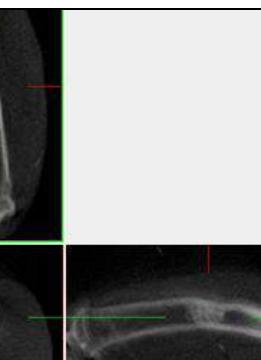
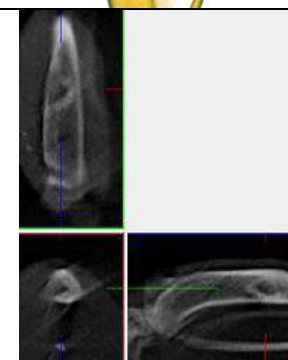
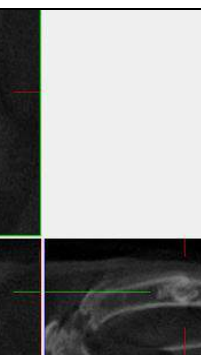
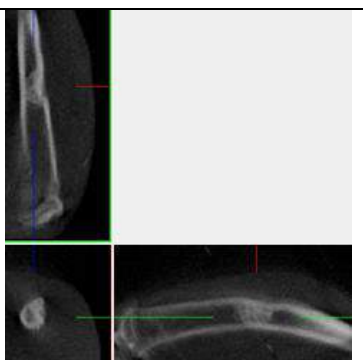
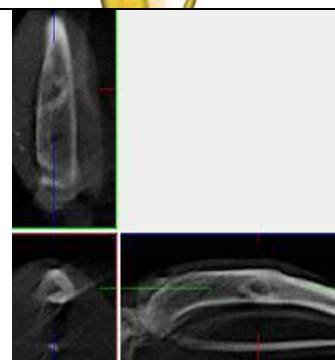
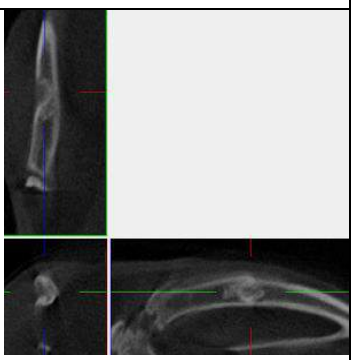
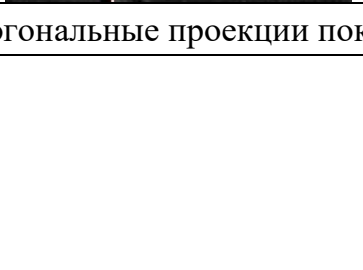
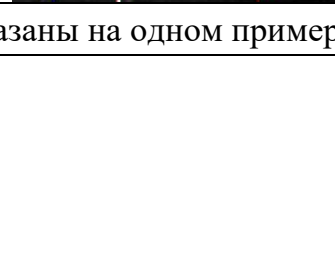
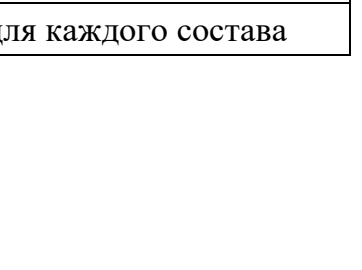
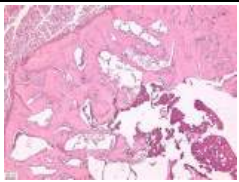
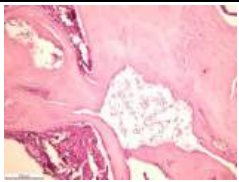
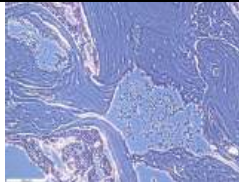
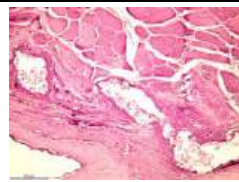
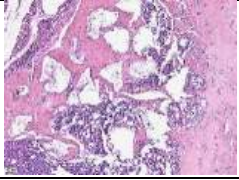
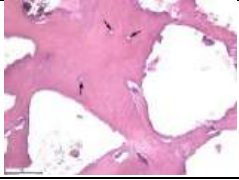
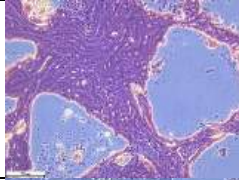
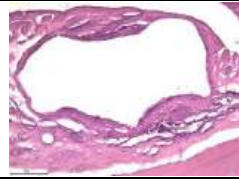
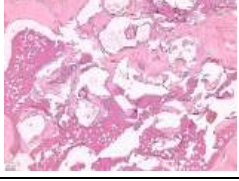
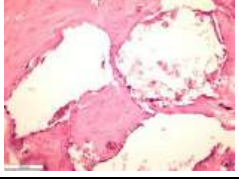
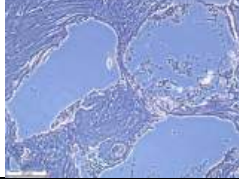
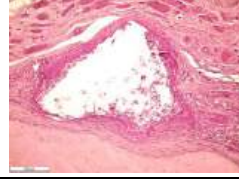
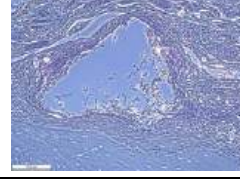
	Фигуративная точка		
	5.5.80	6.2.80	9.2.80
3D-модель и ортогональные проекции исходные			
			
			
3D-модель и ортогональные проекции после 3 мес. имплантации			
			
			
3D-модель и ортогональные проекции показаны на одном примере для каждого состава			

Таблица 3.10 – Результаты морфологического исследования цемента составов точек 5, 6 и 9 со сроками начала схватывания 10 мин.

Состав	Тип микроскопии				
	Стандартная световая Окрашивание гематоксилином – эозином Увел. x50	Стандартная световая Окрашивание гематоксилином – эозином Увел. x200	Фазово-контрастная Окрашивание гематоксилином – эозином. Увел. x200	Стандартная световая Окрашивание гематоксилином – эозином Увел. x200 (мягкие ткани)	Фазово-контрастная Окрашивание гематоксилином – эозином. Увел. x200 (мягкие ткани)
5.5.80					
6.2.80					
9.2.80					
Стрелками обозначены формирующиеся гаверсовы каналы					

Молодая губчатая костная ткань с признаками пластинчатого строения была сформирована трабекулами с многочисленными остеоцитами, при этом в отдельных участках трабекулы становились толще и располагались плотнее, повышалась компактизация костного матрикса и наблюдалось формирование Гаверсовых каналов при имплантации всех указанных составов. Резорбция фрагментов гранул состава 6.2.80 в полости кости была более слабая, чем в других составах, остеокласты встречались редко.

Все исследуемые составы показали высокую биосовместимость, хорошую костную регенерацию с заполнением области дефекта новообразованной костной тканью. Более высокую скорость резорбции *in vivo* также наблюдали у составов с большим содержанием ДКФД и карбонат-групп (точки 5.5.80 и 9.2.80), причем при

использовании состава 9.2.80 наблюдается образование четко рентген-различимого уплотнения кости.

Морфометрический анализ площади остатков имплантированного материала и площади новообразованной костной ткани приведены на рисунке 3.41.

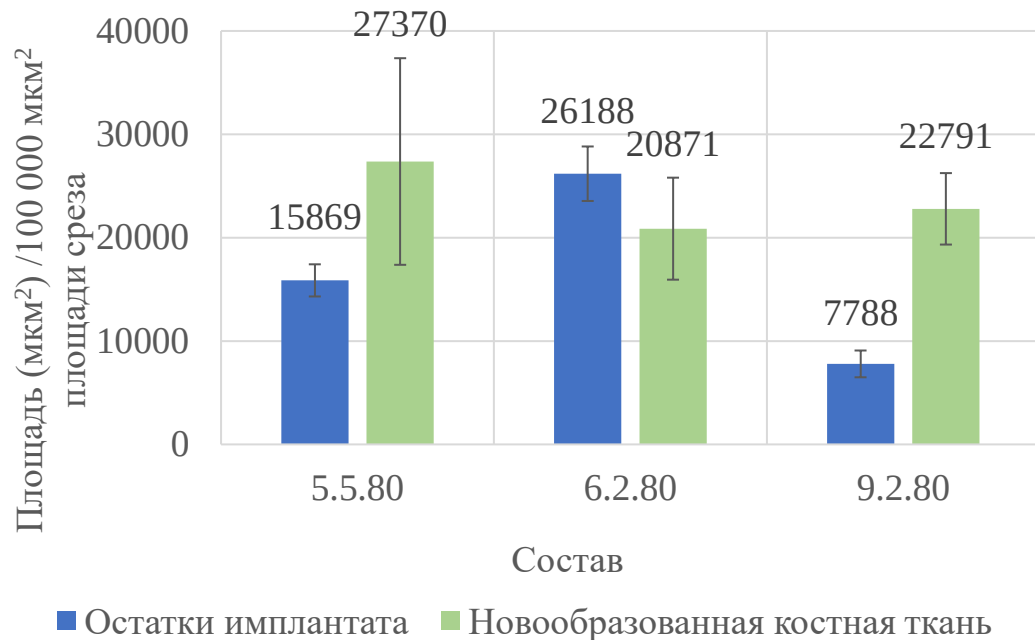


Рисунок 3.41 – Морфометрический анализ площади остатков имплантированного материала и площади новообразованной костной ткани

Морфометрический анализ указывает на различия в скорости резорбции и формирования новообразованной костной ткани. Наименьшее количества материала осталось при имплантации состава 9.2.80, как и предполагалось ранее, за счет образования фазы ДКФД в составе цементного камня и более высокой пористости. Количество новообразованной костной ткани для трех составов отличается незначительно, однако различия между площадями остатков материала и новообразованной костной ткани позволяют делать вывод о том, что наличие более растворимых фаз способствует резорбции материала *in vivo* и восстановлению костной ткани.

3.4 Состав и свойства цементного камня в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при α -ТКФ = 60 и 70 мас. %

На срезах α -ТКФ = 60 и 70 мас. %, в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O были выбраны четыре фигуративные точки в соответствии с рисунком 3.42 и таблицей 3.11. На рисунке 3.42 серой обозначена зона с концентрацией $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, превышающей предельную. Растворимость $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в воде: ~ 218 г/л (20°C).

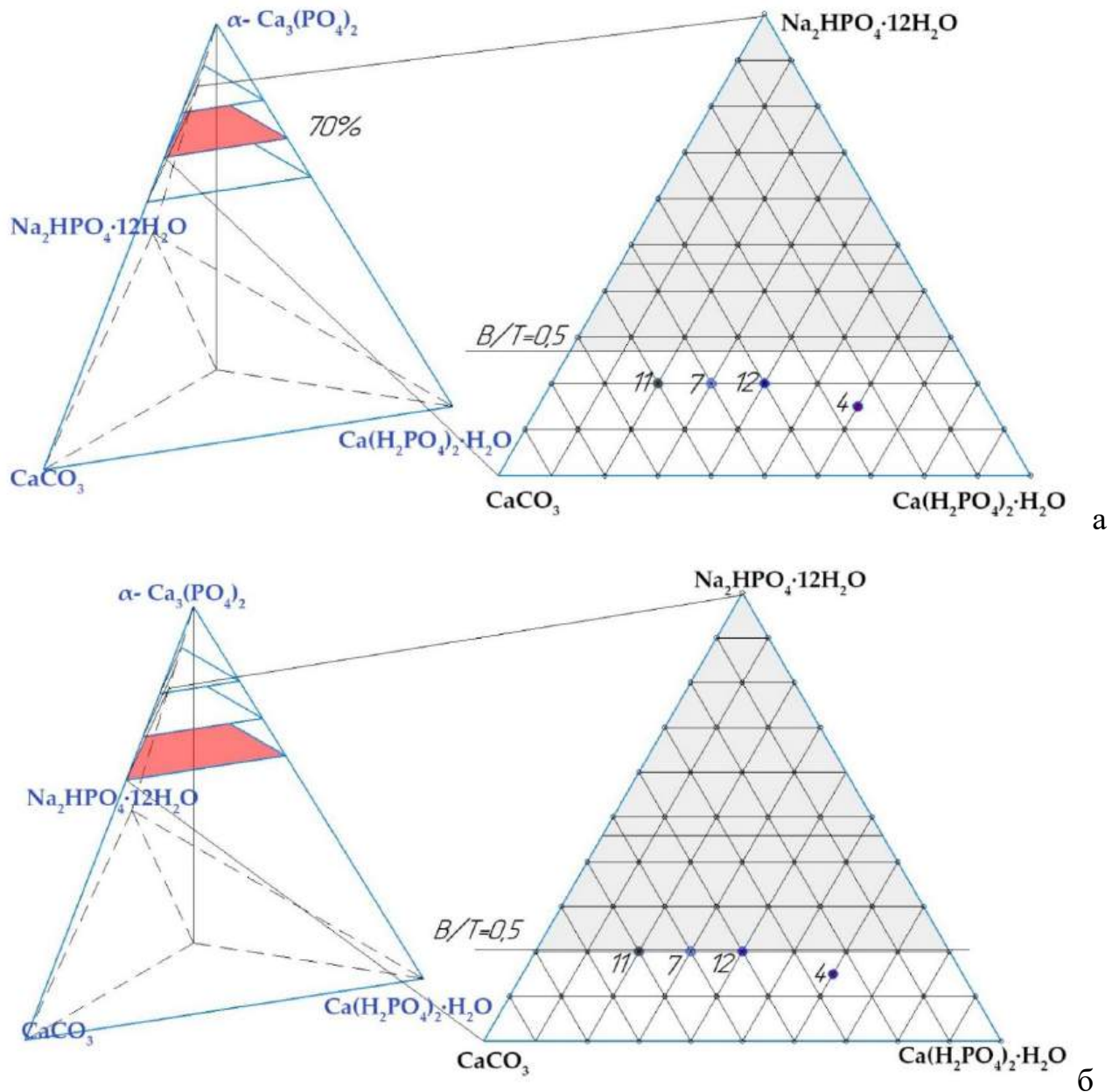


Рисунок 3.42 – Фигуративные точки в сечении диаграммы состава α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при постоянной массе α -ТКФ равной: а – 70 мас. %; б – 60 мас. %

Таблица 3.11 – Содержание компонентов в фигуративных точках

	Количество, мас. %							
	α -ТКФ = 70%				α -ТКФ = 60%			
Фигуративная точка	4	7	11	12	4	7	11	12
CaCO_3	7,5	15	18	12	10	20	24	16
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	18	9	6	12	24	12	8	16
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	4,5	6	6	6	6	8	8	8

Фазовый состав цементного камня, полученного через 28 сут. твердения во влажных условиях в составах при α -ТКФ 70% и 60%, представлен тем же фазовым составом, что в составах при α -ТКФ 80%: карбонатзамещенным гидроксипатитом переменного состава, ДКФД. В составе точек 4 и 12 обнаружена дополнительная фаза дикальцийфосфата ангидрита CaHPO_4 ДКФА (монетит), образование которой возможно при кислотно-основном взаимодействии в системе при повышении температуры до 40°C при взаимодействии компонентов. (рисунок 3.43).

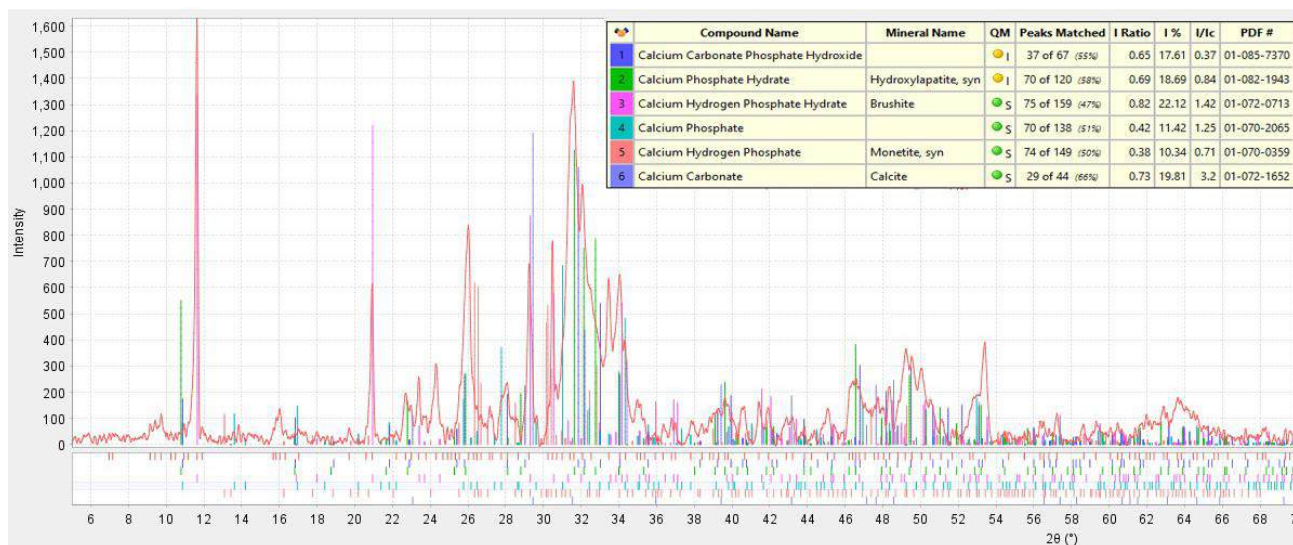


Рисунок 3.43 – Дифрактограмма цементного камня в фигуративной точке состава 4 сечения ТКФ70

На дифрактограмме присутствуют характеристические пики дикальцийфосфата дигидрата $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [072-0713] (ДКФД) и дикальцийфосфата ангидрита CaHPO_4 [070-0359] (ДКФА). Исходный β -трикальцийфосфат $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [070-2065] (β -ТКФ), также, вероятно, останется в составе цементного камня, но его пики совпадают с пиками гидроксипатитовых фаз, также как и пики карбоната кальция, хотя на части рентгенограмм виден 100%-

ный пик кальцита при межплоскостном расстоянии 3,0387 [072-1937], однако он накладывается на пик ДКФД и рассчитать его количество сложно.

Дифрактограммы для всех двенадцати составов фигуративных точек представлены на рисунке 3.44.

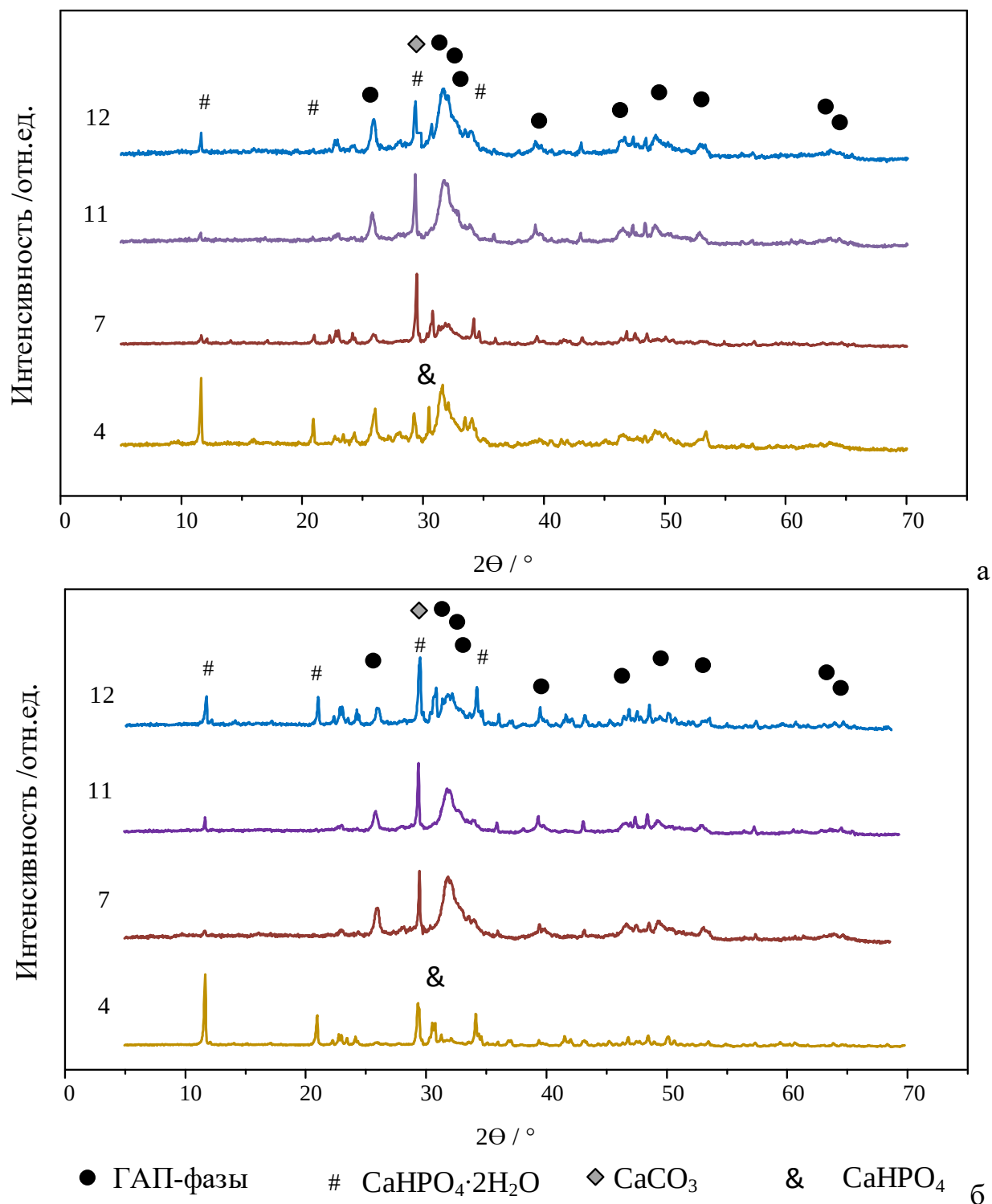


Рисунок 3.44 – Дифрактограммы цементного камня в фигуративных точках составов при постоянной массе α -ТКФ равной: а – 70 мас. %; б – 60 мас. %

При расчете количественного фазового состава учитывались только целевые гидроксиапатитные фазы переменного состава, используя карточку [075-3728], ДКФД [072-0713] и ДКФА [070-0359] и рассчитывалось соотношение фаз ДКФД+ДКФА к ГАП-фазам.

Результаты количественного определения фазового состава (за исключением CaCO_3) цементного камня в фигуративных точках представлены в таблицах 3.12 и 3.13.

Таблица 3.12 – Фазовый состав продуктов взаимодействия $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$ при постоянной массе $\alpha\text{-ТКФ}$ равной 70%

Состав	Количество, мас.%					Соотношение фаз ДКФД/ГАП
	ДКФД	ДКФА	ДКФД+ДКФА	ГАП-фазы		
4	27,6±0,5	23,2±0,3	50,8±0,4	a	49,2±0,4	1,033
7	26,2±0,3	0	26,2±0,3	c	73,9±0,3	0,356
11	14,2±0,4	0	14,2±0,4	d	85,8±0,3	0,165
12	13,0±0,5	24,9±0,7	38,0±0,6	b	62,1±0,6	0,612

Таблица 3.13 – Фазовый состав продуктов взаимодействия $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$ при постоянной массе $\alpha\text{-ТКФ}$ равной 60%

Состав	Количество, мас.%					Соотношение фаз ДКФД/ГАП
	ДКФД	ДКФА	ДКФД+ДКФА	ГАП-фазы		
4	56,1±0,5	26,1±0,3	82,1±0,4	a	17,9±0,4	4,660
7	15,0±0,3	0	15,0±0,3	d	85,0±0,3	0,178
11	17,2±0,5	0	17,2±0,5	c	82,8±0,5	0,208
12	23,5±0,2	29,0±0,7	52,5±0,5	b	47,5±0,5	1,119

При уменьшении содержания $\alpha\text{-ТКФ}$ при сохранении соотношения исходных компонентов, фазовый состав сохраняется прежним, однако распределение фаз по составу фигуративных точек образцов меняется. В связи с увеличением количества МКФМ в исходном составе образуется больше ДКФД в конечном составе. В фигуративной точке 4 помимо фаз, характерных для цементного камня составов

при постоянной массе α -ТКФ равной 80%, появляется фаза дикальцийфосфата ангидрита (ДКФА – монетит) [70-0359 PDF-2]. Монетит появляется в составе цементного камня в процессе дегидратации брушита в связи с повышением температуры цементного теста в ходе кислотно-основного взаимодействия. Расчет количества монетита в составе цементного камня проводился по 100% пику при межплоскостном расстоянии 2,953.

Количество ДКФД и ДКФА в составе цементного камня в фигуративной точке 4 значительно возрастает при уменьшении количества α -ТКФ в исходном составе, что связано с возрастанием соотношения массы кислого компонента к массе основных. Соотношение Са/Р снижается при уменьшении содержания исходного α -ТКФ (таблица 3.14). Такая же ситуация наблюдается и в фигуративной точке 12: количество ДКФД незначительно возрастает, карбонат-замещенного гидроксипатита незначительно снижается, вероятнее всего, за счет перераспределения оставшихся конечных фаз, что не связано с количественным соотношением между другими компонентами системы. Соотношение Са/Р в этой фигуративной точке остается неизменным.

Таблица 3.14 – Расчетное мольное соотношение Са/Р в фигуративных точках при содержании α -ТКФ от 60 до 80 мас. %

Состав	80% α -ТКФ	70% α -ТКФ	60% α -ТКФ
4	1,41	1,36	1,31
7	1,56	1,60	1,64
11	1,63	1,71	1,80
12	1,50	1,50	1,50

В фигуративных точках 7 и 11 наблюдается увеличение Са/Р при снижении количества α -ТКФ в исходном составе. Соотношение конечных фаз в фигуративных точках этих составов практически не меняется (находится в пределах ошибки), однако, вероятно, количество карбоната кальция в этих составах будет повышаться, поскольку в исходном составе его количество растет со снижением количества α -ТКФ, что не учитывалось при расчетах конечных составов по корундовому числу.

При расчете количественного фазового состава карбонат кальция не учитывался, поскольку его характеристические пики закрываются пиками других фаз. Однако в составе цементного камня в фигуративных точках при постоянной массе α -ТКФ в исходных составах равным 70 и 60%, соответственно, наличие карбоната кальция было определено по результатам ИК-Фурье спектроскопии (рисунки 3.45 и 3.46).

По дублету при $1409\text{--}1418\text{ см}^{-1}$ и $1449\text{--}1474\text{ см}^{-1}$, относящемуся к моде ν_3 антисимметричного растяжения, характерного для ионов CO_3^{2-} , можно судить о количестве этих ионов, встроенных в кристаллическую решетку гидроксиапатита и принадлежащему исходному кальциту, не вступившего в реакцию. При 712 см^{-1} наблюдаются колебания спектров цементного камня для всех составов, что подтверждает наличие кальцита во всех составах.

У составов 7 и 11 различимы пики при 1450 и 1470 см^{-1} , которые являются характеристическими для А-типа и Б-типа карбонатного гидроксиапатита, соответственно. У составов 4 и 7 эти пики сливаются в один широкий пик.

На спектре четко видны пики при 1642 см^{-1} , определяющие ионы HPO_4^{2-} кальцийдефицитного гидроксиапатита и дикальцийфосфата дигидрата.

Пики при 600 и $559\text{--}560\text{ см}^{-1}$ характерны для ортофосфорных тетраэдрических ионов в структуре типа гидроксиапатита. Они широкие, сливающиеся в дуплет. При постоянной массе α -ТКФ равной 60% дуплет переходит в триплет в составах 4 и 12 за счет образования максимума при 578 см^{-1} , характерного для изгиба связей $(\text{H} - \text{O}) - \text{P} = \text{O}$ в HPO_4^{2-} . Пик при 535 см^{-1} у составов 4 и 12 также характерен для изгиба связей $(\text{H} - \text{O}) - \text{P} = \text{O}$ в HPO_4^{2-} . Либрации H_2O при 666 см^{-1} наблюдаются в составе 4 при постоянной массе α -ТКФ равной 60%. Полоса при 1210 см^{-1} , характерная для изгиба в плоскости (OH) для ДКФД, видна в спектрах составов 4 и 12 при постоянной массе α -ТКФ равной 60%.

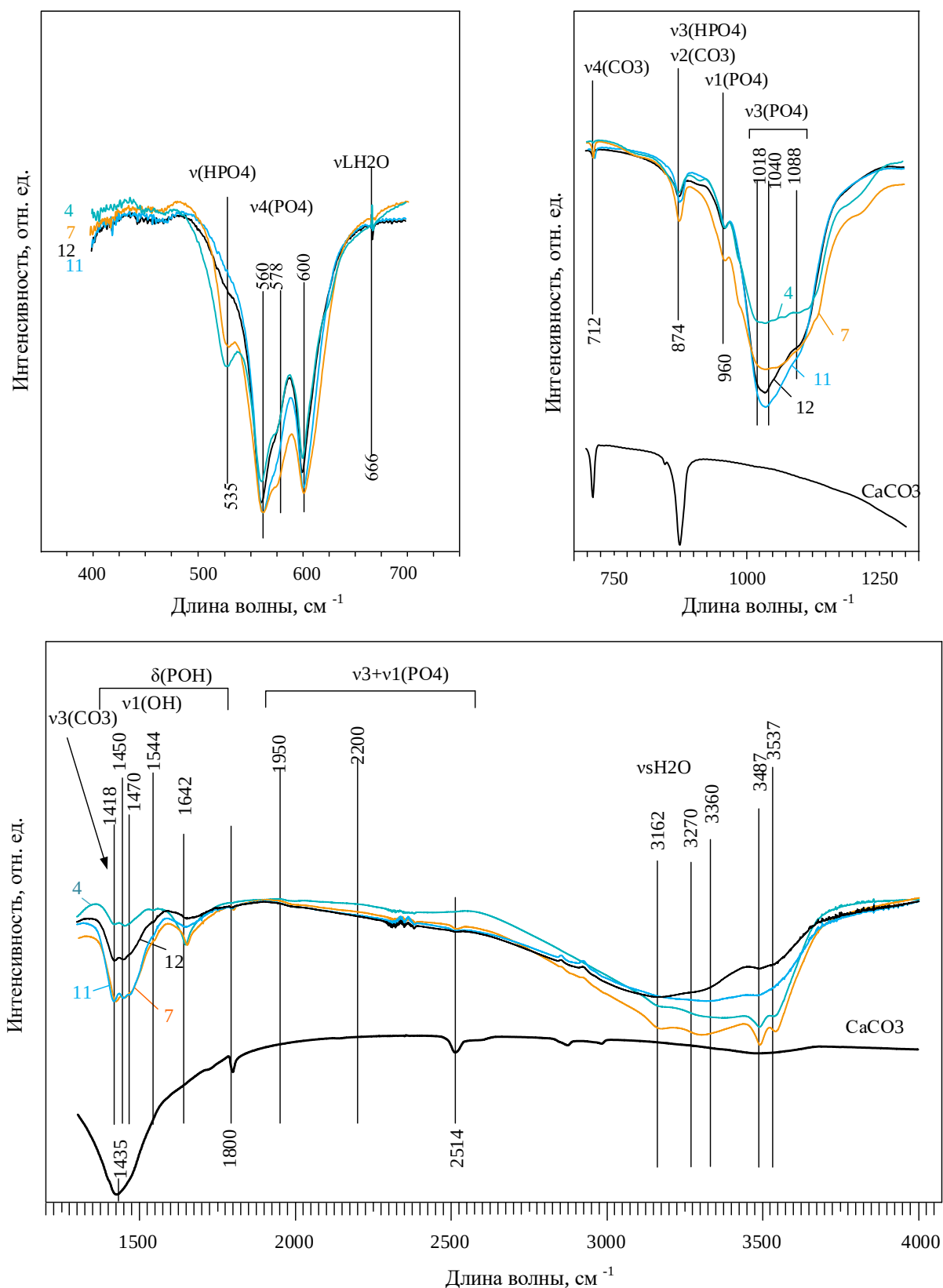


Рисунок 3.45 – ИК-спектры составов цементного камня в фигуративных точках составов при постоянной массе α -ТКФ равной 70%

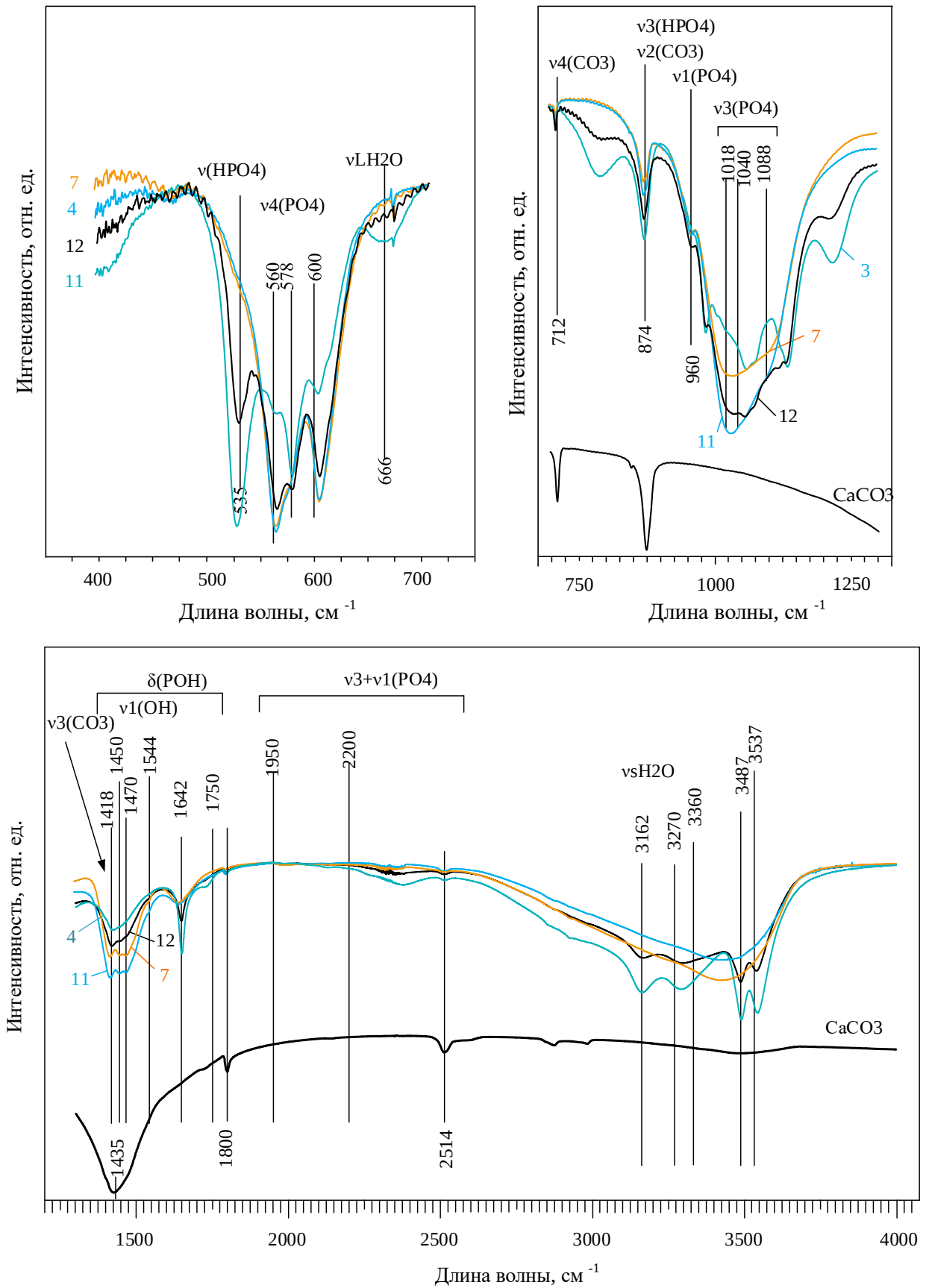


Рисунок 3.46 – ИК-спектры составов цементного камня в фигуративных точках составов при постоянной массе α -ТКФ равной 60%

Таким образом, в соответствии с результатами ИК-спектроскопии, при уменьшении α -ТКФ в исходном составе с 80 до 70 и 60 мас.% наблюдалось увеличение содержания ДКФД в составе цементного камня также от состава 11 к составу 4. В конечных составах цементного камня при постоянной массе α -ТКФ равной 70 или 60% присутствует карбонат кальция, который не был обнаружен в составах цементного камня при постоянной массе α -ТКФ равной 80%.

Полуколичественный анализ, основанный на сравнении соотношения площади пиков, характерных для ионов CO_3^{2-} , встраиваемых в кристаллическую решетку гидроксиапатита и принадлежащих исходному CaCO_3 , был проведен по ИК-спектрам посредством нахождения интегралов в диапазонах волновых чисел 660–730 и 1350–1523 см^{-1} . Сравнение спектров составов с разным количеством α -ТКФ в данном случае невозможно. Принимая соотношение пиков в указанных диапазонах для карбоната кальция и цементного камня, предположительно возможно оценить соотношение количества ионов CO_3^{2-} , встраиваемых в кристаллическую решетку гидроксиапатита и принадлежащих исходному CaCO_3 .

Зависимости количества карбонат-ионов от исходного состава цементов были определены по следующей формуле:

$$K_{\text{CO}_3^{2-}} = \int_{1350}^{1523} \frac{dI}{d\lambda} \text{ и } K_{\text{CO}_3^{2-}} = \int_{660}^{730} \frac{dI}{d\lambda}.$$

Интегралы интенсивностей 660–730 и 1350–1523 см^{-1} представлены в таблицах 3.15 и 3.16 для составов при постоянном содержании α -ТКФ равным 70 и 60%, соответственно.

Таблица 3.15 – Интегральное значение интенсивности пиков для составов при постоянном содержании α -ТКФ равным 70%

Состав	Площадь при 660–730 см^{-1} , усл. ед. ²	Площадь при 1350–1525 см^{-1} , усл. ед. ²	CO_3^{2-} в CaCO_3 , %	CO_3^{2-} в CO_3 -ГАП, %
CaCO_3	235,5	3127,5	100	
4	21,8	2022,2	14,3	85,7
7	71,6	6976,5	13,6	86,4
11	65,7	7745,0	11,3	88,7
12	32,7	4054,6	10,7	89,3

Таблица 3.16 – Интегральное значение интенсивности пиков для составов при постоянном содержании α -ТКФ равным 60%

Состав	Площадь при 660-730 см^{-1} , усл. ед. ²	Площадь при 1350-1525 см^{-1} , усл. ед. ²	CO_3^{2-} в CaCO_3 , %	CO_3^{2-} в CO_3 -ГАП, %
CaCO_3	235,5	3127,5	100	
4	76,0	2272,7	44,4	55,6
7	94,5	6009,3	20,9	79,1
11	122,5	7272,9	22,4	77,6
12	59,0	3065,3	25,6	74,4

Соотношение интегральных значений интенсивности пиков, определяющее соотношение количества CO_3^{2-} , относящееся к CaCO_3 и к CO_3 -ГАП, показывает практические одинаковые соотношения количеств при постоянном значении α -ТКФ равным 70% и при постоянном значении α -ТКФ равным 60% для составов 7, 11 и 12. Однако наблюдается увеличение доли ионов CO_3^{2-} , относящихся к CaCO_3 при уменьшении количества α -ТКФ. Соотношение долей в составе 4 при постоянном значении α -ТКФ равным 60% отличается значительно составляет 44,4/55,6, т.е. почти половина всех карбонатных ионов остается в виде непрореагировавшего CaCO_3 . Это может быть связано с высоким содержанием МКФМ, который взаимодействует в том числе и с α -ТКФ и образует ДКФД, который за счет своего высокого содержания в конечном продукте снижает содержание в нем других фаз, в том числе CO_3 -ГАП, в связи с чем карбонат кальция остается в виде наполнителя в цементе.

В соответствии с результатами ИК-спектроскопии по определению концентрации ионов CO_3^{2-} , относящихся к CaCO_3 , возможно рассчитать количество карбоната кальция в цементном камне, опираясь на ранее полученные результаты корреляции между значениями CO_3^{2-} , полученными газообъемным методом и значениями CO_3^{2-} , полученными по площади пиков по ИК-Фурье спектromетрии в фигуративных точках состава, с достоверностью аппроксимации $R^2 = 0,9344$.

Концентрация ионов CO_3^{2-} в конечных составах фигуративных точек при постоянной массе α -ТКФ равной 70 и 60 % представлена в таблицах 3.17 и 3.18, соответственно.

Таблица 3.17 – Концентрация ионов CO_3^{2-} в конечных составах фигуративных точек при постоянной массе α -ТКФ равной 70%

Состав	CO_3^{2-} , мг/ 1 г цемента	CaCO_3 , мас.% от массы цементного камня
4	$19,7 \pm 2,1$	$0,47 \pm 0,02$
7	$63,5 \pm 3,0$	$1,67 \pm 0,04$
11	$73,6 \pm 2,6$	$1,38 \pm 0,05$
12	$46,5 \pm 1,5$	$0,83 \pm 0,03$

Таблица 3.18 – Концентрация ионов CO_3^{2-} в конечных составах фигуративных точек при постоянной массе α -ТКФ равной 60%

Состав	CO_3^{2-} , мг/ 1 г цемента	CaCO_3 , мас.% от массы цементного камня
4	$41,7 \pm 1,9$	$3,08 \pm 0,14$
7	$66,2 \pm 2,0$	$2,30 \pm 0,07$
11	$100,5 \pm 3,8$	$3,75 \pm 0,14$
12	$58,8 \pm 1,9$	$2,51 \pm 0,08$

Образование различного количества $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в зависимости от состава цемента в фигуративных точках подтверждается данными по кинетике тепловыделения (таблицы 3.19, 3.20).

Как и в случае с составами при постоянном значении α -ТКФ = 80 %, суммарное тепловыделение к 15 мин. увеличивается при увеличении соотношения кислого и основных компонентов системы (рисунок 3.47).

В соответствии с данными по интегральному тепловыделению количество выделившегося тепла имеет линейную зависимость от соотношения кислого и основных компонентов системы при любом количестве α -ТКФ. При этом сохраняется высокая достоверность аппроксимации.

Общее тепловыделение составов при постоянном содержании α -ТКФ 70 и 60 мас. % ниже, чем для составов при фиксированном значении α -ТКФ 80 мас. %, поскольку наибольший вклад в общее тепловыделение вносит реакция гидратации α -ТКФ с образованием гидроксипатитов.

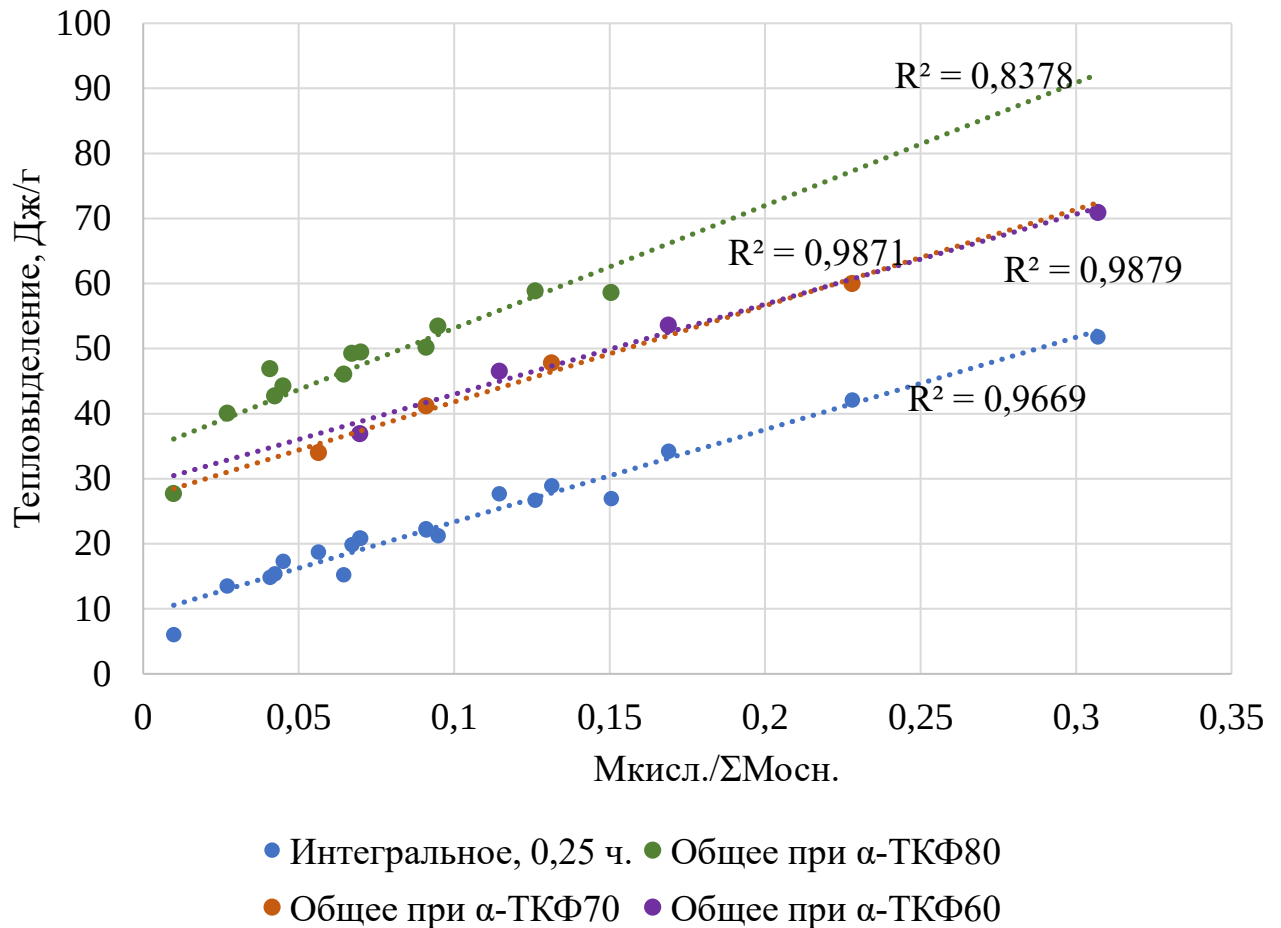


Рисунок 3.47 – Зависимость тепловыделения от соотношения кислого и основных компонентов системы

Большее количество метастабильных фаз в составе цементного камня при α -ТКФ = 70 мас. % и превалирующее при α -ТКФ = 60 мас. % увеличивают растворимость цементного камня, что приводит к пересыщению контактной среды ионами Ca^{2+} и PO_4^{3-} и осаждению на поверхности новых кристаллов.

В отличие от микроструктуры цементного камня фигуративной точки 4 системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при постоянной массе α -ТКФ равной 80%, микроструктура цементного камня при постоянной массе α -ТКФ равной 70 и, в большей степени, 60% представлена призматическими или тонкими чешуйчатыми кристаллами ДКФД, ДКФА и иррегулярными наноразмерными кристаллами гидроксиапатитов (рисунки 3.48, 3.49).

Таблица 3.19 – Кинетика тепловыделения цементов при постоянной массе α -ТКФ равной 70%

Состав	Интегральное тепловыделение, Дж/г							Общее теповыделение, Дж/г	
	0,25 ч.	0,5 ч.	1 ч.	3 ч.	6 ч.	12 ч.	24 ч.		
4	42,1 ± 0,21 g	7,3 ± 0,19	3,1 ± 0,26	1,0 ± 0,21	1,0 ± 0,17	0,5 ± 0,15	0,3 ± 0,09	60,0 ± 0,84 cde	
7	22,1 ± 0,16 d	6,5 ± 0,36	1,7 ± 0,19	1,6 ± 0,19	3,2 ± 0,21	4,4 ± 0,2	5,4 ± 0,23	51,0 ± 0,79 cd	
11	18,7 ± 0,24 b	4,7 ± 0,28	1,4 ± 0,12	1,5 ± 0,17	2,6 ± 0,12	3,4 ± 0,19	4,9 ± 0,18	42,3 ± 0,71 a	
12	28,9 ± 0,3 b	7,1 ± 0,34	1,8 ± 0,18	1,4 ± 0,31	2,3 ± 0,25	3,2 ± 0,1	5,2 ± 0,16	56,2 ± 0,92 a	
Тест Тьюки, разные буквы обозначают существенно отличающиеся значения ($p < 0.05$).									

Таблица 3.20 – Кинетика тепловыделения цементов при постоянной массе α -ТКФ равной 60%

Состав	Интегральное тепловыделение, Дж/г							Общее теповыделение, Дж/г	
	0,25 ч.	0,5 ч.	1 ч.	3 ч.	6 ч.	12 ч.	24 ч.		
4	51,8 ± 0,17 h	10,3 ± 0,1	4,7 ± 0,09	0,2 ± 0,21	0,2 ± 0,12	0,1 ± 0,14	0,1 ± 0,10	70,9 ± 0,64 g	
7	27,7 ± 0,1 ef	5,4 ± 0,16	1,6 ± 0,19	1,5 ± 0,12	3,9 ± 0,27	5,2 ± 0,34	5,8 ± 0,21	57,5 ± 0,61 f	
11	20,9 ± 0,13 fg	5,2 ± 0,21	1,4 ± 0,14	1,6 ± 0,24	2,6 ± 0,17	3,5 ± 0,22	4,7 ± 0,32	45,1 ± 1,03 e	
12	34,2 ± 0,18 c	7,6 ± 0,14	1,9 ± 0,09	1,5 ± 0,12	1,7 ± 0,12	1,5 ± 0,15	1,9 ± 0,15	57,0 ± 0,50 c	
Тест Тьюки, разные буквы обозначают существенно отличающиеся значения ($p < 0.05$).									

После выдержки в физиологическом растворе на поверхности цементного камня наблюдали большое количество пластинчатых кристаллов,

предположительно, гидроксиапатита, поскольку это наиболее стабильная фаза. Эта конкретная кристаллическая морфология довольно нетипична для апатита, который кристаллизуется в симметрии $R\bar{6}_3/m$ (морфология гексагональной призмы). Авторы [362], считают, что такая морфология указывает на возможность осаждения гидроксиапатитов через фазы-предшественники, совместимые с такой морфологией, что вполне может быть объяснено перекристаллизацией кристаллов метастабильных фаз.

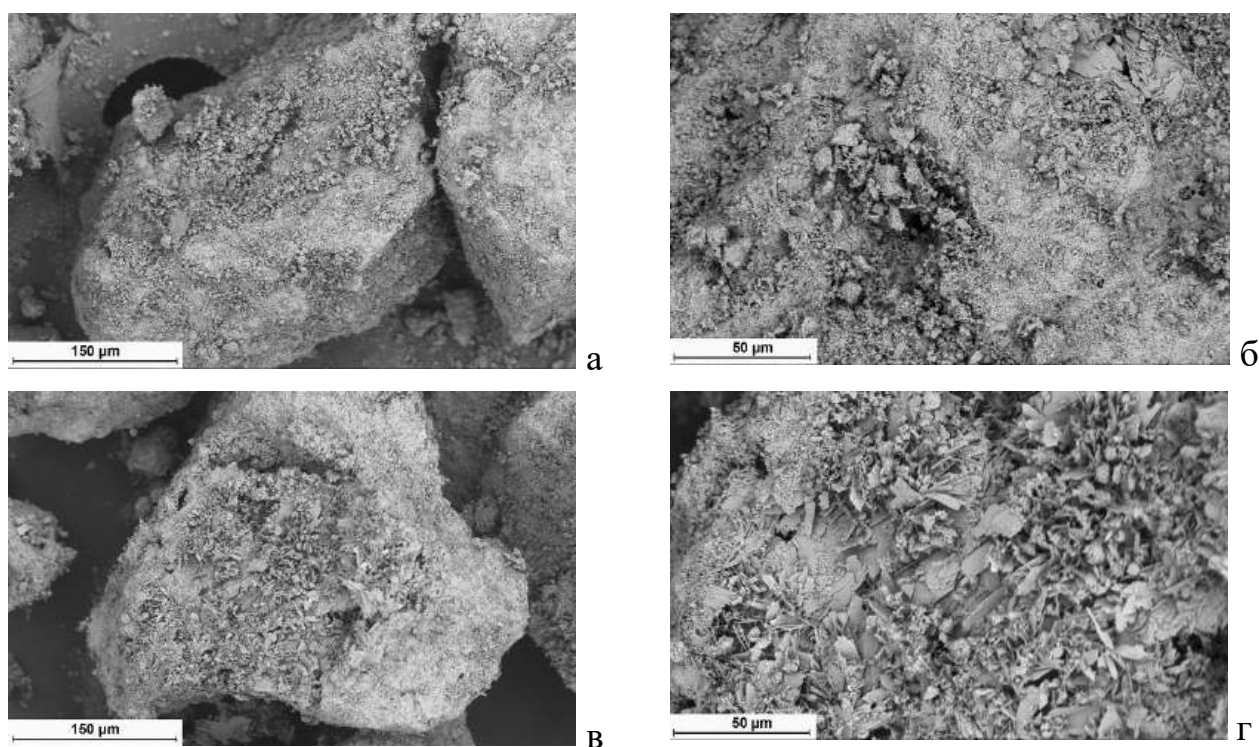


Рисунок 3.48 – Микроструктура цементного камня состава фигуративной точки 4 при постоянной массе α -ТКФ равной 70%: до погружения в физраствор (а, б); после выдержки в физрастворе (в, г). Увеличение: б, г – $\times 2500$; а, в – $\times 1000$

Поверхность цементного камня фигуративной точки 11 при постоянной массе α -ТКФ равной 70 и, в большей степени, 60% после выдержки в физрастворе также более пористая, чем при постоянной массе 80% (рисунок 3.50, 3.51). Растворимость цементного камня в данном случае объясняется растворимостью более растворимой фазы карбоната кальция, которая остается в виде наполнителя. Рельеф поверхности сглаживается, наблюдается повышение пористости, хотя, возможно, это связано с обнажением исходной структуры при растворении частиц.

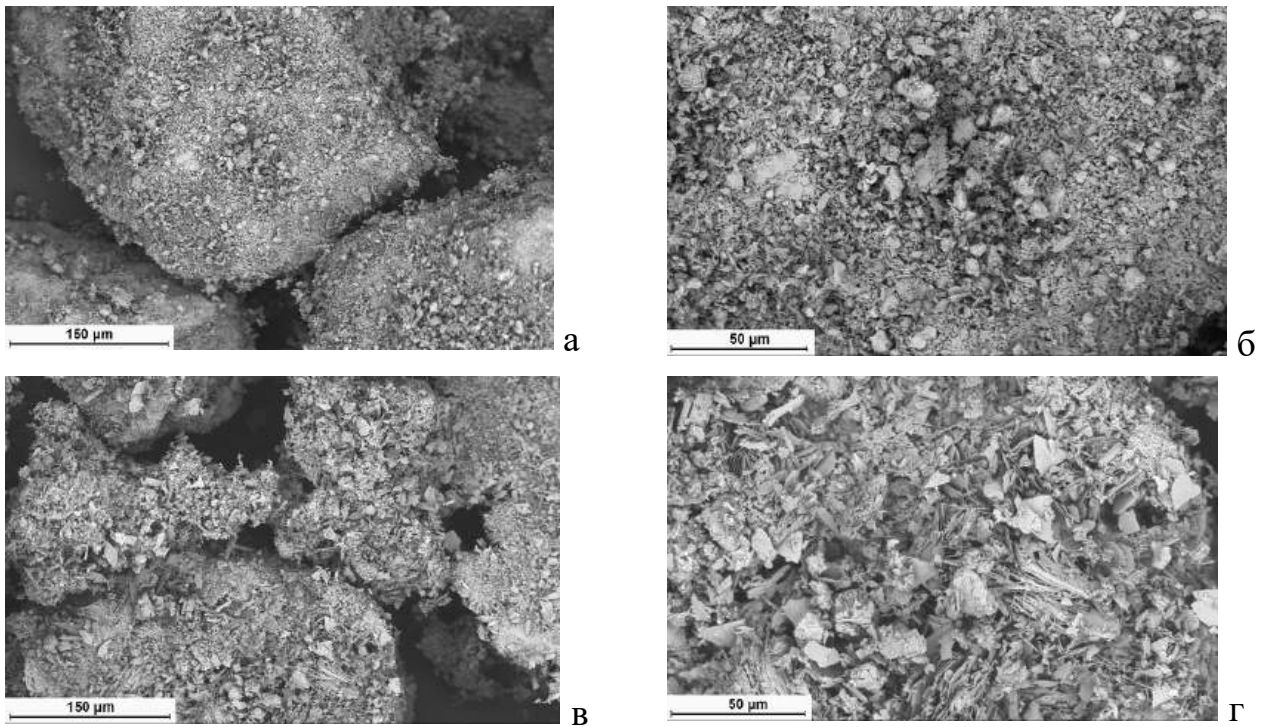


Рисунок 3.49 – Микроструктура цементного камня состава фигуративной точки 4 при постоянной массе α -ТКФ равной 60%: до погружения в физраствор (а, б); после выдержки в физрастворе (в, г). Увеличение: б, г – $\times 2500$; а, в – $\times 1000$

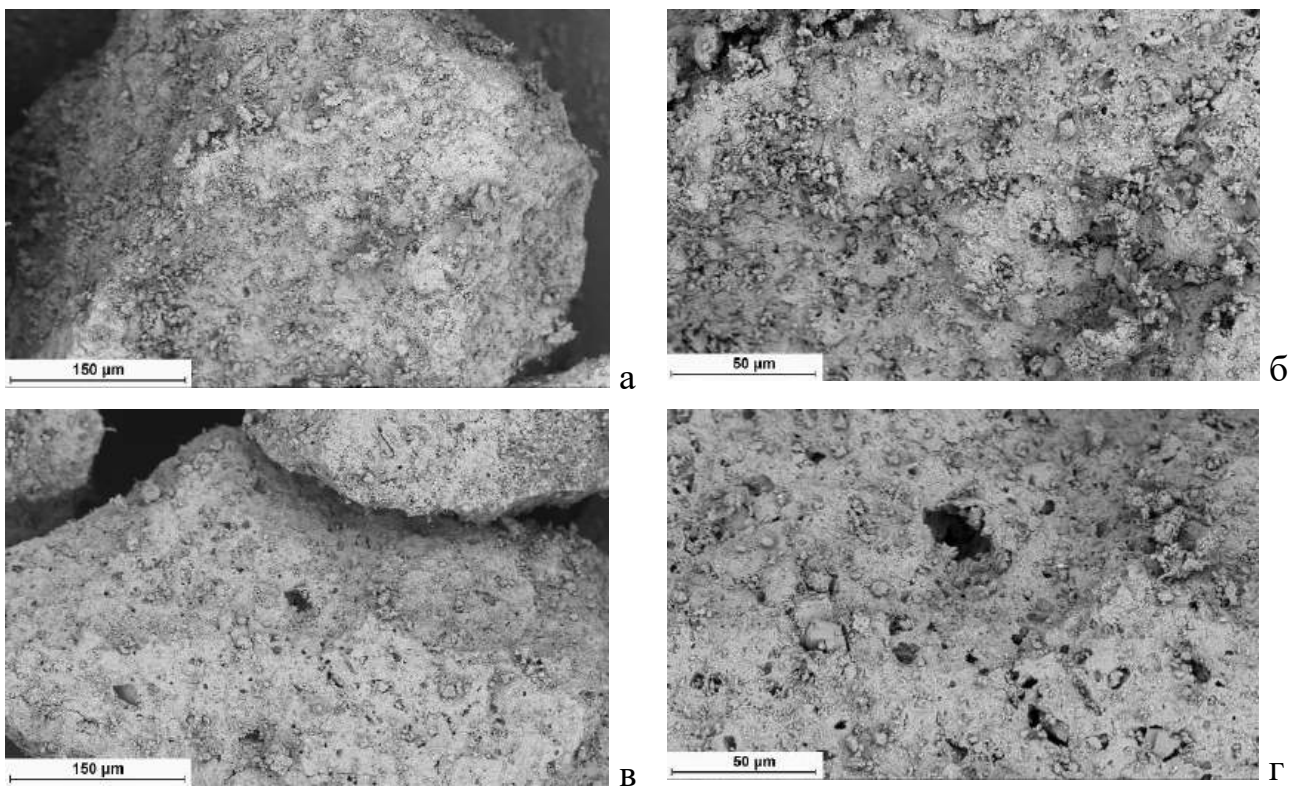


Рисунок 3.50 – Микроструктура цементного камня состава фигуративной точки 11 при постоянной массе α -ТКФ равной 70%: до погружения в физраствор (а, б); после выдержки в физрастворе (в, г). Увеличение: б, г – $\times 2500$; а, в – $\times 1000$

В связи с высоким содержанием ДКФД и карбоната кальция в качестве наполнителя, меняются характеристики цементного камня, такие, как прочность, пористость, рН и растворимость по сравнению с цементным камнем при исходном количестве α -ТКФ = 80 мас. %.

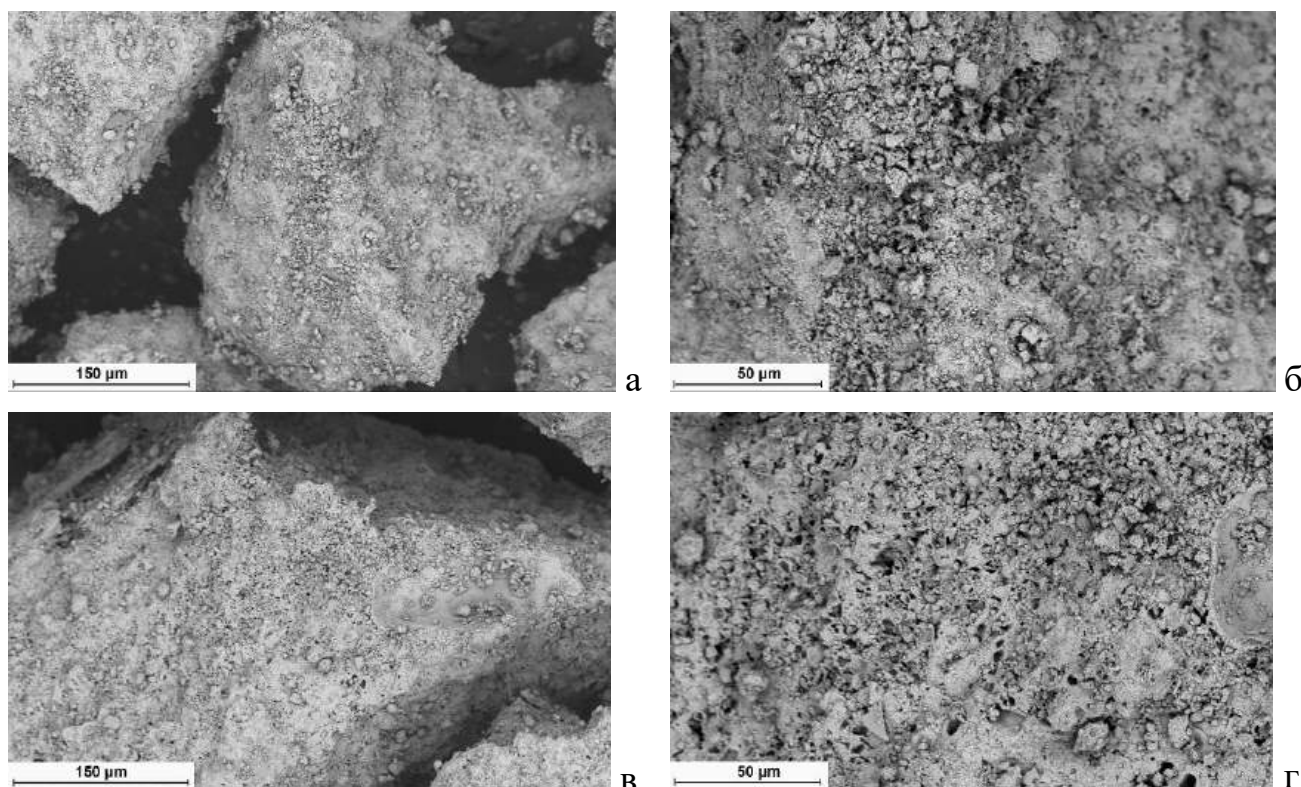
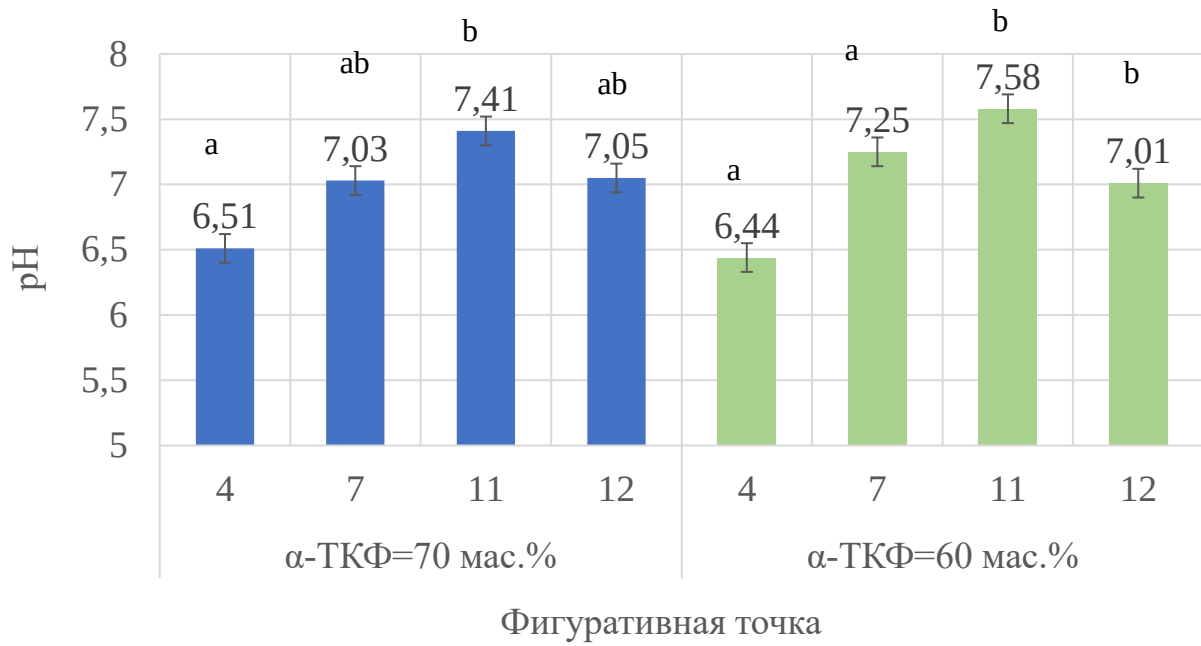


Рисунок 3.51 – Микроструктура цементного камня состава фигуративной точки 11 при постоянной массе α -ТКФ равной 60%: до погружения в физраствор (а, б); после выдержки в физрастворе (в, г). Увеличение: б, г – $\times 2500$; а, в – $\times 1000$

И если значения рН меняются незначительно, понижаясь и повышаясь для одних и тех же точек разных срезов в зависимости от повышения количества ДКФД или карбоната кальция, оставаясь в диапазоне физиологически приемлемых значений (рисунок 3.52), то увеличение количества ДКФД и карбоната кальция сильно влияет на снижение прочности: например, прочность цементного камня состава точки 4 снижается в восемь раз при снижении количества α -ТКФ с 80 до 60% (рисунок 3.53). Меньшее снижение прочности наблюдали у цементного камня составов 7 и 11 за счет образования незначительного количества ДКФД и вклада наполнителя, карбоната кальция, плотность которого составляет 2.74 г/см³, в значения прочности.



*Тест Тьюки, разные буквы обозначают существенно отличающиеся значения ($p < 0,05$) в рамках каждой из двух групп

Рисунок 3.52 – pH цементного камня

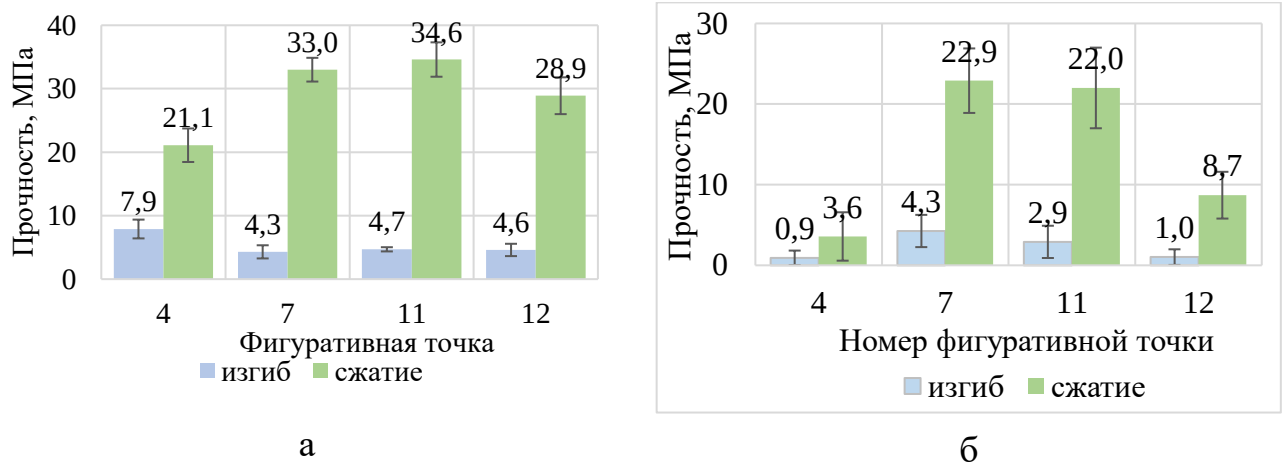


Рисунок 3.53 – Механическая прочность после 28 суток твердения цементного камня в фигуративных точках при постоянном содержании α-TKF: а – 70 мас. %; б – 60 мас. %

В общем случае, распределение механической прочности на срезах диаграммы «состав – свойство» при фиксированном значении α-TKF 70 и 60 мас. % аналогично срезу α-TKF = 80 мас. % (рисунок 3.54).

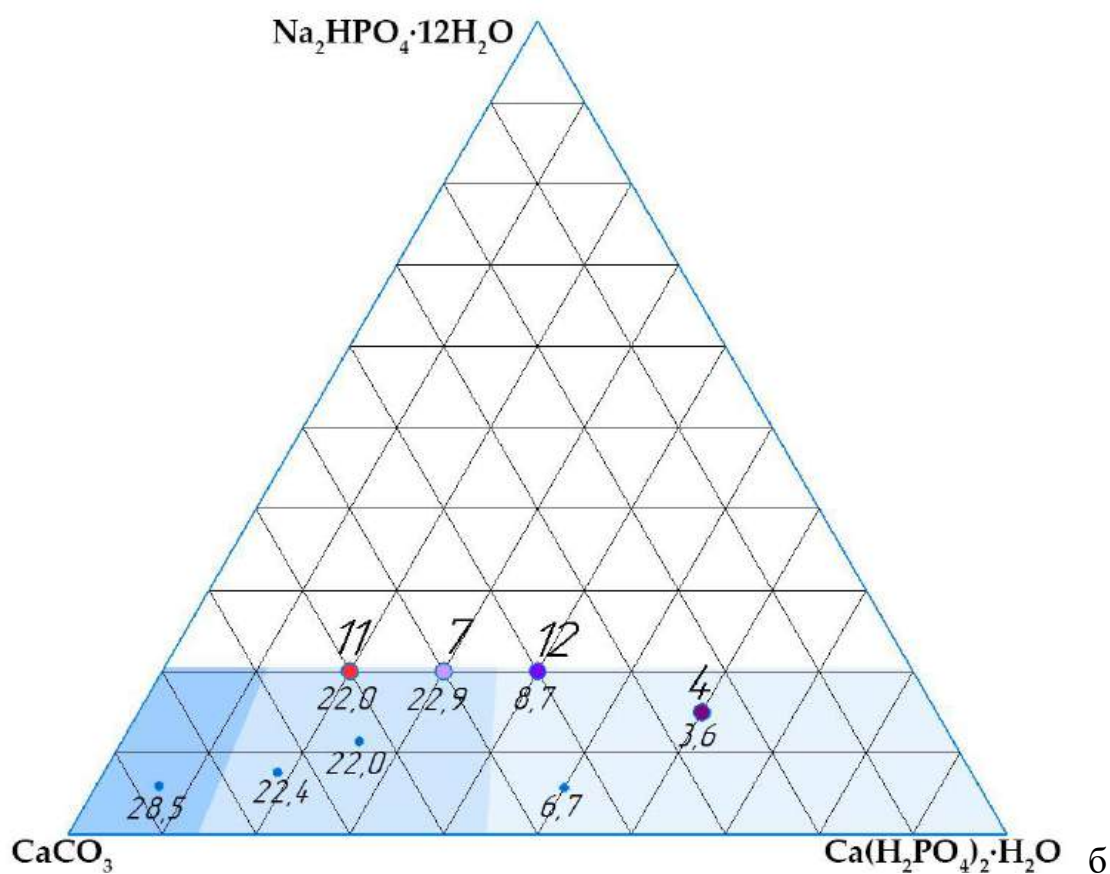
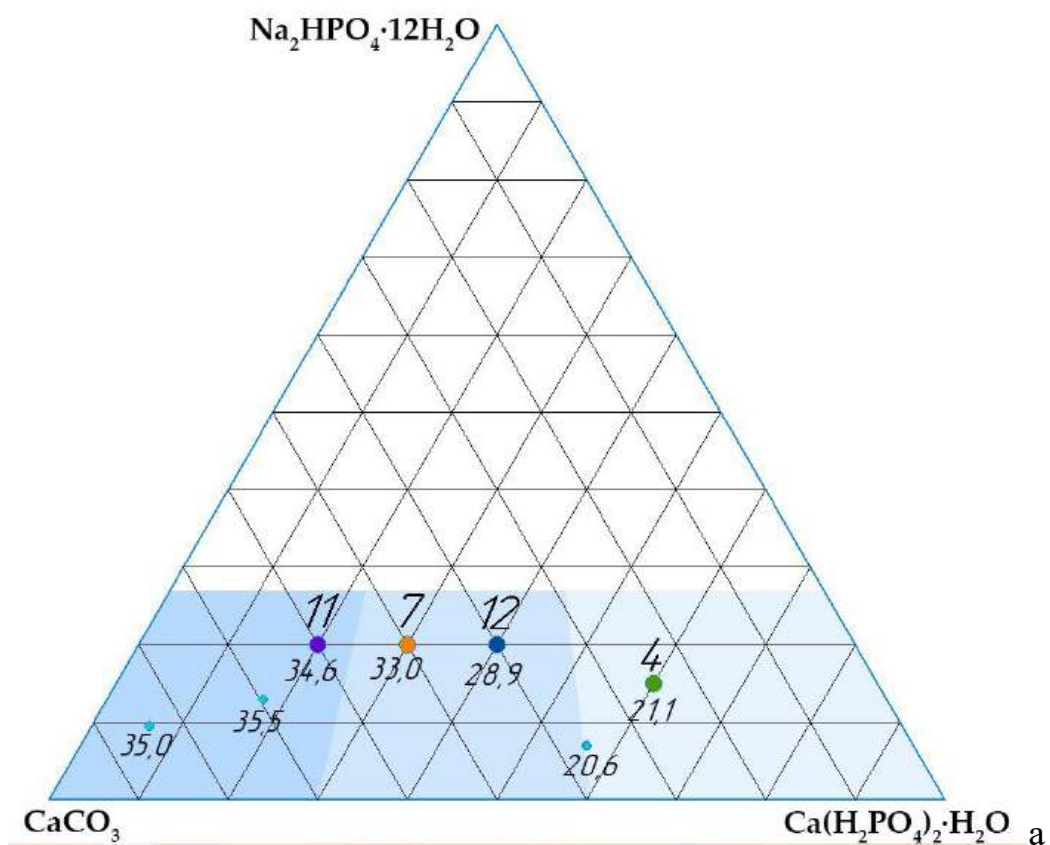


Рисунок 3.54 – Прочность цементного камня на срезе диаграммы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при фиксированном α -ТКФ: а – 70 мас. %; б – 60 мас. %

Ранее отмечалось, что открытая пористость цементного камня, измеренная на 28 сут. твердения, зависит от исходного количества МКФМ в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при фиксированном α -ТКФ = 80%. Такая же зависимость характерна для составов диаграммы при фиксированном значении α -ТКФ = 70 и 60 мас. % (рисунок 3.55). Однако пористость выше в среднем на 8 и 12% у составов при α -ТКФ = 70 и 60 мас. %, соответственно, по сравнению с составами α -ТКФ = 80 мас.%. Наименьший прирост пористости характерен для составов с наибольшим содержанием карбоната кальция, что объясняется избыточным его количеством в исходном составе, которое остается в виде наполнителя в цементном камне и не реагирует с МКФМ с выделением газа. При уменьшении концентрации α -ТКФ в системе до 60 мас. %, в точке при 100%-ном содержании МКФМ, образуется преимущественно ДКФД в соответствии со стехиометрией, пористость увеличивается в связи с образованием более крупных кристаллов ДКФД в цементном камне. В связи с более высокой растворимостью карбоната кальция -lgПР (CaCO_3) = 8,4, -lgПР (ДКФД) = 6,6 по сравнению с гидроксиапатитом -lgПР (ГАП) = 118, растворимость цементного камня возрастает при уменьшении количества ТКФ с 80 до 70 и 60 мас.%, поскольку доля более растворимых фаз увеличивается (рисунок 3.56).

Предполагалось, что растворимость составов с фиксированным значением α - ТКФ = 60 мас. % будет больше, чем при содержании α -ТКФ = 70 мас. %. Однако только после 1 ч контакта с физиологическим раствором ионов кальция в растворе больше у составов ТКФ60, чем у ТКФ70. При увеличении времени выдержки до 24, 72 и 168 ч концентрация ионов кальция в контактном растворе выше у составов ТКФ70, что, по-видимому, связано с переосаждением ионов в гидроксиапатитные фазы в связи с пересыщением раствора. Как было сказано выше, вклад в растворимость вносит содержание ДКФД и ионов CO_3^{2-} . Количество ДКФД, рассчитанное по корундовому числу, уменьшается в следующем ряду: 4→7→12→11. Растворимость составов ТКФ60 и ТКФ70 фигуративной точки 7

незначительно превышают растворимость фигуративной точки 12, однако эта разница статистически незначима.

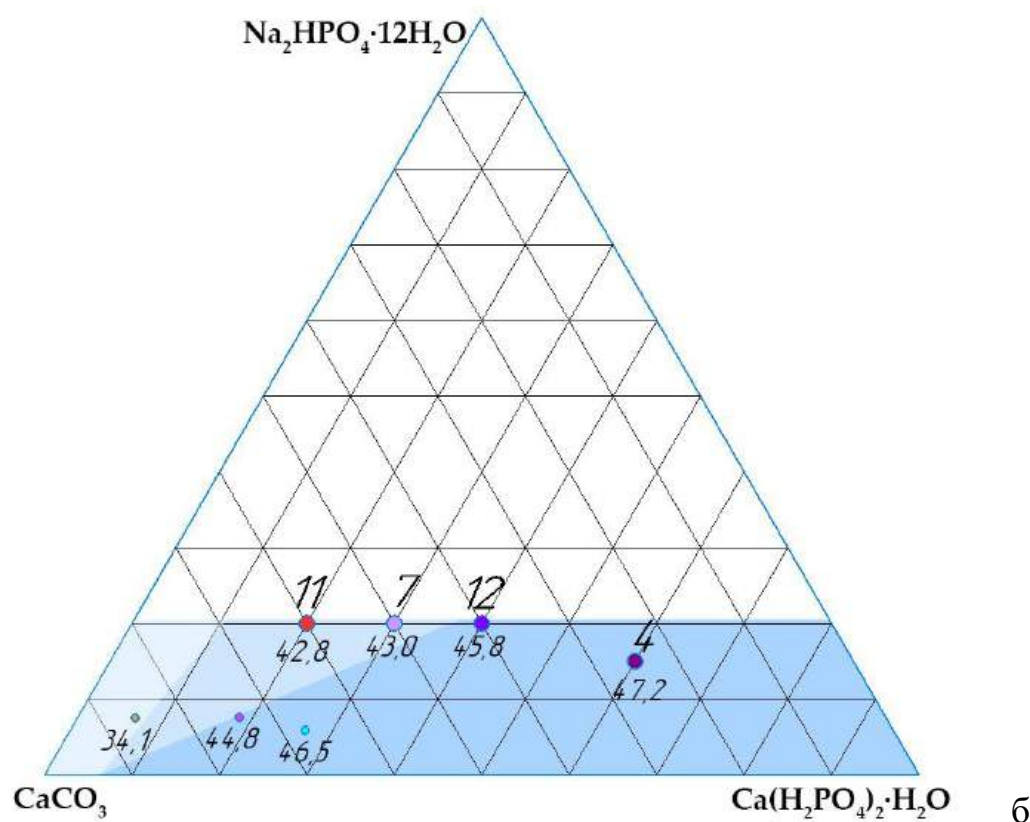
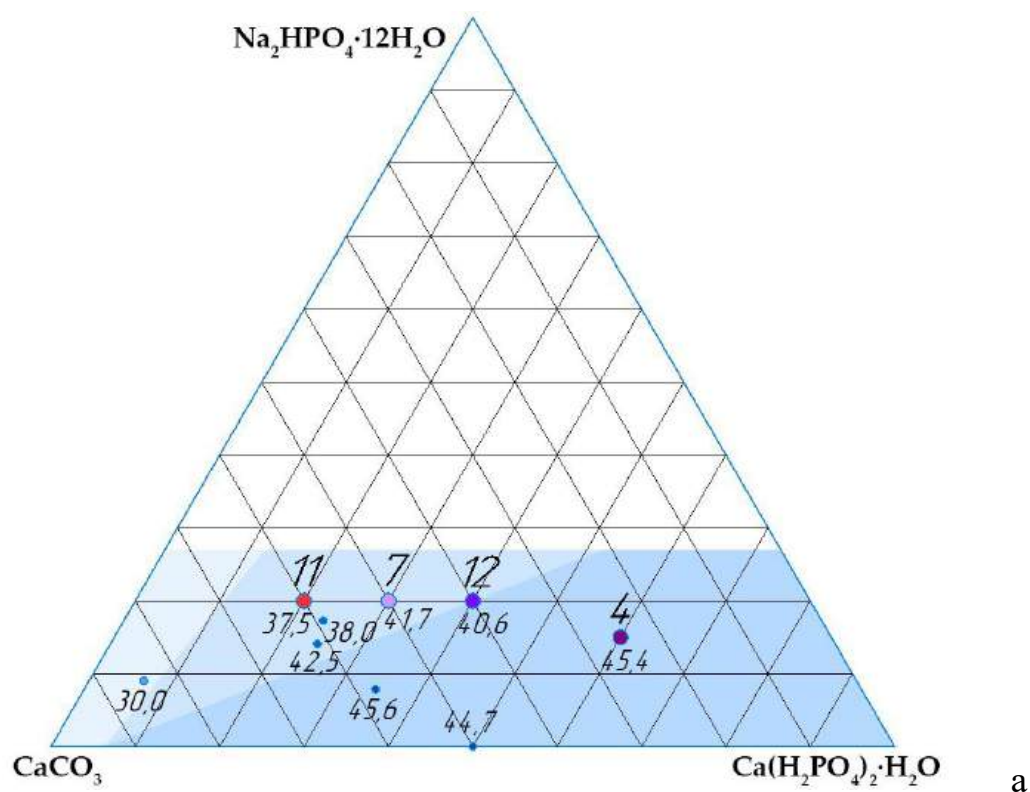
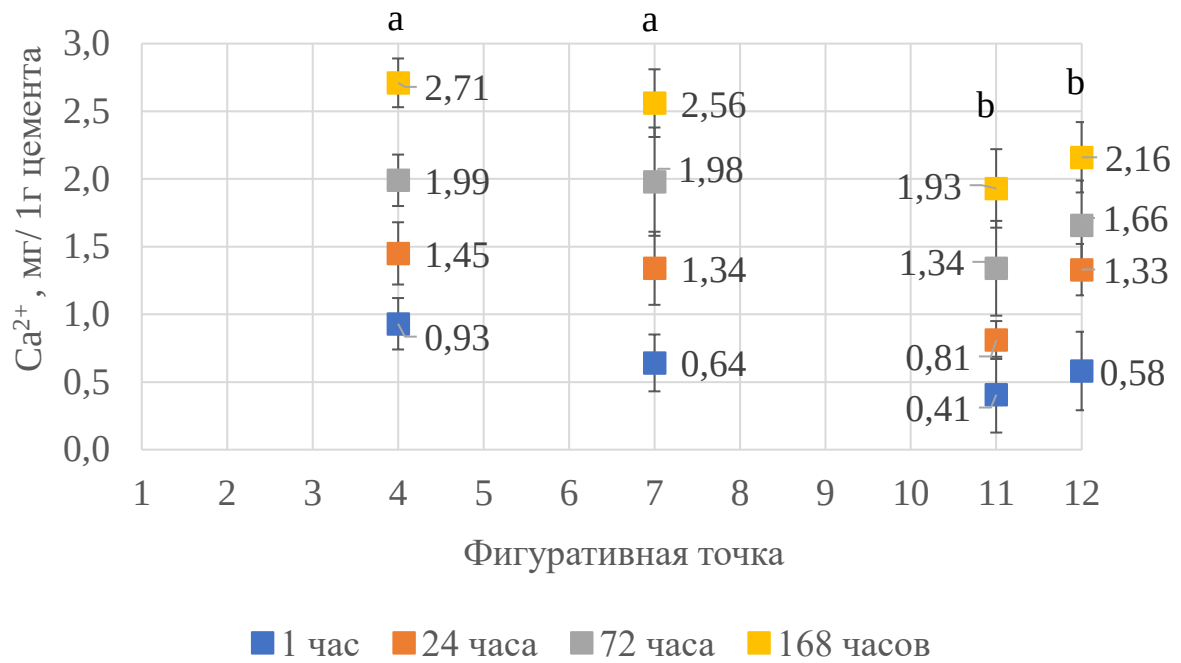
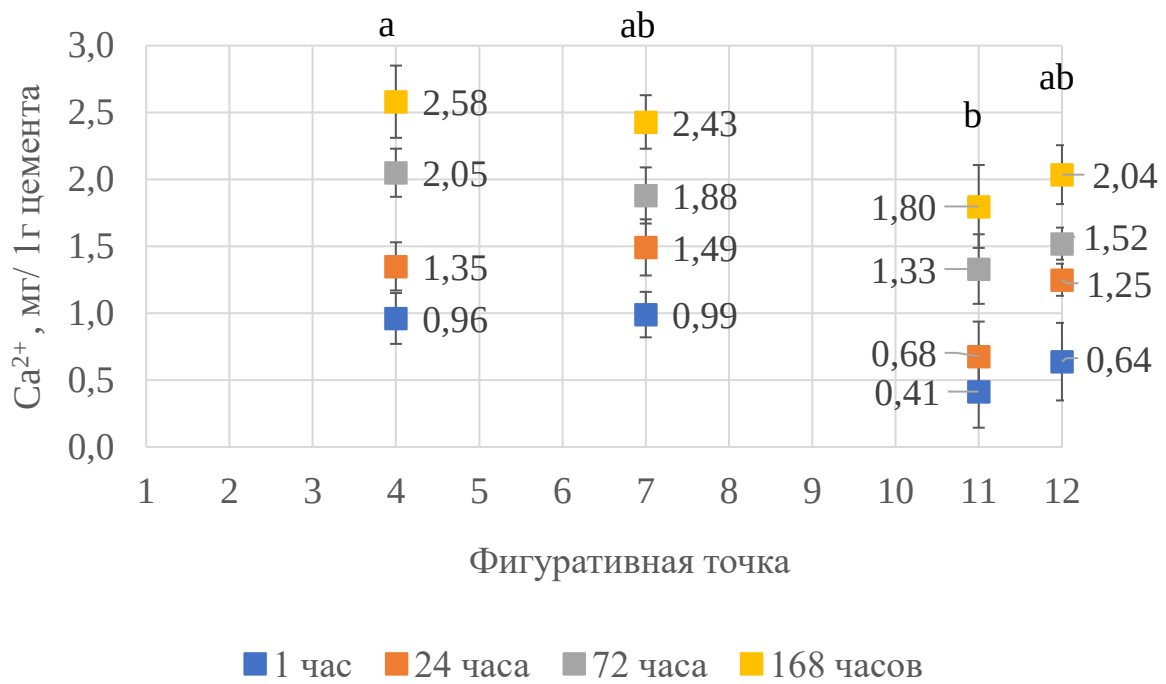


Рисунок 3.55 – Пористость цементного камня на срезах диаграммы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O при фиксированном α -ТКФ: а – 70 мас. %; б – 60 мас. %



а



б

*Тест Тьюки, разные буквы обозначают существенно отличающиеся значения ($p < 0,05$)

Рисунок 3.56 – Концентрация ионов кальция в физиологическом растворе после выдержки в нем при 120 грт гранул 250–500 мкм цементного камня, образованного в фигуративных точках при фиксированном значении α -ТКФ: а – 70 мас. %; б – 60 мас. %

Увеличение МКФМ в составе исходной смеси приводит к увеличению скорости схватывания из-за высокой реакционной способности смеси с образованием ДКФД. Он выступает и как затравка кристаллизации при образовании гидроксиапатита, что приводит к высокой скорости образования цементного камня, содержащего ДКФД. Сроки схватывания цемента составов фигуративных точек при уменьшении количества α -ТКФ в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O с 80 мас. % до 70 мас. % и далее 60 мас. % уменьшаются, в связи с чем требуется меньшее количество додекагидрата натрия для достижения определенных сроков начала схватывания, например, 10 мин. (рисунок 3.57).

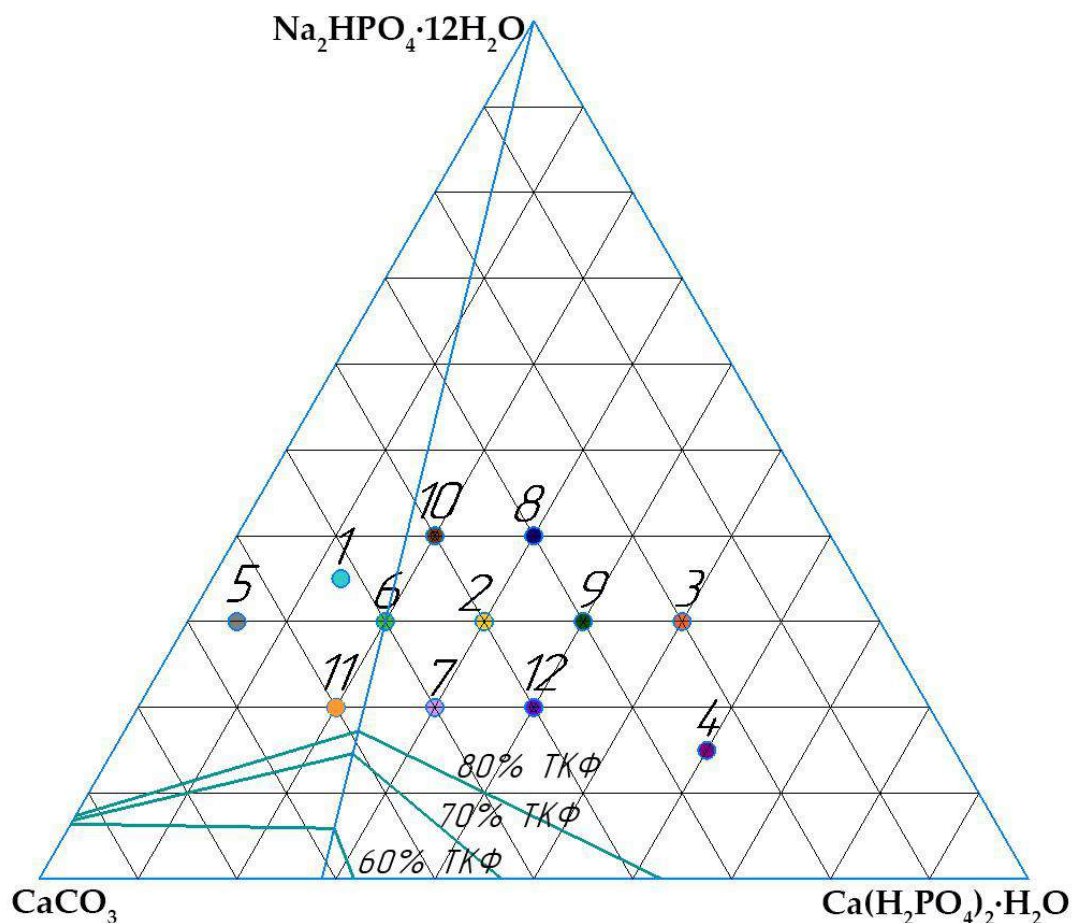


Рисунок 3.57 – Линии составов в системе α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O , сроки схватывания которых составляют 10 мин при фиксированных значениях α -ТКФ 80, 70 и 60 мас. %

Линии составов со сроками начала схватывания 10 мин. для системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O с фиксированным количеством α -ТКФ 70 и 60 мас.% представляют собой ломаные линии, как для составов с фиксированным количеством α -ТКФ 80 мас.%, причем вершины ломаных располагаются на той же линии составов с мольным соотношением $\text{CaCO}_3 / \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \approx 6,29$. Ломаные отличаются углами наклонов составляющих ее отрезков. При снижении массовой доли α -ТКФ, увеличение количества МКФМ вносит более значительный вклад в уменьшение сроков начала схватывания, поскольку его доля в общем количестве сухой цементной смеси увеличивается. Вклад увеличения доли карбоната кальция в сухой цементной смеси, напротив, оказывает меньшее влияние на сроки начала схватывания, поскольку в исходном составе избыточное количество карбоната кальция, который не участвует в образовании продуктов реакции и является наполнителем в цементном камне, практически не оказывая влияния на схватывание.

3.5 Результаты доклинических исследований *in vivo* цементного камня составов фигуративных точек при фиксированном количестве ТКФ70 и ТКФ60

Скорость резорбции карбонатсодержащих гидроксипатитовых цементов, как было определено в работе ранее, зависит от количества ДКФД, как наиболее высокорастворимой фазы многофазного цементного камня. При уменьшении количества α -ТКФ в системе до 70 и 60 мас.% в составе цементного камня обнаружен исходный компонент, карбонат кальция, в качестве наполнителя. В экспериментах *in vitro* была доказана более высокая растворимость цементного камня всех составов ТКФ70 и ТКФ60 по сравнению с составами ТКФ80.

Биосовместимость и резорбируемость составов были исследованы в сравнительном эксперименте *in vivo* на крысах линии Wistar в модели перфорации большеберцовой кости в точках с соотношением $\text{CaCO}_3 / \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \approx 31$ и сроками начала схватывания 10 мин., в связи с чем количество додекагидрата

гидрофосфата натрия менялось в зависимости от количества α -ТКФ. На рисунке 3.58 показаны выбранные для исследования точки 5.80, 5.70 и 5.60.

Гранулы размером 250–500 мкм были устанавливали в костные перфорации критического размера большеберцовой кости крысы линии «Wistar» массой 250–300 г. В исследовании использовались 9 животных.

Через 3 мес. после имплантации, по данным компьютерной микротомографии, происходит частичная резорбция матрикса и формирование новой костной ткани (таблица 3.21).

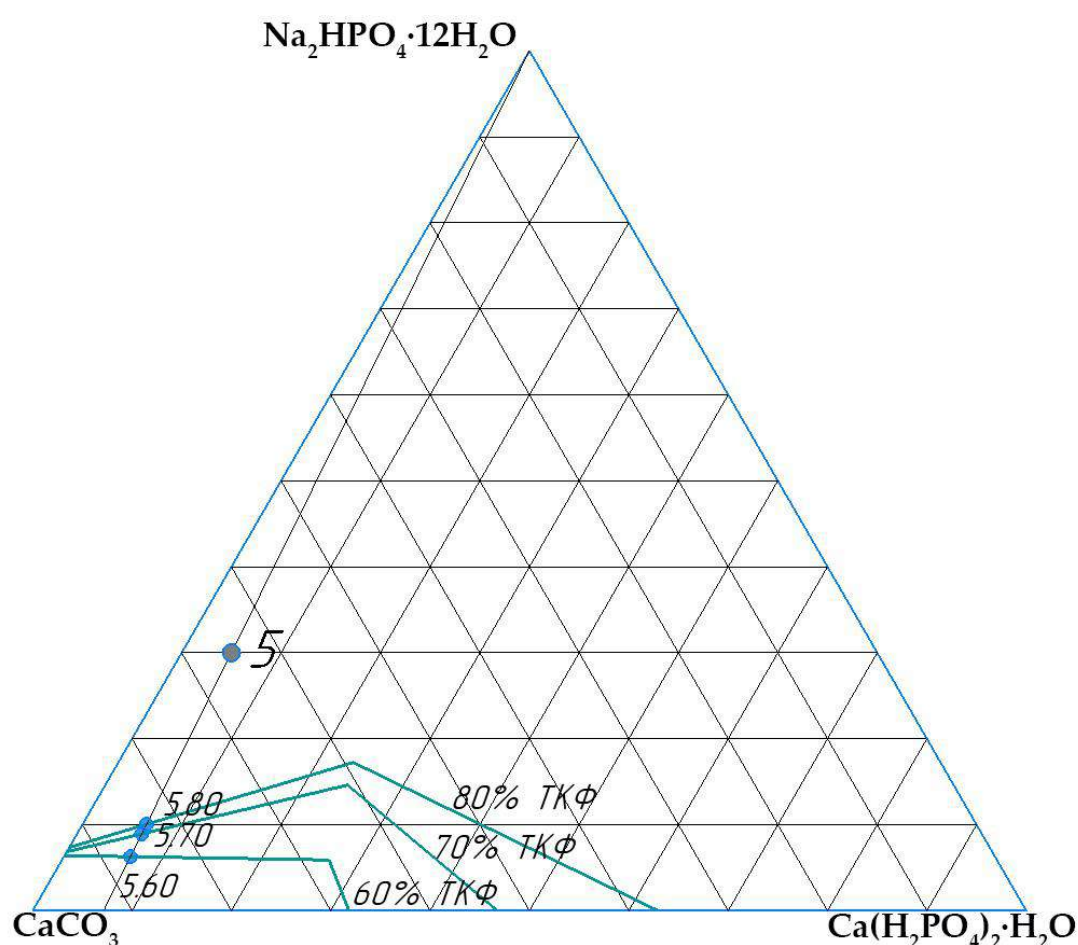


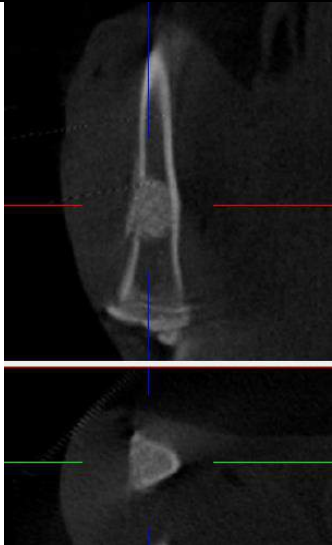
Рисунок 3.58 – Точки составов цементного камня для *in vivo* исследований при ТКФ80 – 5.80, при ТКФ70 – 5.70 и ТКФ60 – 5.60

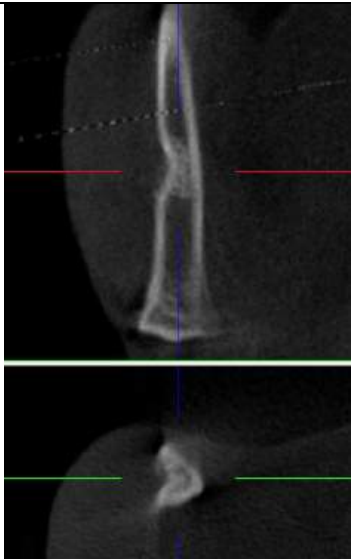
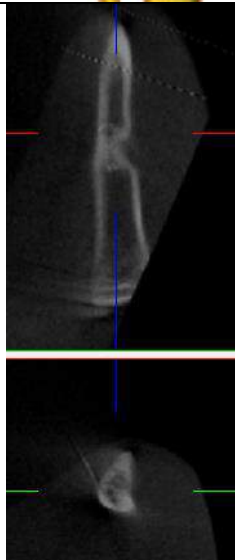
Спустя 3 мес. после имплантации состав 5.80, 5.70 и 5.60 площадь дефекта существенно сокращена. В костномозговом канале сохраняется затемнение от имплантированного материала. Регенерат кости образуется по поверхности материала, обращенной к дефекту, имеет вогнутую форму с отдельными зонами

уплотнения сравнимыми по плотности с кортикальной костью, что свидетельствует об образовании кортикальных мостиков не до конца сформированных. Закрытие дефекта происходит с деформацией кости – отклонением от поверхности в костномозговой канал.

Гранулы материалов остаются рентгеноконтрастными в зоне костномозгового канала, но рентгенологическая их плотность ниже исходной, особенно в случае состава 5.60.

Таблица 3.21 – 3D-модели и ортогональные проекции большеберцовой кости лабораторного животного по результатам микро-КТ

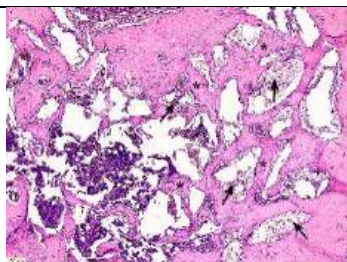
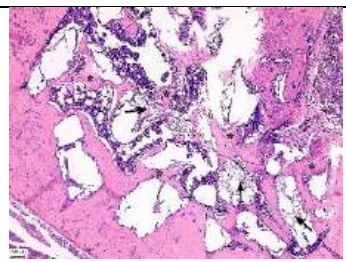
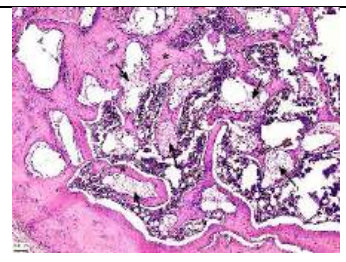
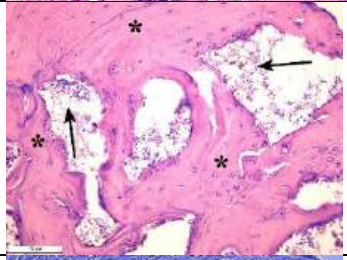
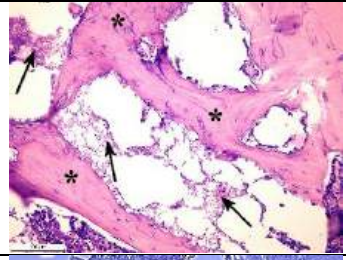
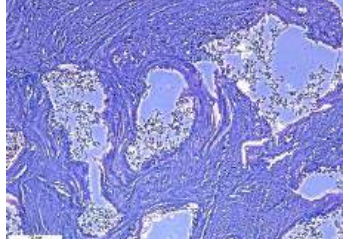
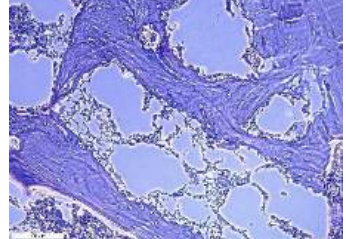
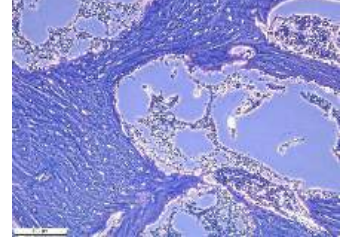
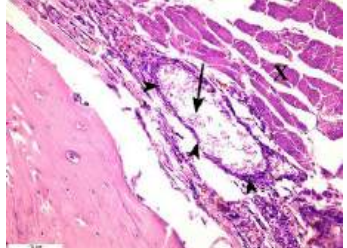
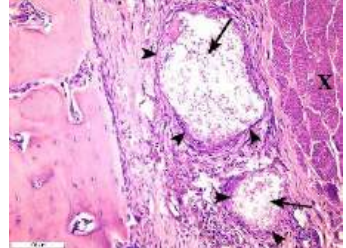
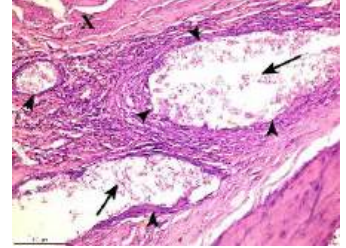
	Фигуративная точка		
	5.80	5.70	5.60
3D-модель и ортогональные проекции исходные			
			

	Фигуративная точка		
	5.80	5.70	5.60
3D-модель и ортогональные проекции после 3 мес. имплантации			
			
3D-модель и ортогональные проекции показаны на одном примере для каждого состава			

Согласно морфологическому исследованию, через 3 мес. после имплантации гранул в отверстия большой берцовой кости почти во всех случаях наблюдалась хорошая костная регенерация с заполнением области дефекта новообразованной костной тканью (таблица 3.22). При этом воспалительная реакция отсутствовала, остатки имплантата выявлялись в костных дефектах во всех случаях. Лучшие результаты были получены для образцов точки 5.60, в которых новообразованная трабекулярная кость была более зрелой с отдельными участками формирования пластинчатой кости.

При исследовании образцов разных составов остатки имплантата вблизи области дефекта помимо кости также встречались и в мышцах. В этом случае они были окружены микрокапсулами из преимущественно макрофагов, в некоторых случаях фибробластов и гигантских многоядерных клеток.

Таблица 3.22 – Результаты морфологического исследования цемента состава 5 сечений диаграммы ТКФ80, ТКФ70 и ТКФ60

		Состав			
		5.80	5.70	5.60	
Имплант в костной ткани	Светооптическая микроскопия, ув. x50				
	Светооптическая микроскопия, ув. x200				
	Фазово-контрастная микроскопия, ув. x200				
Имплант в мягких тканях	Светооптическая микроскопия, ув. x200				
* – новообразованная кость, X – мышцы, стрелки – остатки имплантата, кончики стрелок – соединительнотканная капсула вокруг остатков имплантата					

Все исследуемые в экспериментах *in vivo* составы показывают высокую биосовместимость, отсутствие воспаления. В полости кости отмечалась выраженная костная регенерация вокруг остатков имплантата зернистой структуры

с заполнением области дефекта новообразованной костной тканью. Резорбция *in vivo* практически одинакова для всех составов, однако при использовании состава 5.60 формировались более зрелые толстые трабекулы по сравнению с предыдущими группами, а в отдельных участках начинала уже формироваться структура компактной кости с Гаверсовыми каналами.

3.6 Выводы

1. Система $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$ – вяжущая система, продуктом которой при взаимодействии с водой, является цементный камень, представляющий собой серию твердых растворов, состоящий преимущественно из гидроксипатитных фаз, дикальцийфосфата дигидрата. При снижении количества исходного $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в составе цементного камня появляется и увеличивается количество карбоната кальция.

2. Соотношение исходных компонентов в системе влияет на состав и свойства цементного камня. Увеличение количества монокальцийфосфата моногидрата приводит к увеличению дикальцийфосфата дигидрата и снижению количества ионов CO_3^{2-} в конечном составе.

3. Растворимость цементного камня, образованного в $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$, зависит от количества дикальцийфосфата дигидрата и карбонат-ионов в структуре гидроксипатита. Наибольшие значения растворимости характерны для составов, которые содержат наибольшие количества дикальцийфосфата дигидрата. При этом невысокое содержание дикальцийфосфата дигидрата частично компенсируется более высоким содержанием ионов CO_3^{2-} .

4. pH всех цементного камня всех составов является нейтральным и находится в диапазоне 6,44–7,25.

5. Прочность цементного камня составляет 29–35 МПа для составов, содержащих $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в количестве 80 мас.%, и снижается до 3–28 МПа для составов, содержащих $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в количестве 60 мас.%.

6. Сроки схватывания в системе $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaCO}_3\text{--Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O--Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O--H}_2\text{O}$ уменьшаются при снижении количества $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, причем наибольшие сроки начала схватывания приходятся на мольное соотношение $\text{CaCO}_3/\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O} = 6,29$. Отклонение от этого соотношения в сторону увеличения монокальцийфосфата моногидрата оказывает большее влияние, чем отклонение в сторону увеличения CaCO_3 .

7. Все исследуемые в экспериментах *in vivo* составы обладают высокой биосовместимостью, хорошей костной регенерацией с заполнением области дефекта новообразованной костной тканью без воспалительной реакции. Наиболее интенсивная резорбция материала *in vivo* и костная регенерация была характерна для составов, содержащих больше дикальцийфосфата дигидрата и карбонат-групп, что приводит к достаточно зрелой структуре новообразованной кости с большим количеством остеоцитов.

8. Образование в системе карбонатзамещенного гидроксиапатита и дикальцийфосфата дигидрата увеличивают пассивную резорбцию (растворимость) за счет замещения ионов PO_4^{3-} на CO_3^{2-} и искажения кристаллической решетки гидроксиапатита, а также за счет образования кристаллов метастабильного при физиологических условиях соединения в составе цементного камня.

4 ПОРИСТЫЕ МАТРИКСЫ НА ОСНОВЕ КАРБОНАТЗАМЕЩЕННОГО ГИДРОКСИАПАТИТОВОГО ЦЕМЕНТА

Наличие пористости является важным фактором не только для остеоинтеграции в начальный период времени, но и резорбции в более поздний. Микропористость обеспечивает хорошую пропитку материала биологическими жидкостями и создает шероховатость поверхности, которая играет важную роль для адсорбции и удержания остеогенных клеток на поверхности имплантата, а макропористость обеспечивает доступ крови к контактным поверхностям, ангиогенез, ускоряет резорбцию и сопутствующую остеоинтеграцию. Микропористость формируется за счет формирования структуры материала (роста кристаллов) в процессе гидратации, выделения CO_2 и вовлечения воздуха.

Большинство кальцийфосфатных цемента не обладают макропористостью, несмотря на высокие значения общей пористости, что затрудняет васкуляризацию, доступ крови к контактным поверхностям матрикса через формирующуюся сеть кровеносных капилляров, ангиогенез и остеоинтеграцию (диаметр остеона находится в пределах 100–150 мкм) [138, 161].

Макропористость может быть получена за счет введения порообразующих агентов, предпочтительно невзаимодействующих с цементом и удаляемых либо путем резорбции в тканях организма, либо растворением в воде, в растворителях, либо нагреванием после затвердения цемента. Порообразующие агенты в виде гранул, волокон включают D-Маннит, желатин, полиглактин, сахар, растворимые соли щелочных металлов, вводимые в прямом виде или в виде соединений, содержащих определенные анионы и катионы, которые образуют соли щелочных металлов, например, хлорид калия, натрия, кальция, цитрат натрия и гидроксид натрия или калия, бикарбонат натрия и фосфатные соли [161–165, 167, 168, 363].

Недостатком использования частиц высокорастворимых в воде солей является неуправляемость размером и количеством пор [168]. Растворение порообразующих добавок в затвердевших цементах проводится от нескольких часов до нескольких месяцев для разных по химическому составу добавок [167].

Трудность удаления порообразователя из внутреннего объема матрикса делает процесс малоконтролируемым.

Формирование макропористости возможно за счет введения органических порообразующих агентов, не взаимодействующих с цементом и удаляемых путем растворения в органических растворителях [169].

Существующие коммерческие апатитовые цементы (Norian SRS, Graftys, β -, γ -BSM, Mimix, Calcibon), используемые в регенеративной медицине, обладают прочностью от 12 до 60 МПа и являются микропористыми. Увеличение макропористости приводит к снижению прочности по экспоненциальному закону. С целью повышения прочности матриксов, полученных по технологии самосхватывающихся композиций, может проводиться подпрессовка цементной пасты [196–198]. В процессе подпрессовки удаляется вода, количество которой влияет на микропористость, увеличивается количество контактных связей. Такие материалы часто называют низкотемпературной керамикой или реакционно-связанными материалами, однако механизмы образования цементного камня подпрессованных материалов идентичны цементам, полученным простым формованием.

Еще одним важным условием для улучшения механических характеристик материала является температура, при которой происходит набор прочности. Например, при изменении температуры выдержки от 40 до 80 °C при гидролизе подпрессованного α -трикальцийфосфата (α -ТКФ) прочность увеличивается и достигает значений 95 МПа при давлении подпрессовки 400 МПа [196].

Таким образом, в работе решались следующие задачи:

- изучение влияния условий гидратации на кинетику образования цементного камня и полноту протекания реакции;
- разработка технологии получения макропористых блоков по цементной технологии.

4.1 Влияние условий гидратации на кинетику образования цементного камня на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита и полноту протекания реакции

Процессы образования матриц по цементной технологии состоят из кислотно-основного взаимодействия и гидролиза при взаимодействии исходной порошковой смеси с водной средой. Для образования матриц можно применять давление при прессовании.

Технологические параметры, такие как температура консолидации и размер частиц исходных компонентов, оказывают влияние на скорость протекания реакции. Растворимость α -ТКФ лимитирует скорость протекания реакции, поскольку обладает невысокой растворимостью 0,002 г/100мл.

Для получения матриц по цементной технологии сухая четырехкомпонентная цементная смесь состава фигуративной точки 1 системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O увлажнялась дистиллированной водой при $\text{В/Т}=0,07$, укладывалась в формы и выпрессовываются образцы при 130 МПа при использовании гидравлического пресса П-10. Увеличение значения $\text{В/Т} > 0,07$ приводит к выжиманию лишней жидкости при прессовании. Твердение проводилось при 100% влажности и температурах от 20 до 80 °С.

Состав фигуративной точки 1 был выбран в связи с его соответствием коммерческому цементу «Norian SRS» (Norian Corporation, Cupertino, CA, USA) и является лишь одним из множества составов системы, на основе которых возможно получение макропористых матриц. В данном исследовании подтверждается принципиальная возможность использования технологии низкотемпературной керамики, как часто называют технологию получения подпрессованных блоков с последующей консолидацией за счет гидратации используемой цементной смеси.

В соответствии с результатами РФА полнота протекания реакции зависит от температуры и возрастает при увеличении времени выдержки (рисунки 4.1 – 4.4). Интенсивность пиков, характерная для продуктов реакции (гидроксиапатитов)

увеличивается во времени, интенсивность пиков исходных компонентов уменьшается. Средний размер частиц α -ТКФ = 37,02 мкм, $S_{\text{пов-ти}} = 1,1080 \text{ м}^2/\text{г}$.

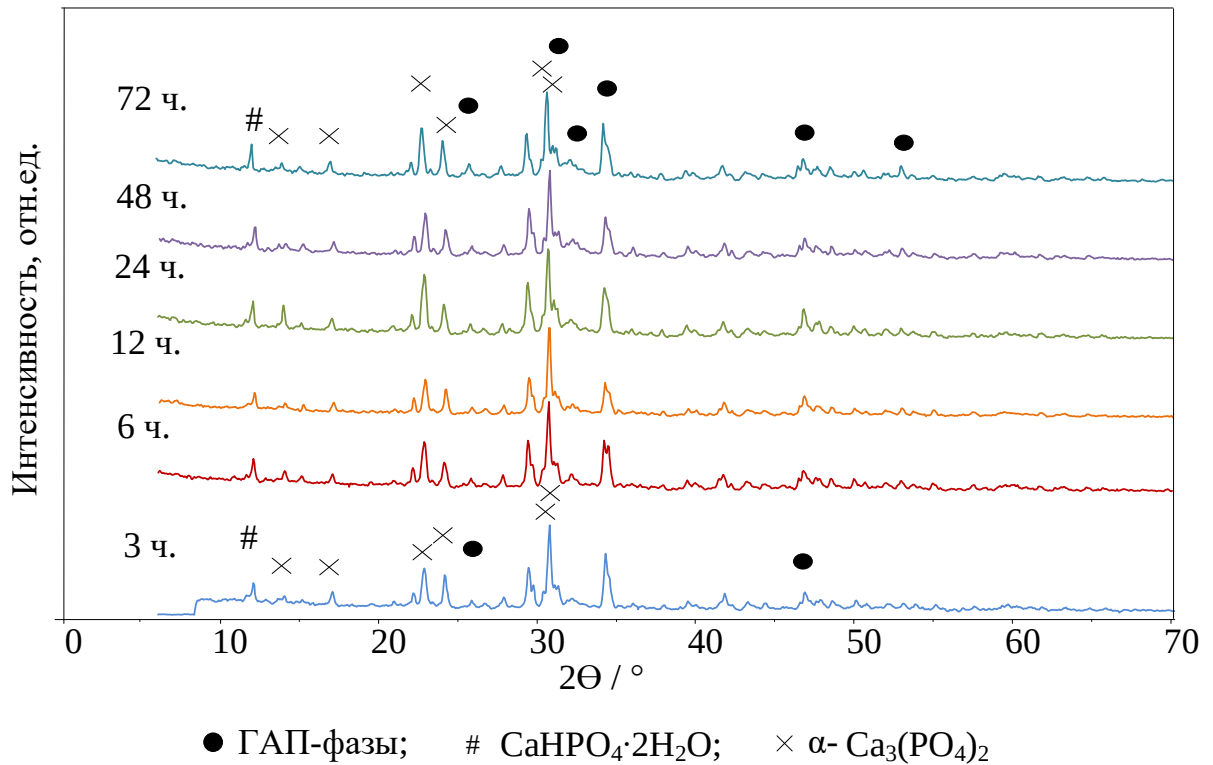


Рисунок 4.1 – Дифрактограммы цементного камня после твердения в течение 3–72 ч при температуре 20 °С

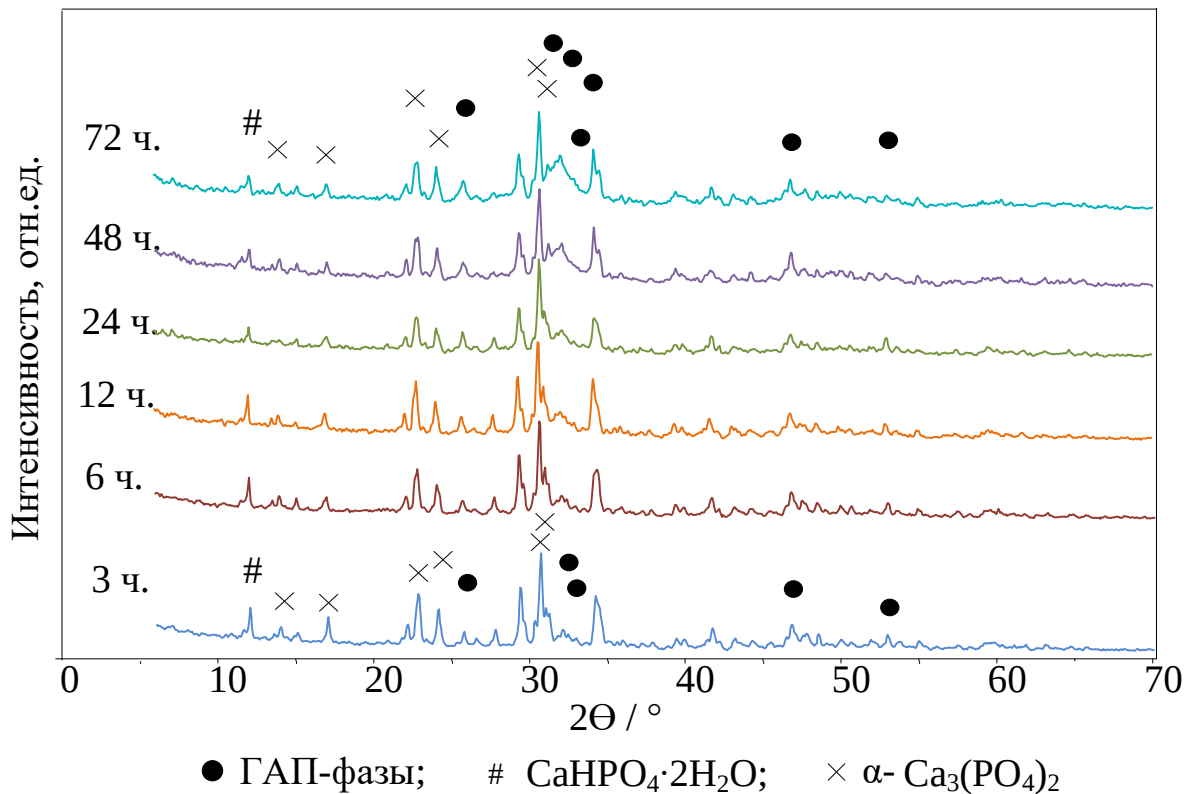


Рисунок 4.2 – Дифрактограммы цементного камня после твердения в течение 3–72 ч при температуре 40 °С

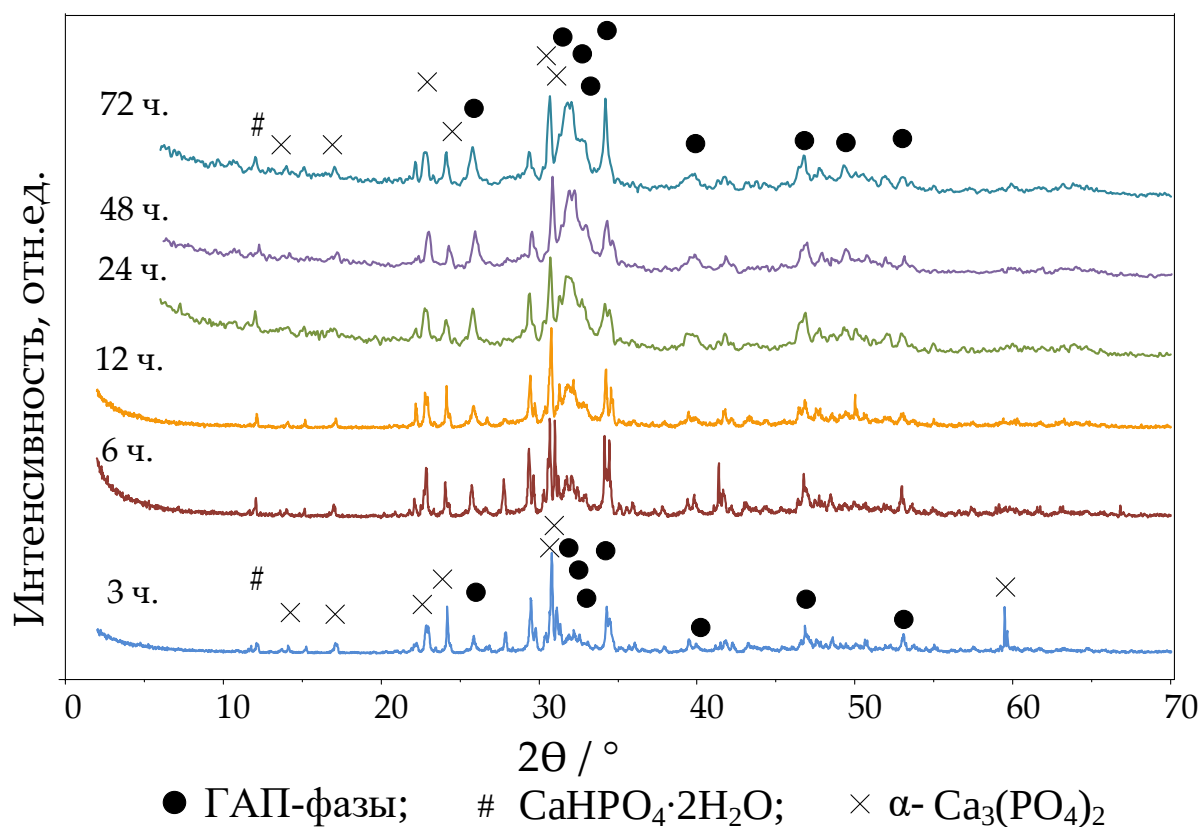


Рисунок 4.3 – Дифрактограммы цементного камня после твердения в течение 3–72 ч при температуре 60 °С

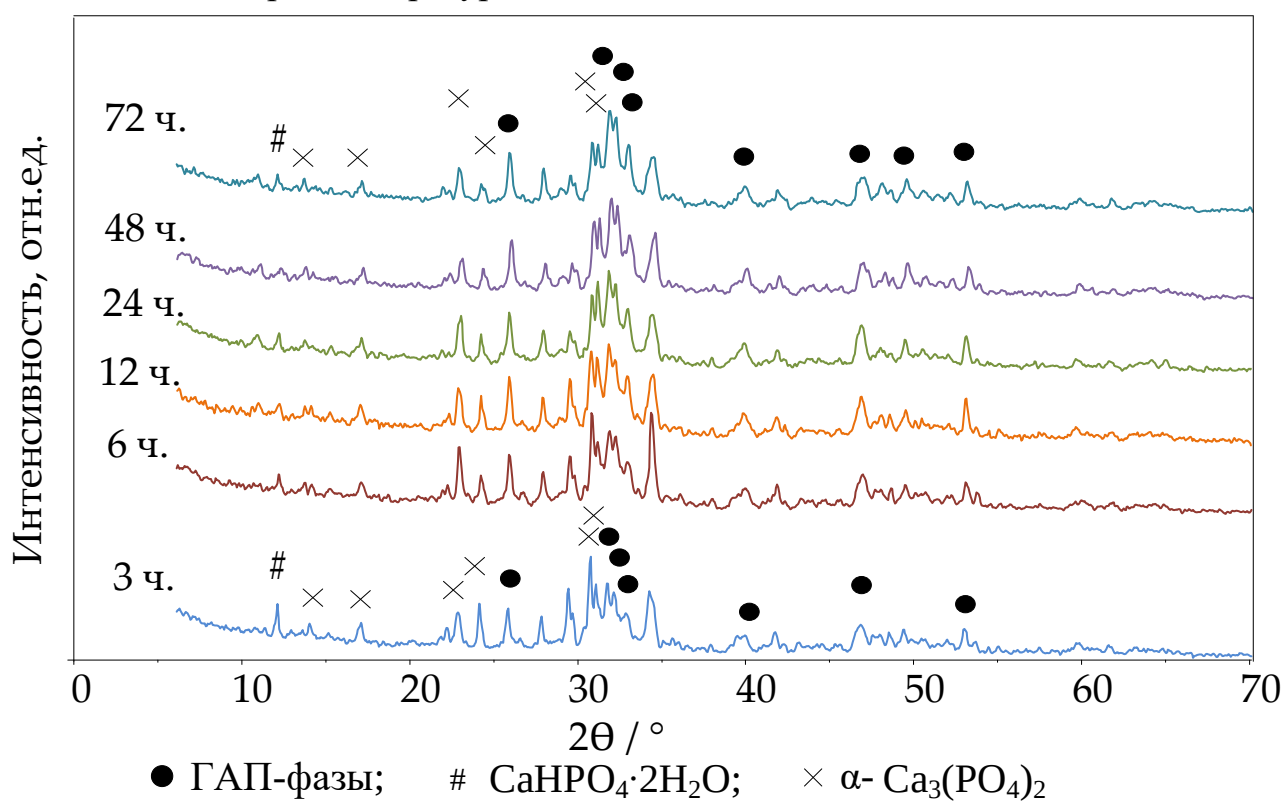


Рисунок 4.4 – Дифрактограммы цементного камня после твердения в течение 3–72 ч при температуре 80 °С

Рентгенофазовый анализ матрикса, образованного в ходе кислотно–основного взаимодействия и гидролиза компонентов системы, показал наличие карбонатзамещенного гидроксиапатита переменного состава, $(\text{CO}_3\text{-ГАП})$ (например, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_4(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_4$ [085-7370], $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_{2,829}(\text{CO}_3)_{0,26}(\text{OH})_{1,59}$ [075-3728], $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{5,56}(\text{CO}_3)_{0,64}(\text{OH})_{3,668}$ [072-9861]), пики которых практически совпадают, и сложны для идентификации, в том числе связи с искажением кристаллической решетки и смещением пиков. Вероятно, за счет гидролиза образуется кальцийдефицитный гидроксиапатит $\text{Ca}_{8,86}(\text{PO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_2$ (КГАП) [082-1943], основные пики которого накладываются на пики карбонатного гидроксиапатита. Кроме ГАП-фаз присутствуют пики, характерные для дикальцийфосфата дигидрата (ДКФД) $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [072-0713], α -трикальцийфосфата [070-0364].

Идентификация карбоната кальция [072-1652] и β -трикальцийфосфат $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [070-2065] (β -ТКФ) методом рентгенофазового анализа невозможна, поскольку отсутствуют характеристические пики (не совпадающие с пиками присутствующих фаз) в указанной системе (рисунок 4.5).

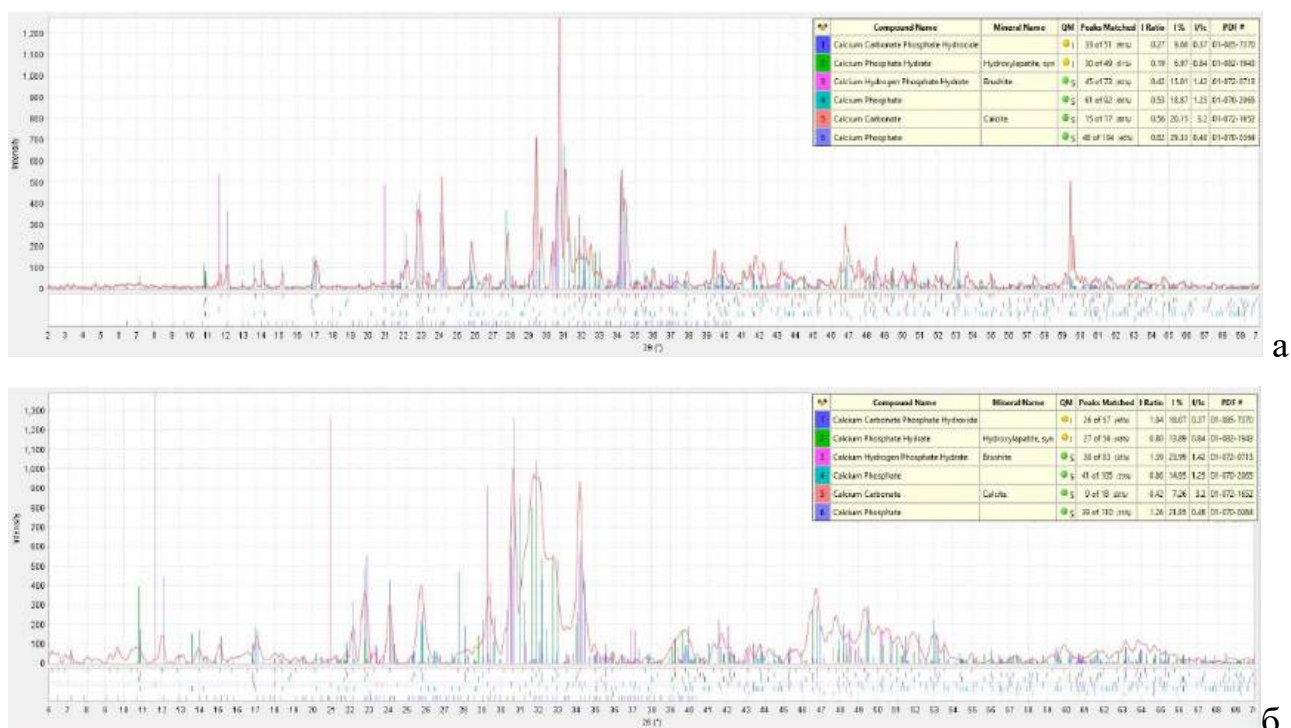


Рисунок 4.5 – Дифрактограммы цементного камня матриксов, твердеющих при 60 °С в течение: а – 3 ч.; б – 72 ч.

Наличие фаз исходных компонентов объясняется неполнотой протекания реакции. В начальный период гидратации на поверхности исходных частиц образуются кристаллы продуктов реакции. Количество исходной фазы α -ТКФ уменьшается при увеличении температуры. Степень полноты протекания реакции рассчитывалась как % гидроксиапатитов переменного состава от α -ТКФ в составе цементного камня.

Кинетика образования гидроксиапатитных фаз из исходных при различных температурах представлена на рисунке 4.6.

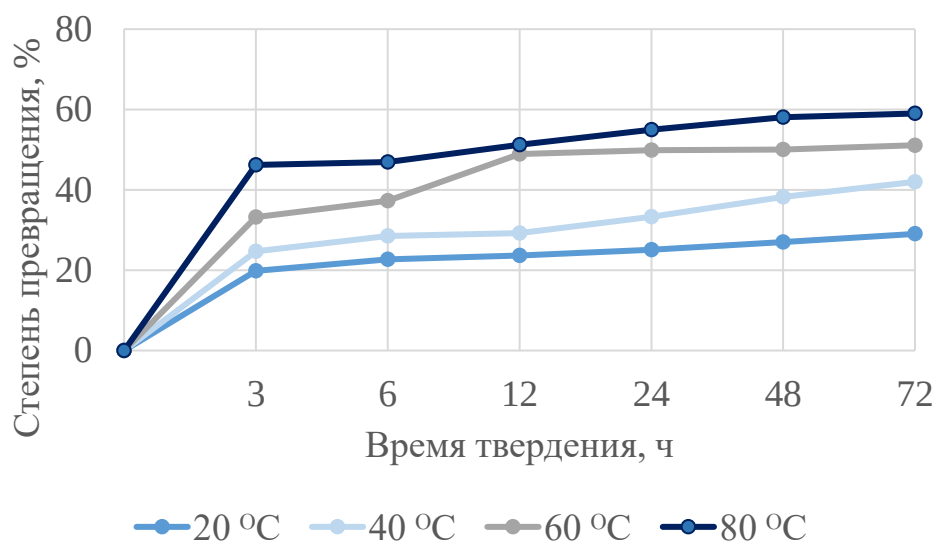


Рисунок 4.6 – Кинетика образования гидроксиапатитов при различных температурах (средний размер частиц α -ТКФ = 37,02 мкм, $S_{\text{пов-ти}} = 1,1080 \text{ м}^2/\text{г}$)

Образование гидроксиапатитов переменного состава интенсивно происходит в первые 3 ч, после чего идет их медленное образование до 72 ч. Увеличение степени превращения напрямую связано с температурой гидратации. Однако даже при твердении при 80°C степень превращения к 3 ч составила почти 50 %, увеличилась плавно к 48 ч до значений близких к 60 % и практически не менялась к 72 ч.

Скорость образования гидроксиапатитов напрямую зависит от температуры и увеличивается при уменьшении размера частиц α -ТКФ. Прямая зависимость

между размером частиц исходных компонентов и размером кристаллов была обнаружена авторами [348]. Более быстрое растворение мелких частиц способствует пересыщению и образованию кристаллических зародышей.

Кинетика образования гидроксиапатитов в результате твердения при различных температурах с уменьшением среднего размера частиц α -ТКФ до 6,12 мкм (площадь поверхности $S_{\text{пов-ти}} = 3,1503 \text{ м}^2/\text{г}$) представлена на рисунке 4.7.

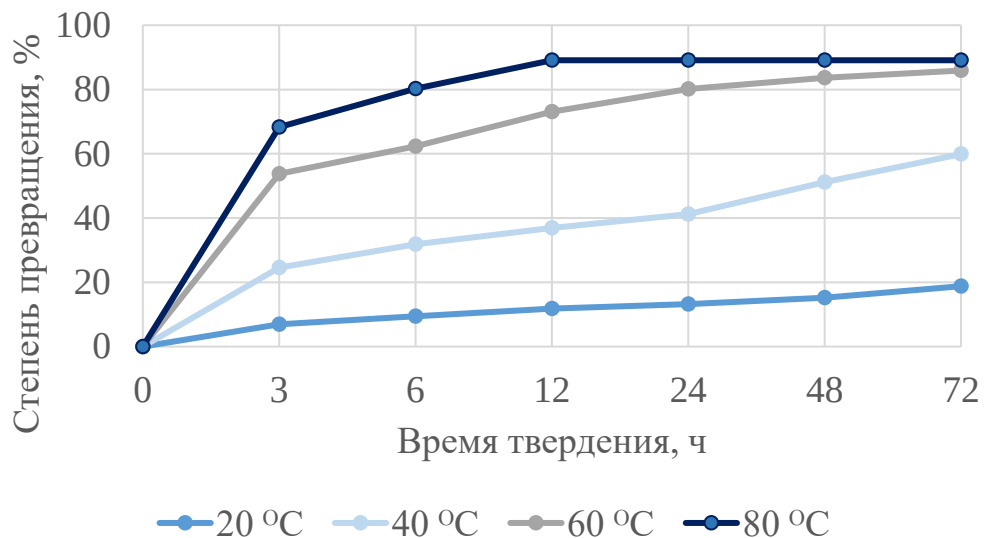


Рисунок 4.7 – Кинетика образования гидроксиапатитов при различных температурах (средний размер частиц α -ТКФ=6,12 мкм, $S_{\text{пов-ти}} = 3,1503 \text{ м}^2/\text{г}$)

Максимальная степень превращения исходных компонентов в гидроксиапатиты составляет 89 мас. %, что связано с присутствием дополнительных фаз в составе продуктов реакции: ДКФД и β -ТКФ. Количество гидроксиапатитов превышает 80 мас. % при температурах 60–80 °C и времени консолидации от 24 ч.

Данные ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием позволяют идентифицировать карбонат кальция в составе цементного камня (рисунок 4.8). Изменение интенсивности пиков ИК-спектров цементного камня, характерных для карбоната кальция, подтверждает протекание химических реакций в указанный промежуток времени.

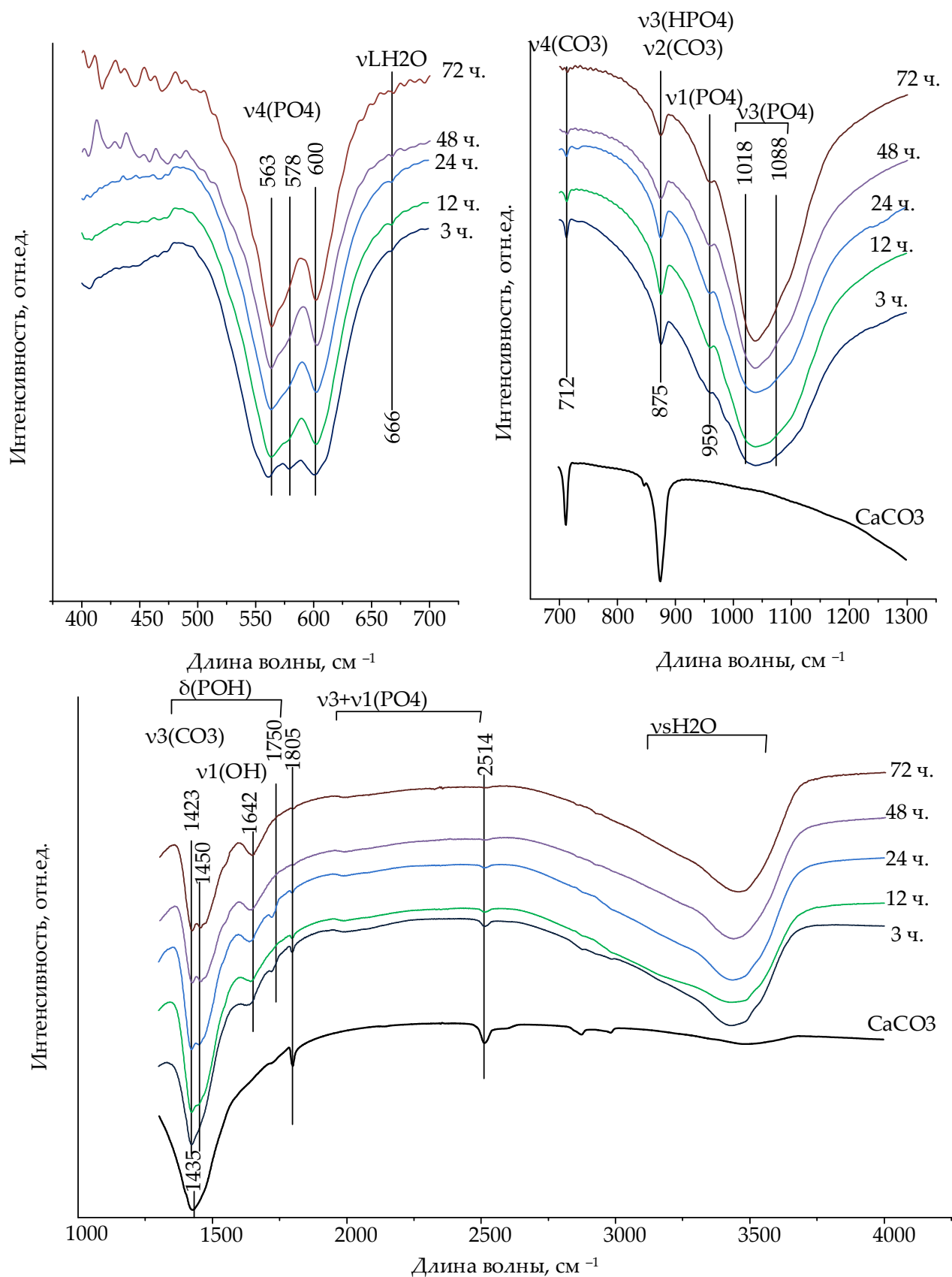


Рисунок 4.8 – ИК-спектры цементного камня при разном времени консолидации при 60 °С и ИК-спектр карбоната кальция

Как было описано ранее, для спектра карбоната кальция наиболее интенсивная и высокочастотная полоса 1435 см^{-1} не является характеристической, поскольку сливается с дублексом, характерным для ионов CO_3^{2-} карбонатзамещенного гидроксиапатита. Интенсивные полосы около $1409\text{--}1423\text{ см}^{-1}$ и $1449\text{--}1474\text{ см}^{-1}$ в спектре относятся к моде ν_3 антисимметричного растяжения, характерного для ионов CO_3^{2-} в А-типе (замещение ионов OH^-) и Б-типе (замещение ионов PO_4^{3-}) карбонатзамещенного гидроксиапатита.

Полосы при 712 и 875 см^{-1} соответствуют деформационным колебаниям ионов CO_3^{2-} карбоната кальция, причем полосу 712 см^{-1} можно считать характеристической, она позволяет судить о наличии или отсутствии кальцита в составе. Полоса при 874 см^{-1} совпадает с колебаниями, характерными для ионов HPO_4^{2-} . При увеличении времени выдержки во влажной среде интенсивность пика при 712 см^{-1} уменьшается, и он не наблюдается через 48 часов. На ИК-спектре карбоната кальция наблюдается пик при полосе 1805 см^{-1} , который также присутствует в начальные сроки гидратации, но отсутствует на спектрах после 24 часов. При отсутствии характеристических пиков карбоната кальция сохраняются интенсивные полосы около $1409\text{--}1423\text{ см}^{-1}$ и $1449\text{--}1474\text{ см}^{-1}$, причем дублекс четко виден. Это позволяет утверждать, что одной из фаз является карбонатзамещенный гидроксиапатит.

Время гидратации и температура влияют на прочность цементного камня и время ее набора (рисунок 4.9).

Наилучшие прочностные характеристики достигаются после твердения матриц при повышенных температурах. Набор прочности согласуется с данными по полноте протекания реакции, что подтверждает зависимость прочностных характеристик от количества и прочности контактов новообразованных кристаллов. Твердение при $80\text{ }^\circ\text{C}$ обеспечивает быстрый набор прочности, однако значения прочности незначительно ниже, чем при твердении при $60\text{ }^\circ\text{C}$, хотя диапазоны значений перекрываются, статистическая значимость отсутствует. В первые часы твердения кальцийфосфатных матриц при $60\text{ }^\circ\text{C}$ прочностные характеристики увеличиваются на 47% при увеличении времени

выдержки с 3 до 6 ч и на 25 % – с 6 до 24 ч, далее прочность изменяется не более, чем на 4% к 3 сут.

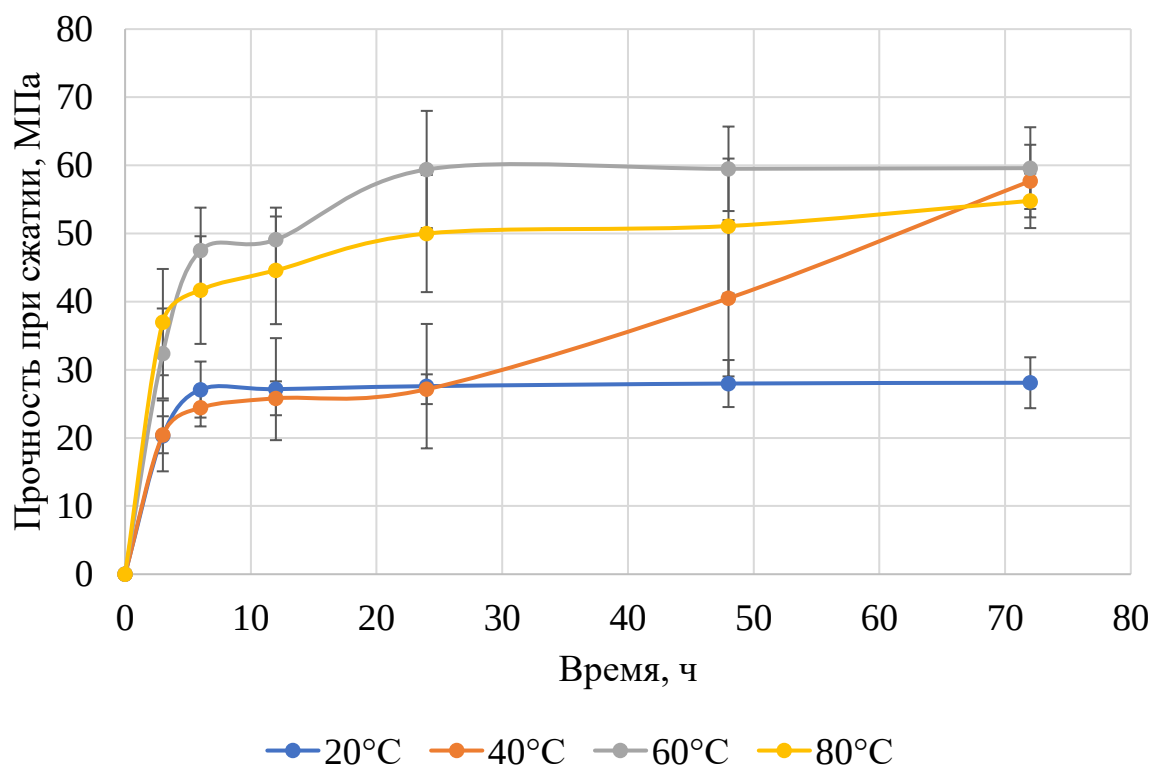


Рисунок 4.9 – Изменение прочности при сжатии образцов цементного камня состава фигуративной точки 1 от времени твердения при температурах 20–80 °С

Для сравнения прочность при сжатии матриксов на основе α -ТКФ с размером частиц 37,02 мкм при консолидации в течении 24 часов при температуре 60 °С составляет 43,8 МПа, тогда как на основе α -ТКФ с размером частиц 6,12 мкм – 59,4 МПа.

Кинетика гидролиза α -ТСР предполагает существование двух механизмов, ограничивающих скорость: первоначально площадь поверхности реагентов, а затем диффузия через гидратированный слой. Первый механизм управляет реакцией на начальных стадиях, далее реакция лимитируется диффузией [348].

При соприкосновении с водой на контактной поверхности исходных частиц, по-видимому, начинают идти реакции растворения, в связи с чем раствор 12-водного гидрофосфата натрия начинает насыщаться ионами OH^- , HPO_4^{2-} , Ca^{2+} , H_2PO_4^- . При прессовании «лишняя» жидкость выжимается из заготовки,

происходит уплотнение, увеличивается количество контактов исходных частиц, вызванное необратимой деформацией частиц, сокращается количество пор, внутри которых в течение первых суток после формования происходит пересыщение ионами и образование кристаллов гидроксиапатитов или дикальцийфосфата дигидрата. Т.е. в начальные сроки твердения механическая прочность обусловлена в большей степени когезией и адгезией и в меньшей степени образованием и ростом кристаллогидратов.

По мере увеличения количества образованных кристаллогидратов на поверхности исходных частиц ограничивается диффузия жидкости к негидратированной части частиц, в связи с чем замедляется скорость образования целевых фаз. Повышение температуры раствора отверждения объясняется необходимостью повышения растворимости исходных компонентов для увеличения скорости протекания реакции.

На прочностные характеристики матриц оказывают непосредственное влияние особенности микроструктуры цементного камня. На микрофотографиях образцов, твердеющих при 60 °С 3 ч, видны зародыши кристаллов гидроксиапатита на поверхности частиц α -трикальцийфосфата, представляющие собой тонкие иглы (рисунок 4.10 а, б). Через 6 ч твердения на поверхности α -ТКФ наблюдается значительное количество игольчатых длиной до 4 мкм и пластинчатых кристаллов гидроксиапатита (рисунок 4.10 в, г). Через 24 ч видны пластинчатые и игольчатые кристаллы длиной около 10 мкм, расположенные сростками. Такая структура сохраняется на 48 и 72 сут. (рисунок 4.10 д, е).

Происходит заполнение межзернового пространства вновь образованными кристаллами, контактирующими друг с другом, в связи с чем увеличивается механическая прочность. Микроструктура цементного камня не меняется после 24 ч твердения, что, в совокупности с данными по прочностным характеристикам и степени протекания реакции, подтверждает образование слоя новообразованных кристаллов на поверхности α -ТКФ и предотвращение диффузии жидкости и дальнейшей гидратации с увеличением содержания целевых фаз.

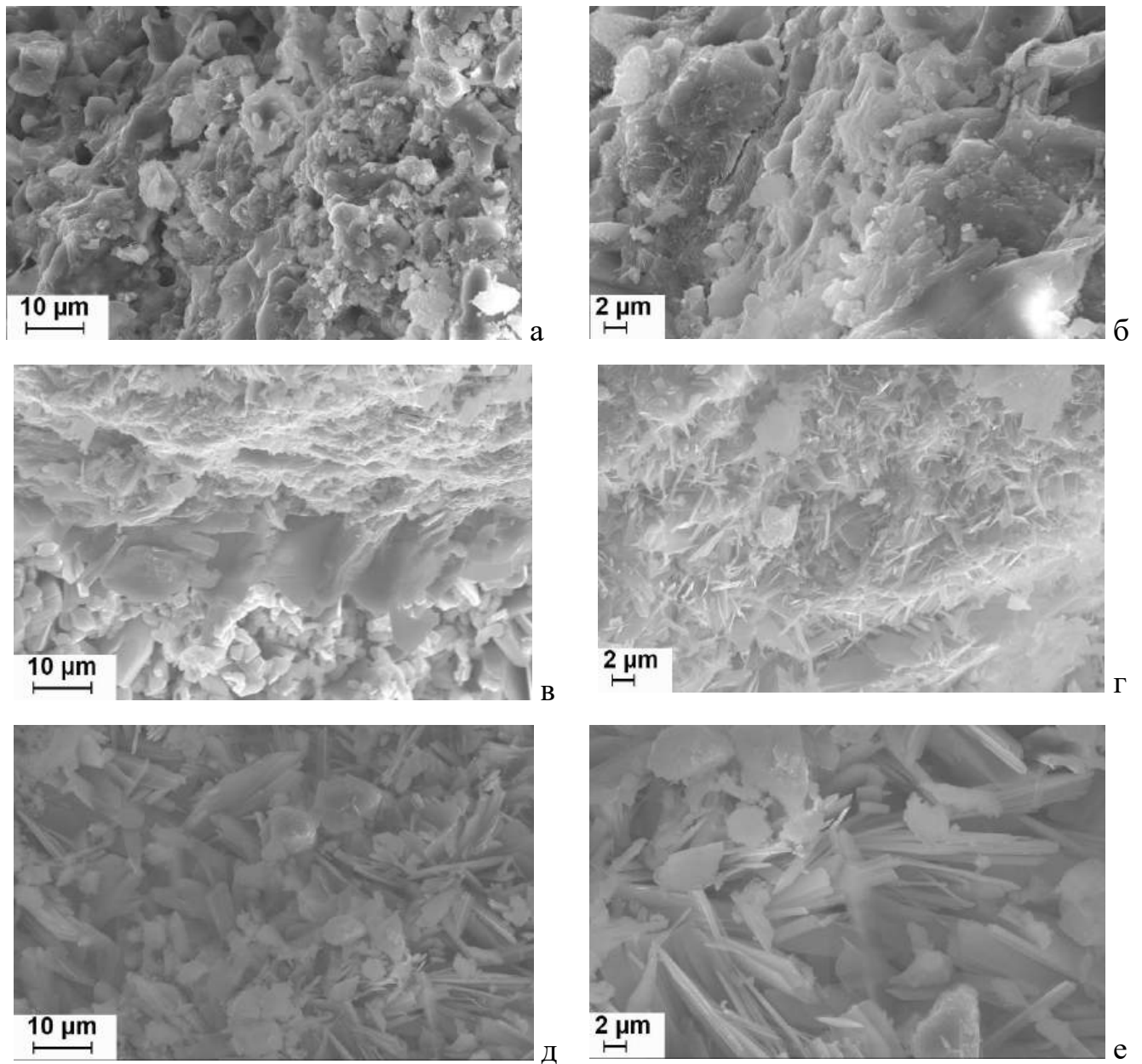


Рисунок 4.10 – Микроструктура цементного камня, твердеющего при 60 °С в течение, ч: а, б – 3; в, г – 6; д, е – 72. Увеличение: а, в, д – $\times 3000$; б, г, е – $\times 6000$

Возможно, при твердении при температуре 80 °С за счет образования более мелких кристаллов (около 5 мкм), в соответствии с результатами сканирующей электронной микроскопии, или незначительный их рост в процессе твердения приводит к меньшему количеству контактов, чем при образовании вытянутых кристаллов, образованных при 60° С (рисунок 4.11).

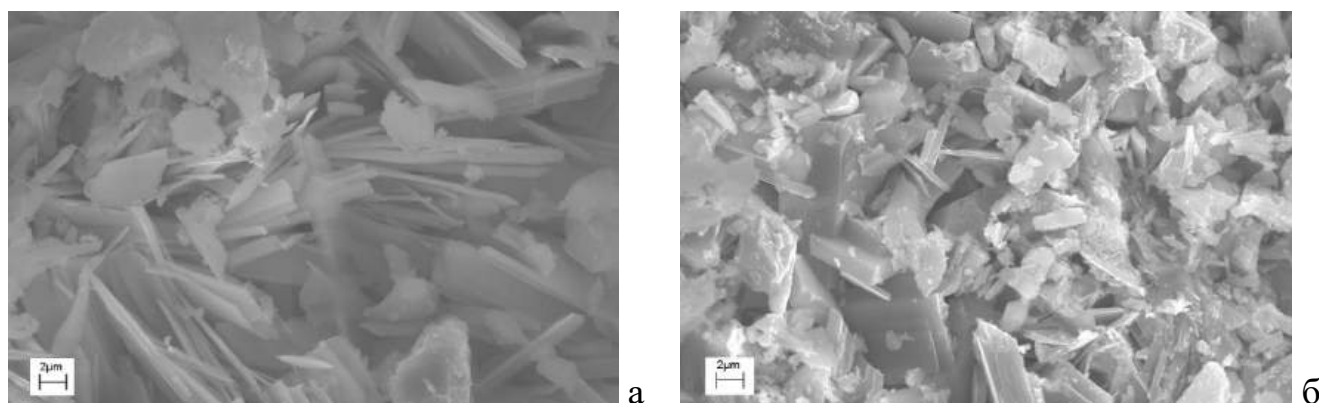


Рисунок 4.11 – Микроструктура цементного камня при твердении в течение 72 ч при температуре, °С: а – 60; б – 80. Увеличение X6000

Для дальнейших исследований была выбрана температура термообработки 60 °С и время обработки 24 ч, которые являются оптимальными в соответствии с прочностными характеристиками и степенью превращения.

4.2 Технология получения макропористых матриц на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита

Для получения макропористых матриц на основе карбонатного гидроксиапатита по низкотемпературной технологии использовался метод формирования пористой структуры за счет введения органических частиц в сухую смесь с последующим их вымыванием из цементного камня экстракцией в аппарате Сосклета до постоянной массы (точность 0,001 г), вакуумированием в течение 24 ч и, при необходимости, экстракцией диоксидом углерода в сверхкритическом состоянии в проточном реакторе с использованием насоса высокого давления.

Наиболее подходящими добавками для создания пористой структуры, соответствующими требованиям по температуре экстракции и отсутствию химического взаимодействия с компонентами смеси, являются частицы органических веществ.

4.2.1 Создание макропористости с использованием гранул парафина

Преимуществом парафина перед другими органическими веществами является возможность приготовления гранул различного размера методом

несмешивающихся жидкостей, отсутствие химического взаимодействия с матриксом и хорошей растворимостью в сверхкритическом CO_2 .

Парафиновые гранулы были получены путем охлаждения при постоянном перемешивании с помощью верхнеприводной мешалки (200 об./мин.) нагретой до 80 °С смеси парафина и 0,03%-ного мыльного раствора при соотношении мыльный раствор/парафин = 1/15. Парафиновые гранулы отфильтровывали и рассеивали на ситах с целью отбора гранул размером 200–500 мкм.

В качестве растворителей для экстракции парафина, использовали хлороформ или толуол. Потери массы образцов рассчитывали в % от значения предыдущего измерения (таблица 4.1). В таблице приведены средние значения потери массы образцов, содержащих 20 % парафиновых гранул в исходной смеси, при экстракции в органических растворителях.

Таблица 4.1 – Потери массы образца при экстракции в органических растворителях

Время экстракции, ч	Потери массы при экстракции, %	
	хлороформом	толуолом
3	7,11±0,09	7,12±0,06
6	2,32±0,07	3,38±0,09
9	1,79±0,07	2,08±0,08
12	1,52±0,08	1,31±0,07
15	0,18±0,06	0,21±0,06
24	0	0,17±0,07
28	0	0

При экстракции парафина хлороформом масса образцов остается неизменной после 15 ч, в толуоле – после 24 ч. Потери массы образцов не соответствуют исходному содержанию парафина в связи с выплавлением некоторого количества парафина из образцов при выдержке в растворе отверждения при 60 °С, а также из-за разницы в исходном и конечном составе по массе.

Следующим этапом очистки пористых кальцийфосфатных матриксов является воздействие на них сверхкритическим CO_2 (ск- CO_2), обладающим высокой диффузионной способностью, низкой вязкостью, способностью хорошо растворять неполярные органические соединения.

Спектры ЯМР ^1H трех образцов, полученных из матрикса с гранулами парафина, матрикса после экстракции парафина толуолом в аппарате Сокслета (110°C , 24 ч) и матрикса, дополнительно очищенного сверхкритическим CO_2 в проточном реакторе (90°C , 100 бар, 6 ч), представлены на рисунке 4.12.

Теоретически по спектрам можно рассчитать количество парафина в матриксах, учитывая, что интегральная интенсивность одного протона соответствует его содержанию в образце в количестве 0,0561 ммоль. Но, несмотря на достаточно высокую чувствительность метода, количественно определяющегося содержания парафина в образце за пределами погрешности взвешивания ($\pm 0,1$ мг), сама методика приготовления образца в принципе не позволяет перевести весь парафин из блока в образец. В связи с этим по спектрам ЯМР ^1H был проведен расчет содержания групп CH_2 и CH_3 парафина по следующей формуле:

$$[\text{CH}_x] = \frac{I}{x} * 0,0561,$$

где I – интенсивность групп алканов; x – количество протонов в группе алканов.

Остаточное содержание парафина после очистки на 3 порядка меньше, чем в исходных матриксах, при этом даже следовых количеств использованных растворителей в спектрах не наблюдается. Кроме того, в спектрах ЯМР ^1H (таблица 4.2) наблюдается уменьшение соотношения метиленовых и метильных протонов в парафине матрикса $[\text{CH}_2]/[\text{CH}_3]$ в процессе экстракции в органическом растворителе и дальнейшее уменьшение в процессе обработки в ск- CO_2 , т.е. доля разветвленных алканов в остаточном парафине повышается с увеличением степени очистки образца. Это подтверждает дальнейшую экстракцию парафина в CO_2 после очистки в органическом растворителе, несмотря на то что точность взвешивания не позволяет зафиксировать изменение массы. При этом в спектрах не наблюдается следовых количеств использованных растворителей, что указывает на их полное удаление при вакуумировании образцов, обладающих высокими значениями открытой пористости. Возможно, после вымывания в органических растворителях

парафин остался в виде тонких покрытий на внутренней поверхности матриц, и дополнительное воздействие ск- CO_2 привело к более эффективной экстракции.

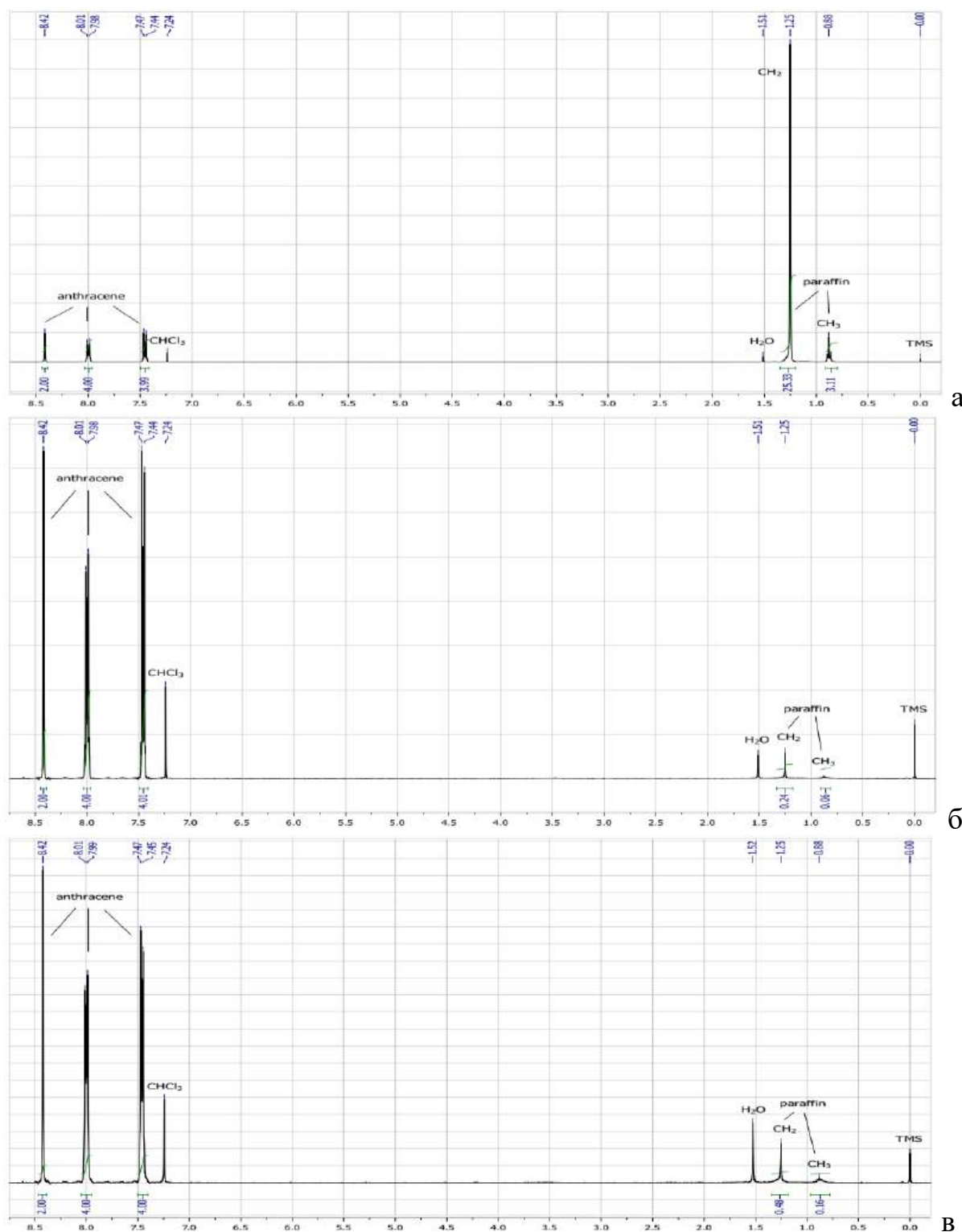


Рисунок 4.12 – Спектры ЯМР ^1H продуктов экстракции хлористым метиленом измельченного матрикса после экстракции толуолом и ск- CO_2 с добавкой антрацена в CDCl_3 : а – без экстракции парафина; б – после экстракции парафина толуолом в аппарате Сокслета (110 $^\circ\text{C}$, 24 ч); в – после дополнительной очистки в ск- CO_2

Таблица 4.2 – Мольное $[\text{CH}_2]/[\text{CH}_3]$ в матриксах до и после экстракции парафина

	без экстракции	после экстракции толуолом	после экстракции ск- CO_2
Количество $[\text{CH}_2]$, ммоль	0,7105	0,0067	0,0135
Количество $[\text{CH}_3]$, ммоль	0,0582	0,0011	0,0030
Мольное $[\text{CH}_2]/[\text{CH}_3]$	12,2	6,1	4,5

Открытая пористость матриксов, прессованных при давлении 130 МПа, после экстракции парафина составляет 44 ± 3 % для составов, содержащих 20 мас. % парафина в исходной цементной смеси, и 61 ± 6 % – для составов, содержащих 30 мас. % парафина, соответственно, что в несколько раз превышает значения пористости образцов, не содержащих парафин в исходной смеси, которая составляет $4 \pm 0,4$ %.

Прессование повышает прочность матриксов на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита в 3,5–4 раза по сравнению с непрессованными формами материала, несмотря на невысокую степень гидратации, преимущественно за счет сил адгезии и когезии. Поэтому создание пористости в таких матриксах приводит к очень резкому падению прочности (рисунок 4.13).

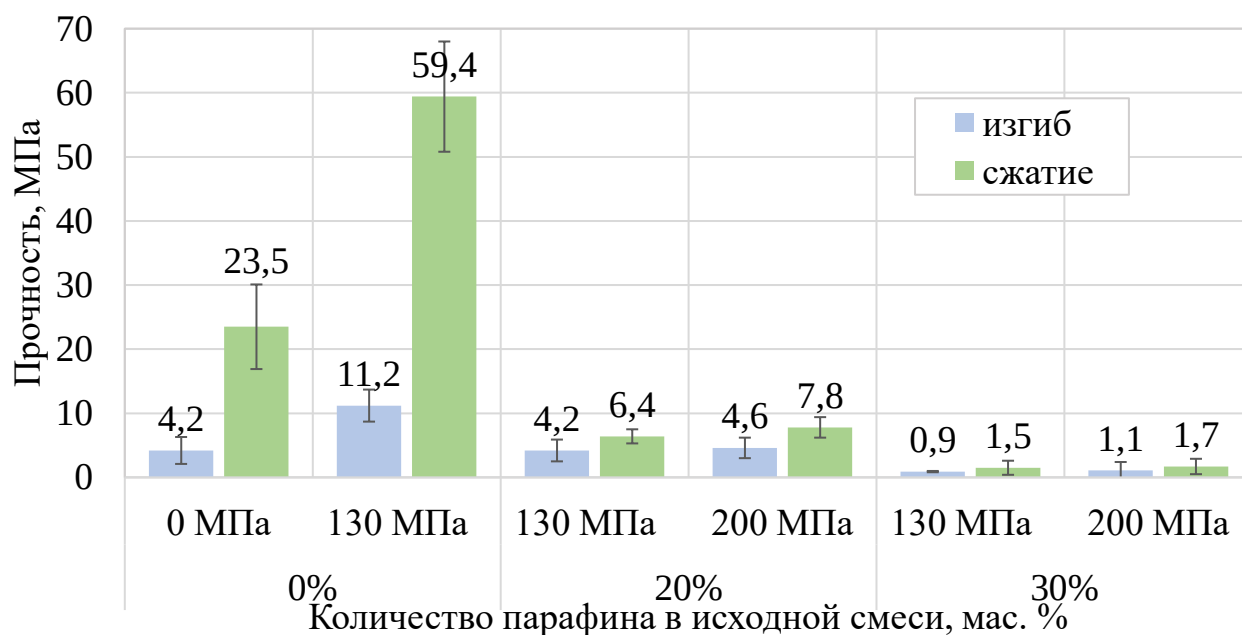


Рисунок 4.13 – Прочность матриксов, полученных при твердении в течение 24 ч при 60 °С с последующей экстракцией парафина

Увеличение давления прессования с 130 МПа до 200 МПа увеличивает прочность на 10–20 %. Прочность матриц, полученных по цементной технологии с добавлением 30 мас. % парафиновых гранул в сухую смесь ниже нижней границы прочности губчатой кости, поэтому для использования матриц в качестве остеопластического материала максимальное количество введенных гранул может быть ограничено 20 мас. %.

Критическое падение прочности связано с образованием гидрофобных покрытий на поверхности исходных частиц и кристаллах продуктов, препятствуя их росту и образованию сцепления (рисунок 4.14).

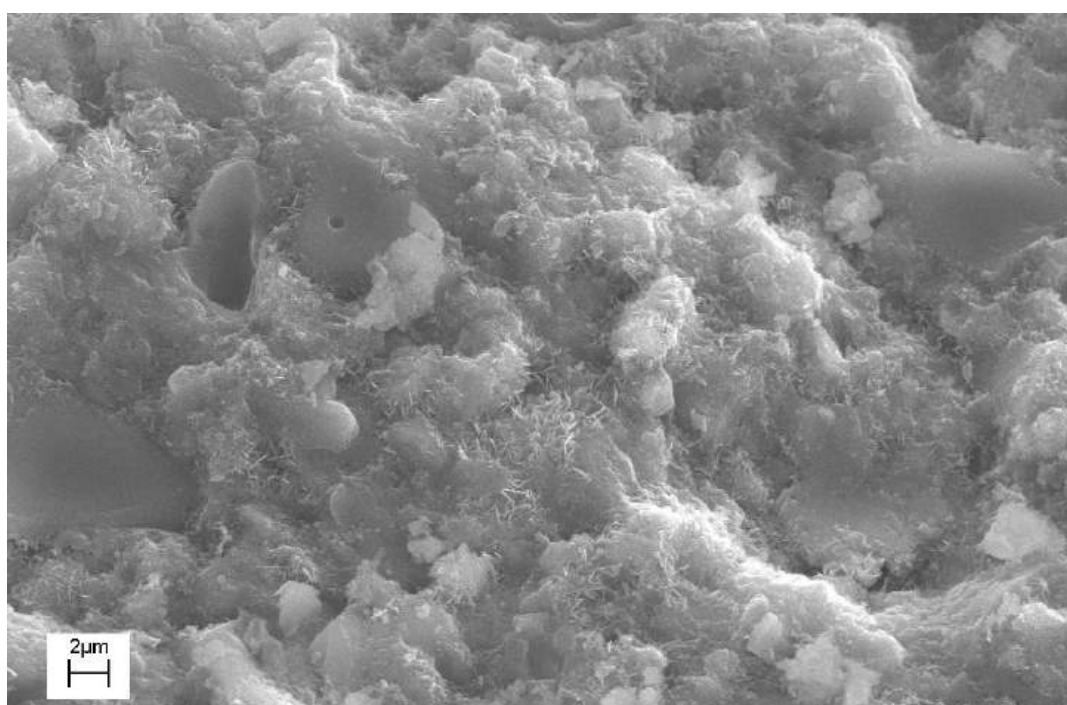


Рисунок 4.14 – Микроструктура цементного камня матриц после экстракции парафиновых гранул

Гидрофобный парафин вносит вклад в кинетику протекания реакции, образуя, предположительно, пленки на частицах исходных соединений. В соответствии с результатами рентгенофазового анализа полнота протекания реакции пористого матрикса после отмывки от парафина в количестве 20 мас. % незначительно снижается по сравнению с плотным матриксом без введения парафиновых гранул с 80,2 % до 59,6 % через 24 ч твердения (рисунок 4.15).

Доклиническая оценка разработанного материала и оценка необходимости использования дополнительной обработки с помощью сверхкритического CO_2 проводилась с использованием модели эктопического остеогенеза с макроскопической оценкой областей имплантации.

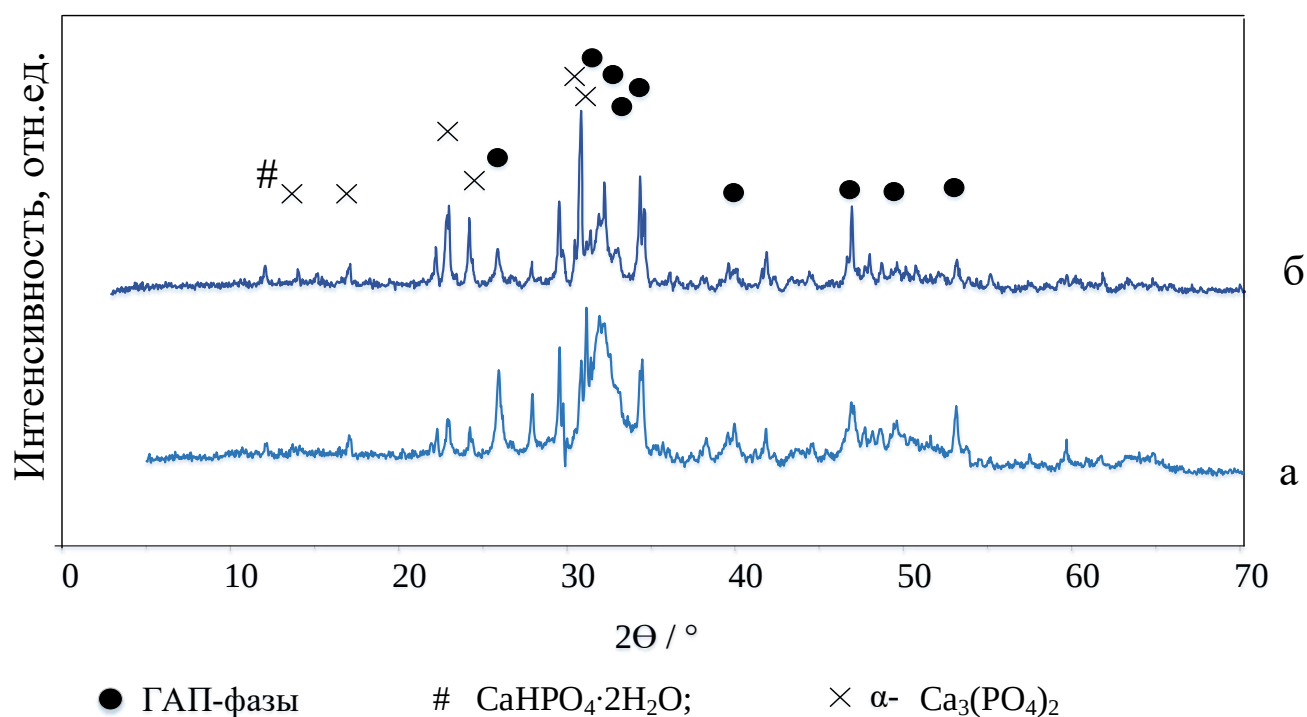


Рисунок 4.15 – Дифрактограммы цементного камня: а – плотного; б – пористого (образован 20 мас. % парафина)

Карбонатный гидроксиапатит не вызывал раздражающего действия на окружающие ткани при имплантации в подкожную клетчатку мелкого лабораторного животного. Отсутствие пористости в кальцийфосфатных имплантатах значительно тормозило развитие ангиогенеза. В свою очередь прессованные матриксы со сформированной макропористой системой активно стимулировали ангиогенез с прорастанием капиллярной сети в пористую систему имплантата. Дополнительная очистка ск- CO_2 показала более активное стимулирование ангиогенеза, что мы связываем с отсутствием тонких парафиновых пленок на кристаллической структуре цементного камня, которые могли остаться после экстракции парафина органическими растворителями. Такие пленки гидрофобизируют поверхность, мешая пропитке матрикса межтканевыми жидкостями и адгезии клеток.

4.2.2 Создание макропористости с использованием гранул полиэтиленгликоля

Другим вариантом получения макропористости матрикса является включение в сухую цементную смесь от 10 до 50 мас. % гранул полиэтиленгликоля $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}$ со средней молекулярной массой 3350 (ПЭГ 3350) размером 100–600 мкм сверх массы сухой цементной смеси, их подпрессовка при 130 МПа, консолидация в течение 24 ч, и последующая экстракция из полученного цементного камня. Экстракцию проводили до постоянной массы образцов, после чего проводили сушку в вакууме в течение 24 ч. В качестве растворителя ПЭГ может выступать дистиллированная вода, однако она является растворителем для фармацевтических субстанций, носителем которых потенциально может являться матрикс. В связи с этим для формирования макропористости были использованы органические растворители, хлороформом и толуол.

Удаление ПЭГ контролировалось путем измерения массы образцов: условием очистки являлось постоянство массы в течение часа. Эмпирическое время очистки составляет 24 ч. Методом ЯМР ^1H установлено, что массовая доля остаточного ПЭГ равна в среднем 0,9% от общей массы образцов.

Остаточный ПЭГ расположен внутри пор (рисунок 4.16) за счет неполного экстрагирования, что подтверждается данными СЭМ.

Использование органических растворителей для экстрагирования гранул, которые являются токсичными, при неполном их удалении могут снизить биосовместимость разработанных материалов. В связи с этим финальной стадией подготовки матриксов является дополнительная очистка в среде сверхкритического CO_2 при температурах 35–70 °С, с существенно более высокой эффективностью, чем при использовании вакуума. В спектрах ЯМР ^1H не обнаружены следовые количества хлороформа или толуола.

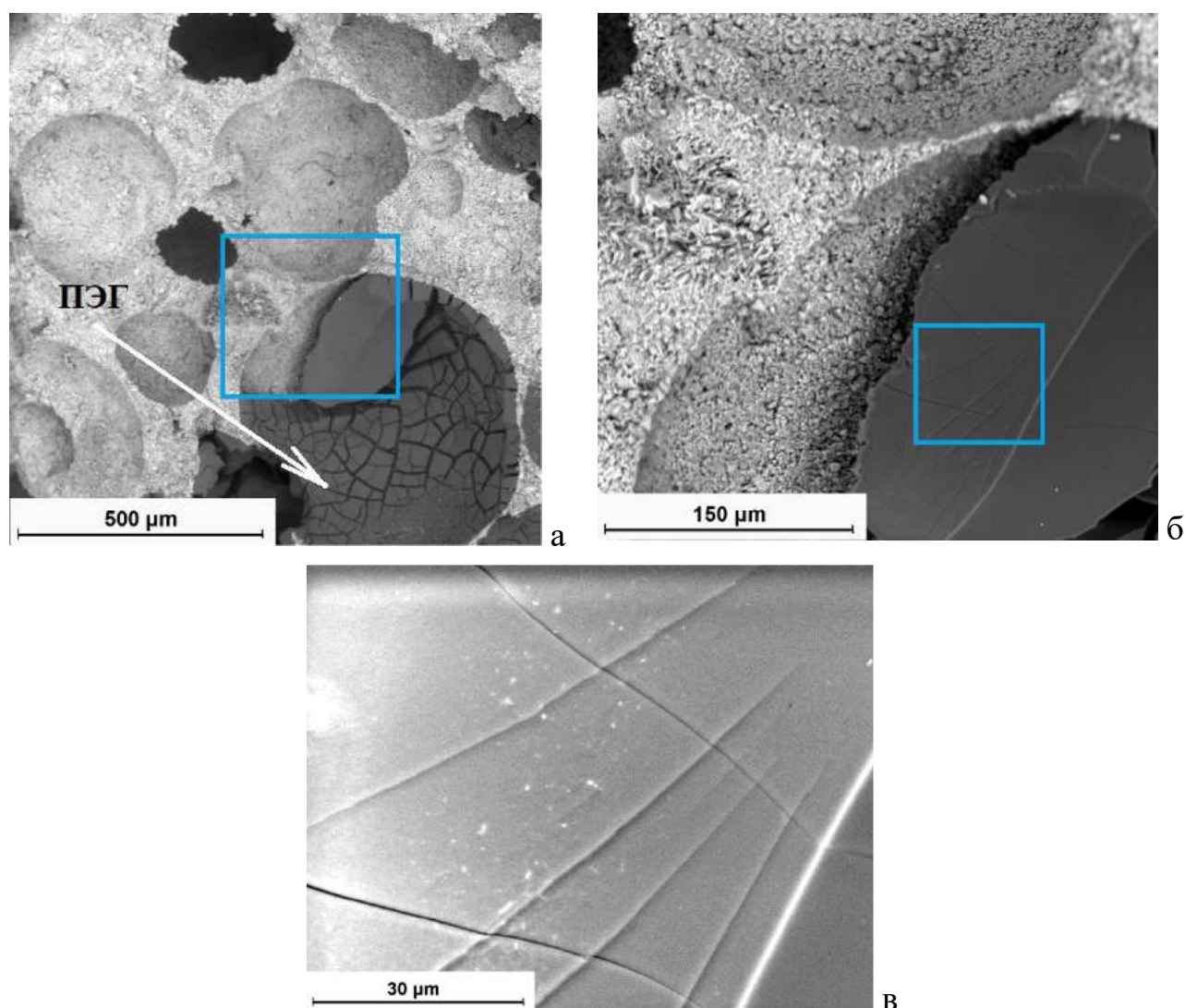


Рисунок 4.16 – Микроструктура пористого матрикса (образован 30 мас. % ПЭГ). Увеличение: а – $\times 540$; б – $\times 1040$; в – $\times 5000$

ПЭГ, являющийся компонентом цементной смеси при формировании матрикса и последующие стадии его экстракции, не оказывают влияния на фазовый состав конечного продукта. Конечный фазовый состав пористого матрикса идентичен составу плотного матрикса.

Электронная микроскопия и энергодисперсионный анализ подтверждает наличие фаз, обнаруженных посредством рентгенофазового анализа (рисунок 4.17). Непрореагировавшие частицы α -ТКФ присутствуют на микрофотографиях в виде плотных частиц с однородной поверхностью, покрытой кристаллами гидроксиапатита (рисунок 4.17 а). Внутренняя межпористая структура не меняется.

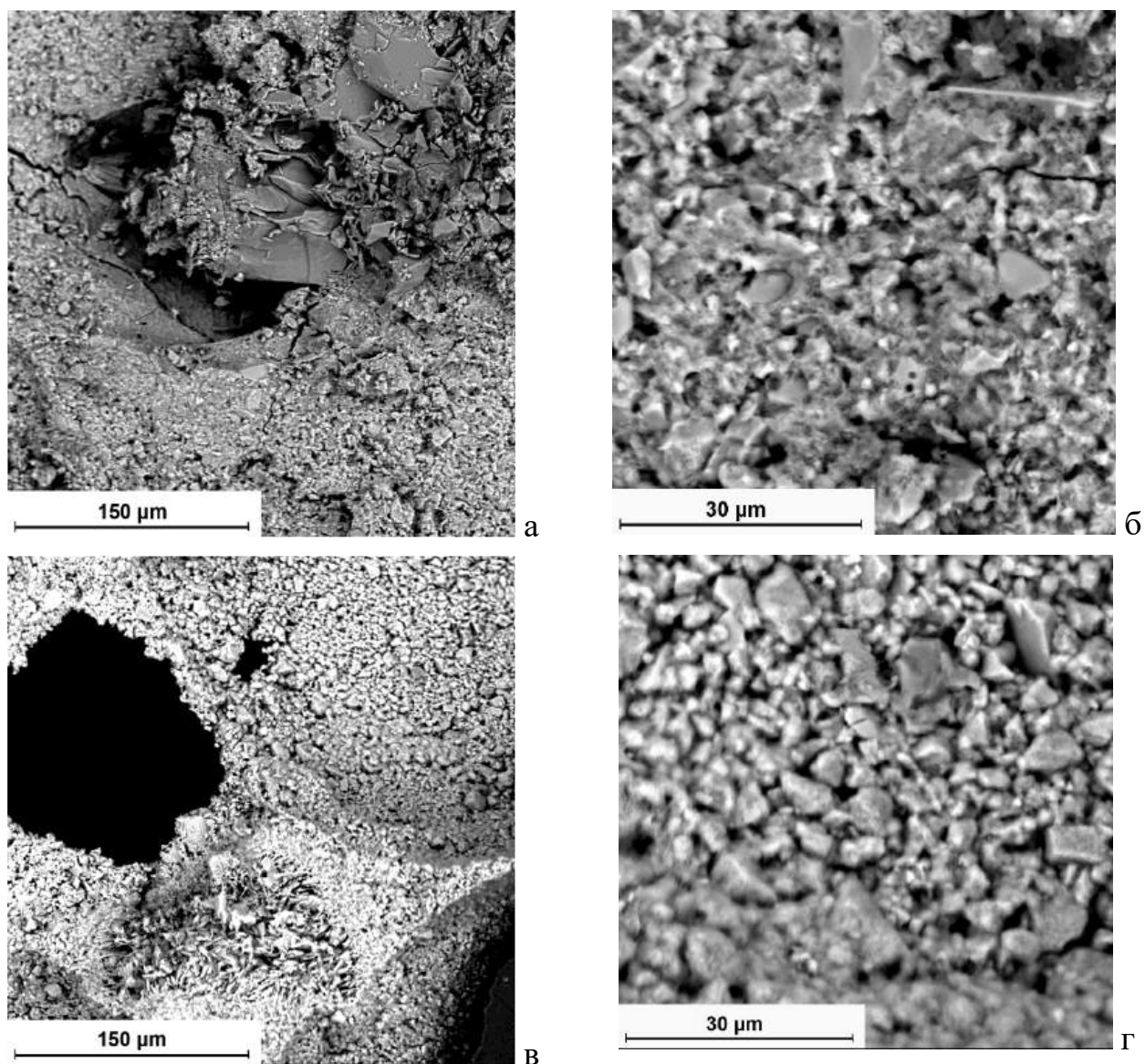


Рисунок 4.17 – Микроструктура матрикса: а, б – плотного; в, г – пористого (образован 30 мас. % ПЭГ). Увеличение: а, в – X1000); б, г – X5000

Микроструктура пористых матриксов схожа со структурой плотных, однако, наблюдаются крупные сферические поры, образованные после экстракции ПЭГ. В межпоровом пространстве встречаются пластинчатые кристаллы, относящиеся к ДКФД в соответствии с данными энергодисперсионного анализа (рисунок 4.18). Пластинчатые кристаллы имеют мольное соотношение $\text{Ca/P} = 1,07$.

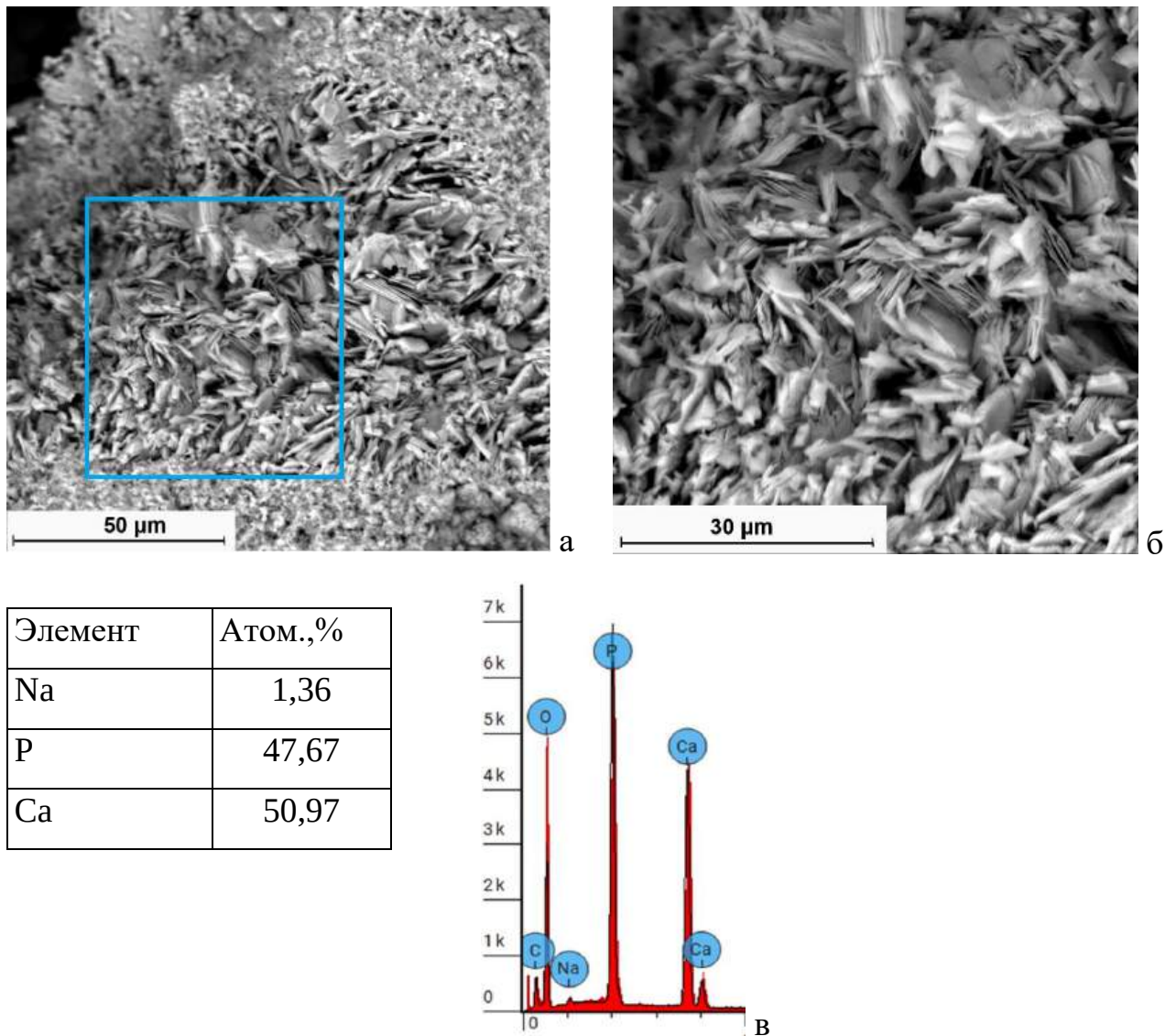
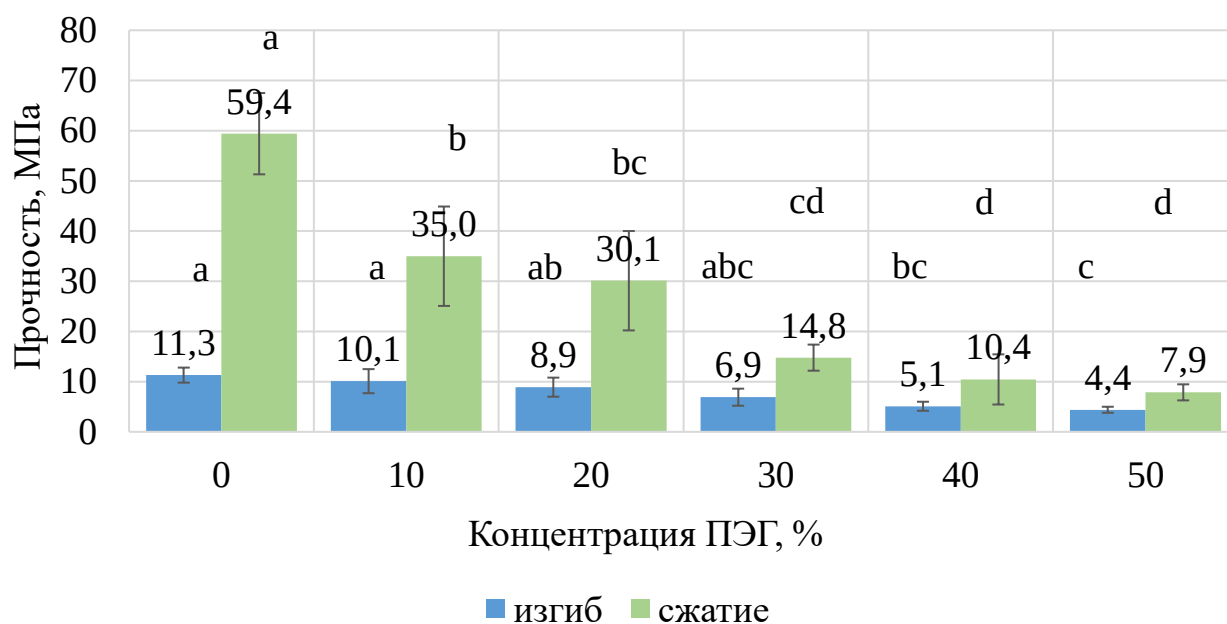


Рисунок 4.18 – Микроструктура пористого матрикса (образован 30 мас. % ПЭГ) (а, б) и результаты EDX (в). Увеличение: а – X2500); б – X5000

Механическая прочность кальцийфосфатных матриксов обратно пропорциональна концентрации гранул ПЭГ (в % от массы сухой цементной смеси) (рисунок 4.19). Изменение механической прочности цементного камня макропористого матрикса связано с уменьшением количества контактов минеральной составляющей консолидированного матрикса.



*Тест Тьюки, разные буквы обозначают существенно отличающиеся значения ($p < 0.05$) в рамках испытаний на изгиб и сжатие отдельно

Рисунок 4.19 – Прочность при сжатии матриц после экстракции ПЭГ, введенного в количестве 0 – 50 мас. % после 24 часов твердения при 60 °С

В случае отсутствия в составе исходной смеси ПЭГ, наличие микропористости определяется присутствием растворимой соли 12-водного гидрофосфата натрия, воздуха, вовлеченного в матрикс при его выпрессовывании и образованием CO_2 в ходе кислотно-основного взаимодействия CaCO_3 с $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (рисунок 4.20). При введении в состав исходной смеси ПЭГ пористость складывается из микро- и макропористости, образованной за счет экстракции гранул ПЭГ из матрикса. Введение 30 масс.% гранул ПЭГ в состав цементной смеси создает около 50 об.% пор, что является достаточным при совокупном условии значений прочности не менее 10 МПа при сжатии, соответствующей значениям прочности губчатой костной ткани.

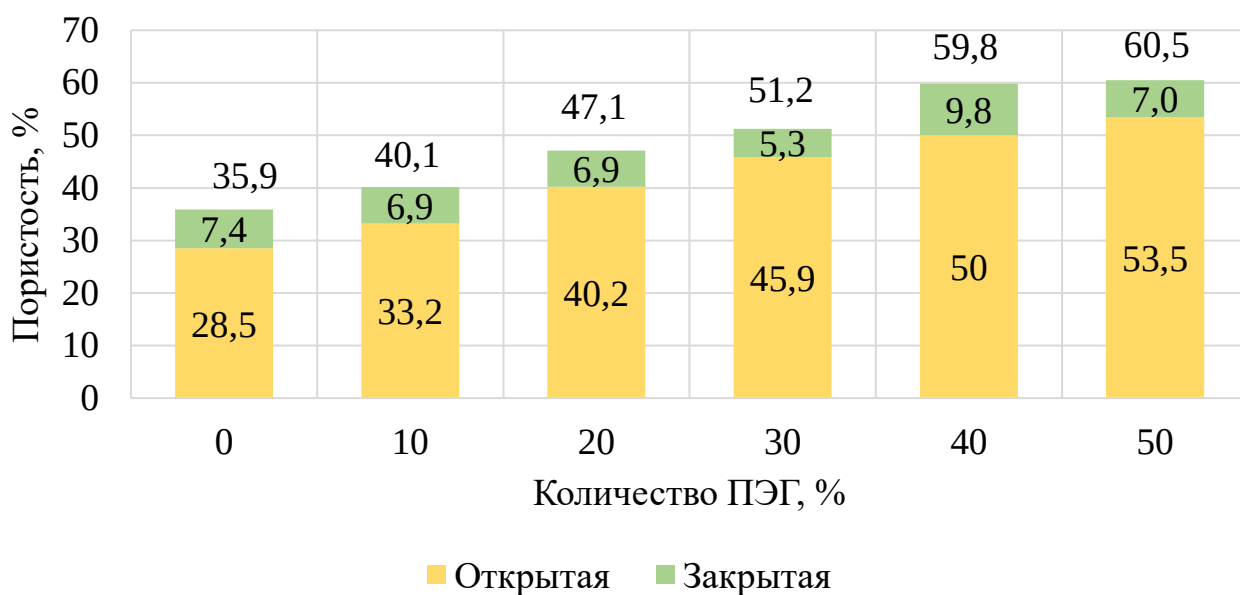


Рисунок 4.20 – Пористость цементного камня, полученная при твердении в течение 24 часов при 60 °

По данным микро-КТ распределение гранул ПЭГ в матрице равномерное, форма макропор отличается от сферической и представляет собой эллипсоид вращения, что связано в приложенной одноосной нагрузкой при формировании матрикса (рисунок 4.21).

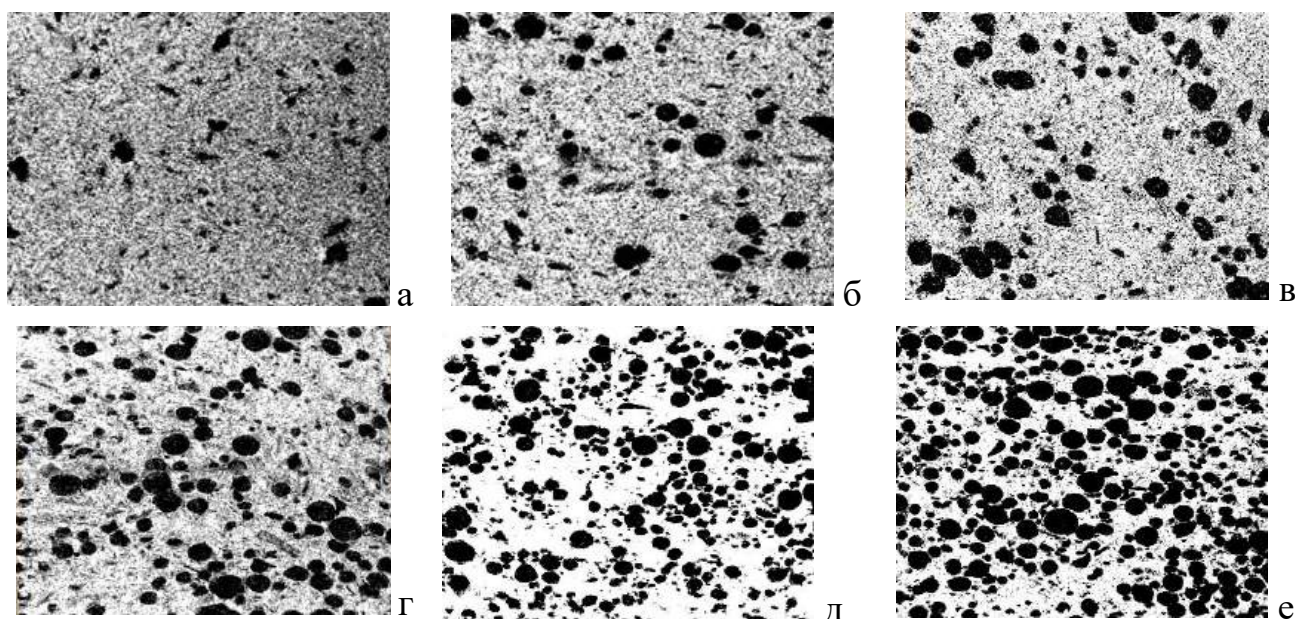


Рисунок 4.21 – Микро-КТ матриксов после экстракции гранул ПЭГ в количестве, %: а – 0; б – 10; в – 20; г – 30; д – 40; е – 50

Соотношение большой оси эллипсоида к малой составляет 1,5. Исходя из сохранения объема частицы ПЭГ и изменения сферической формы на эллипсоид вращения, мы получили ожидаемые результаты по распределению макропор по размерам. Оно во всех образцах близко к распределению частиц ПЭГ по размерам, %: 500–600 мкм – 19, 400–500 мкм – 23, 350–400 мкм – 8, 250–350 мкм – 28, 100–250 мкм – 22. Отклонение от этих значений незначительно, снижается при увеличении пористости и связано с наличием запрессованного воздуха.

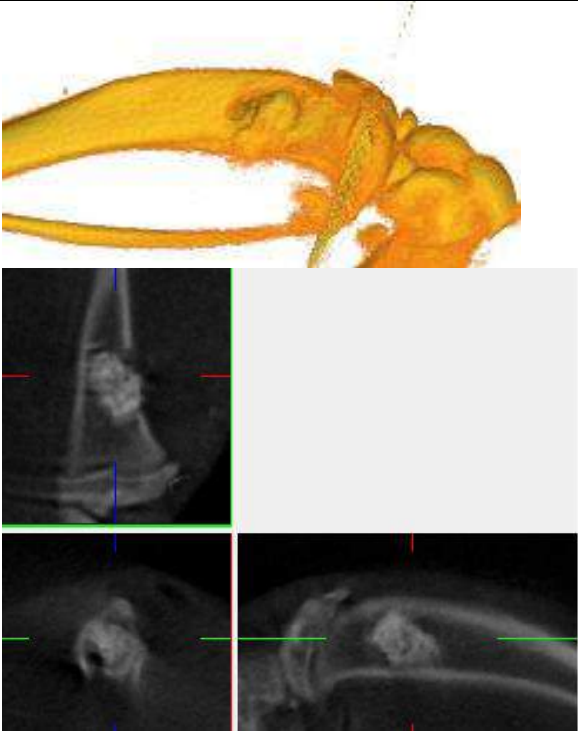
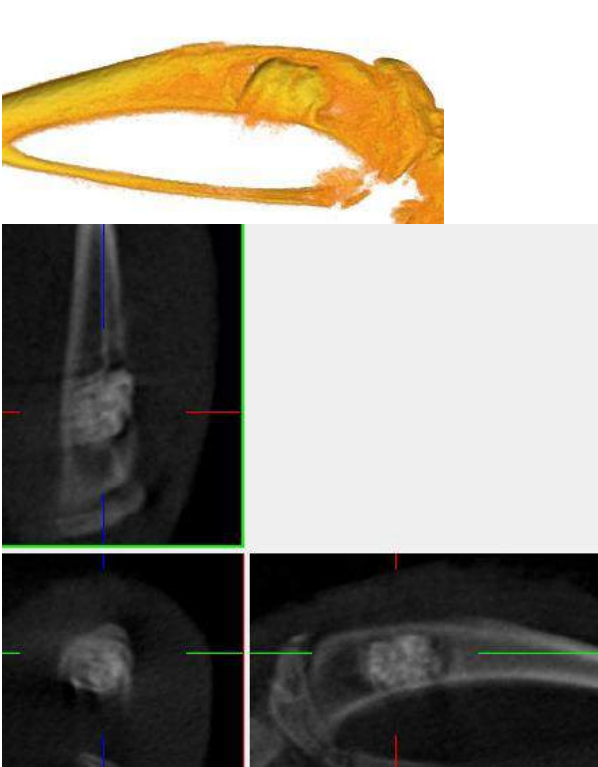
4.3 Результаты доклинических исследований *in vivo* макропористого кальцийфосфатного матрикса

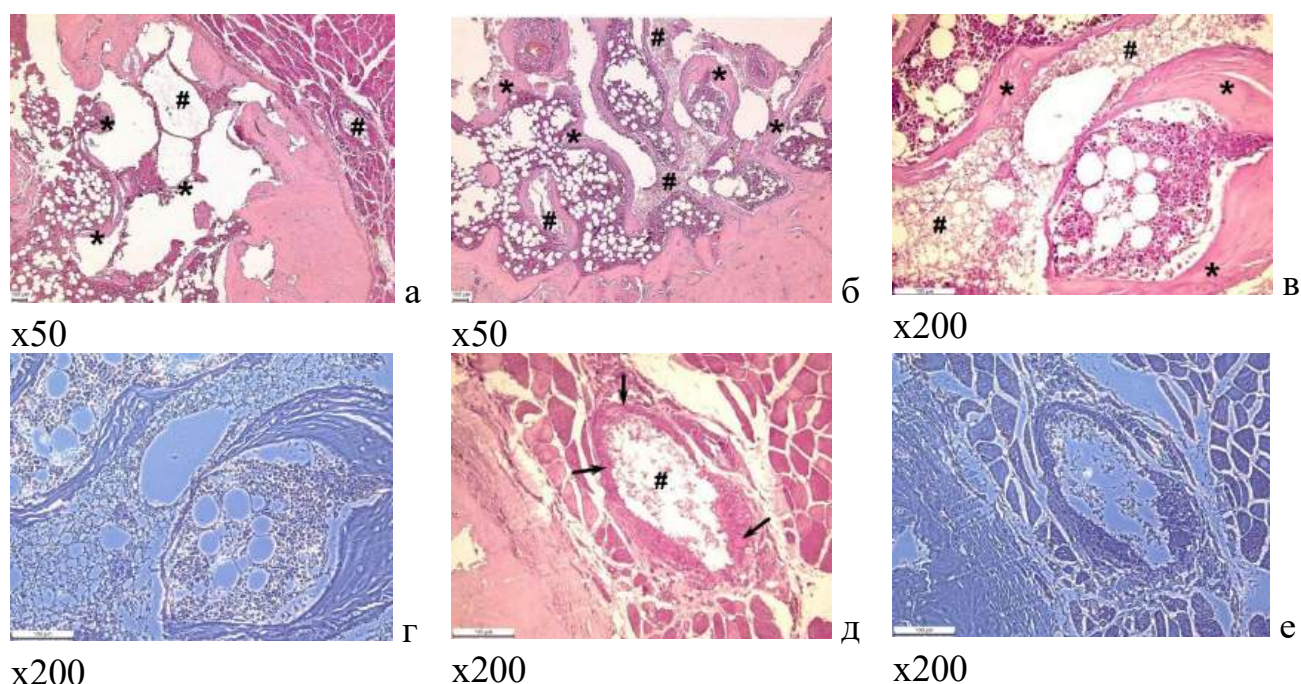
Оценку поведения кальцийфосфатных матриксов после экстракции 30 мас. % гранул ПЭГ *in vivo* на биосовместимость, регенераторный потенциал проводили с использованием модели имплантации матрикса в трепанационное отверстие большеберцовой кости крысы линии Wistar в сравнении с регенераторным потенциалом при незаполненном трепанационном отверстии. В исследовании использовались 3 животных. Результаты компьютерной томографии представлены в таблице 4.3.

Через три мес. в микро-КТ исследовании определяется полное закрытие дефекта с увеличенной толщиной кортикальной стенки в месте бывшего дефекта, разрастанием кости наружу и внутрь костномозгового канала в зоне нахождения имплантированного материала. Также констатируется неперестроенный материал в костномозговом канале, не контактирующий с реципиентной костью.

По результатам гистологического исследования во всех образцах просвет кости был заполнен многочисленными остатками имплантата зернисто-ячеистой структуры (рисунок 4.22 а, б). Вокруг фрагментов имплантата формировались новообразованные трабекулы губчатой кости с большим количеством остеоцитов, воспалительная реакция отсутствовала (рисунок 4.22 в, г). В мягких тканях редко встречались остатки имплантата, которые были окружены тонкими соединительнотканными микрокапсулами из гигантских многоядерных клеток и макрофагов (рисунок 4.22 д, е).

Таблица 4.3 – 3D-модели и ортогональные проекции большеберцовой кости лабораторного животного по результатам микро-КТ

Номер животного	Срок имплантации	
	0 суток	90 суток
1		
2		

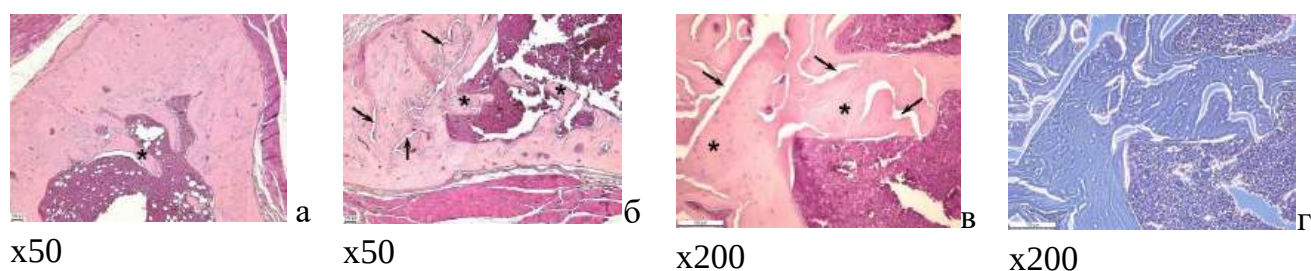


*- новообразованная костная ткань; # - фрагменты имплантата; стрелки указывают на гигантские многоядерные клетки

Рисунок 4.22 – Выраженная костная регенерация вокруг многочисленных остатков имплантата (а, б), отсутствие воспаления в кости (в, г), в мягких тканях формирование тонких микрокапсул из макрофагов и гигантских многоядерных клеток вокруг остатков имплантатов (д, е): а, б, в, д – светлопольная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином

При сравнении регенераторного потенциала при имплантации матрикса на основе карбонатзамещенного гидроксиапатитового цемента с регенераторным потенциалом при незаполненном трепанационном отверстии (рисунок 4.23), можно сделать вывод о стимулировании выраженной костной регенерации материалом (таблица 4.4).

По результатам гистологического исследования в контрольных образцах присутствовала зрелая неизменная пластинчатая костная ткань с Гаверсовой системой каналов (рисунок 4.23 а, б), встречались небольшие области деструкции, костная регенерация была слабая (рисунок 4.23 в, г).



*- новообразованная костная ткань; стрелки указывают на области деструкции.

Рисунок 4.23 – Пластинчатая кость обычной структуры с областями деструкции и слабой костной регенерацией: а, б, в – светлопольная микроскопия; г – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином

Таблица 4.4 – Площади новообразованной костной ткани и остатков имплантата (мкм^2) на $100\,000\text{ мкм}^2$ площади среза

Площадь, мкм^2	Контроль (пустое отверстие)	Опыт (матрикс)
Остатки имплантата	–	$20003 \pm 861,8$
Новая костная ткань	7281 ± 2400	$13496 \pm 125,6$

Имплантация макропористых матриксов на основе карбонатзамещенного гидроксиапатитового цемента стимулировала выраженную костную регенерацию в просвете кости, при этом воспаление отсутствовало, что говорит о хорошей биосовместимости материала. Однако резорбция данного материала была слабой по сравнению с резорбцией ранее исследованных гранул на основе цемента: в кости и в мягких тканях обнаруживались многочисленные остатки имплантата к 3 мес. после имплантации.

4.4 Выводы

1. Низкотемпературная технология получения кальцийфосфатного матрикса обеспечивает сохранность активности антибактериальных субстанций на всех этапах создания материала, обеспечивает биорезорбируемость, возможность адаптации к терапевтическим потребностям за счет изменения концентрации лекарственного средства, пористости самого матрикса.

2. Скорость протекания реакции зависит от температуры консолидации и размера частиц: уменьшение среднего размера частиц и увеличение температуры

консолидации с 20 до 80° С увеличивает степень превращения исходных компонентов в гидроксиапатитовые фазы. Подпрессовка при давлении 130 МПа увлажненной цементной смеси для приготовления матриц приводит к повышению прочностных характеристик с 23,5 до 59,4 МПа к 24 часам при твердении при 60 °С, что выше, чем прочность матрикса = 50 МПа, твердеющего при 80 °С.

3. Прочность и пористость матриц на основе цементного камня зависит от полноты протекания реакции и составляет при давлении прессования 130 МПа к 24 часам ≈ 28 МПа при 20 °С; ≈ 31 МПа при 40 °С; ≈ 59 МПа при 60 °С и ≈ 50 МПа при 80 °С.

4. Технология получения макропористых матриц экстракцией органических гранулярных наполнителей (парафина, полиэтиленгликоля), введенных в сухую цементную смесь, органическими растворителями после консолидации матриц с дополнительной очисткой сверхкритической флюидной экстракцией, эффективна.

5. Использование полиэтиленгликолевых гранул в качестве экстрагируемого после схватывания порообразователя является более предпочтительным, чем парафиновых гранул, что связано с гидрофобностью последних и предотвращении гидратации при их использовании за счет образования пленки на исходных компонентах, что снижает механическую прочность с 14,8 до 1,5 МПа при использовании 30 мас. % гранул парафина от массы сухой цементной смеси вместо гранул полиэтиленгликоля.

6. Макропористый матрикс на основе цемента является биосовместимым с выраженной регенерацией костной ткани вокруг остатков имплантата с относительно невысокой скоростью резорбции, что подтверждено в исследованиях *in vivo*.

5 КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПО ЦЕМЕНТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ, КАК СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СУБСТАНЦИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СЕПТИЧЕСКИХ ВОСПАЛЕНИЙ

Использование гранул и матриксов, полученных по цементной технологии и содержащих антибактериальные субстанции – эффективная стратегия лечения инфицированных дефектов костей. Способность кальцийфосфатных материалов включаться в процесс костной регенерации позволяет одновременно не только купировать воспалительный процесс, но и полностью закрыть костный дефект. Локальные системы доставки лекарственных средств с использованием носителей обладают преимуществами, заключающимися в повышении возможности проникновения антимикробных агентов в костные ткани, обеспечении пролонгированного высвобождения и локализованных концентраций антимикробных агентов в инфицированной зоне, избегая при этом системных побочных эффектов и токсичности [364]. Инкорпорирование обеспечивает пролонгацию выхода фармацевтических субстанций в месте имплантации по сравнению со скоростью выхода при пропитке готового матрикса.

Карбонатсодержащий нестехиометрический гидроксипатит, схожий по составу с минеральной составляющей костной ткани и полученный по низкотемпературной технологии, приводит к получению материалов с большой удельной поверхностью и более высокой скоростью растворения, что выгодно с точки зрения увеличения скорости резорбции конечного продукта. Замещение PO_4^{3-} на CO_3^{2-} в конечной фазе приводит к искажению кристаллической решетки, и, в результате искаженных длин связей и углов, возможно приводит к большей адсорбции лекарственного средства [365]. Предположительно, инкорпорирование лекарственных средств в сухую цементную смесь предполагает их присутствие в процессе гидратации, которое, вероятно происходит через аморфные фазы с низкой энергией кристаллической решетки и большой способностью к адсорбции.

Адсорбция – это единственный механизм внедрения функциональных веществ в цемент [296].

Увеличение массы молекулы антибактериального вещества должно увеличивать электростатическое взаимодействие с многовалентными группами Ca^{2+} и PO_4^{3-} на поверхности частицы и образовывать большую плотность водородных связей с ОН-группами гидроксиапатита. Однако десорбция молекулы с поверхности частицы может быть лучше описана с точки зрения конкурирующего сродства среды, в данном случае как к поверхности частицы, так и к молекуле лекарственного средства, в связи с чем гидрофильные молекулы лекарственных средств более эффективно удаляются с поверхности кристаллов цемента.

Наиболее частым возбудителем костной инфекции, которая вызывает примерно 75% случаев остеомиелита, является условно-патогенный грамположительный золотистый стафилококк [366]. Другие возбудители включают энтерококки, стрептококки, синегнойную палочку и энтеробактерии [367].

В зависимости от бактериальной среды в качестве антибактериальных субстанций могут быть использованы ванкомицин, рифампицин и фосфомицин, наиболее широко используемые антибиотики, применяемые при гнойно-септических воспалениях костной ткани. Возможность объемного инкорпорирования антибактериальных средств определяется влиянием на цементную матрицу и на активность антибиотиков при взаимодействии с матрицей по время гидратации и твердения.

Таким образом, задачами исследования являются:

- разработка технологии получения кальцийфосфатных гранул, полученных по цементной технологии, как системы доставки антибактериальных субстанций для лечения гнойно-септических воспалений;
- изучение скорости элюирования антибиотика в зависимости от фазового состава цементного камня;
- разработка технологии получения антибиотикосодержащего кальцийфосфатного макропористого матрикса;

- выявление кинетических особенностей элюирования антибактериальной субстанции от концентрации антибиотика в исходной смеси и макропористости кальцийфосфатных матриксов.

5.1 Взаимодействие антибиотиков с компонентами системы

В качестве антибактериальных веществ использовали ванкомицина гидрохлорид «Ванкомицин» (Красфарма, Россия) или «Ванкомицин Эльфа» (Elfa Laboratories, Индия), фосфомицин «Фосфомицин» (Красфарма, Россия) и рифампицин «Рифампицин» (Фармасинтез, Россия).

Совместное введение рифампицина и ванкомицина ассоциировано с повышением токсичности (повышением трансаминаз) при длительном сочетании [368]. В связи с этим совместное влияние сочетания ванкомицин/рифампицин в данной работе не исследовалось.

Раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ при взаимодействии с ванкомицином, в отличие от фосфомицина и рифампицина, образует твердую соль, встраивая фосфат-ионы в его структуру. На ИК-спектре ванкомицина после обработки раствором $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ появляются полосы поглощения, характерные для $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 2466, 517, 511, 860, 957, 991 (рисунок 5.1). Образующаяся соль растворима.

Присутствие ароматической группы обнаруживается по полосам 3030 и 1600–1500 cm^{-1} [369]. Полосы при 1600 (1580), 1500 характерны для бензольного кольца. Полоса при 1580 cm^{-1} характерна только при сопряжении бензольного кольца с ненасыщенной группой, имеющей свободную пару электронов. Две полосы при 1650 и 1500 cm^{-1} поглощают при наличии конденсированных систем. Полосы при 1400 и 1420 cm^{-1} могут относиться к деформационным колебаниям всех активных метиленовых групп. Полосы при 1310–1330 cm^{-1} характерны для алканов и вызваны колебаниями группы CH_2 . Полосы при 1154–1174 cm^{-1} , 1230 cm^{-1} , 1020–1060 cm^{-1} и 991 cm^{-1} характерны для различных замещений в бензоле (плоские деформационные колебания). Пики при 1154–1174 cm^{-1} в исходном ванкомицине менее интенсивны и четко разделенные, после взаимодействия с $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

сливаются в один пик большей интенсивности. Пик при 1060 см^{-1} также имеет большую интенсивность после модификации ванкомицина. Полоса 991 см^{-1} не является характеристической, так как происходит наложение полос, характерных для $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ и для замещений в бензоле.

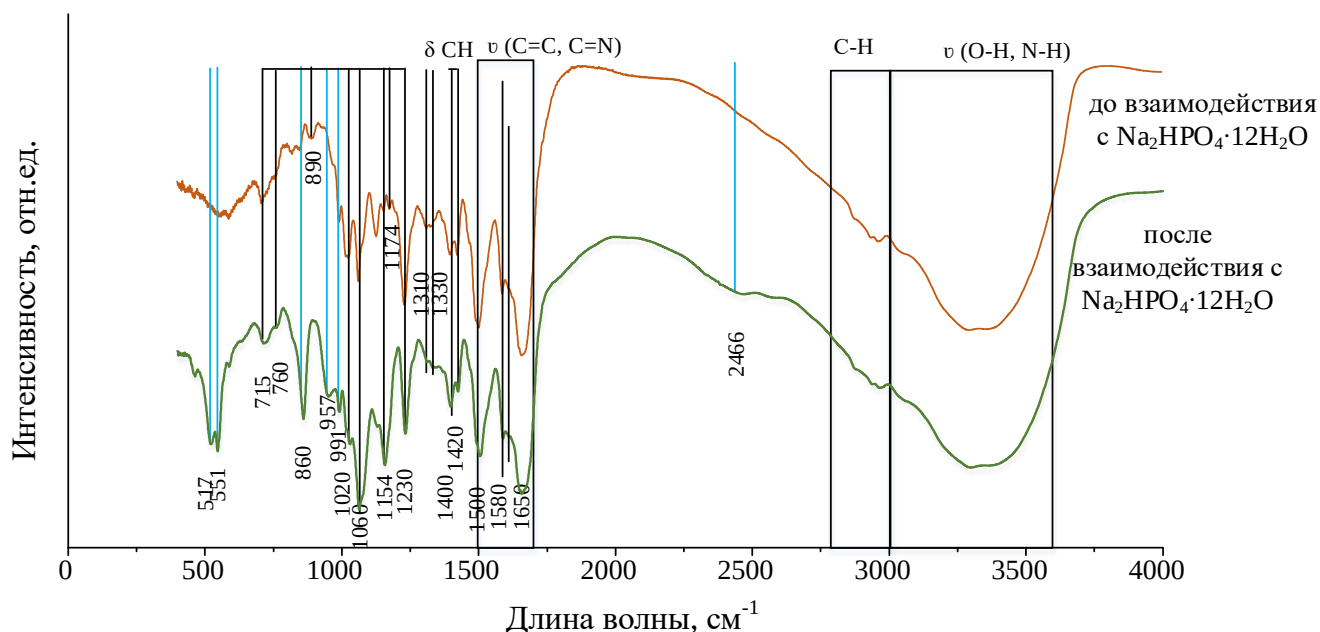


Рисунок 5.1 – ИК-спектр ванкомицина до и после взаимодействия $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (голубыми линиями обозначены пики, характерные для $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

Взаимодействие ванкомицина гидрохлорида с додекагидратом гидрофосфата натрия связано, вероятно, с ионным замещением ионов хлора на фосфат-ионы. Антибактериальная активность аддукта не уступает антибактериальной активности ванкомицина гидрохлорида (рисунок 5.2). Диаметр зоны задержки роста (ингибирования роста) бактерий *S. aureus* ATCC 6538 в результате суточной инкубации с образцом ванкомицина, провзаимодействующего с $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (на рисунке обозначен «О»), после культивации соответствует диаметру зоны задержки роста образца исходного ванкомицина (на рисунке обозначен «ван.») и превышает диаметр зоны положительного контроля – тест - диск с цефтазидимом и клавулановой кислотой ($\text{CАС}^{30/10}$ - ceftazidime 30мкг/ clavulanic acid 10мкг).

HIMEDIA®, Индия). В качестве отрицательного контроля – физиологический раствор (на рисунке обозначен «K⁻»).



Рисунок 5.2 – Антибактериальная активность ванкомицина после взаимодействия с $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

Все другие компоненты системы $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaCO}_3\text{-Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2\cdot\text{H}_2\text{O}-\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{O}$ содержат положительно заряженные ионы Ca^{2+} , которые могут образовывать водородные связи с отрицательно заряженными функциональными группами антибиотиков. Так, в молекуле ванкомицина содержатся остатки аспарагиновой кислоты, глюкозы, N-метил-D-лейцина, глицина, 3-метил-4-кетогексановой (ванкомициновой), 3-хлор-4-оксибензойной и 3-хлор-4-окси-5-нитробензойной кислот. Лейцин – неполярная гидрофобная группа, глицин – полярная незаряженная группа, аспарагиновая кислота – отрицательно заряженная полярная группа. Предположительно, карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты взаимодействуют с ионами кальция [303, 304, 337]. Функциональными группами рифампицина, обеспечивающими его взаимодействие с ионами кальция, являются четыре гидроксильные группы мостика анса и нафтольного кольца, которые способны образовывать водородные связи.

Фосфомицин с ионами кальция способен образовывать малорастворимую в воде соль кальций фосфомицина ($C_3H_5CaO_4P$)

5.2 Состав и свойства цементных гранул на основе карбонатсодержащего гидроксипатита, содержащих антибактериальные вещества

Для получения антибактериального эффекта гранул, полученных по цементной технологии, в состав сухой цементной смеси вводились антибактериальные субстанции: ванкомицин (V), фосфомицин (F), рифампицин (R) и смесь фосфомицина и рифампицина в количестве на чистое вещество 1 г фосфомицина/ 10 г сухой цементной, 1 г ванкомицина/ 10 г смеси или 150 мг рифампицина на 10 г сухой цементной смеси.

Адсорбированные антибактериальные вещества могут влиять на фазовый состав и структуру цементного камня. Фазовый состав цементного камня состава точки 5.5.80, содержащего антибактериальные субстанции и полученного через 7 сут. твердения во влажных условиях, представлен карбонатзамещенным гидроксипатитом переменного состава, дикальцийфосфатом дигидратом $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [072-0713] (ДКФД) и исходным α -трикальцийфосфатом [070-0364]. β -трикальцийфосфат $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ [070-2065] (β -ТКФ) и карбонат кальция не имеют на дифрактограмме характеристических пиков (рисунок 5.3).

Присутствие α -трикальцийфосфата связано с неполнотой протекания реакции в срок 7 сут. Количество исходной фазы α -ТКФ зависит от введенной антибактериальной субстанции, что связано с активными химическими группами антибиотиков и отличается от количества указанной фазы в цементном камне без антибиотика только в случае использования фосфомицина (таблица 5.1).

Степень полноты протекания реакции рассчитывалась как % гидроксипатитов переменного состава от α -ТКФ в составе цементного камня (рисунок 5.4). Степень превращения цементного камня уменьшается при введении фосфомицина или смеси его с рифампицином в исходную цементную смесь.

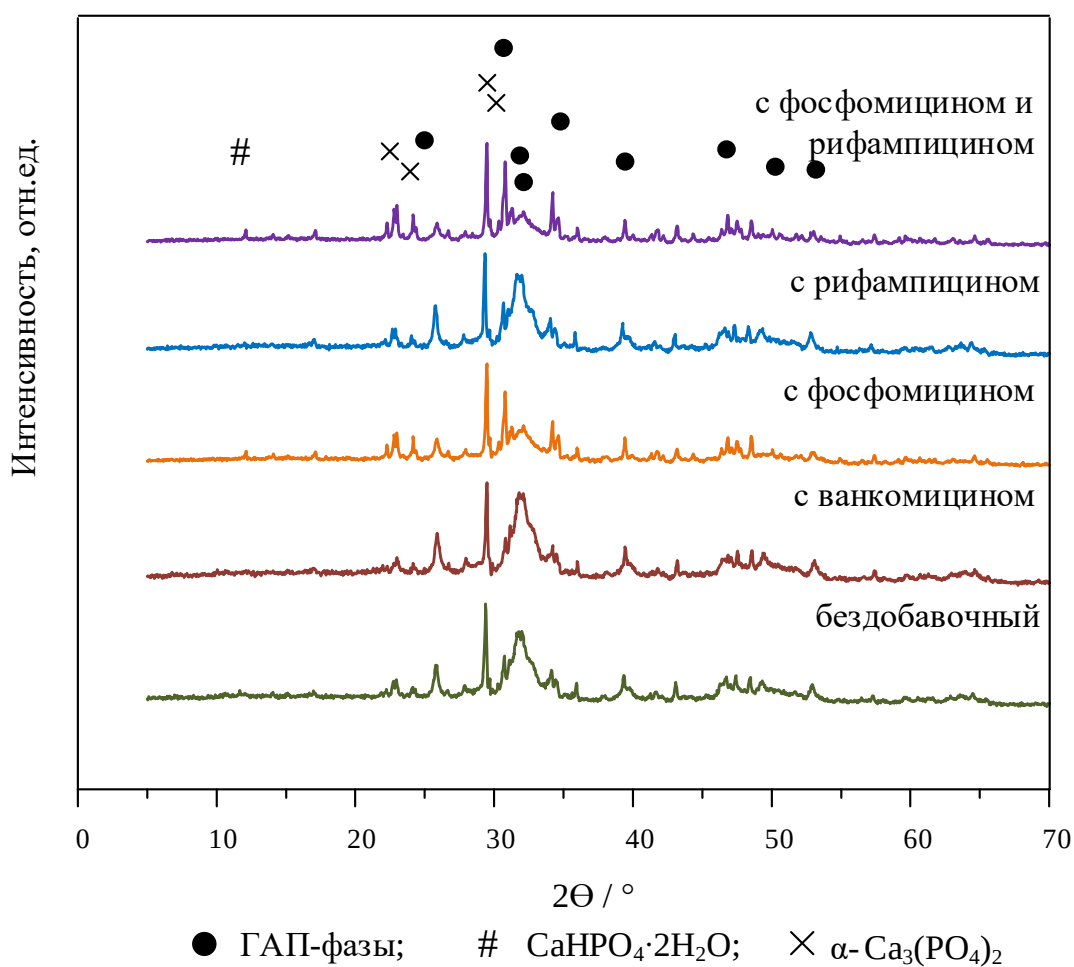


Рисунок 5.3 – Дифрактограммы цементного камня, содержащего антибактериальные субстанции

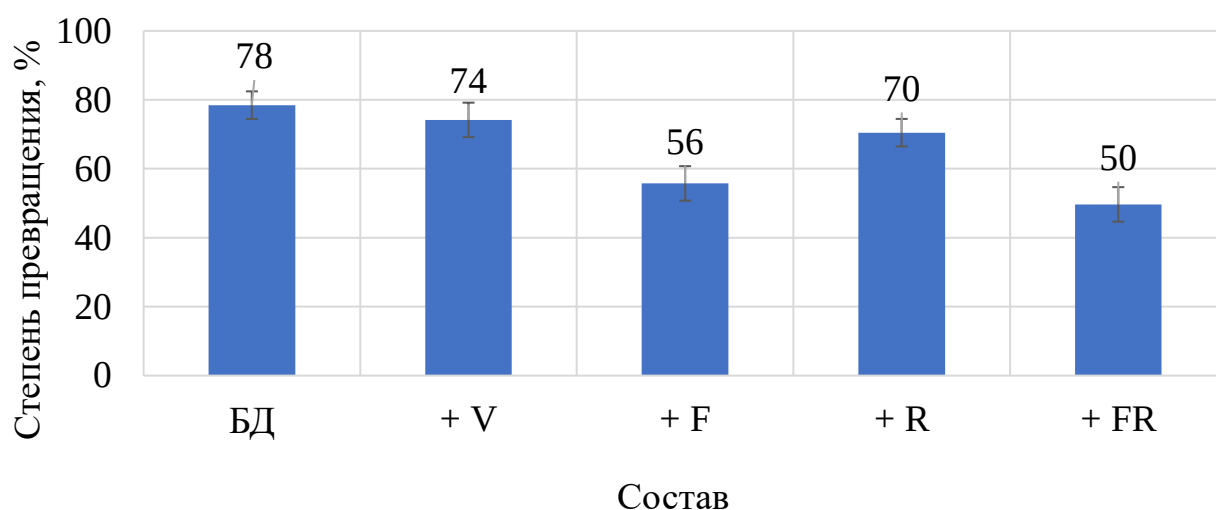


Рисунок 5.4 – Степень превращения:

БД – бездобавочный; +V – с ванкомицином; +F – с фосфомицином; +R – с рифампицином; +FR – с фосфомицином и рифампицином

В связи с образованием кальция фосфомицина и, соответственно, неполнотой протекания реакции гидратации при введении фосфомицина, структурообразование цементного камня нарушается, видны частицы исходных компонентов (рисунок 5.5). Это оказывает отрицательное влияние на прочностные характеристики (рисунок 5.6).

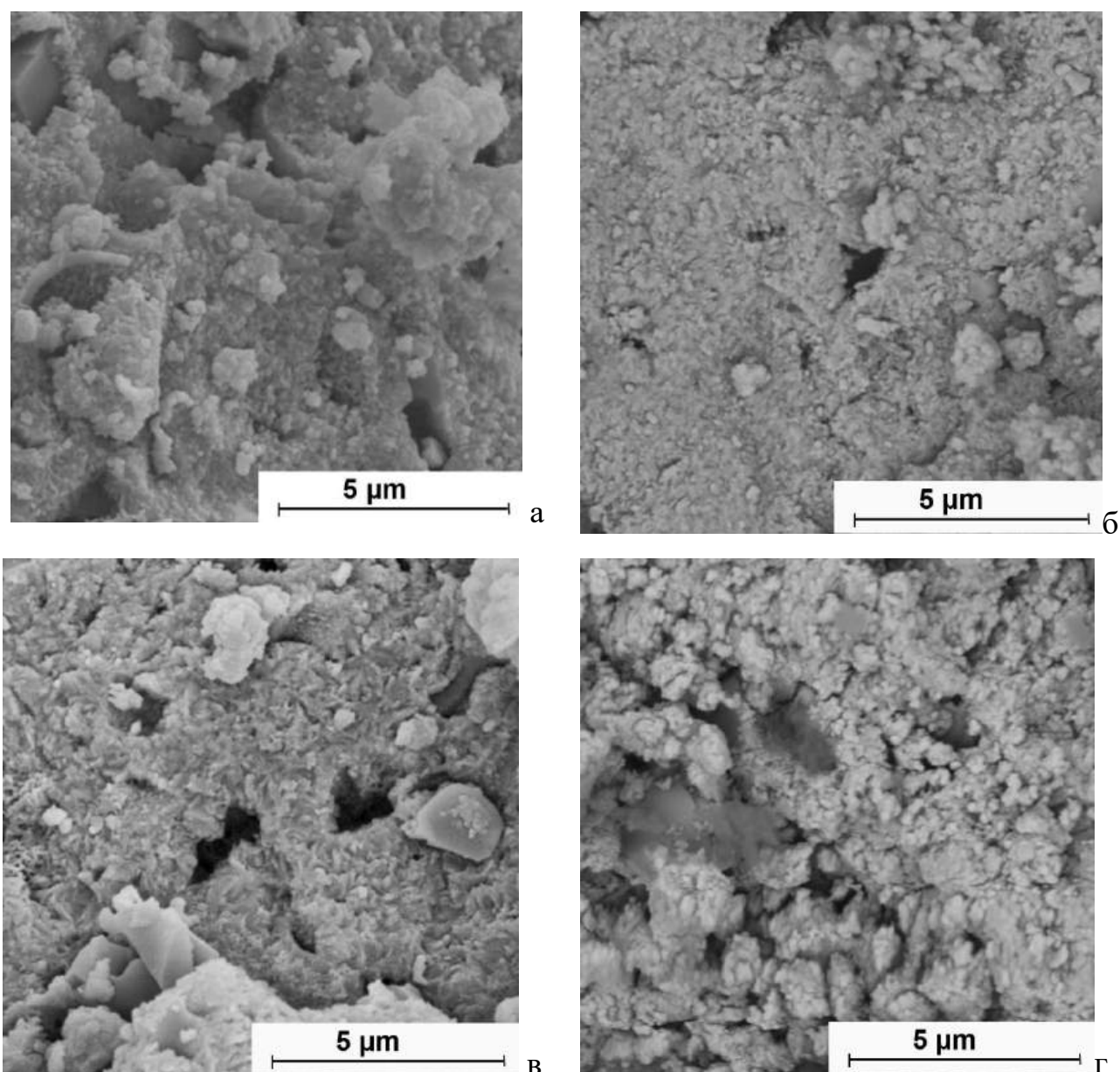


Рисунок 5.5 – Микроструктура цементного камня состава т. 5.5.80: а – бездобавочного; б – с ванкомицином; в – с фосфомицином; г – с рифампицином. Зелеными стрелками обозначены частицы исходных компонентов

Снижение прочности цементного камня $\approx 40\%$ наблюдается при введении фосфомицина, при снижении открытой пористости (рисунок 5.7). Результаты по

прочностным характеристикам хорошо согласуются с фазовым составом цементного камня, который представлен большим количеством исходных соединений со степенью превращения около 56%, что и является причиной снижения прочности.

Ванкомицин и рифампицин практически не оказывают влияния на прочностные характеристики цементного камня. Разность значений прочности при сжатии ванкомицин-содержащих составов и бездобавочных находится в пределах погрешности измерений. Отсутствие влияния ванкомицина на прочность цементного камня различных составов цемента подтверждается на составах точек 5.5.80, 6.2.80 и 9.2.80, расположенных в характерных точках ломанной линии на диаграмме «сроки схватывания» при времени начала схватывания 10 мин.

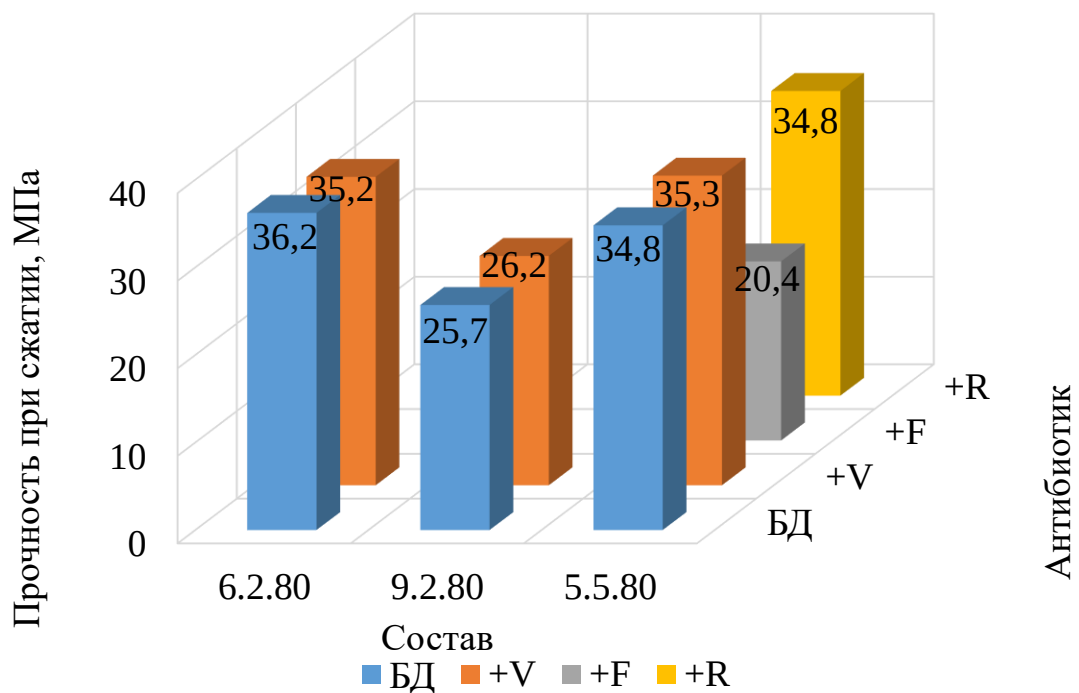


Рисунок 5.6 – Прочность цементного камня, содержащего антибиотики, на 7 сут. твердения: БД – бездобавочный; +V – с ванкомицином; +F – с фосфомицином; +R – с рифампицином; +FR – с фосфомицином и рифампицином

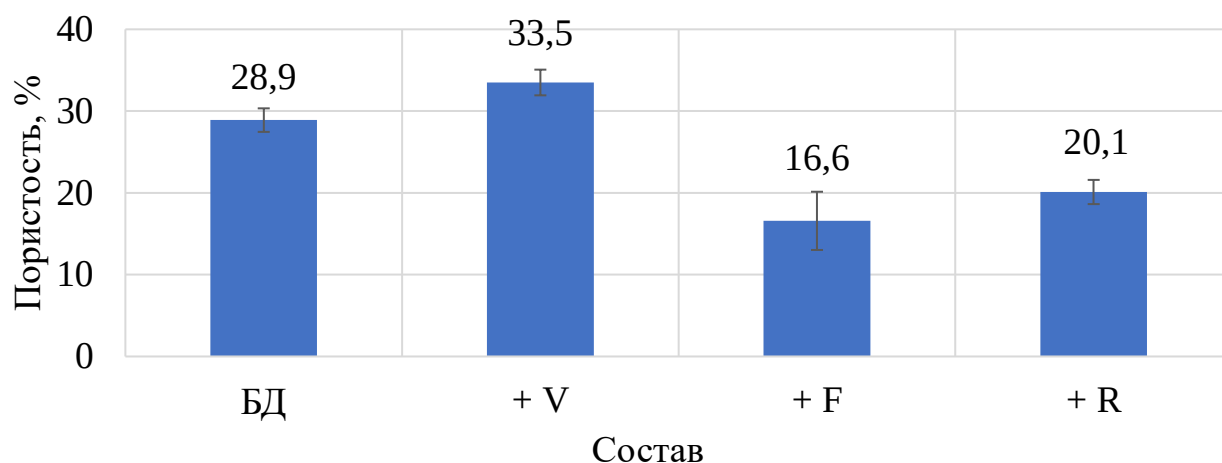


Рисунок 5.7 – Пористость цементного камня состава т. 5.5.80, содержащего антибиотики на 7 сут. твердения: БД – бездобавочный; +V – с ванкомицином; +F – с фосфомицином; +R – с рифампицином

Снижение открытой пористости при введении фосфомицина связано с образованием малорастворимых соединений на исходных частицах, предотвращающих пропитывание инертной жидкостью, что оказывает влияние на результаты измерения пористости методом гидростатического взвешивания. Таким образом, полученные значения пористости могут не соответствовать действительности. Однако эти значения дают представления о водопоглощающей способности антибиотико-содержащего цементного камня.

Ванкомицин незначительно увеличивает пористость, возможно, за счет образования соли при гидратации, которая создает дополнительную пористость. В целом, статистически значимого влияния добавления препарата на общую пористость не наблюдалось.

В связи с образованием кальций фосфомицина, являющейся малорастворимой солью, которая, вероятно, образует на поверхности исходных частиц оболочку, растворимость фосфомицин-содержащего цемента крайне низкая (рисунок 5.8), в отличие от остальных антибиотикосодержащих цементов, значения растворимости которых близки к значениям растворимости бездобавочного цемента и находятся в пределах погрешности.

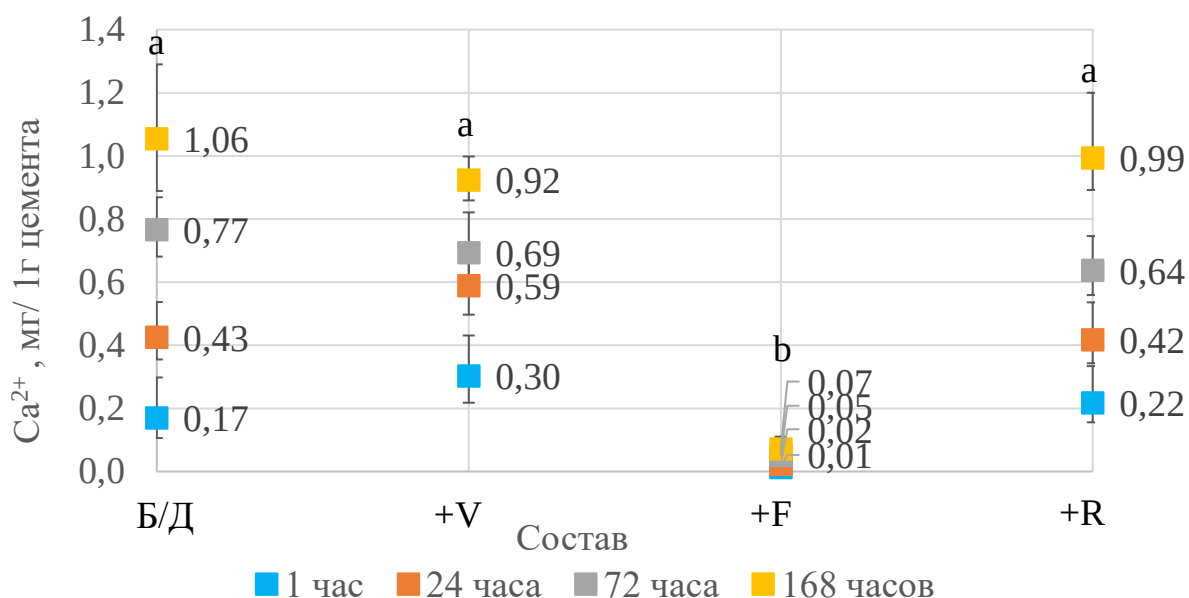


Рисунок 5.8 – Растворимость цементного камня состава т. 5.5.80, содержащего антибактериальные субстанции: БД – бездобавочный; +V – с ванкомицином; +F – с фосфомицином; +R – с рифампицином

Низкая растворимость кальций фосфомицина оказывает влияние на длительность эффективности действия фосфомицин-содержащих гранул размером 250–500 мкм на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита в отношении патогенов (таблицы 5.1–5.3). Эффективность против бактерий золотистого стафилококка (*S. aureus* ATCC 6538) и синегнойной палочки (*P. aeruginosa* 3057) ограничивается 96 и 72 ч, соответственно, и отсутствует против кишечной палочки (*E. coli* ATCC 25982). Таким образом, инкорпорирование фосфомицина в гранулы для пролонгации действия оказывает короткосрочный (до 3 сут.) эффект, в противоположность инкорпорированию рифампицина и ванкомицина. Рифампицин-содержащие составы оказывают наиболее длительный антибактериальный эффект в одном и том же составе против патогенов.

Таблица 5.1 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур золотистого стафилококка с антибиотикосодержащими цементами

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5.5.80	0	0
	5.70	0	0
	5.5.80 + V*	0	504
	5.70 + V*	0	456
	5.5.80 + F	48	96
	5.5.80 + R	144	528
	5.5.80 + F + R	96	312

*Красфарма, Россия

Таблица 5.2 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур кишечной палочки с антибиотикосодержащими цементами

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч
<i>E. coli</i> ATCC 25982	5.5.80	0	0
	5.70	0	0
	5.5.80 + V*	0	0
	5.70 + V*	0	0
	5.5.80 + F	0	0
	5.5.80 + R	0	96
	5.5.80 + F + R	0	96

*Красфарма, Россия

Таблица 5.3 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур синегнойной палочки с антибиотикосодержащими цементами

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч
<i>P. aeruginosa</i> 3057	5.5.80	0	0
	5.70	0	0
	5.5.80 + V*	0	552
	5.70 + V*	0	504
	5.5.80 + F	0	72
	5.5.80 + R	0	192
	5.5.80 + F + R	0	96

*Красфарма, Россия

Более подробные результаты микробиологического исследования представлены в Приложении А1.

При введении в рифампицин-содержащие гранулы фосфомицина, уменьшается время, в течение которого материал эффективен в отношении всех исследованных видов микроорганизмов, что связано, вероятно, с химическим связыванием фармсубстанции с компонентами цемента и «закупориванием» части рифампицина внутри малорастворимых оболочек кальций фосфомицина.

Ванкомицин-содержащие гранулы состава 5.5.80 эффективны в отношении *S. aureus* и *P. Aeruginosa* в течение 21 сут. и 23 сут., соответственно, что незначительно дольше, чем состава 5.70 19 сут. и 21 сут., соответственно, и не эффективны в отношении *E. coli*. Однако зона задержки роста бактерий золотистого стафилококка меньше, чем у положительного контроля (диск с ципрофлоксацин 30 мкг (CIP³⁰ – Ciprofloxacin, 30 мкг, SD142. HiMedia, Индия): 20 мм в течение 7 сут. для состава 5.5.80 и в течение 6 сут. для состава 5.70 против 32 мм для контроля. Состав цементного камня оказывает влияние на релиз антибактериальных веществ, что связано, вероятно, с пористостью, повышение которой позволяет диффундировать ванкомицину несколько быстрее и кинетикой деградации носителя, которая в значительной степени определяет временной профиль высвобождения лекарственного средства, согласно исследованиям [370].

Рифампицин-содержащие гранулы эффективны в отношении всех исследуемых микроорганизмов, что указывает на широкий спектр действия.

Более подробные результаты микробиологического исследования представлены в Приложении А2.

Зависимость релиза ванкомицина от растворимости и пористости цементного камня подтверждается результатами микробиологического исследования с *S. aureus* ATCC 6538 и *E. coli* ATCC 25982 для антибиотикосодержащих гранул размером 250–500 мкм на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита составов точек 5.5.80, 6.2.80 и 9.2.80 (Таблицы 5.4–5.5).

Таблица 5.4 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур золотистого стафилококка с цеменами, содержащими ванкомицин

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч	Примечание
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5.5.80	0	0	
	6.2.80	0	0	
	9.2.80	0	0	
	5.5.80 + V*	0	456	6 SG
	6.2.80 + V*	0	408	6 SG
	9.2.80 + V*	0	168	6 SG

Elfa Laboratories, Индия

Результаты микробиологического исследования коррелируют с данными по растворимости составов: пролонгация выхода ванкомицина напрямую зависит от растворимости составов. Наибольшая растворимость из трех исследуемых составов гранул характерна для состава 9.2.80 за счет большего содержания наиболее растворимой фазы ДКФД [370] и большей пористости, которая несомненно влияет на выход антибиотика. В связи с этим, время положительного воздействия на угнетение роста бактерий *E. coli* ATCC 25982 и *S. aureus* ATCC 6538 гранул состава 9.2.80 составляет 7 сут., что значительно меньше, чем у других составов.

Таблица 5.5 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур кишечной палочки с цеменами, содержащими ванкомицин

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч	Примечание
<i>E. coli</i> ATCC 25982	5.5.80	0	0	
	6.2.80	0	0	
	9.2.80	0	0	
	5.5.80 + V*	0	480	
	6.2.80 + V*	0	456	
	9.2.80 + V*	0	168	6 SG

Elfa Laboratories, Индия

Зоны задержки роста бактерий золотистого стафилококка и кишечной палочки меньше, чем у положительного контроля (диск с ципрофлоксацин 30 мкг (CIP³⁰ – Ciprofloxacin, 30 мкг, SD142. HiMedia, Индия) на всех сроках активности: от 17 до 18,4 мм на начальных сроках с постепенным уменьшением против 20,7–22,8 мм для контроля.

Следует отметить, что в зоне задержки роста бактерий отмечался вторичный рост *S. aureus* в присутствии всех составов и *E. Coli* в присутствии состава 9.2.80 по прошествии сроков эффективности составов, что говорит о недостаточной концентрации для полного подавления роста, в связи с чем наблюдается развитие резистентности у микроорганизма на этих сроках.

Необходимо заметить, что ванкомицин активен в отношении грамположительных микроорганизмов, а *E. Coli* является грамотрицательной бактерией, в связи с чем результаты по угнетению роста бактерий *E. Coli* относятся только к фармсубстанции определенного производителя. Активность по отношению к *S. aureus* может также меняться при использовании антибактериальных веществ разных производителей.

Микробиологическое исследование подтверждает эффективность использования гранул, приготовленных по цементной технологии и объемно содержащих антибиотик, в качестве активных материалов по отношению к штаммам кишечной палочки и золотистому стафилококку.

5.3 Результаты доклинических исследований in vivo антибактериальных цемента при лечении гнойно-септических воспалений костной ткани

Резорбируемость и антимикробная активность гранул на основе карбонат-замещенного гидроксиапатита была исследована в экспериментах in vivo на крысах линии Wistar в модели костной перфорации большеберцовой кости с предварительно созданным гнойно-септическим воспалением. Исследование проводилась на 12 животных, разделенных на четыре группы по составам: 1) 5.5.80; 2) 6.2.80; 3) 9.2.80 и 4) 5.7.70. Для определения антибактериальной активности

гранул, содержащих ванкомицин, составов 5.5.80, 6.2.80, 9.2.80 и 5.7.70 устанавливались в костные перфорации критического размера: в одно животное устанавливались гранулы без ванкомицина (контроль) и гранулы с ванкомицином (опыт) в разные конечности с целью сравнения.

Гнойно-септическое воспаление было создано инокуляцией золотистого стафилококка в костномозговой канал большеберцовой кости крысы. Контроль воспаления проводился через 1,5 мес. после инокуляции с помощью гистологического исследования биоптата.

В большинстве биоптатов обнаруживались в фибринозном экссудате многочисленные фрагменты некротизированной кости с разной степенью некроза и деструкции (рисунок 5.9, 5.10). В части образцов отмечались достаточно крупные фрагменты некротизированной кости с преобладанием пустых лакун без остеоцитов, лишенные чёткой тонкой структуры матрикса и с фиброзированным костным мозгом (рисунок 5.9). По периферии такие костные фрагменты подвергались выраженной деструкции. Мелкие костные фрагменты были окружены макрофагами и лимфоцитами с незначительной примесью нейтрофилов, т.е. отмечалось хроническое воспаление. Некротизированная кость при поляризационной микроскопии давала слабую анизотропию (рисунок 5.9 г).

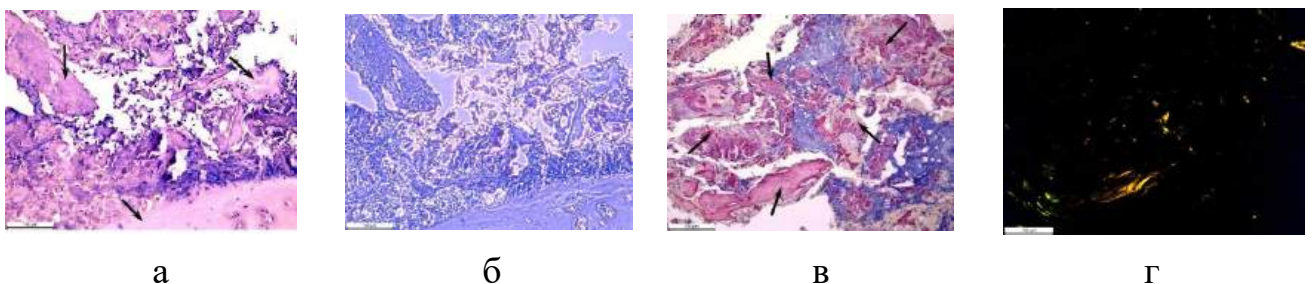


Рисунок 5.9 – Некроз и деструкция костной ткани, хроническое воспаление: а – стандартная световая микроскопия; б – фазово-контрастная микроскопия; в – стандартная световая микроскопия; г – поляризационная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, б); окраска пикросириусом красным (в, г). Увеличение x200. Стрелками обозначены фрагменты некротизированной кости

В других образцах выявлялись очень мелкие фрагменты некротизированной кости, между которыми наблюдалось врастание фиброзной ткани с незначительной лимфо-макрофагальной инфильтрацией (рисунок 5.10).

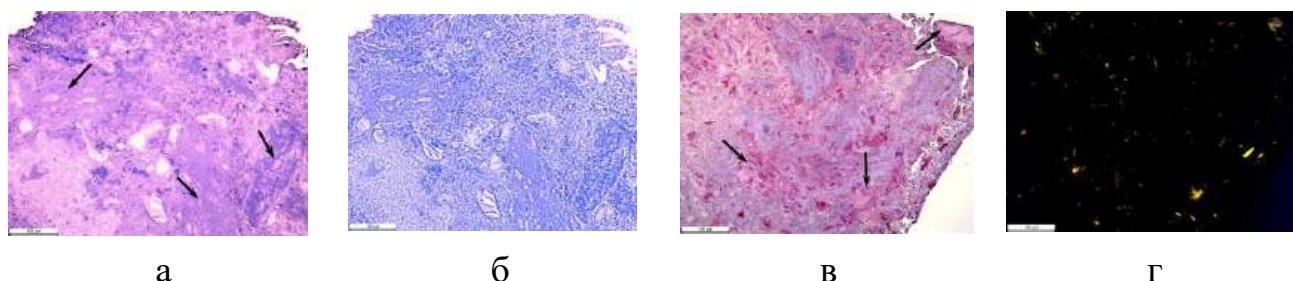


Рисунок 5.10 – Некротизированные мелкие костные фрагменты, фиброз: а – стандартная световая микроскопия.; б – фазово-контрастная микроскопия; в – стандартная световая микроскопия; г – поляризационная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, б); окраска пикросириусом красным (в, г). Увеличение x200. Стрелками обозначены фрагменты некротизированной кости

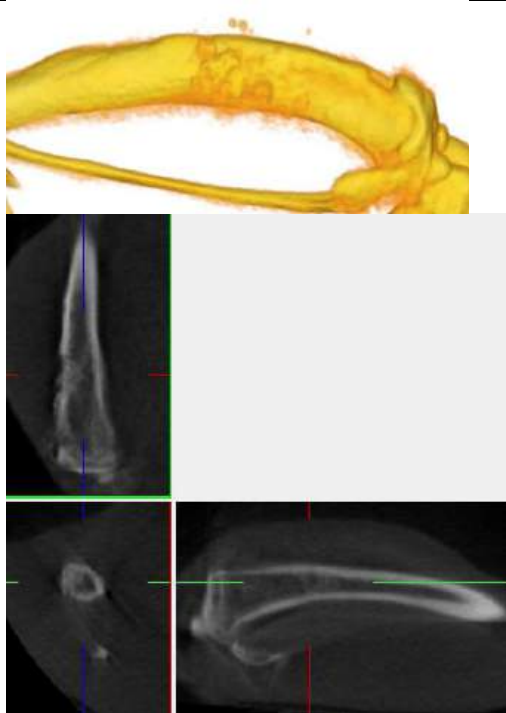
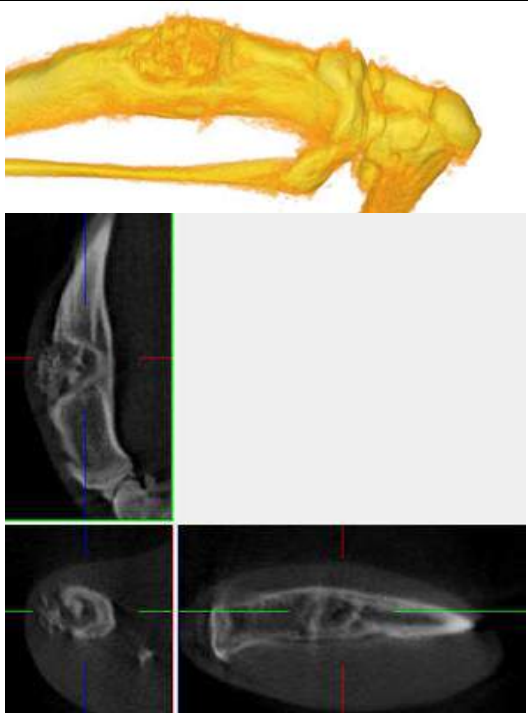
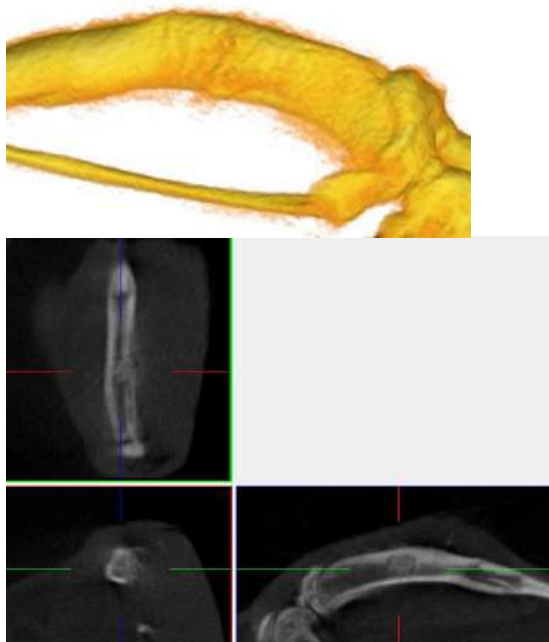
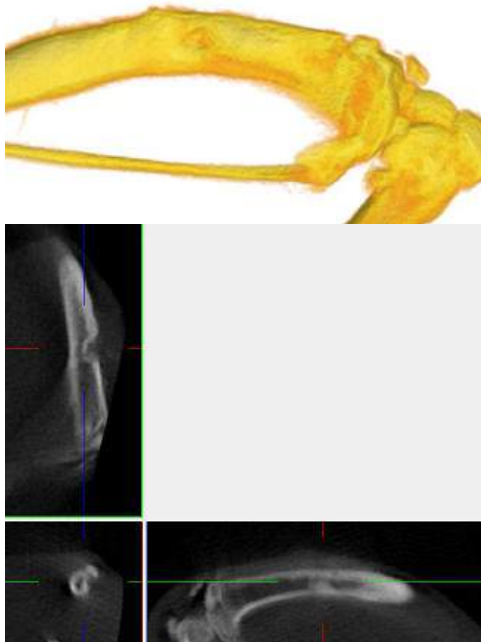
Таким образом, во всех образцах биоптатов выявляется хронический остеомиелит. Балльная оценка морфологических признаков воспаления, некроза и регенерации в области дефекта по 5-балльной шкале (0 - нет, 4 - максимальная интенсивность) (модифицированная шкала по Smeltzer [350]) представлена в таблице 5.6.

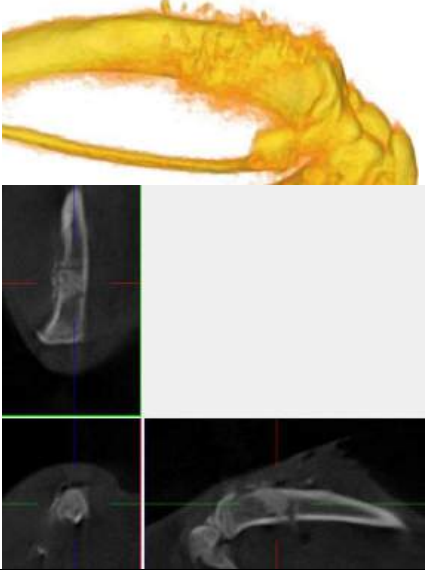
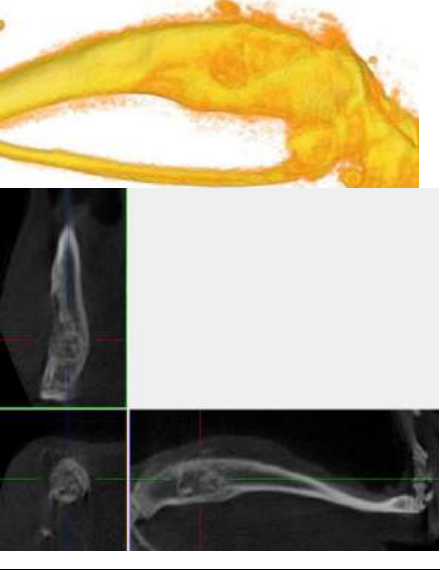
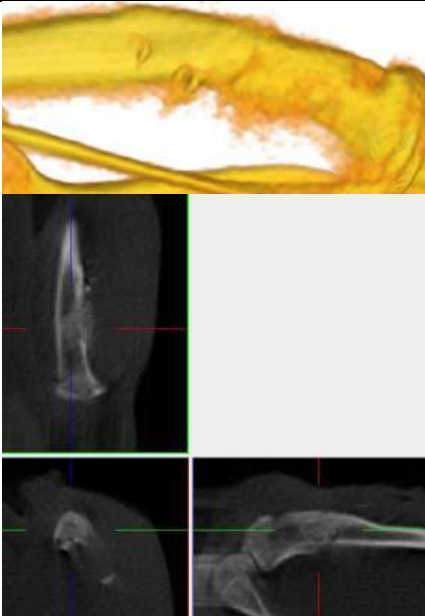
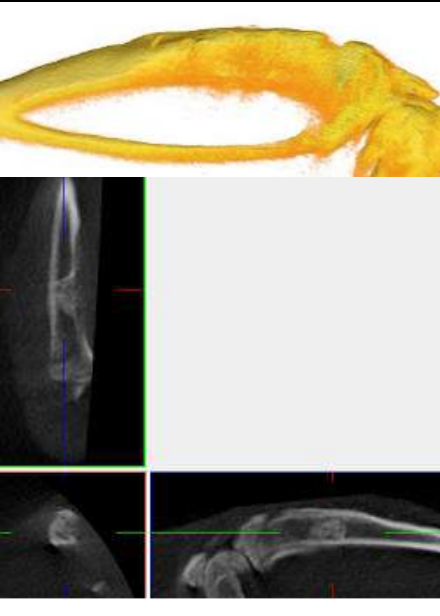
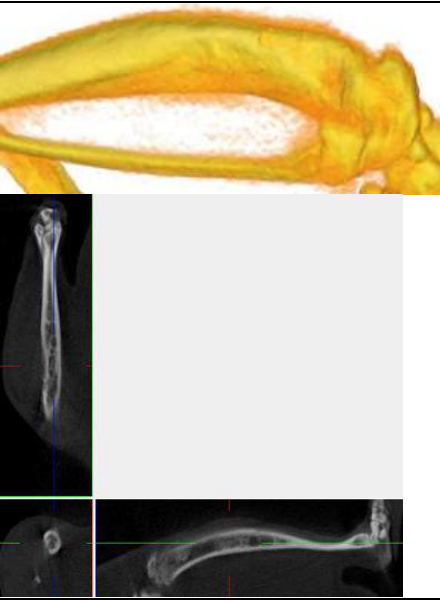
Таблица 5.6 – Балльная оценка выраженности остеомиелита в биоптатах

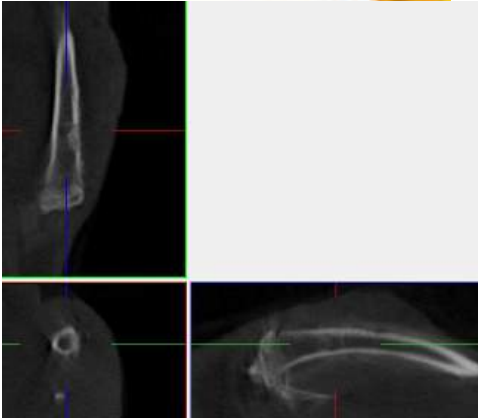
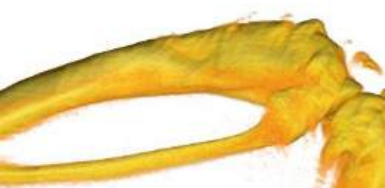
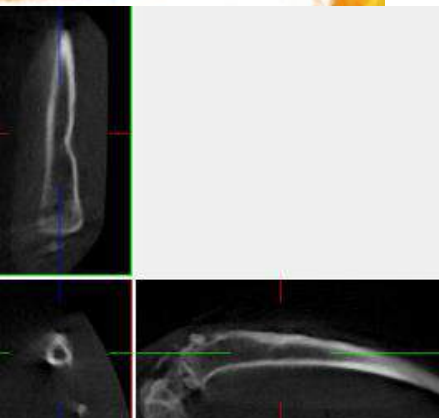
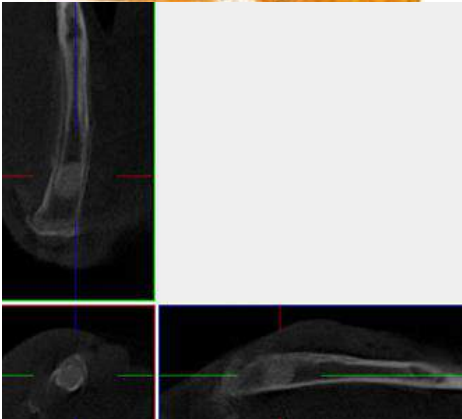
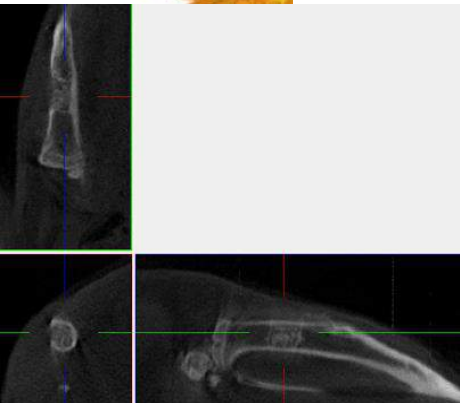
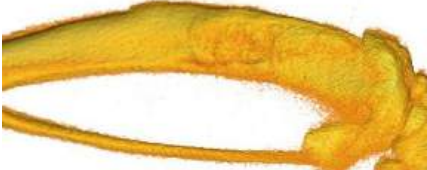
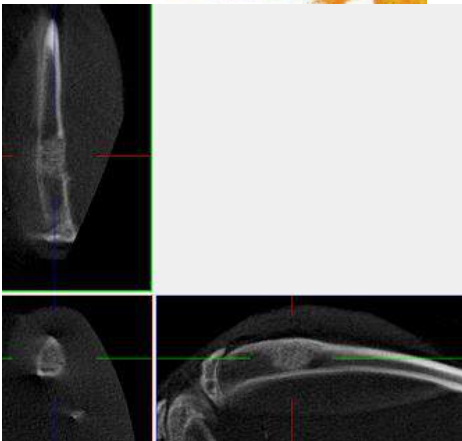
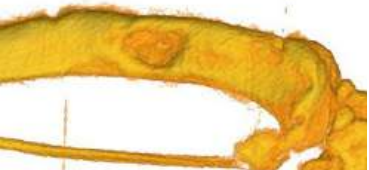
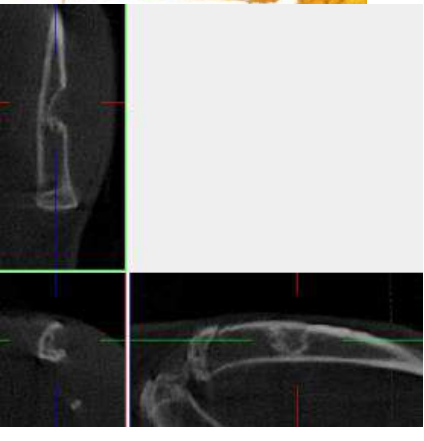
Состав	Острое воспаление	Воспаление хроническое	Некроз кости	Регенерация кости
Состав т. 5.5.80	1,0	2,0	3,3	0
Состав т. 5.5.80 + V	1,3	2,0	3,0	0
Состав т. 6.2.80	1,3	2,0	3,3	0
Состав т. 6.9.80 + V	0,7	1,3	3,3	0
Состав т. 9.2.80	0,7	1,7	3,3	0
Состав т. 9.5. 80 + V	1,0	2,7	2,7	0
Состав т. 5.7.70	1,3	2,0	3,3	0
Состав т. 5.7.70 + V	1,3	2,0	3,3	0

Результаты рентген-томографического исследования через 3 мес. после имплантации представлены в таблице 5.7 по одному примеру ортогональных проекций зон интереса в контрольном и опытном исследовании.

Таблица 5.7 – 3D-модели и ортогональные проекции большеберцовой кости лабораторного животного по результатам микро-КТ

Состав	0 суток	90 суток
5.5.80		
5.5.80+V		

Состав	0 суток	90 суток
6.2.80		
6.2.80+V		
9.2.80		

Состав	0 суток	90 суток
9.2.80+V	 	 
5.7.70	 	 
5.7.70+V	 	 

По результатам КТ, выполненной при имплантации гранул, определялся имплантированный материал в зоне дефекта и увеличение толщины мягких тканей вокруг кости. Через 3 мес. после имплантации гранул составов 5.5.80 и 6.2.80 восстановление целостности костной ткани не наблюдалось. К этому сроку появились разрастания в проекции дефекта и деформация. В зоне костномозгового канала появились уплотнения вплоть до закрытия канала. В одном случае при использовании состава 6.2.80 наблюдались признаки остеомалиции, секвестирования и деформация. В одном из образцов состава 5.7.70 наблюдалось также разрушение кортикального слоя, что подтверждает сохранение воспаления.

При использовании составов 5.5.80+V и 6.2.80+V, через 3 мес. отмечались признаки восстановления целостности кости с сохранением деформации. Регенерат был погружен в костномозговой канал. Объем мягких тканей уменьшен. В некоторых случаях при уходящем воспалении, новообразованная костная ткань закрывает костномозговой канал.

Через 3 мес. после имплантации гранул составов 9.2.80 и 9.2.80+V отмечалось восстановление целостности кости с затемнением по костномозговому каналу и изогнутостью кости к каналу. На поперечном срезе наблюдалась неполная замкнутость канала, однако признаки воспаления не наблюдались. Можно предположить, что состав, содержащий ДКФД обладает некоторыми противовоспалительными свойствами, однако маленькая выборка не позволяет делать таких выводов.

Через 3 мес. после имплантации гранул 5.7.70+V наблюдалось сохранение дефекта при полном или почти полном отсутствии гранул с тенденцией к восстановлению костной ткани. На КТ может быть практически не виден плохо минерализованный костно-хрящевой регенерат, видны уплотнения в глубине дефекта. Гранулы состава 5.7.70 обладают высокой скоростью резорбции в связи с наличием карбоната кальция в качестве наполнителя цементного камня. Принимая во внимание, что рН при воспалении снижается до 5, химическая растворимость материала гранул увеличивается тем сильнее, чем больше карбоната кальция

содержится в нем. Гранулы практически отсутствуют уже через 2 мес. после имплантации (рисунок 5.11).

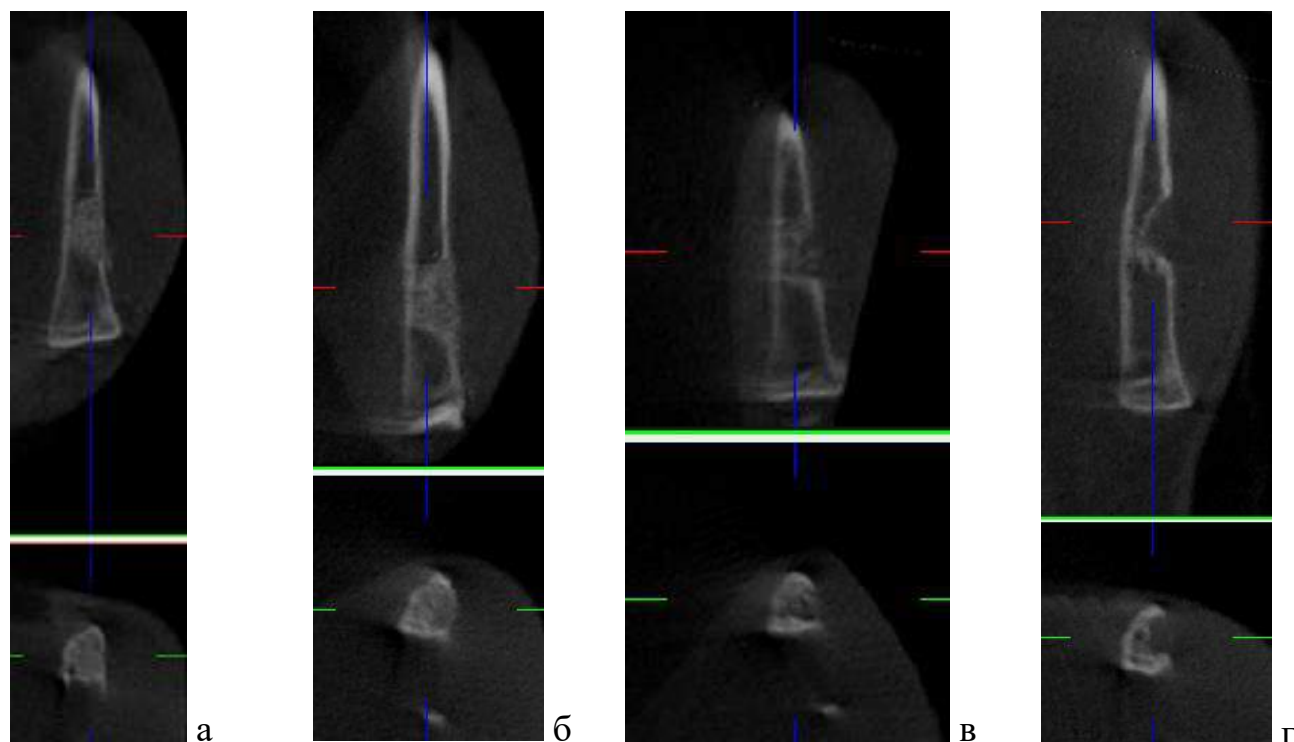


Рисунок 5.11 – Ортогональные проекции большеберцовой кости лабораторного животного по результатам микро-КТ гранул состава 5.7.70+V на: а – 0 сут.; б – 1 мес.; в – 2 мес.; г – 3 мес.

Согласно морфологическому исследованию, через 3 мес. после имплантации гранул в отверстия большой берцовой кости при имплантации составов, не содержащих антибиотик, сохранялось воспаление при хорошей костной регенерации.

При использовании состава 5.5.80 в области дефекта обнаруживались секвестры некротизированной кости в окружении фиброзной ткани со значительной макрофагальной инфильтрацией – хроническое воспаление сохранялось на высоком уровне (рисунок 5.12 а–г). Острое воспаление отсутствовало. Регенерация кости в этой группе была хорошая (рисунок 5.12 д, е). В мягких тканях обнаруживались остатки имплантата зернистой структуры в окружении микрокапсул из гигантских многоядерных клеток и макрофагов (рисунок 5.12 ж, з).

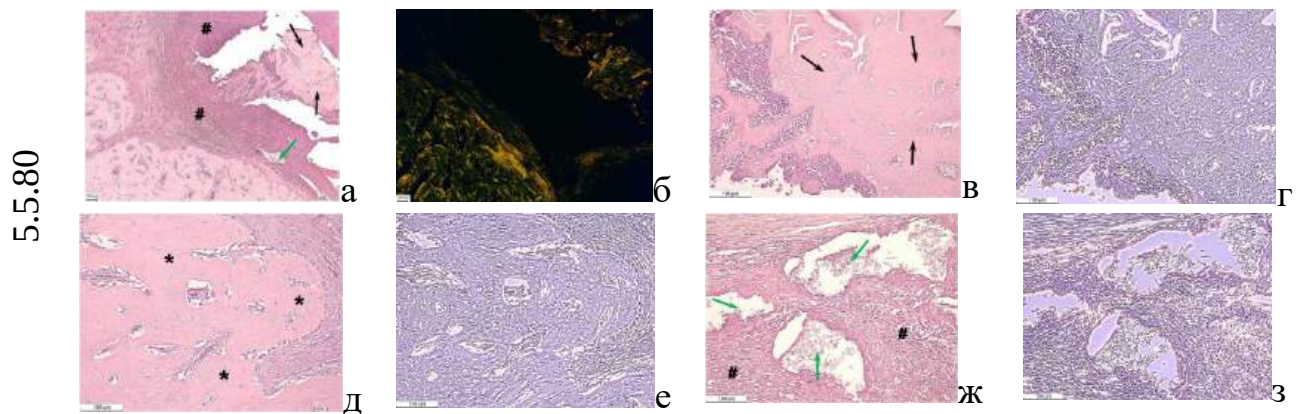


Рисунок 5.12 – Секвестры кости, значительное хроническое воспаление, фиброз и хорошая костная регенерация в области дефекта: а, в, д, ж – светлопольная микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е, з – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–з), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – X50; в–з – x200. Черными стрелками обозначены фрагменты некротизированной кости; зелеными стрелками – остатки имплантата; решетками – фиброзная ткань с воспалительным инфильтратом; звездочками – новообразованная костная ткань

При имплантации гранул состава 5.5.80, содержащего ванкомицин, в области дефекта секвестров кости, острого и хронического воспаления не наблюдалось (рисунок 5.13 а, б). Регенерация кости была хорошо выражена (рисунок 5.13 в, г). В мягких тканях обнаруживались остатки имплантата зернистой структуры в окружении микрокапсул из гигантских многоядерных клеток и макрофагов (рисунок 5.13 д, е).

В области дефекта с имплантированными гранулами состава т. 6.2.80 секвестры не выявлялись, острое и хроническое воспаление были слабыми, однако иногда наблюдались микроабсцессы из экссудата в основном с разрушенными нейтрофилами и сформированной вокруг фиброзированной грануляционной ткани с увеличенным количеством макрофагов (рисунок 5.14 а–г). Костная регенерация в одних образцах была хорошая, в других выражена слабее, в целом по группе остеогенез был умеренным (рисунок 5.14 д, е). Остатки имплантата не выявлялись.

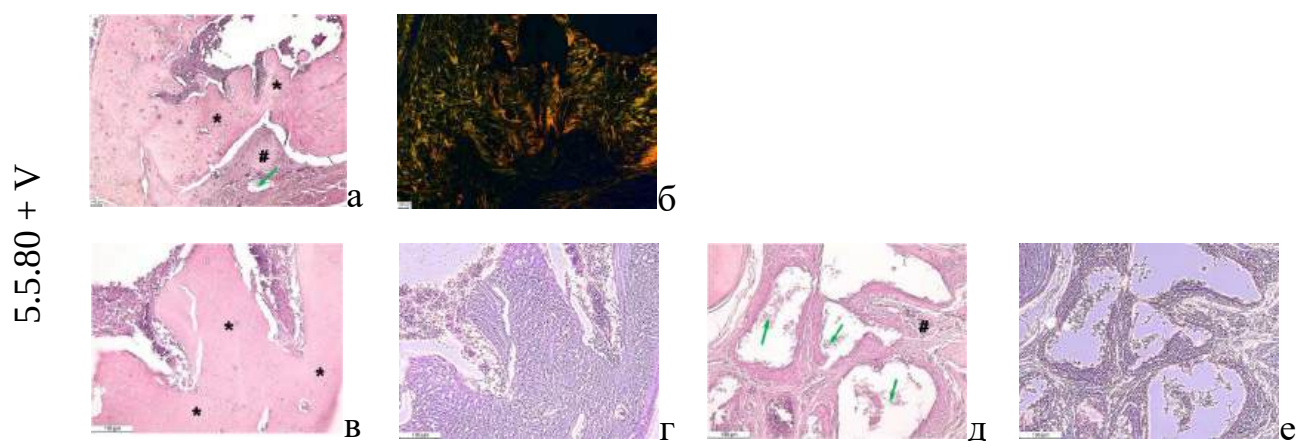


Рисунок 5.13 – Отсутствие некроза кости и воспаления в области дефекта, хорошая костная регенерация: а, в, д – светлопольная микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – $\times 50$; в–е – $\times 200$. Зелеными стрелками обозначены остатки имплантата; решетками – фиброзная ткань; звездочками - новообразованная костная ткань

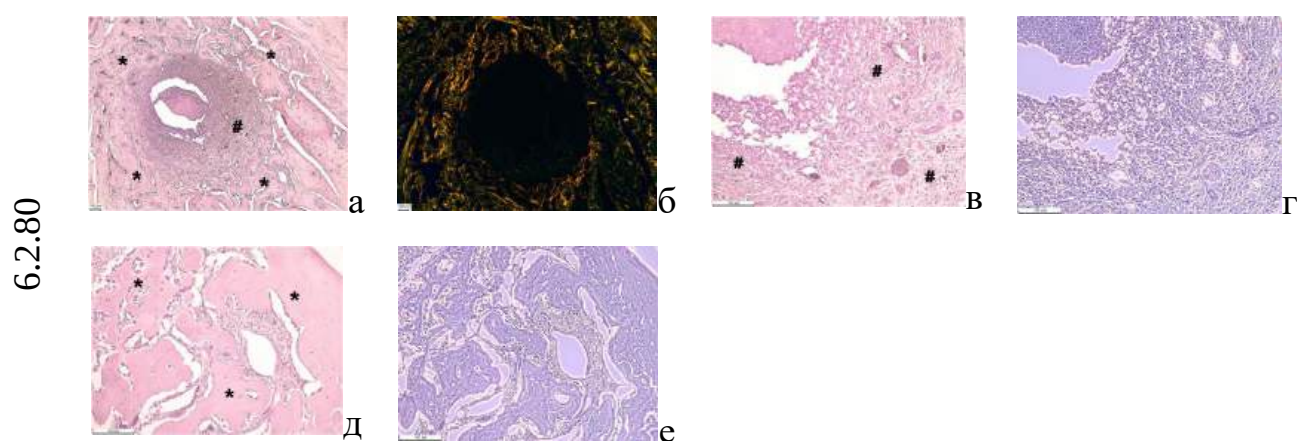


Рисунок 5.14 – Микроабсцесс, фиброз и умеренная костная регенерация в области дефекта: а – светлопольная микроскопия; б – поляризационная микроскопия; в, д – светлопольная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – $\times 50$; в–е – $\times 200$. Решетками обозначена фиброзная ткань с воспалительным инфильтратом; звездочками - новообразованная костная ткань

При имплантации гранул состава т. 6.2.80, содержащих ванкомицин, в области дефекта секвестры некротизированной кости отсутствовали, острое и хроническое воспаление было снижено, хотя в одном из образцов наблюдался микроабсцесс из окружающей экссудат с разрушенными нейтрофилами

фиброзированной грануляционной ткани с увеличенным количеством макрофагов и мелкими фрагментами кости (рисунок 5.15 а–г). Костная регенерация в этой группе была мощная. В большинстве образцов весь просвет кости был заполнен остатками имплантата и сформированными вокруг них новообразованными костными трабекулами (рисунок 5.15 д–з).

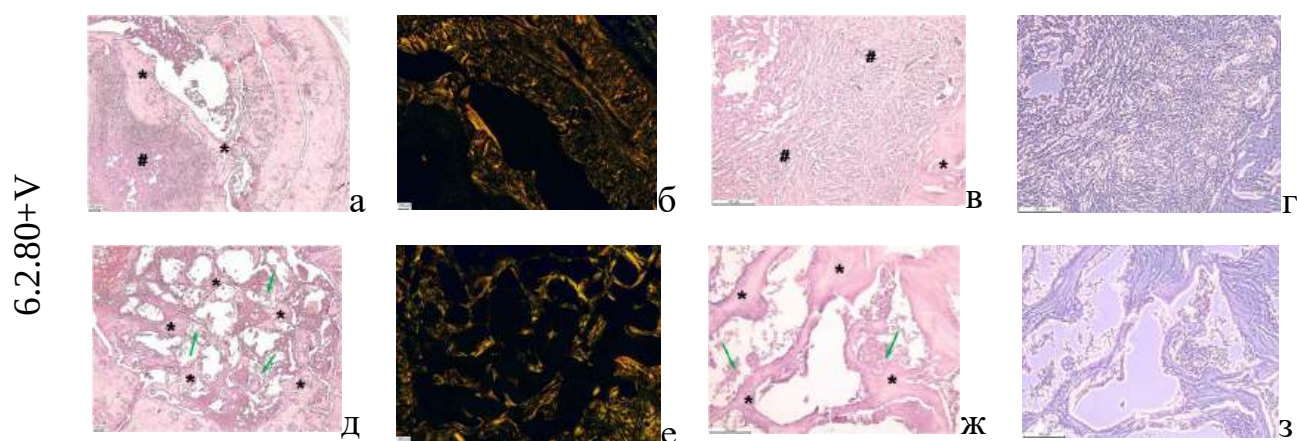
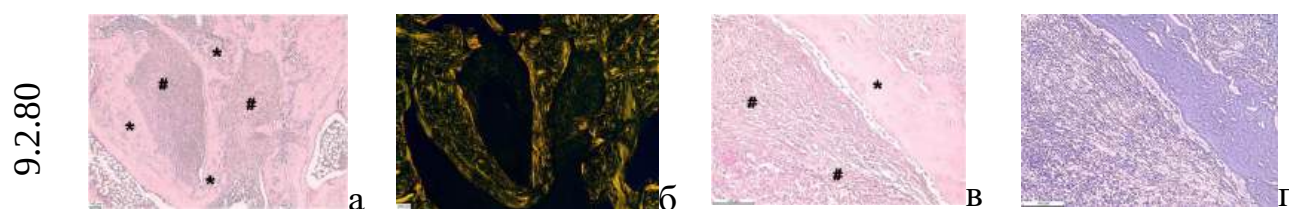


Рисунок 5.15 – Слабое воспаление и фиброз, мощная костная регенерация в области дефекта: а, в, д, ж – светлопольная микроскопия; б, е – поляризационная микроскопия; г, з – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–д, ж, з), окраска пикросириусом красным (б, е). Увеличение: а, б, д, е – $\times 50$; в, г, ж, з – $\times 200$. Зелёными стрелками обозначены остатки имплантата; решетками – фиброзная ткань с воспалительным инфильтратом; звездочками – новообразованная костная ткань

При имплантации гранул состава 9.2.80 в области дефекта некроз кости отсутствовал, хроническое воспаление с фиброзом были слабо выражены и отмечались лишь в одном образце (рисунок 5.16 а–г), острое воспаление отсутствовало. В этой группе, как и в предыдущей, наблюдали значительную костную регенерацию (рисунок 5.16 д–з). Выявлены многочисленные остатки имплантата между тонкими трабекулами молодой кости (рисунок 5.16 ж, з).



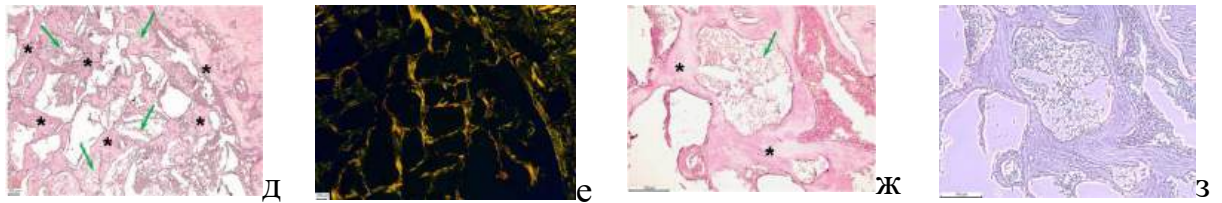


Рисунок 5.16 – Слабое воспаление и фиброз, мощная костная регенерация в области дефекта: а, в, д, ж – светлопольная микроскопия; б, е – поляризационная микроскопия; г, з – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–д, ж, з), окраска пикросириусом красным (б, е). Увеличение: а, б, д, е – х50; в, г, ж, з – х200. Зелёными стрелками обозначены остатки имплантата; решетками – фиброзная ткань с воспалительным инфильтратом; звездочками – новообразованная костная ткань

При заполнении дефекта кости гранулами состава 9.2.80 с ванкомицином, некроз кости, воспаление и фиброз в области дефекта полностью отсутствовали (рисунок 5.17 а, б). Наблюдали хорошую регенерацию кости в этой группе. Немногочисленные остатки имплантата были выявлены в новообразованной кости и прилежащих к ней мягких тканях (рисунок 5.17 в, г).

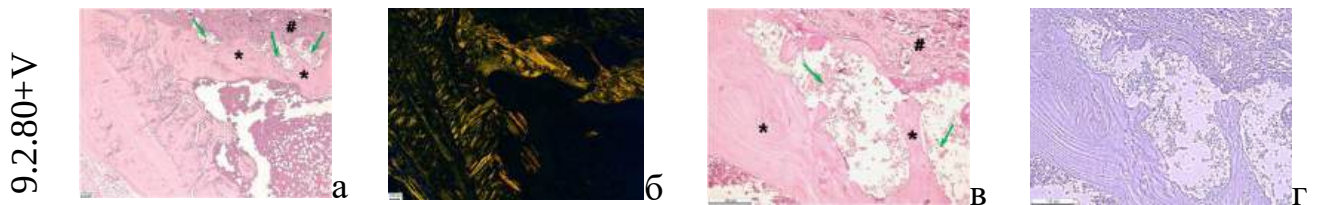


Рисунок 5.17 – Отсутствие некроза кости, воспаления и фиброза в области дефекта, хорошая костная регенерация: а, в – светлопольная микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в, г), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – х50; в, г – х200. Зелёными стрелками обозначены остатки имплантата; решетками – фиброзная ткань с воспалительным инфильтратом; звездочками – новообразованная костная ткань

При имплантации состава т. 5.7.70 в области дефекта во всех образцах обнаруживалась фиброзная ткань умеренной лимфо-макрофагальной инфильтрацией и очагами имплантированного материала зернисто-сетчатой структуры, фрагменты гранул не выявлялись (рисунок 5.18 а, б). Вокруг остатков

имплантата наблюдалась костная регенерация (рисунок 5.18 в, г) или формировались микрокапсулы из макрофагов и гигантских многоядерных клеток (рисунок 5.18 д, е). Острое воспаление и некроз кости отсутствовали.

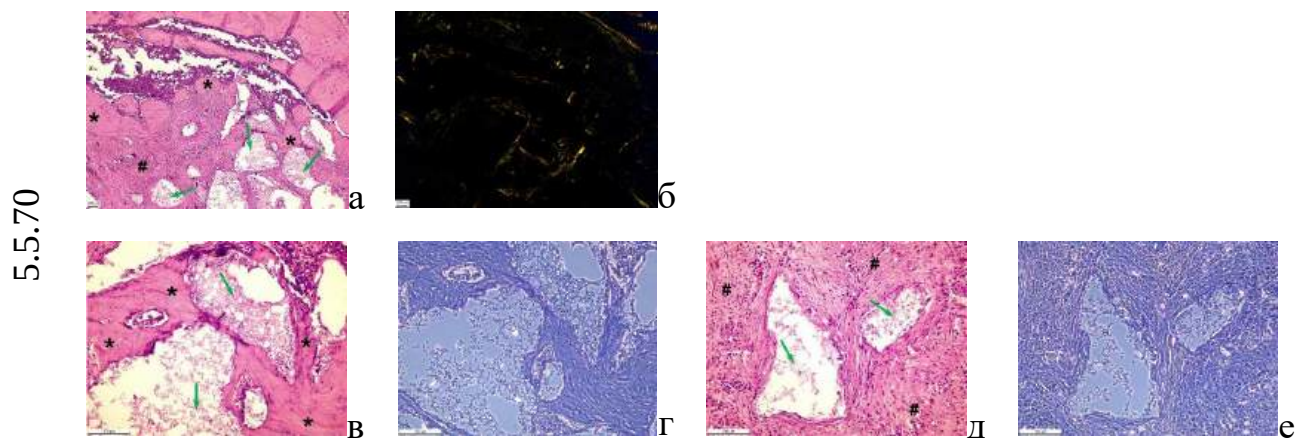


Рисунок 5.18 – Фиброзная ткань с остатками имплантата в области дефекта, умеренные хроническое воспаление и костная регенерация: а, в, д – светлопольная микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а–г – х50; д, е – х200. Зелеными стрелками обозначены остатки имплантата; решетками – фиброзная ткань с воспалительным инфильтратом; звездочками - новообразованная костная ткань

При имплантации гранул состава 5.7.70 с ванкомицином во всех образцах этой группы в области дефекта наблюдалась мощная костная регенерация (рисунок 5.19 а, б). Остатки имплантата зернисто-сетчатой структуры были окружены новообразованными костными трабекулами с большим количеством остеоцитов (рисунок 5.19 в, г). Фрагментов цемента, некротизированной кости, острого воспаления обнаружено не было. Хроническое воспаление было минимальным. В мягких тканях остатки имплантата были почти полностью резорбированы макрофагами и гигантскими многоядерными клетками и замещались грануляционно-фиброзной тканью с большим количеством сосудов (рисунок 5.19 д, е).

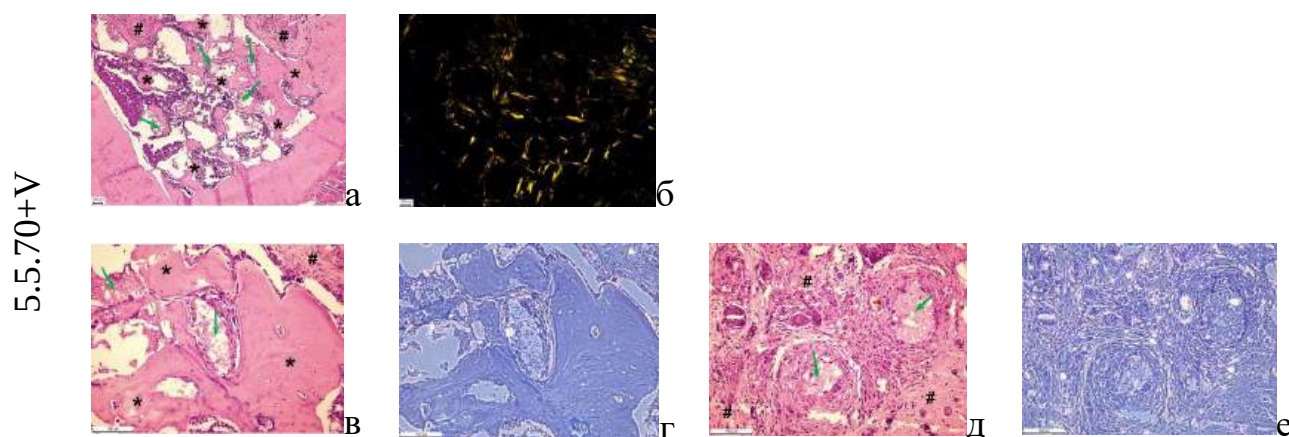


Рисунок 5.19 – Фиброзная ткань с остатками имплантата в области дефекта, умеренные хроническое воспаление и костная регенерация: а, в, д – светлопольная микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а–г – $\times 50$; д, е – $\times 200$. Зелёными стрелками обозначены остатки имплантата; решетками – фиброзная ткань с воспалительным инфильтратом; звездочками – новообразованная костная ткань

Таким образом, морфологический анализ показал, при имплантации в область дефекта различных модификаций карбонатзамещенных кальцийфосфатных гранул различных составов при фиксированном количестве α -ТКФ = 80 мас. % происходило снижение выраженности остеомиелита по сравнению с контрольными биоптатами: некроз кости снижался в среднем в 10,6 раза, острое воспаление – в 10 раз, а хроническое воспаление – в 3,8 раза (таблица 5.8).

Таблица 5.8 – Балльная оценка выраженности остеомиелита через 3 мес. после имплантации гранул

Состав	Острое воспаление	Воспаление хроническое	Некроз кости	Регенерация кости
Состав т. 5.5.80	0	1,3	2,0	3
Состав т. 5.5.80 + V	0	0	0	2,7
Состав т. 6.2.80	0,3	1,0	0	2,0
Состав т. 6.9.80 + V	0,3	0,3	0	3,3
Состав т. 9.2.80	0	0,3	0	3,3
Состав т. 9.5. 80 + V	0	0	0	2,7
Состав т. 5.7.70	0	2	0	1,7
Состав т. 5.7.70 + V	0	0,5	0	3

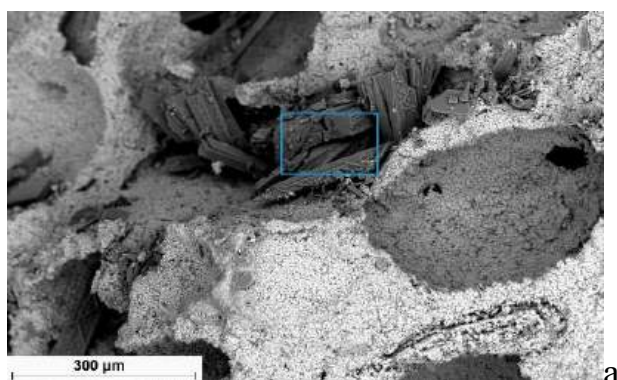
При этом в большинстве образцов после лечения наблюдался активный остеогенез. При сравнении разных модификаций следует особо отметить группы составов т.5.5.80+V, т.6.2.80+V, т.9.2.80 и Т.9.2.80+V, в которых признаки остеомиелита (некроз кости, острое и хроническое воспаление) полностью отсутствовали (т.5.5.80+V, т.9.2.80+V) или было выявлено только минимально выраженное воспаление (т.9.2.80, т.6.2.80+V). Во всех случаях наблюдали значительную костную регенерацию. При этом добавление ванкомицина в модификации стимулировало снижение выраженности некроза, острого и хронического воспаления в разных группах, т.е. оказывало явный положительный эффект.

При имплантации в область дефекта гранул состава т. 5.7.70 также происходило снижение выраженности остеомиелита, т.е. отсутствовали признаки острого воспаления и некроза кости, однако присутствовало хроническое воспаления и костная регенерация была слабой. При использовании ванкомицина в составе 5.7.70+V некроз, острое и хроническое воспаление отсутствовали, остатки имплантата почти полностью резорбировались и наблюдалась мощная костная регенерация в области дефекта.

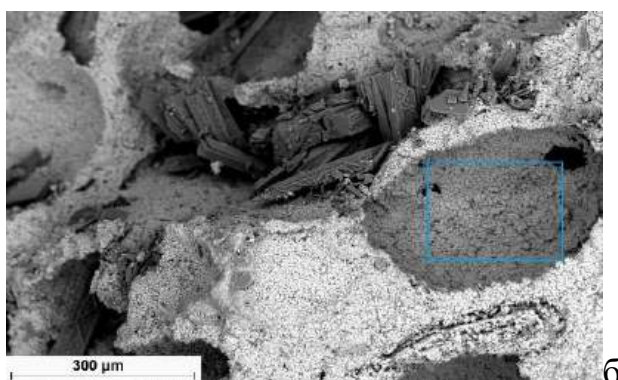
5.4 Технология получения антибиотикосодержащего кальцийфосфатного матрикса на основе карбонатзамещенного цемента

Внесение лиофилизатов антибактериальных средств в состав цементной смеси на стадии приготовления состава для прессования определяет основную задачу последующих стадий приготовления матрикса – сохранение количества антибиотика и его активности. В данной работе в качестве антибактериальной субстанции в матриксе использовали ванкомицин (брутто-формула $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$) в количестве 50 мг / 1см³ матрикса с внесением антибиотика в сухую цементную смесь состава фигуративной точки 1.80 до увлажнения и выпрессовывания смеси. В процессе гидратации матрикса при 100%-ной влажности, возможно, происходит частичное растворение ванкомицина, раствор которого пропитывает кальцийфосфатный матрикс. Ванкомицин внутри матрикса располагается в

межпоровом пространстве в виде сростков плоских кристаллов, что подтверждается данными сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионного анализа (рисунок 5.20 а). Присутствие Cl на поверхности кристаллов кальцийфосфатов, возможно, указывает на пропитку матрикса раствором ванкомицина, образованном на стадии гидратации цемента (рисунок 5.20 б).



Элемент	Атом., %
C	55,22
N	21,89
O	18,72
P	0,69
Cl	2,41
Ca	1,07

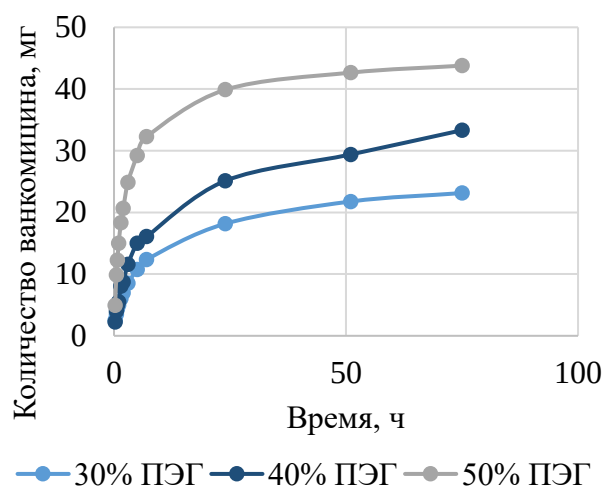


Элемент	Атом., %
C	15,60
O	57,89
Na	0,45
P	9,40
Cl	0,29
Ca	16,36

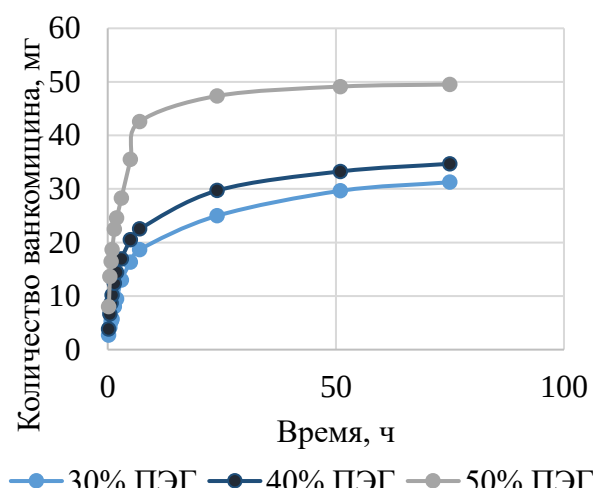
Рисунок 5.20 – Микрофотография с выделенными зонами и EDX зон матрикса: а – ванкомицин; б – кальцийфосфатный матрикс. Увеличение X530

По результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), полученным при измерении концентрации антибиотика в хлороформе после использования его для экстракции гранул ПЭГ из матрикса, потери ванкомицина составили менее 0,01 %.

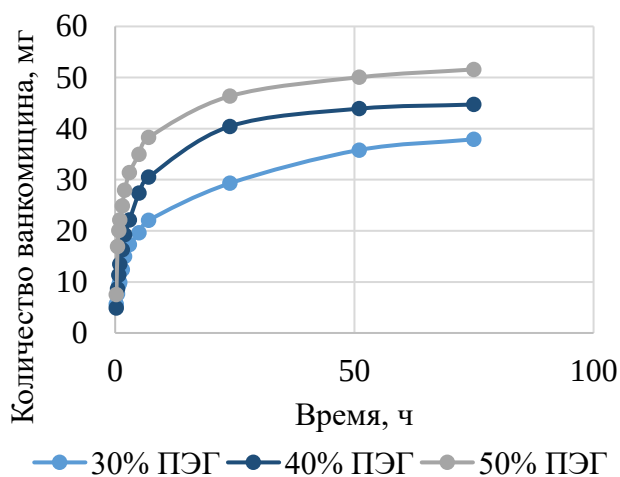
Скорость выхода антибиотика зависит от пористости блоков и прямопропорциональна количеству ПЭГ в исходной смеси, экстрагированием которого образуется макропористость (рисунок 5.21).



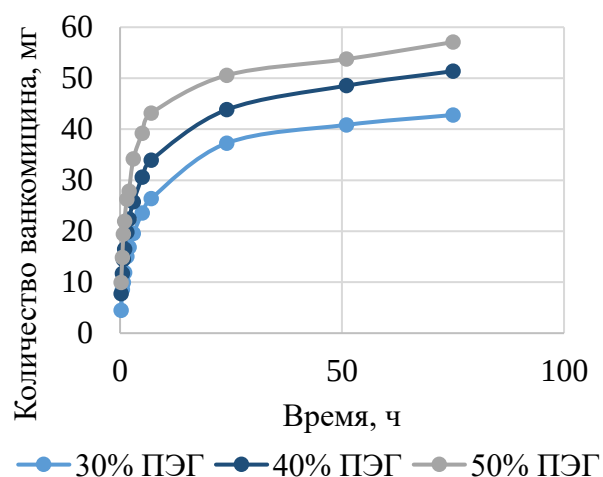
а



б



в



г

Рисунок 5.21 – Динамика выхода ванкомицина при исходной концентрации на 3 см³ матрикса, мг: а – 150; б – 200; в – 250; г – 300

Профили выхода исследованных препаратов для всех форм характеризуются наличием области интенсивного выхода действующих веществ и области, в которой выход замедляется. На первом этапе происходит высвобождение антибиотика, адсорбированного на поверхности носителя, затем концентрация на поверхности снижается и дальнейший выход происходит за счет диффузии антибиотика, оставшегося внутри матрикса, через поры и дефекты структуры. Во всех случаях тангенс угла наклона кривых выхода ванкомицина в начальный период времени до 8–9 ч значительно больше тангенса угла наклона кривых после указанного времени. Скорость выхода замедляется со временем, но к 75 ч на плато

не выходит. Ванкомицин, растворяясь внутри матрикса в жидкости, выходит через взаимосвязанные поры. Профиль выхода согласуется с результатами исследований других авторов, которые сообщают, что профиль высвобождения подставляет собой кривую с большим начальным выбросом антибиотика с последующим медленным высвобождением [201].

В соответствии с литературными данными быстрое начальное высвобождение способно эффективно остановить патологический процесс, в то время как его более продолжительная вторая фаза высвобождения постепенно поддерживает процесс лечения [299]. Нет четких данных по необходимой скорости, тем более скорость выхода *in vivo* отличается от *in vitro*, по некоторым данным, в 2 раза [290]. Установлено, что к 75 ч выход антибиотика составил от 15 мас.% до 57 мас.% в зависимости от концентрации и пористости матрикса. Эффективность скорости высвобождения антибиотиков более достоверно определяется в микробиологическом исследовании. Данные микробиологического исследования представлены ниже.

Для описания контролируемого высвобождения препаратов при растворении из матриксов использовали регрессионный анализ на основе наиболее подходящих в соответствии с литературными данными математических моделей для определения кинетики высвобождения лекарственных средств [296, 297]:

- модель первого порядка (для описания высвобождения лекарственных веществ, в котором скорость процесса пропорциональна текущему количеству вещества в системе. Обычно используется для систем с быстрым растворением матрицы или разрушением лекарственной формы);

- модель Хигучи (для описания химического процесса, в котором высвобождение происходит за счет диффузии, концентрация вещества в матриксе выше его растворимости. Не подходит для систем, в которых процесс контролируется резорбцией матрикса), скорость выхода вещества прямо пропорциональна его концентрации. При уменьшении концентрации скорость уменьшается);

- модель Бейкера-Лонсдейла (описывает выход вещества из монолитных матриц доставки лекарств, в которых активный фармацевтический ингредиент изначально диспергирован по всей инертной диффузионной матрице);

- модель Корсмейера-Пеппаса (для описания кинетики высвобождения лекарственных веществ из полимерных систем, когда процесс растворения трудно предсказать или включает комбинацию различных процессов).

Для определения применимости моделей их преобразовали с целью линеаризации (таблица 5.9) для определения значений кинетических констант, используемых впоследствии для построения графика прогнозируемого выхода ванкомицина от времени. При определении линеаризации использовали линии тренда, учитывающие коэффициент «а» уравнений $y = ax + b$ для всех моделей ($a=1$ – для моделей первого порядка, Бейкер-Лонсдейл; $a=0,5$ – для модели Хигучи; $a=n$ – для Корсмейер-Пеппас).

Таблица 5.9 – Уравнения моделей выхода антибиотика

Модель	Уравнение	Преобразованная форма
Первого порядка	$\ln \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right) = -K \cdot t$	$\ln \left(-\ln \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right) \right) = \ln(K) + \ln(t)$
Хигучи	$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot t^{\frac{1}{2}}$	$\ln \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \ln(K) + \frac{1}{2} \ln(t)$
Бейкер-Лонсдейл	$f_1 = \frac{3}{2} \left(1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{\frac{2}{3}} \right) - \frac{M_t}{M_\infty}$ $= K \cdot t$	$\ln(f_1) = \ln(K) + \ln(t)$
Корсмейер-Пеппас	$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot t^n$	$\ln \left(\frac{M_t}{M_\infty} \right) = \ln(K) + n \ln(t)$
M_t – количество высвободившегося лекарства в момент времени t , M_∞ – общее количество лекарства, которое может быть высвобождено (предельное значение), K – кинетическая константа, t – время		

Из уравнений линейных регрессий были получены значения кинетических констант высвобождения для каждой модели. Кинетические константы высвобождения (k) для каждой модели приведены в таблице 5.10.

Таблица 5.10 – Основные кинетические константы, характеризующие выход антибиотиков из макропористых матриц

Модель→	Хигучи, ч. ^{1/2}	Первого порядка, ч. ⁻¹	Бейкер- Лонсдейл, ч. ⁻¹	Корсмейер- Пеппас, ч. ⁻¹
Конц. ванкомицина, мг ↓				
30% ПЭГ				
150	$2,91 \cdot 10^{-2}$	$1,63 \cdot 10^{-2}$	$1,46 \cdot 10^{-4}$	$3,31 \cdot 10^{-2}$
200	$3,62 \cdot 10^{-2}$	$1,62 \cdot 10^{-2}$	$1,45 \cdot 10^{-4}$	$3,15 \cdot 10^{-2}$
250	$1,90 \cdot 10^{-2}$	$1,90 \cdot 10^{-2}$	$1,98 \cdot 10^{-4}$	$4,18 \cdot 10^{-2}$
300	$3,17 \cdot 10^{-2}$	$1,78 \cdot 10^{-2}$	$1,73 \cdot 10^{-4}$	$3,75 \cdot 10^{-2}$
40% ПЭГ				
150	$3,65 \cdot 10^{-2}$	$2,07 \cdot 10^{-2}$	$2,31 \cdot 10^{-4}$	$3,86 \cdot 10^{-2}$
200	$3,99 \cdot 10^{-2}$	$2,25 \cdot 10^{-2}$	$2,76 \cdot 10^{-4}$	$4,76 \cdot 10^{-2}$
250	$2,38 \cdot 10^{-2}$	$2,38 \cdot 10^{-2}$	$3,07 \cdot 10^{-4}$	$4,98 \cdot 10^{-2}$
300	$4,22 \cdot 10^{-2}$	$2,39 \cdot 10^{-2}$	$3,08 \cdot 10^{-4}$	$5,30 \cdot 10^{-2}$
50% ПЭГ				
150	$7,41 \cdot 10^{-2}$	$4,37 \cdot 10^{-2}$	$9,91 \cdot 10^{-4}$	$9,03 \cdot 10^{-2}$
200	$6,99 \cdot 10^{-2}$	$4,09 \cdot 10^{-2}$	$8,73 \cdot 10^{-4}$	$8,97 \cdot 10^{-2}$
250	$3,44 \cdot 10^{-2}$	$3,44 \cdot 10^{-2}$	$6,30 \cdot 10^{-4}$	$7,88 \cdot 10^{-2}$
300	$5,28 \cdot 10^{-2}$	$1,67 \cdot 10^{-2}$	$4,90 \cdot 10^{-4}$	$6,91 \cdot 10^{-2}$

В сравнении с реальными значениями скорости выхода ванкомицина определяли точность описания кинетики выхода антибиотика. Сравнительный анализ применимости моделей к реальной скорости выхода основан на совпадении

графика расчетной скорости выхода антибиотика в соответствии с уравнениями и графика реальной скорости выхода (рисунок 5.22).

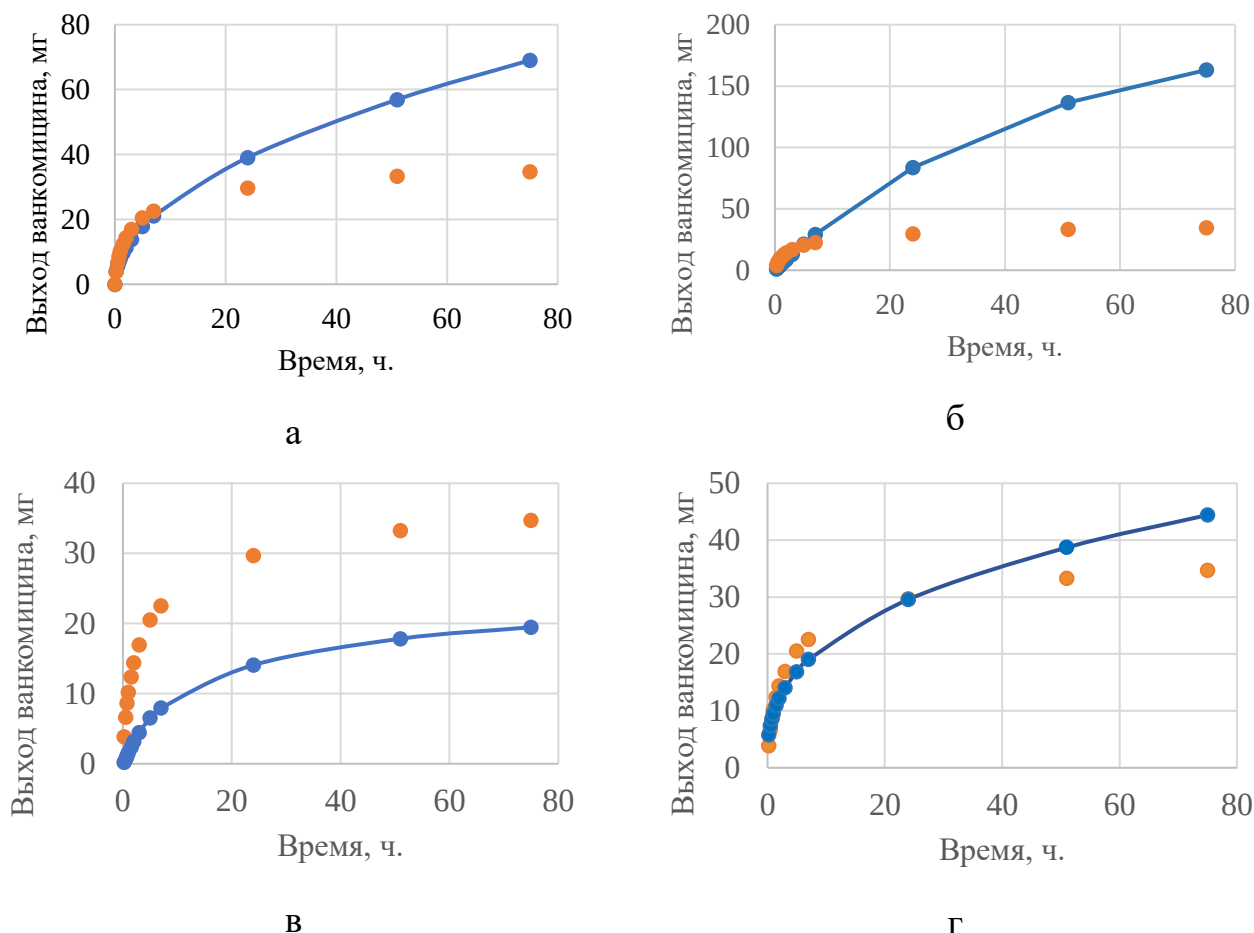
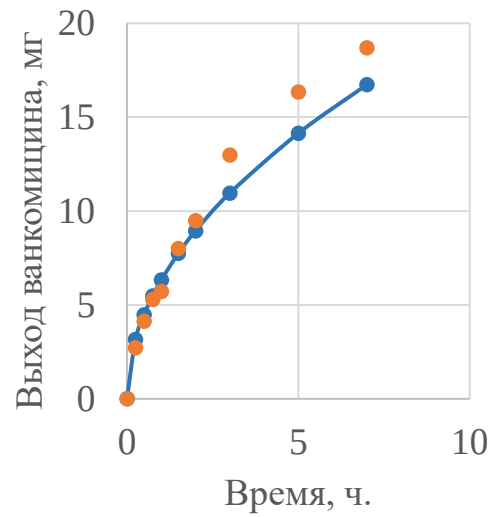
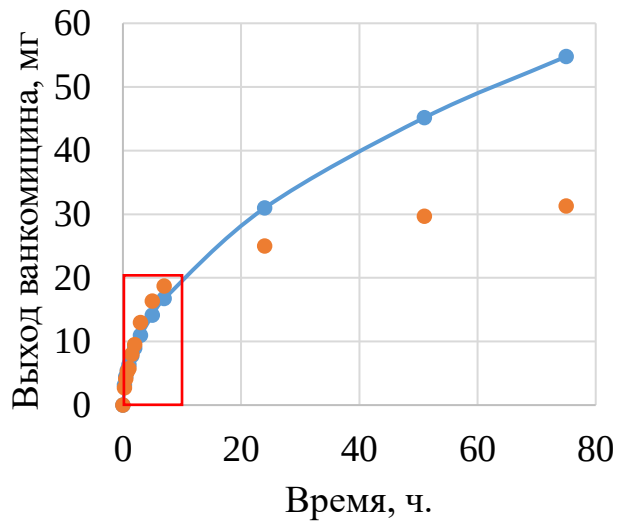


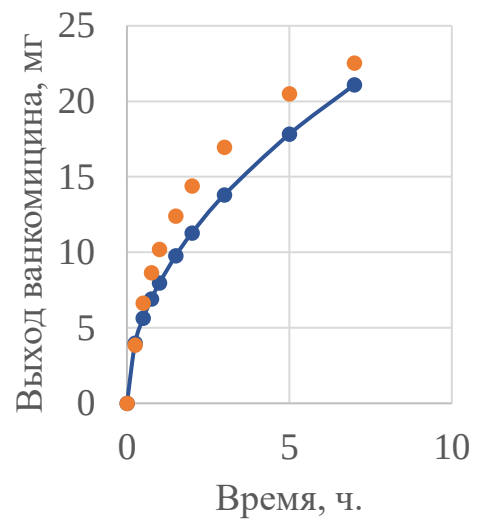
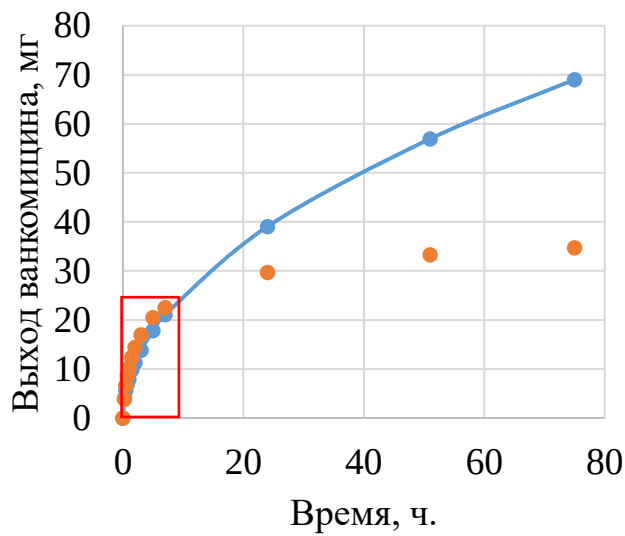
Рисунок 5.22 – Анализ применимости моделей к динамике выхода ванкомицина из матриц: а – Хигучи; б – уравнение 1 порядка; в – Бейкера-Лонсдейла; г – Корсмейера-Пеппаса

* пример для матрикса с 40% экстрагированного ПЭГ и 200 мг ванкомицина

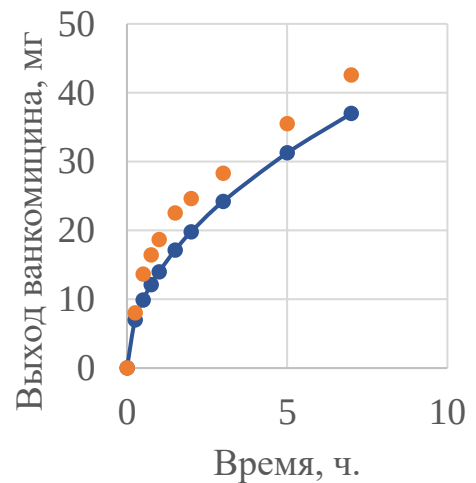
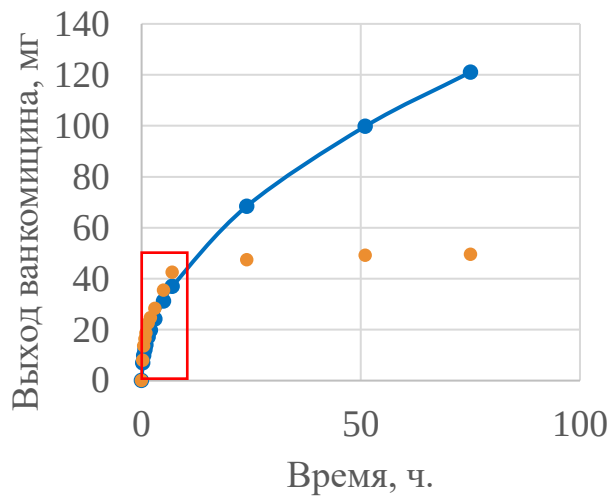
Высвобождение ванкомицина из цементных пористых матриц продемонстрировало неполное соответствие указанным моделям. Максимально близкие значения характерны для модели Корсмейера-Пеппаса, но в начальный период времени (до 7 ч.) сходимость выше при использовании модели Хигучи (рисунок 5.23).



а



б



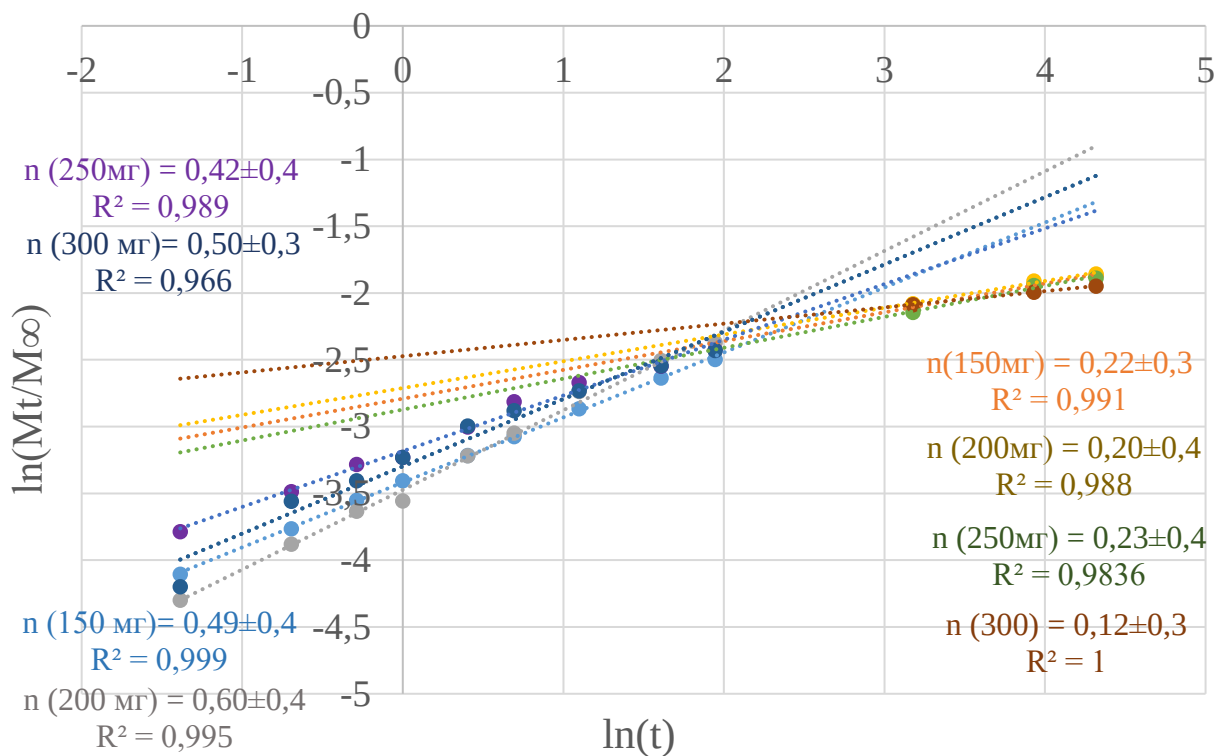
в

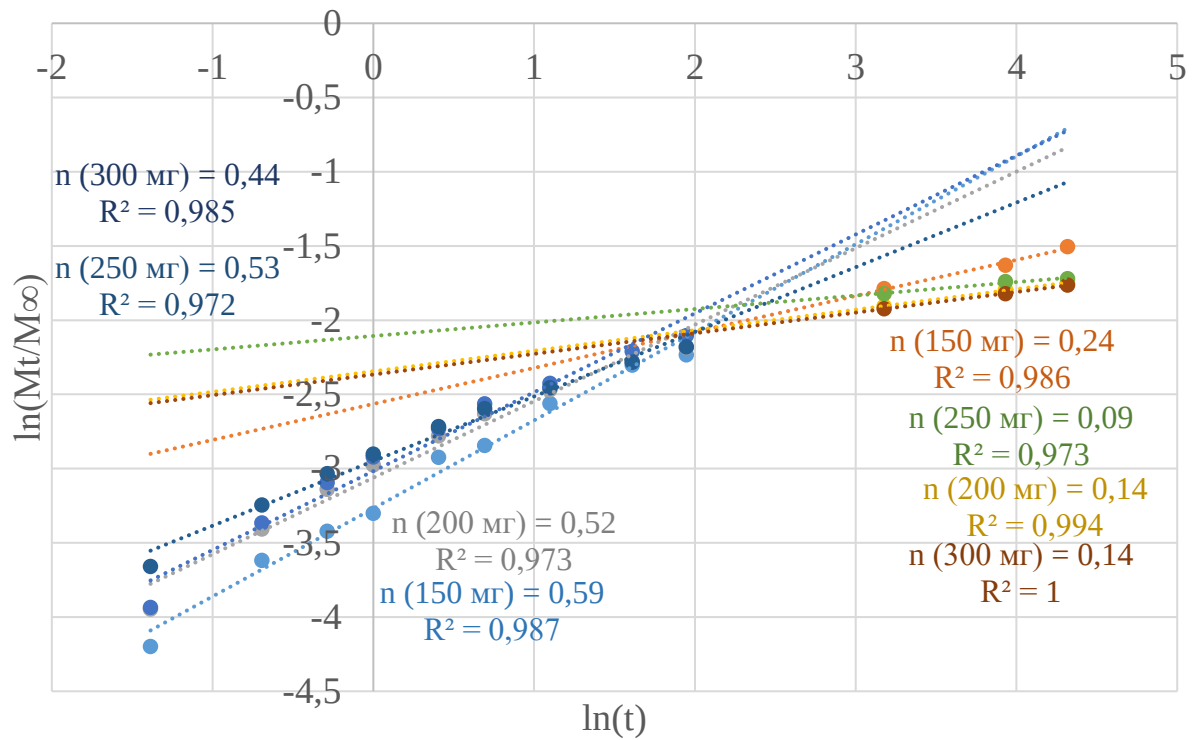
Рисунок 5.23 – Высвобождение 200 мг ванкомицина в сравнении с расчетами по уравнению модели Хигучи в матрицах по экстракции: а – 30 % ПЭГ; б – 40 % ПЭГ; в – 50 % ПЭГ

Механизм высвобождения связан с диффузией, где скорость высвобождения зависит от оставшегося количества лекарства. В научной литературе многими авторами также отмечается, что скорость выхода антибиотиков из кальцийфосфатных матриц соответствует закону диффузии Фика и описывается моделью Хигучи [76, 290, 295]. По модели Корсмейера–Пеппаса диффузия определяется как обычная ($n_{\text{среднее}} = 0,33\text{--}0,37$) в соответствии с расчетами типа механизма высвобождения для цилиндрических образцов:

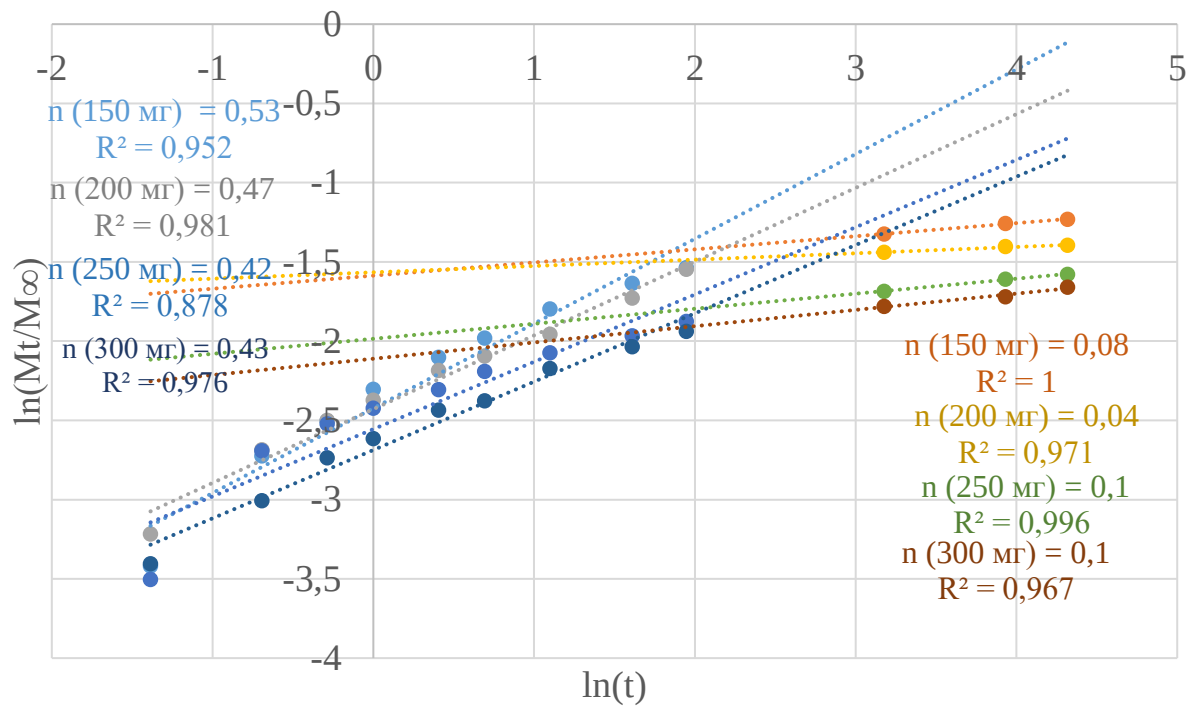
- при $n \leq 0,45$ – диффузия по закону Фика,
- при $0,45 < n < 0,89$ – диффузия не по закону Фика,
- при $n = 0,89$ – Case-II-транспорт,
- при $n > 0,89$ – аномальная диффузия.

Необходимо заметить, что в первый период времени диффузия не соответствует закону Фика ($n > 0,45$) в большинстве случаев, тогда как в более поздние сроки (от 1 сут.) наблюдается высокая достоверность аппроксимации при использовании модели Корсмейера–Пеппаса (рисунок 5.24).





6



B

Рисунок 5.24 – Линеаризированные графики данных по высвобождению ванкомицина по модели Корсмейера–Пеппаса, из которой был получен показатель Корсмейера–Пеппаса, n для матриц с исходным содержанием ПЭГ: а – 30%; б – 40%; в – 50%

Анализ соответствия Корсмейера-Пеппаса подтверждает, что механизм высвобождения ванкомицина происходит посредством диффузии частично адсорбированного антибиотика. Вероятно, быстрый выход в первые минуты связан не только с десорбцией с поверхности кристаллов, но и выходом свободного антибиотика. По результатам проведенного исследования по определению адсорбционной способности исходных компонентов и конечного продукта (цементного камня), установлено, что ванкомицин адсорбируется на α -ТКФ и ГАП (рисунок 5.25), что подтверждает присутствие свободного (внутрипористого) ванкомицина в цементном камне и адсорбционного.

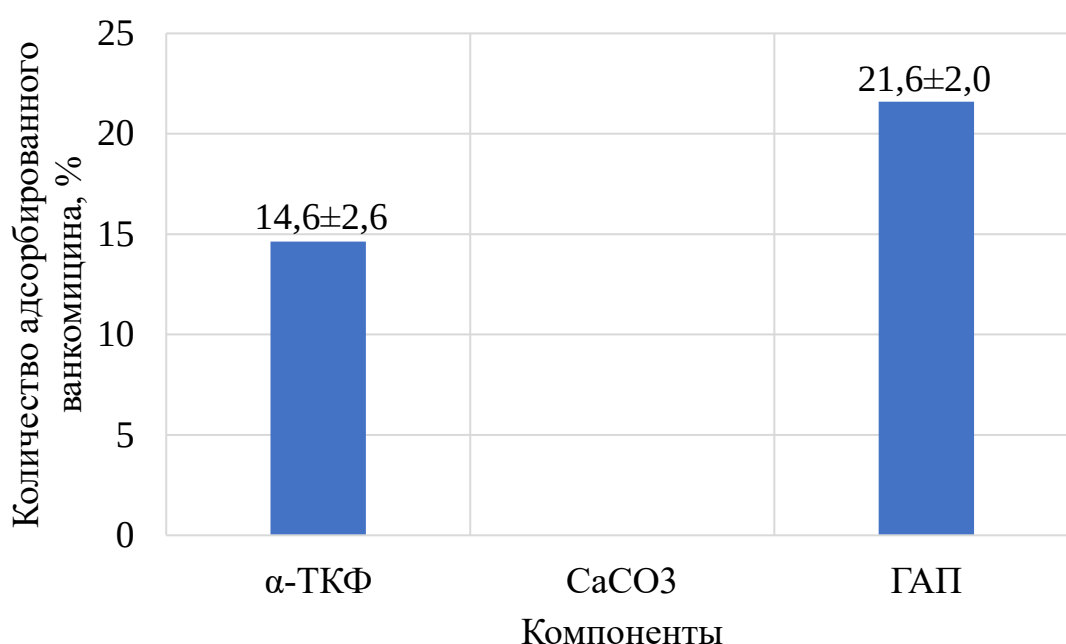


Рисунок 5.25 – Адсорбция ванкомицина на компонентах цемента

Таким образом, высвобождение ванкомицина из цемента продемонстрировало неполное соответствие указанным моделям, релиз соответствовал более чем одному механизму диффузии.

При увеличении пористости увеличивается площадь поверхности, что влечет за собой увеличение количества вышедшего в раствор антибиотика, расположенного по поверхности и близко от нее за счет открытой микропористости. Константы скорости в моделях кинетики высвобождения увеличиваются при увеличении пористости в общем случае при использовании

любой из указанных моделей. Константы скорости во всех моделях кинетики увеличиваются с увеличением исходной концентрации антибиотика в большинстве случаев для макропористых матриц, образованных экстракцией 30 и 40 мас.% ПЭГ. Однако значения констант скорости незначительно снижаются при увеличении количества фармвещества в матрицах, макропористость которых образована экстракцией 50% ПЭГ. Вероятно, вклад в замедление вносит сопротивление матрицы, являющееся лимитирующим фактором при высоких концентрациях вещества, т.е. диффузия ванкомицина приближается к предельно возможной, что снижает долю вышедшего ванкомицина.

Таким образом, элюирование ванкомицина зависит от исходного количества антибиотика и пористости матрицы. Указанными факторами можно регулировать скорость выхода антибактериальных субстанций.

Разработанная технология объемного инкорпорирования ванкомицина в пористые матрицы на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита состава т. 1.80 системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O позволяет сохранить его активность, что подтверждается результатами микробиологического исследования с *S. aureus* ATCC 6538 и *E. coli* ATCC 25982 (таблицы 5.11, 5.12).

В качестве положительного контроля использовали тест–диск с Ципрофлоксацином (CIP^{30} – Ciprofloxacin, 30 μg , SD142. HiMedia, Индия).

Таблица 5.11 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур золотистого стафилококка с антибактериальными матрицами

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Количество ПЭГ в сухой смеси – 30 %		
	Б/Д	0	0
	150 мг V*	72	552
	200 мг V*	216	576
	250 мг V*	240	624
	300 мг V*	264	648

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч
	Количество ПЭГ в сухой смеси – 40 %		
	Б/Д	0	0
	150 мг V*	168	480
	200 мг V*	168	480
	250 мг V*	264	600
	300 мг V*	264	600
	Количество ПЭГ в сухой смеси – 50 %		
	Б/Д	0	0
	150 мг V*	168	432
	200 мг V*	144	456
	250 мг V*	-	-
	300 мг V*	240	528

Elfa Laboratories, Индия

Таблица 5.12 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур кишечной палочки с антибактериальными матриксами

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч
<i>E. coli</i> ATCC 25982	Количество ПЭГ в сухой смеси – 30 %		
	Б/Д	0	0
	150 мг V*	48	384
	200 мг V*	120	384
	250 мг V*	144	528
	300 мг V*	192	552
	Количество ПЭГ в сухой смеси – 40 %		
	Б/Д	0	0
	150 мг V*	72	384
	200 мг V*	96	360
	250 мг V*	144	456
	300 мг V*	168	432
	Количество ПЭГ в сухой смеси – 50 %		
	Б/Д	0	0
	150 мг V*	96	312
	200 мг V*	96	288
	250 мг V*	-	-
	300 мг V*	168	408

Elfa Laboratories, Индия

Эффективность против бактерий *S. aureus* и *E. Coli* ванкомицинсодержащего матрикса зависит от пористости и концентрации антибиотика в исходном составе и не уступает положительному контролю в сроки до 11 и 8 сут. при общем времени влияния на угнетение бактерий до 27 и 23 сут., соответственно. Указанные сроки более длительны и эффективны, чем встречающиеся в литературе, что подтверждает эффективность самого метода инкорпорирования и материалов, используемых в качестве матрикса – доставки лекарственных средств.

Увеличение пористости способствует более быстрому элюированию, увеличение концентрации увеличивает время эффективности матриксов против бактерий. Этими параметрами возможно регулировать релиз антибиотиков в месте имплантации.

Более подробные результаты микробиологического исследования представлены в Приложении А3.

5.5 Результаты доклинических исследований in vivo антибиотикосодержащего кальцийфосфатного матрикса

Резорбируемость и антимикробная активность пористых кальцийфосфатных матриксов была исследована в экспериментах in vivo на самцах крысы линии Wistar в модели костной перфорации большеберцовой кости с предварительно созданным гнойно-септическим воспалением, подтвержденным с помощью морфологического исследования биоптатов, взятых до имплантации матриксов.

Гнойно-септическое воспаление было создано инокуляцией золотистого стафилококка в костномозговой канал крысы линии Wistar. В исследовании использовались 3 животных. Контроль воспаления проводился с помощью гистологического исследования биоптата. В биоптате были обнаружены мелкие некротизированные фрагменты кости, полностью лишённые остецитов и окруженные воспалительным инфильтратом (рисунок 5.26). При окраске пикросириусом и поляризационной микроскопии в некротизированных фрагментах кости полностью отсутствует анизотропия (рисунок 5.26 б).

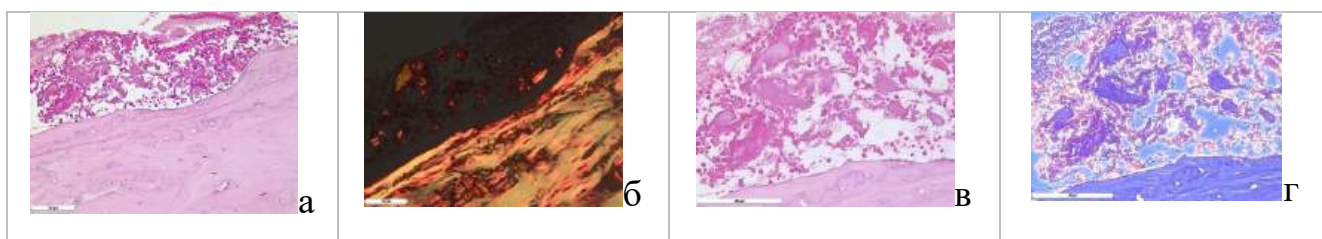


Рисунок 5.26 – Некротизированные костные фрагменты в биоптатах: а, в – светлопольная микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в, г), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – X200; в, г – X400

Для определения антибактериальной активности разработанные матриксы устанавливались в костные перфорации критического размера: в одно животное устанавливались матрикс без ванкомицина (контроль) и матрикс с ванкомицином (опыт) в разные конечности с целью сравнения.

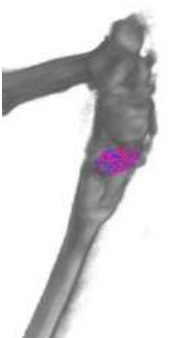
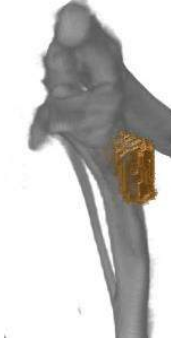
Через 3 мес. после имплантации в соответствии с результатами микро-КТ исследований, происходит частичная резорбция матрикса и образование новой костной ткани (таблица 5.13). На рисунках 5.27, 5.28 представлены по одному примеру ортогональных проекций зон интереса в контрольном и опытном исследовании.

Резорбция матрикса в среднем по трем животным составляет 11 % в контрольной группе и 37 % в опытной к трем месяцам имплантации.

Согласно морфологическому исследованию через 3 мес. после имплантации матриксов, во всех контрольных образцах выявляются некротизированные костные фрагменты, лишенные клеточных элементов, с разрыхленным и разволокненным костным матриксом (таблица 5.14). В области поражения наблюдаются крупные участки фиброзной соединительной ткани с выраженной воспалительной инфильтрацией (лимфоциты, макрофаги, нейтрофилы) и местами с усиленной васкуляризацией. В отличие от нормальной кости некротизированная кость неравномерно окрашивается гематоксилин-эозином, при фазово-контрастной микроскопии ее тонкая волокнистая структура не видна, при окраске пикросириусом и поляризационной микроскопии в ней отсутствует анизотропия. Некротизированные участки кости часто окружены воспалительным

инфильтратом и фиброзной соединительной тканью с выраженной лимфо-макрофагальной инфильтрацией.

Таблица 5.13 – Объем имплантата и 3D-модели большеберцовой кости лабораторного животного, созданного по результатам КТ

	Контроль (ванкомицин отсутствует)		Опыт (содержание ванкомицина 1505–2015 мкг)	
Срок имплантации, сут.	0	90	0	90
Объем матрикса, мм ³	39,72	39,10	32,35	23,56
	21,14	17,00	35,55	23,40
	31,12	28,98	31,01	13,27
3D-модели с визуализацией матрикса				
				
				
				
				

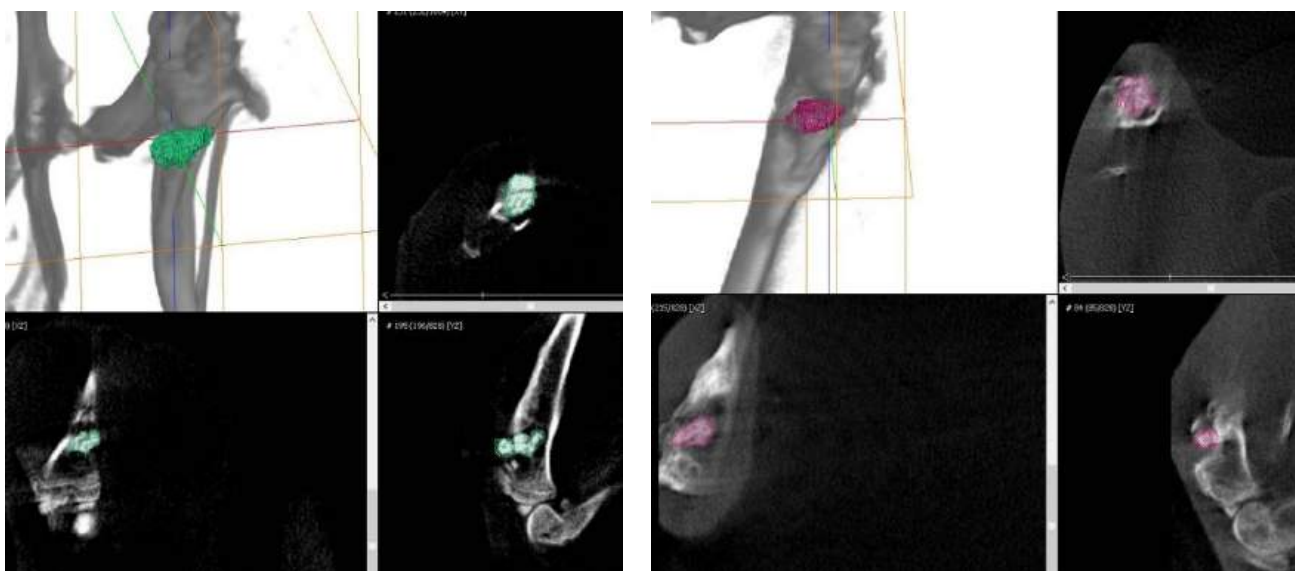


Рисунок 5.27 – Ортогональные проекции зоны интереса в контрольном исследовании, на сут.: а – 0; б – 90

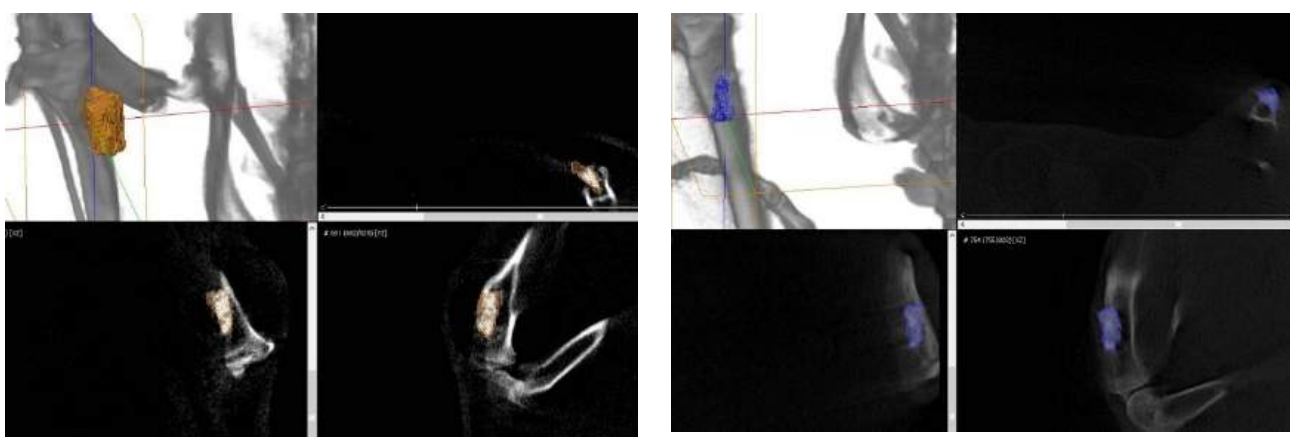
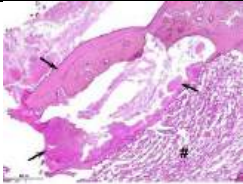
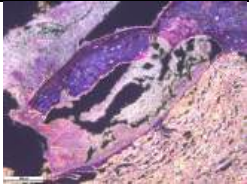
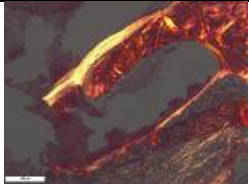
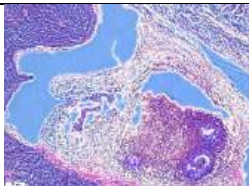
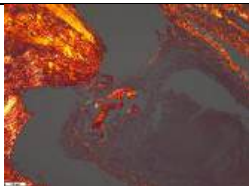
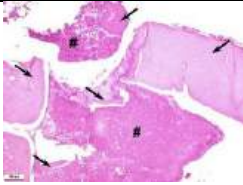
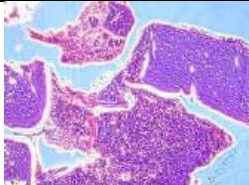
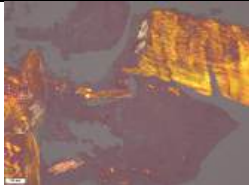
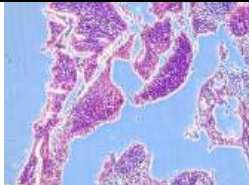
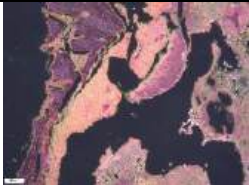
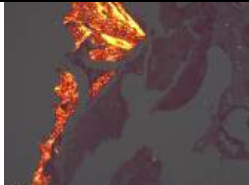
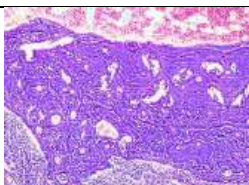
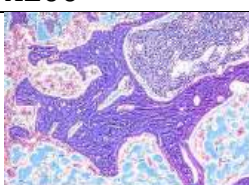
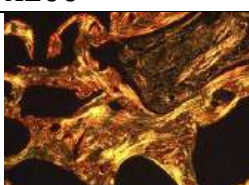


Рисунок 5.28 – Ортогональные проекции зоны интереса в опытном исследовании на сут.: а – 0; б – 90

Лечение развившегося гнойно-воспалительного процесса матриксами, полученными по цементной технологии, содержащими ванкомицин, дает положительный результат, большая часть костной ткани имеет нормальное строение и лишь небольшие участки кости подвергаются некрозу, хотя в образцах и сохраняется выраженная воспалительная инфильтрация.

Таблица 5.14 – Микроструктура морфологического исследования цемента

Вид микроскопии	Стандартная световая (окраска гематоксилином-эозином)	Фазово-контрастная (окраска гематоксилином-эозином)	Темного поля (гематоксилином-эозином)	Поляризационная (окраска пикросириусом красным)
Контроль	 x200	 x200	 x200	 x200
	 x200	 x200	 x200	 x200
	 x100	 x100	 x100	 x100
Опыт	 x100	 x100	 x100	 x100
	 x200	 x200	 x200	 x200
	 x200	 x200	 x200	 x200
Стрелками обозначены некротизированные костные фрагменты, решёткой – окружающая их фиброзная ткань с воспалительным инфильтратом, звездочкой – компактная костная ткань нормальной структуры				

5.6 Выводы

1. Рифампицин и ванкомицин, введенные в сухую цементную смесь, не теряют антибактериальную активность при разработанной технологии получения макропористых блоков и не влияют на структурообразование и свойства цементного камня.
2. Внесение антибиотиков в кальцийфосфатный матрикс – эффективный способ лечения септических воспалений костной ткани в соответствии с результатами исследований *in vivo*.
3. Увеличение количества метастабильной фазы дикальцийфосфата дигидрата в составе цементного камня увеличивает скорость выхода антибиотика, снижая время его воздействия.
4. Скорость резорбции в условиях закисления окружающей среды при септическом воспалении составов, содержащих карбонат кальция в качестве наполнителя в цементном камне, превосходит скорость формирования новообразованной костной ткани за счет большой разности в значениях pH.
5. Внесение в состав смеси исходных компонентов лиофилизата ванкомицина гидрохлорида на стадии получения пористого кальцийфосфатного матрикса пролонгирует его выход, и зависит от концентрации антибиотика и пористости матрикса: к 24 часам элюирует $\approx 11-14\%$ антибиотика из матриксов составов, образованных экстракцией 30 мас.% полиэтиленгликоля, $\approx 14-17\%$ - 40 мас.% и $\approx 16-27\%$ - 50 мас.%.
6. Выход адсорбированного и свободного антибиотика происходит за счет диффузии и соответствует модели Хигучи в первые 7 часов и приближена к модели Корсмейера-Пеппаса.
7. Микробиологическая эффективность антибиотикосодержащих макропористых матриксов на основе цемента после экстракции 30 мас. % гранул полиэтиленгликоля при концентрации ванкомицина 250 – 300 мг на 3 см³ матриксов высока в течение 17 суток в отношении золотистого стафилококка и 22 суток в отношении кишечной палочки. Увеличение пористости за счет увеличения концентрации гранул полиэтиленгликоля до 50 мас. % увеличивает скорость

выхода антибиотика, в связи с чем эффективность высока в течение 9 суток в отношении золотистого стафилококка и 4 суток в отношении кишечной палочки.

8. Кальцийфосфатный цемент с инкорпорированным ванкомицином при костной имплантации является терапевтически эффективным носителем субстанции при заживлении костного дефекта в условиях окружающего септического воспаления и может использоваться в качестве носителя для проведения антибактериальной терапии локально, в месте имплантации.

6 ВЫСОКОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ БРУШИТНО-НЬЮБЕРИТНЫЕ ЦЕМЕНТЫ С РЕГУЛИРУЕМОЙ СКОРОСТЬЮ РЕЗОРБЦИИ

Брушитовый цемент – резорбируемый цемент, получаемый взаимодействием β -трикальцийфосфата (β -ТКФ) и моногидрата монокальцийфосфата (МКФМ) с образованием метастабильной фазы дикальцийфосфата дигидрата $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ при физиологических условиях. Благодаря метастабильности брушитный цемент обладает высокой скоростью резорбции и высоким потенциалом как в качестве материала для замещения костной ткани, так и в качестве носителя фармацевтических субстанций.

Известно, что присутствие биоактивного иона Mg^{2+} в структуре фосфатов кальция играет существенную роль в биологическом процессе и стимулирует формирование кости. Магний является облигатным кофактором щелочной фосфатазы и многих ферментативных реакций, участвует в синтезе костного коллагена в клеточной пролиферации и дифференцировке, взаимодействии клетки с матриксом и нормальном функционировании органов. Одной из важных особенностей присутствия иона магния Mg^{2+} в составе брушита при замещении иона кальция Ca^{2+} является стабилизация фазового состава, поскольку магний действует как сильный ингибитор роста кристаллов менее растворимых фосфатов кальция, в связи с чем не происходит перекристаллизация магний-кальцийфосфатного цементного камня со временем, как это происходит с брушитом при длительном эксперименте *in vivo*, что сохраняет высокую скорость резорбции.

Помимо ионного замещения скорость резорбции может быть повышена, также, как в случае с гидроксиапатитовым цементом, созданием многофазного продукта, с различной скоростью резорбции фаз. Увеличение скорости резорбции возможно и за счет образования дополнительной фазы ньюберита $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, помимо основной фазы брушита $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Ньюберит образуется в составе цемента при введении высоких концентраций ионов Mg^{2+} . Растворимость

ньюберита при 25°C $-\log(K_{sp})$ составляет 5,51–5,82, тогда как растворимость брушита $-\log(K_{sp}) = 6,59$.

Однако лабильность брушита и ньюберита и их низкие значения pH могут оказывать отрицательное влияние на активное начало антибиотика [286] и наоборот, антибиотик может оказывать влияние на зародышеобразование, рост кристаллов [289]. Сообщается об очень незначительном количестве исследований, касающихся возможности использования магнийсодержащего брушитового цемента в качестве носителя фармсубстанций, но ни одно из них не сосредоточено на изучении влияния ванкомицина на свойства Mg-замещенных брушитовых или брушитно-ньюберитных цементах, эффективность их в качестве носителей антибактериальных субстанций не была ранее представлена в научной литературе. Поэтому исследование возможности использования брушитно-ньюберитных цементах в качестве носителей ванкомицина для лечения ортопедических инфекций является важным вопросом при создании линейки резорбируемых остеопластических материалов.

Задачей исследования является разработка технологии получения высокорезорбируемых брушитно-ньюберитных цементах, выявление закономерности свойств и кинетических особенностей деградации от исходного состава, а также исследование возможности использования брушитно-ньюберитных цементах в качестве носителей ванкомицина для лечения ортопедических инфекций.

6.1 Технология получения брушитно-ньюберитных цементах

В соответствии с непредставленными в данной работе исследованиями¹ размер частиц и температура обжига прекурсора влияет на свойства цементного камня. При понижении температуры обжига для получения β -ТКФ с 1100 до

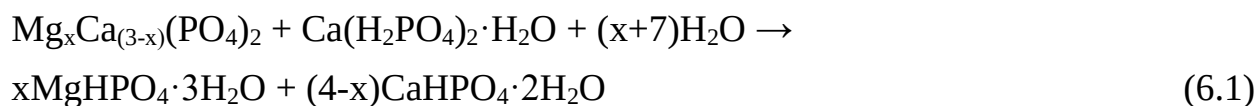
¹ Lukina Y., Kotov S., Senyagin A., Bionyshev-Abramov L., Serejnikova N., Chelmodeev R., Tavgorkin A., Ryndyk M., Smolentsev D., Sivkov S., Safronova T. Composite brushite-monetite-newberyite cements loaded with vancomycin and their efficiency against infections of: In vitro and in vivo research// Open Ceramics. 2024. V. 17. P. 1.

Lukina Y., Kotov S., Bionyshev-Abramov L., Serejnikova N., Chelmodeev R., Fadeev R., Toshev O., Tavgorkin A., Ryndyk M., Smolentsev D., Gavryushenko N., Sivkov S. Low-Temperature Magnesium Calcium Phosphate Ceramics with Adjustable Resorption Rate // Ceramics. 2023. V. 6. P. 168–194.

1000 °С снижается кристалличность, повышается водопотребность, реакционная способность, уменьшаются сроки схватывания. В связи с этим при маленьком размере частиц (≈ 6 мкм) требуются высокие концентрации добавок-замедлителей схватывания, которые, вероятно, образуют на поверхности частиц малорастворимые соединения и снижают полноту протекания реакции, что отрицательно влияет на свойства цемента. При температуре 1100°С и размере частиц более 40 мкм добавки-замедлители не требуются, однако конечный фазовый состав цементов содержит большое количество исходных непрореагировавших компонентов при использовании цементного теста нормальной густоты.

Оптимальными для получения материалов, подходящих по свойствам в качестве остеокондуктивного матрикса, были выбраны температура обжига прекурсора 1000 °С и размер частиц 10–20 мкм.

Магний-кальцийфосфатный цемент получали при кислотнo-щелoчном взаимодействии путем смешивания синтезированного $Mg_xCa_{(3-x)}(PO_4)_2$ ($x=0-3$ – композиции Mg_0 , $Mg_{0.75}$, $Mg_{1.5}$, $Mg_{2.25}$, Mg_3) и монокальцийфосфата моногидрата $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ в соотношении 55/45 мас. % с жидкостью затворения в соответствии с реакцией:



Ванкомицин инкорпорирован путем введения 100 мг порошка фармацевтической субстанции на 1 г сухого цементного порошка перед его увлажнением. Водотвердое соотношение (В/Т) не учитывает ванкомицин.

Для формования цементов в виде блоков или гранул необходимо предотвратить раннее схватывание. Начало схватывания должно быть в 3–4 мин. Время схватывания бездобавочных брушитно-ньюберитных цементов составляет чаще всего менее 1 мин. В качестве добавок - замедлителей процесса гидратации использовались пирофосфат натрия гексагидрата (SPP) и моногидрат лимонной

кислоты (СА). Добавки вводились в виде раствора совместно. Соотношение жидкость/порошок = 0,6 мл/г.

Составы цементов указаны в Таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Составы цементов

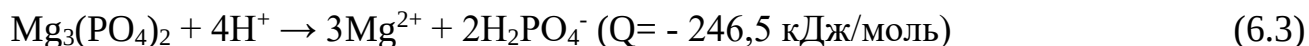
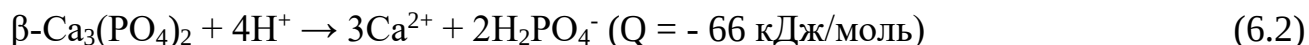
Состав	Компонент 1, 55 мас.%	Компонент 2, 45 мас.%	Ванко- мицин, 10 мас.%*	Жидкость затворения
C-Mg0	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	–	0,11M СА + 0,044 M SPP
C-Mg0.75	$\text{Mg}_{0,75}\text{Ca}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	–	0,12M СА + 0,055 M SPP
C-Mg1.5	$\text{Mg}_{1,5}\text{Ca}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	–	0,2M СА + 0,066 M SPP
C-Mg2.25	$\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	–	0,2M СА + 0,066 M SPP
C-Mg3	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	–	–
C-Mg0+V	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	+	0,11M СА + 0,044 M SPP
C-Mg0.75+V	$\text{Mg}_{0,75}\text{Ca}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	+	0,12M СА + 0,055 M SPP
C-Mg1.5+V	$\text{Mg}_{1,5}\text{Ca}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	+	0,2M СА + 0,066 M SPP
C-Mg2.25+V	$\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	+	0,2M СА + 0,066 M SPP
C-Mg3+V	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	+	–

*сверх массы цементного порошка

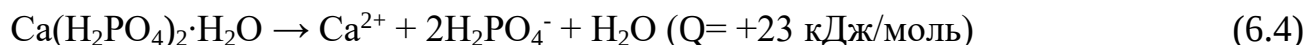
В ходе кислотно-основного взаимодействия происходит образование кристаллогидратов брушита и ньюберита с выделением тепла. Основные реакции образования цементного камня – растворение частиц монокальцийфосфата моногидрата, $\text{Mg}_x\text{Ca}_{3-x}(\text{PO}_4)_2$ и образование конечных продуктов гидратации.

Повышение тепловыделения характерно для всех составов, что говорит о протекании экзотермической реакции. По данным энтальпий образования можно сделать вывод о том, что реакции растворения $\text{Mg}_x\text{Ca}_{3-x}(\text{PO}_4)_2$ и образования брушита и ньюберита экзотермические, а растворения монокальцийфосфата моногидрата – эндотермическая.

Растворение β -трикальцийфосфата и тримагнийфосфата сопровождается выделением тепла:

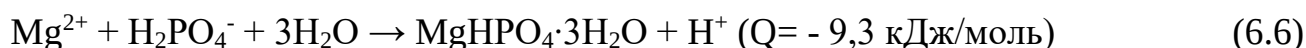
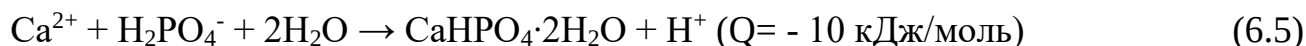


Растворение моногидрата монокальцийфосфата проходит с поглощением тепла:

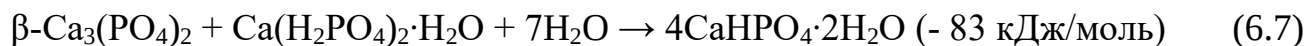


Эндотермический пик не наблюдается на кривых тепловыделения в связи с тем, что процессы проходят практически одновременно.

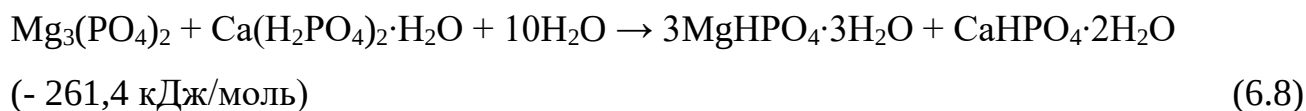
Образование брушита и ньюберита проходит с выделением тепла:



Общее тепловыделение представляет собой суммарное тепловыделение трех реакций при взаимодействии β -ТКФ с МКФМ = (реакция (6.2) + реакция (6.4) + 4 · реакция (6.5):



Общее тепловыделение представляет собой суммарное тепловыделение трех реакций при взаимодействии ТМФ с МКФМ = (реакция (6.3) + реакция (6.4) + 3 · реакция (6.6) + реакция (6.5):



Следовательно, образование цемента проходит с выделением тепла, в связи с чем наблюдается пик на кривой тепловой мощности каждого состава (рисунок 6.1).

Наиболее крупные экзотермические пики характерны для составов С-Mg3 и С-Mg3+V, что подтверждает более высокую реакционную способность этих составов по сравнению с другими.

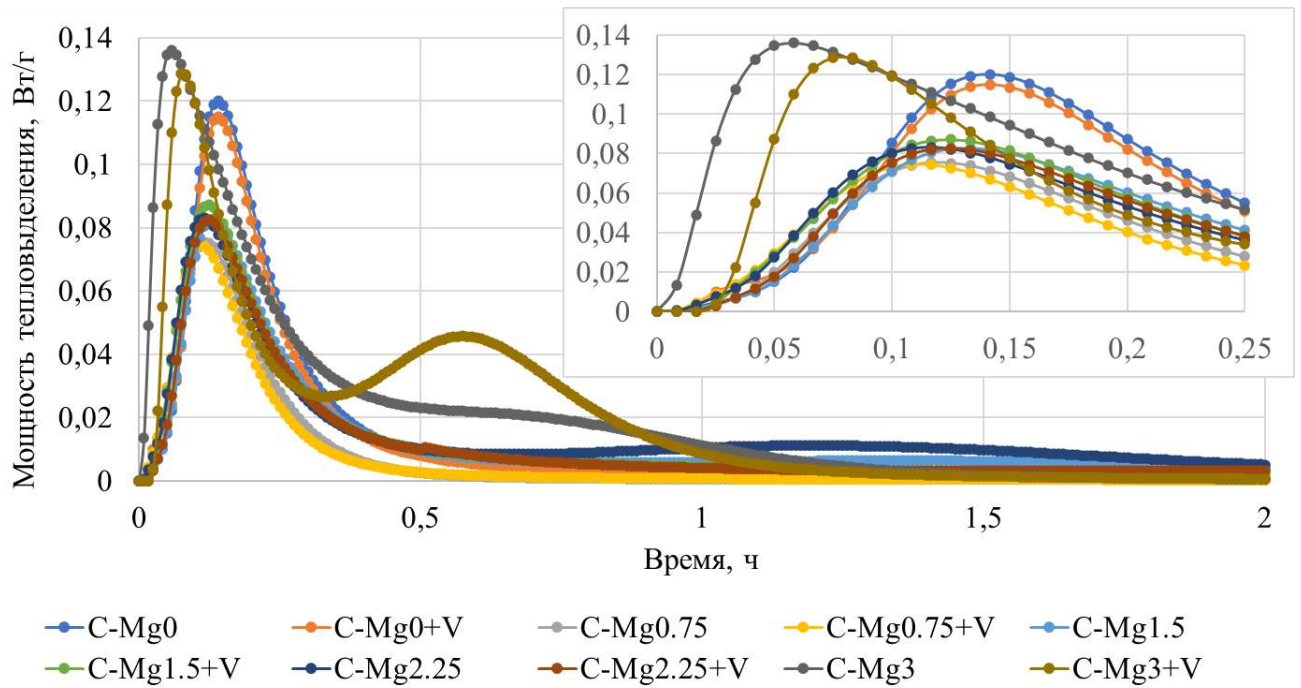


Рисунок 6.1 – Тепловыделение цемента

В процессе структурообразования этапы растворения и образования новых фаз накладываются между собой, в связи с чем на графиках изменения тепловой мощности от времени наблюдается один большой пик, максимум которого приходится на время от 3 до 8,5 мин. для разных составов. Скорость повышения тепловыделения в первые минуты после затворения водой связана в большей степени с растворением исходных веществ. Наиболее крупные экзотермические пики составов C-Mg3 и C-Mg3+V приходятся на 3–4 мин. и обусловлены высоким тепловыделением при растворении $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$. Схватывание цементов указанных составов происходит примерно при достижении максимума тепловой мощности (таблица 6.2). Скорость растворения $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ выше скорости растворения $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, что смещает пики на более раннее время по сравнению с другими составами. Однако спад тепловыделения происходит с меньшей скоростью и на паттернах кривых тепловыделения и на 35–45 мин. приходятся максимумы вторых пиков, что говорит о продолжающемся структурообразовании. Но на нашем мнению вторые пики могут быть связаны с разрушением оболочек из новообразованных кристаллов на частицах исходных фосфатов и продолжением активного процесса

взаимодействия, и образованием ньюберита. Второй пик характерен и для других составов, но он ниже и смещен по оси времени в сторону больших значений.

На графиках кривых тепловыделения от времени всех промежуточных составов от C-Mg0.75 до C-Mg2.25 рост тепловыделения практически совпадает с ростом тепловыделения составов C-Mg0 и C-Mg0+V, а падение смещается на более ранние сроки, что связано с действием ингибиторов схватывания, которые уменьшают ζ -потенциал поверхности и образуют плохорастворимые пленки гидратов пирофосфатов, препятствующих растворению фосфатов кальция и магния.

Вероятно, на ранних сроках после затворения водой растворяются исходные компоненты, что и определяет столь быстрое повышение тепловой мощности до начала схватывания этого вида цемента (таблица 6.2). Наличие ванкомицина сдвигает экзотермический пик с 3 на 4 мин. Для составов C-Mg0 и C-Mg0+V статистически значимой разницы в паттернах тепловой мощности не наблюдали. Экзотермические пики этих составов наблюдаются намного позже, чем у составов C-Mg3 и C-Mg3+V и приходятся на 8.5 мин. Для всех промежуточных составов, содержащих и не содержащих ванкомицин, характерен максимум тепловыделения через 7–7,5 мин. после затворения. Статистической разницы между значениями пиков промежуточных составов не наблюдали.

Таблица 6.2 – Сроки схватывания цементов

	C-Mg0		C-Mg0,75		C-Mg1,5		C-Mg2,25		C-Mg3	
	начало	конец	начало	конец	начало	конец	начало	конец	начало	конец
Время, мин.:сек.	4:00	4:40	3:15	4:45	3:45	4:45	3:50	5:30	3:00	8:00

Паттерн кривой изменения тепловой мощности зависит не только от термодинамических характеристик самих веществ, но и от ингибиторов схватывания, которые, вероятно, уменьшают и смещают по шкале времени пики тепловыделения.

Несмотря на меньшую концентрацию ингибиторов схватывания у составов C-Mg0 и C-Mg0+V по сравнению с другими составами, за исключением C-Mg3 и

C-Mg₃+V, экзотермические пики приходятся на немного более позднее время, сроки схватывания также незначительно больше. Это может быть связано с большим влиянием добавок импрегнаторов на растворение β-ТКФ в сравнении с более растворимым тримагнийфосфатом.

Общее тепловыделение при наличии ванкомицина в составе незначительно снижается (таблица 6.3). Это не связано с действием самого антибиотика, но связано с использованием одинакового количества жидкости к массе сухой цементной смеси, тогда как ванкомицин добавлялся сверх массы цементной смеси, что уменьшало В/Т всей порошковой смеси. При уменьшении Са/Mg цемента, увеличивается общее тепловыделение. Исключение составляют составы C-Mg_{0.75} и C-Mg_{0.75}+V, суммарное тепловыделение которых значительно ниже других составов.

Таблица 6.3 – Общее тепловыделение цементов

Состав	Общее тепловыделение, Дж/г
C-Mg ₀	103,5*±0,9
C-Mg ₀ +V	99,6±1,5
C-Mg _{0.75}	60,0*±0,5
C-Mg _{0.75} +V	57,4±0,4
C-Mg _{1.5}	123,2*±1,6
C-Mg _{1.5} +V	118,2±0,8
C-Mg _{2.25}	142,6*±0,4
C-Mg _{2.25} +V	136,2±1,1
C-Mg ₃	161,1*±0,8
C-Mg ₃ +V	157,4±1,5

*—значимые отличия

Второй экзотермический пик наблюдается у составов C-Mg₃, C-Mg₃+V, менее значительный и более поздно появляющийся – у состава C-Mg_{2.25}. Второй пик связан, предположительно, с образованием продуктов взаимодействия, тогда как первый – с растворением исходных компонентов. При низком содержании ионов магния, оба пика сливаются в единый пик. При образовании ньюберита наступает более позднее образование кристаллов в связи с более высокой растворимостью ньюберита. Необходимо достижение пересыщения раствора по

отношению к ньюбериту, на что требуется больше времени. Наличие более высокого второго пика при использовании состава с ванкомицином, где жидкости затворения меньше, укладывается в предложенный механизм.

Высокое тепловыделение обуславливается высокой реакционной способностью $\text{Mg}_x\text{Ca}_{3-x}(\text{PO}_4)_2$ и, в связи с этим, при использовании $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в качестве конечного компонента помимо брусита $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (72-0713 PDF-2), образуется монетит CaHPO_4 (70-0359 PDF-2). Это подтверждается данными рентгенофазового анализа цементного камня, выполненного после 7 сут. твердения образцов во влажных условиях (рисунок 6.2).

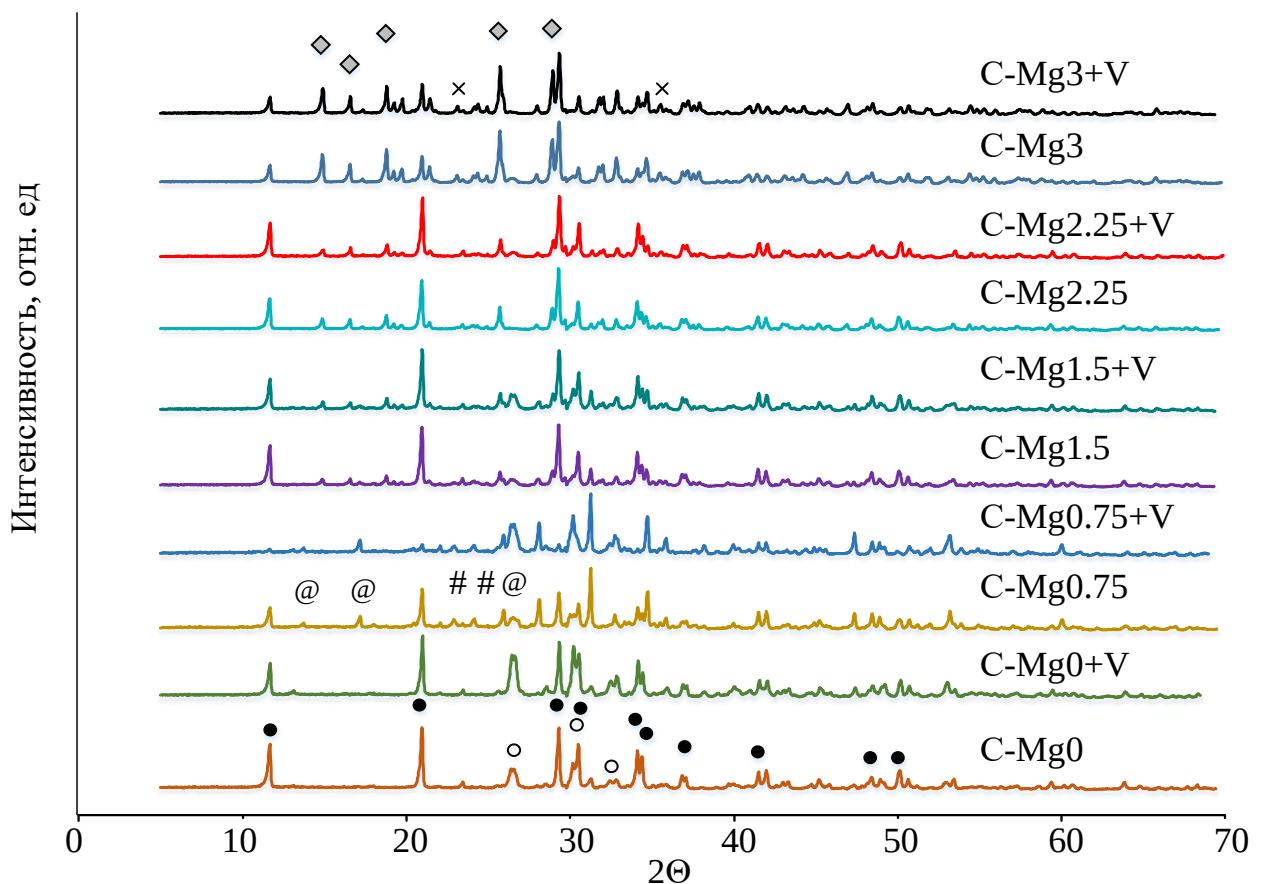
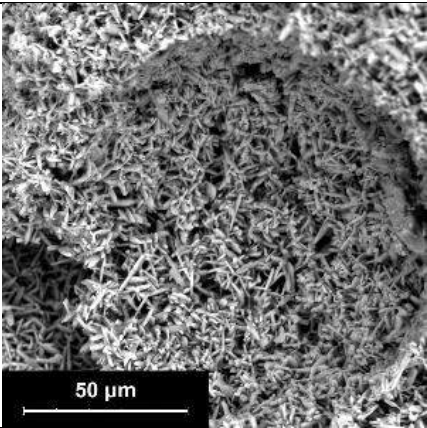
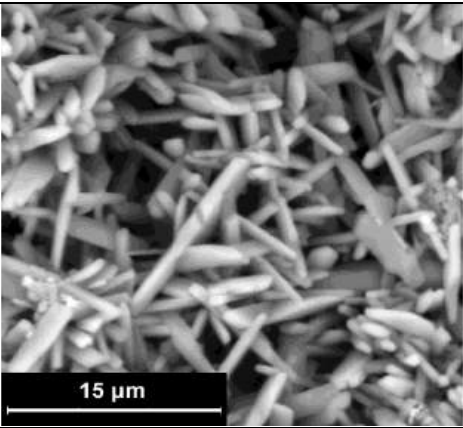
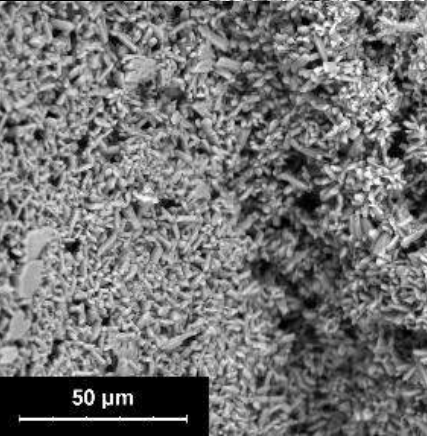
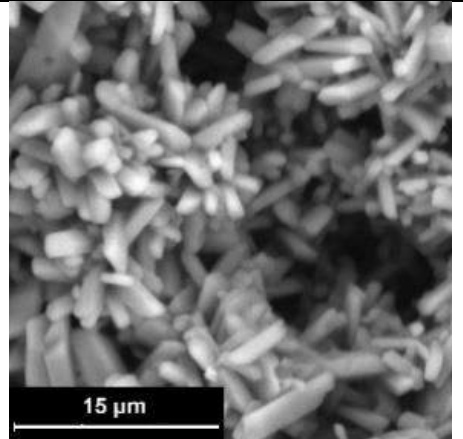
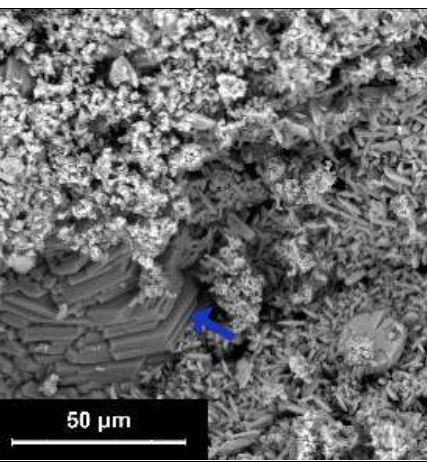
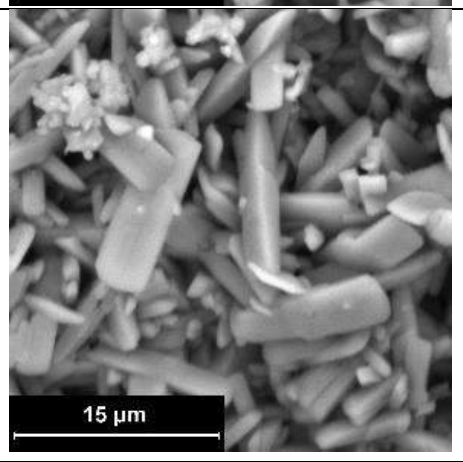
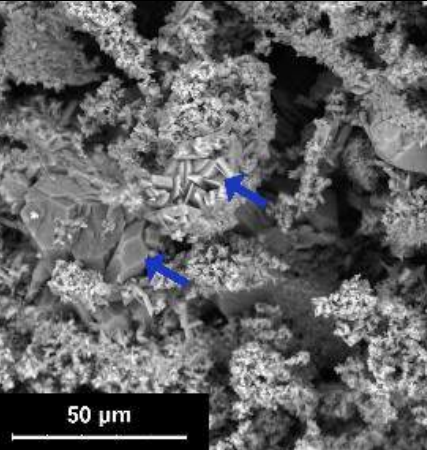
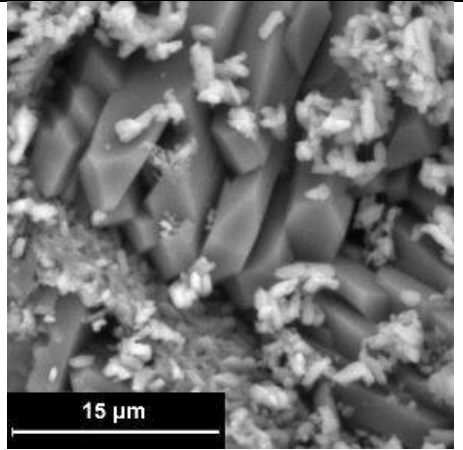


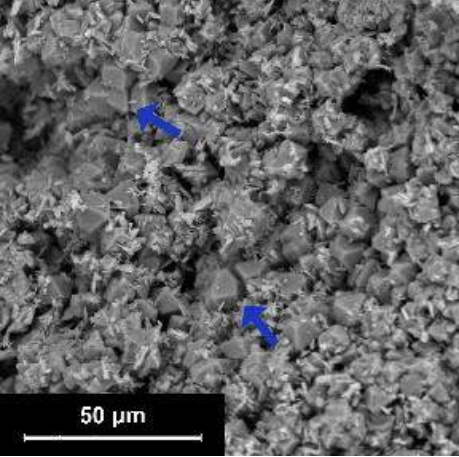
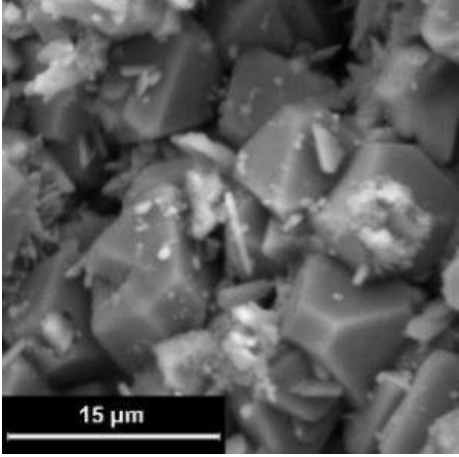
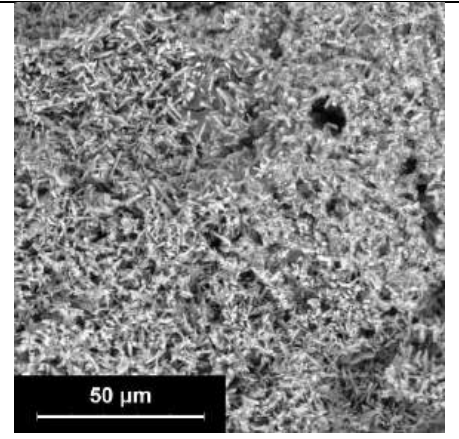
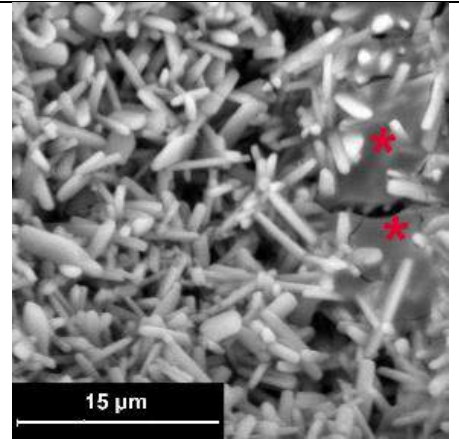
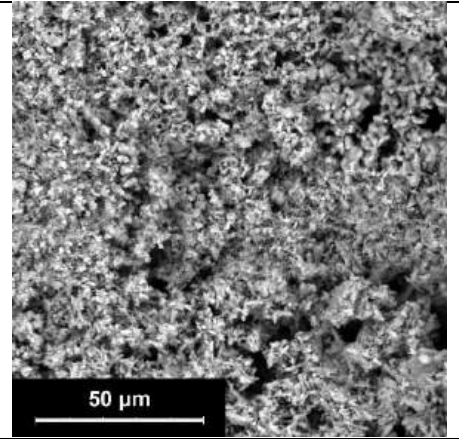
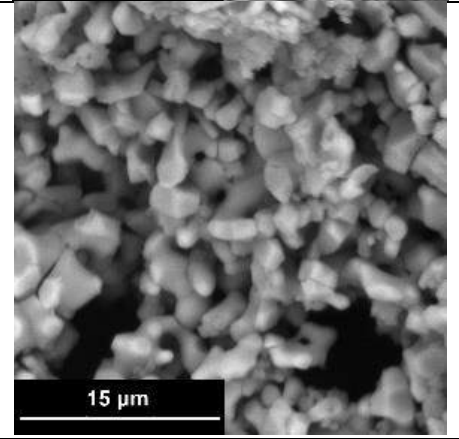
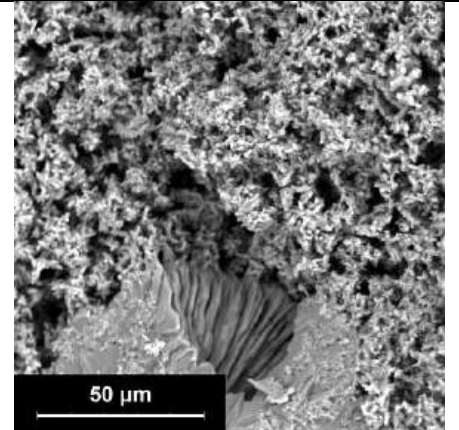
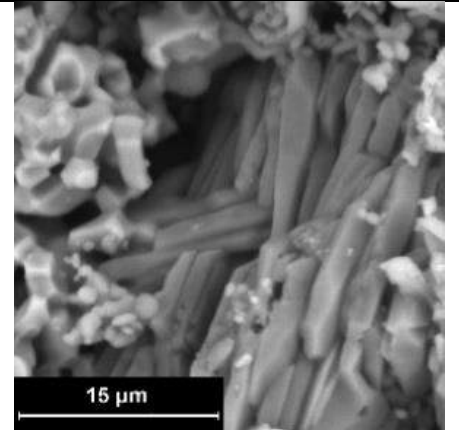
Рисунок 6.2 – Дифрактограммы цемента:

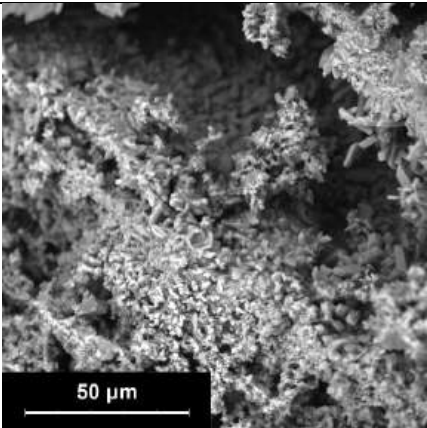
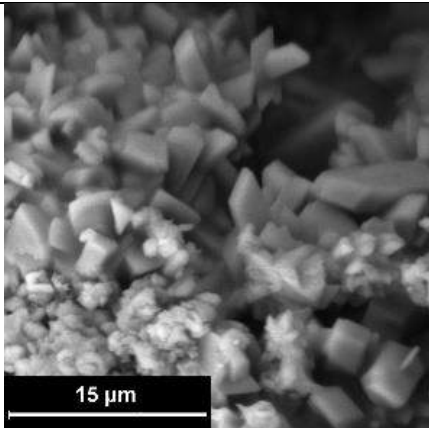
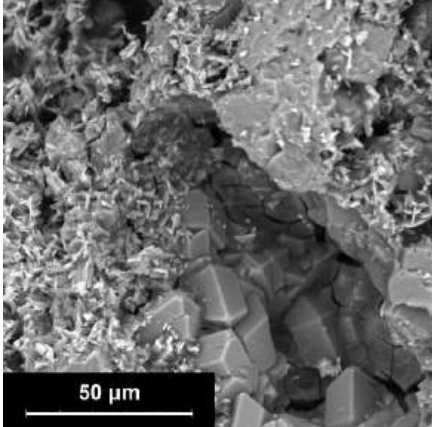
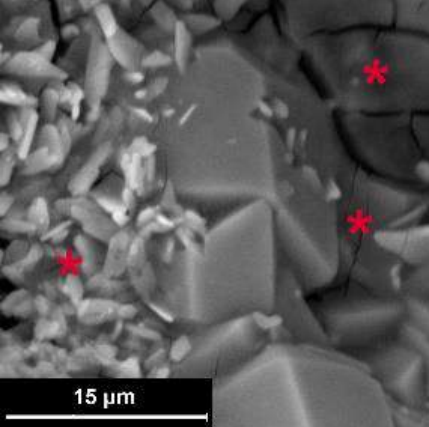
● $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; ○ CaHPO_4 ; ◆ $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; × $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$;
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; @ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Микроструктура такого цемента представлена преимущественно остроугольными пластинчатыми кристаллами брусита и монетита длиной преимущественно 10–15 мкм, шириной 2–3 мкм, толщиной менее 1 мкм (таблица 6.4).

Таблица 6.4 – Микроструктура цементного камня

Состав	Увеличение x2500	Увеличение x10000
C-Mg0		
C-Mg0.75		
C-Mg1.5		
C-Mg2.25		

Состав	Увеличение x2500	Увеличение x10000
C-Mg3		
C-Mg0+V		
C-Mg0.75+V		
C-Mg1.5+V		

Состав	Увеличение x2500	Увеличение x10000
C-Mg _{2.25} +V		
C-Mg ₃ +V		

В составе цементов C-Mg_{0.75}, C-Mg_{1.5}, C-Mg_{2.25} и C-Mg₃ помимо фаз $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и CaHPO_4 присутствует ньюберит $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (72-0023 PDF-2). Введение в состав ванкомицина незначительно увеличивает содержание монетита, что связано с тратой жидкости затворения на смачивание порошка антибиотика и меньшее его включение в реакцию гидратации (рисунок 6.3). Количество ньюберита, согласно расчету по корундовым числам, имеет незначительно ниже значения, чем прогнозируемые: 18, 36, 55 и 69 %.

Согласно РФА, при использовании $\text{Mg}_{0.75}\text{Ca}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$ в составе цементного камня обнаруживаются исходные компоненты, т.е. для этого состава характерна неполнота протекания реакции. Это может быть связано с более высокой стабильностью $\text{Mg}_{0.75}\text{Ca}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$ по сравнению с $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и, соответственно, меньшей растворимостью. Снижение растворимости наблюдалось и в работе Saleh et.al., которые получили цемент на основе ТКФ, допированного ионами магния в количестве 11 мол. % [131]. Конец схватывания такого цемента составил 33 мин.

Авторы объясняют это повышением стабильности β -ТКФ за счет образования слоя типа витлокита $[(Ca\ Mg)_3(PO_4)_2]$ на поверхности.

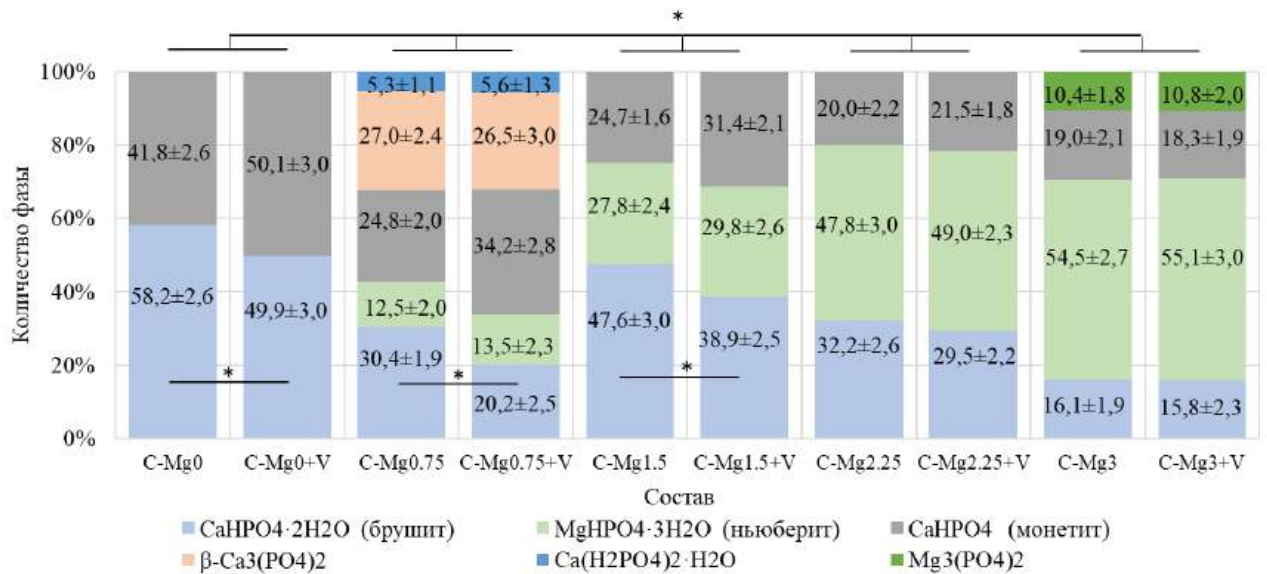


Рисунок 6.3 – Количественный фазовый состав цементов. Значимые отличия обозначены * ($p < 0,05$)

В соответствии с литературными данными максимальное количество магния, способного заменить кальций в положениях Ca(4) и Ca(5) в структуре β -ТКФ составляет 14-15 мол. % [371–373]. В данной работе магний замещает кальций в количестве 25 мол. % в случае с $Mg_{0.75}Ca_{2.25}(PO_4)_2$. В связи с этим образуется не только магний-допированный ТКФ, но и стенфилдит. При получении брушита, видимо, наличие стенфилдита ускоряет схватывание цемента. Введение ингибиторов регулирует растворимость исходных компонентов, в том числе магний-допированный ТКФ, что приводит к незавершенности реакции. Общее тепловыделение при образовании цементного камня C-Mg0.75 и C-Mg0.75+V ниже, чем у других составов, что также может указывать на низкую реакционную способность исходных компонентов и неполноту протекания реакции.

При введении ионов магния в структуру брушита путем ионного замещения кристаллы цементного камня уменьшаются в длине до менее 10 мкм, остроугольность пропадает. Кристаллы цементного камня представляют собой призматические (в форме параллелепипедов) кристаллы толщиной около 2 мкм.

Встречаются редкие призматические кристаллы большого размера, представляющие собой треугольные призмы (таблица 6.4).

Добавки-ингибиторы увеличивают сроки схватывания цемента и их требуется больше при увеличении концентрации ионов магния в прекурсор. Это может быть связано с более высокой растворимостью $Mg_3(PO_4)_2$ ($-\log(K_{sp}) = 13$), по сравнению с растворимостью $Ca_3(PO_4)_2$ ($-\log(K_{sp}) = 28,9$). Следовательно, добавки оказывают влияние на растворимость исходных компонентов. Однако сроки схватывания определяются не только растворением исходных компонентов, но и образованием продуктов реакции, что также зависит от их растворимости. Поскольку растворимость ньюберита выше ($-\log(K_{sp}) = 5.51-5.82$), чем брушита ($-\log(K_{sp}) = 6.59$) или монетита ($-\log(K_{sp}) = 6.90$), необходима более высокая концентрация ионов для образования кристаллогидратов. На кривых тепловыделения видны отдельные пики при больших концентрациях магния в составах прекурсора. Bohner et.al. предположили, что во время реакции отверждения при введении ингибиторов могут возникнуть два экзотермических пика: 1 – растворение β -ТКФ и МКФМ и 2 – осаждение ДКФД [133]. В соответствии с результатами калориметрического исследования максимумы тепловой мощности для составов С- Mg0 и С-Mg0+V наступают позже конца схватывания, что подтверждает параллельность процессов образование брушита и растворения исходных компонентов.

На кривых тепловыделения видны отдельные пики при больших концентрациях магния в составах прекурсора, для составов С-Mg3 и С-Mg3+V отчетливо наблюдается второй пик, который может быть связан с дальнейшим образованием ньюберита в ходе разрушения оболочек, образованных осаждением кристаллов конечных фаз на поверхности исходных частиц в связи с ростом кристаллов. Ньюберит в указанных составах представлен кристаллами дипирамидальной формы с двумя усеченными вершинами, которые являются характерными для искусственно полученных кристаллов ньюберита (таблица 6.4).

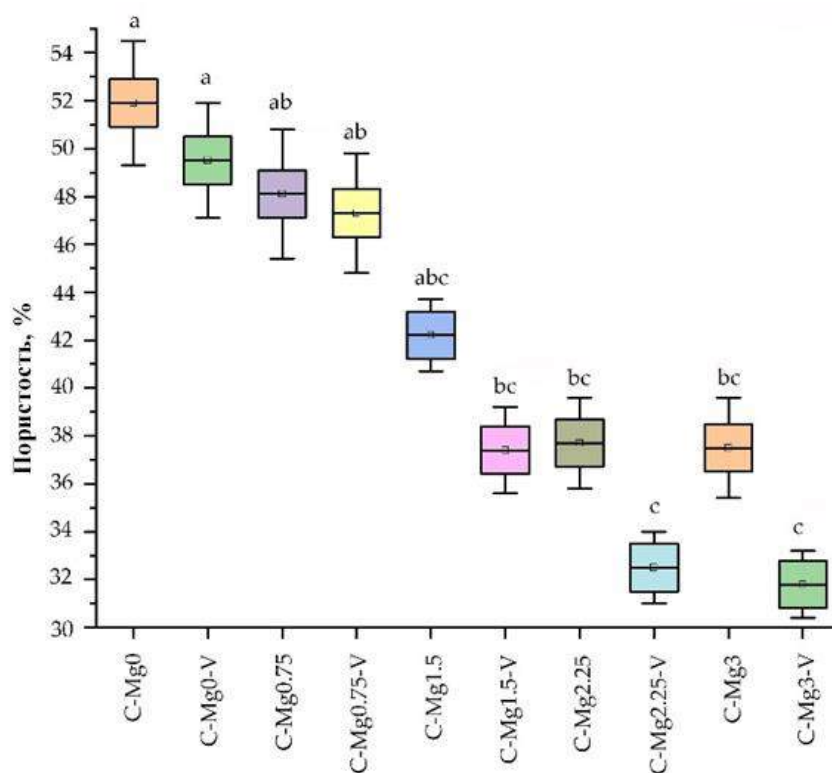
Необходимо заметить, что в других составах, содержащих ньюберит, такая форма кристаллов не обнаруживается. Ньюберит образуется в виде тонкопластинчатых кристаллов. В составе С-Mg2.25 помимо тонкопластинчатых

кристаллов наблюдаются призматические кристаллы, близкие по форме к параллелепипедам длиной 15–20 мкм с усеченными вершинами. Это также кристаллы ньюберита, согласно литературным данным [132, 133, 225]. Кристаллы брушита в составе С-Mg_{2.25} располагаются между кристаллами ньюберита. Размер кристаллов брушита менее 2 мкм (таблица 6.4).

Ванкомицин практически не оказывает влияния на процесс гидратации и структурообразования цементного камня, что подтверждается данными как РФА, так и калориметрического исследования. Незначительное снижение количества фазы брушита и увеличения монетита связано с расходом части жидкости затворения на смачивание лиофилизата ванкомицина, как и незначительное снижение суммарного тепловыделения.

Ванкомицин не влияет на форму и размер кристаллов минеральных фаз. Он образует пленку, обволакивая кристаллы (обозначен звездочкой в таблице 6.4).

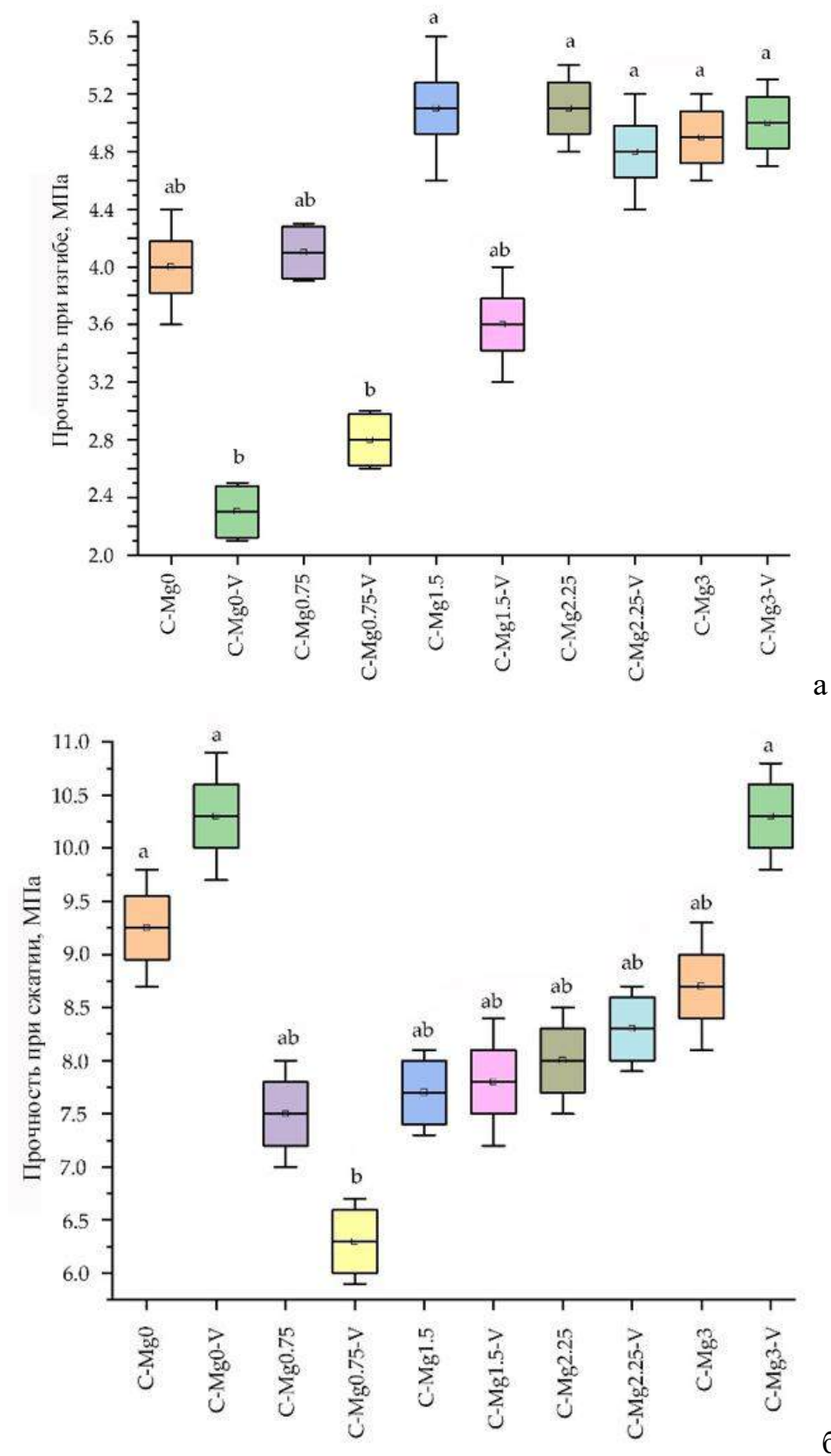
Количество ньюберита в конечном составе магнийкальцийфосфатных цементов влияет на свойства цементного камня. Пористость цемента, измеренная на 1-ые сут. после формования, выдержки при 37 °С при 100 % влажности и высушивания, уменьшается при увеличении количества магния в $Mg_xCa_{3-x}(PO_4)_2$ и, соответственно, ньюберита (рисунок 6.4). Значения пористости составов с ванкомицином меньше за счет образования пленок на внутренней поверхности затвердевшего цемента. Расхождение пористости антибактериальных составов и не антибактериальных увеличивается с увеличением количества магния в составе. Не все значения являются статистически значимыми, однако укладываются в общую тенденцию, которая может быть связана с увеличением внутренней структурной плотности цементного камня от С-Mg₀ до С-Mg₃ при одинаковом количестве ванкомицина в составах.



*тест Тьюки; значения, обозначенные разными буквами, существенно отличаются ($p < 0,05$)

Рисунок 6.4 – Пористость цементов на 1-ые сут. после формования, выдержки при 100 % влажности при 37 °С и высушивания

К брушитно-ньюберитным цементам, используемым в качестве остеопластических материалов и систем доставки фармацевтических субстанций, не предъявляются высокие требования по физико-механическим характеристикам, поскольку материалы используются как osteoconductors в местах, не несущих нагрузки. Все разработанные составы на 1-ые сут. после формования и выдержки при 100 % влажности при 37 °С с последующим высушиванием обладают прочностью спонгиозной кости (2–12 МПа на сжатие [30]) и могут быть использованы, однако высокая прочность предпочтительна в связи с лучшей сохранностью формы при заполнении дефектов костной ткани (рисунок 6.5).



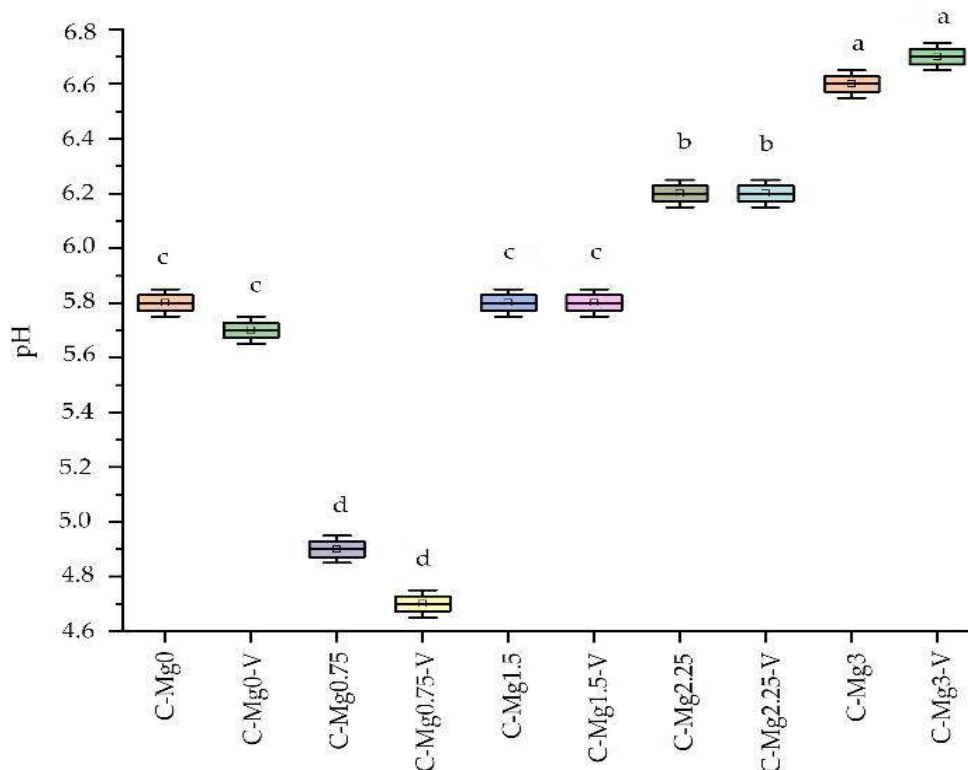
*тест Тьюки; значения, обозначенные разными буквами, существенно отличаются ($p < 0,05$)

Рисунок 6.5 – Механическая прочность цементов: а – при изгибе; б – при сжатии

Снижение прочности при сжатии при введении ионов магния в количестве 25 мол. % (C-Mg0.75) связано с небольшим изменением формы и уменьшением длины кристаллов цемента, а также с неполнотой протекания реакции. За счет этого уменьшается количество контактов между кристаллами. Alkhraisat, и др. [223] предположили, что снижение прочности возможно за счет снижением микротвердости из-за дефектности кристаллов, чего нельзя исключать и в нашем случае. Увеличение фазы ньюберита в конечном составе вызывает рост прочности. Большие кристаллы ньюберита уплотняют структуру, снижают пористость, упрочняют матрикс.

Наличие пленок ванкомицина снижают прочность на изгиб и увеличивают прочность на сжатие в незначительных пределах в большинстве составов.

Присутствие ньюберита в составе цементного камня оказывает положительное влияние на pH (рисунок 6.6).



*тест Тьюки; значения, обозначенные разными буквами, существенно отличаются ($p < 0,05$)

Рисунок 6.6 – pH контактной среды для цементов

Известно, что биоцемент брушитового типа обладает низкими значениями pH во время схватывания и твердения [133]. Равновесное значение pH контактной среды ($V = 10$ мл) для предварительно затвердевшего брушитового цемента в форме гранул диаметром 4 мм, высотой 2 мм ($V = 25,133 \text{ мм}^3$), в данном исследовании составляет 5,8. Значения pH увеличиваются при увеличении ньюберита в конечном составе и приближается к физиологическим значениям pH 7,2—7,4. Более низкие значения pH составов C-Mg0.75 и C-Mg0.75+V (4,7 и 4,9, соответственно), как сообщается в литературе, является незначительной проблемой, когда эти цементы используются *in vivo*, поскольку динамический поток и буферная способность жидкостей организма нейтрализуют pH [215].

Ванкомицин не оказывает влияние на pH контактирующего раствора.

Скорость высвобождения функциональных веществ зависит от морфологии частиц цементного камня, так как приводит к разной степени адсорбции и десорбции вещества на внутренней поверхности. Так, например, известно, что десорбция функциональных веществ с поверхности кальцийфосфатов, обладающих игольчатой морфологией кристаллов выше по сравнению с десорбцией при пластинчатой или призматической морфологии [302]. Кроме того, большие кристаллы обеспечивают хорошее взаимодействие между препаратом и поверхностью кристаллов цемента, большее химическое связывание [289, 316]. В связи с этим десорбция ванкомицина с крупных кристаллов ньюберита более длительна, что пролонгирует выход ванкомицина из цементного камня.

Поверхностный заряд молекул функциональных веществ увеличивает адсорбцию с поверхностью кальцийфосфатного цемента за счет электростатического притяжения. Как обсуждалось в 5 главе работы, в молекуле ванкомицина содержатся остатки аспарагиновой кислоты, и предположительно, карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты взаимодействует с ионами кальция и магния [303, 304, 337]. Адсорбированные антибактериальные вещества могут влиять на морфологию кристаллов по результатам исследования Hesaraki [305]. Морфология кристаллов цементного камня не изменялась при взаимодействии с ванкомицином. Отсутствие влияние аспарагиновой кислоты на

морфологию и размер кристаллов брушита наблюдали и Rubini et.al. [337] and Sikirić et.al. [374]. Они показали, что аспарагиновая кислота не влияет на морфологию, в отличие от полиаспарагиновой кислоты.

Пористость также оказывает большое влияние на релиз функциональных веществ. Более высокая открытая пористость C-Mg0+V приводит к увеличению поверхности и более быстрому элюированию ванкомицина из цементного матрикса, поскольку раствор лекарственного средства высвобождается посредством явления капиллярного течения [309].

Скорость выхода ванкомицина при контакте с дистиллированной водой определялась спектрофотометрическим методом. Динамика выхода ванкомицина представлена на рисунке 6.7.

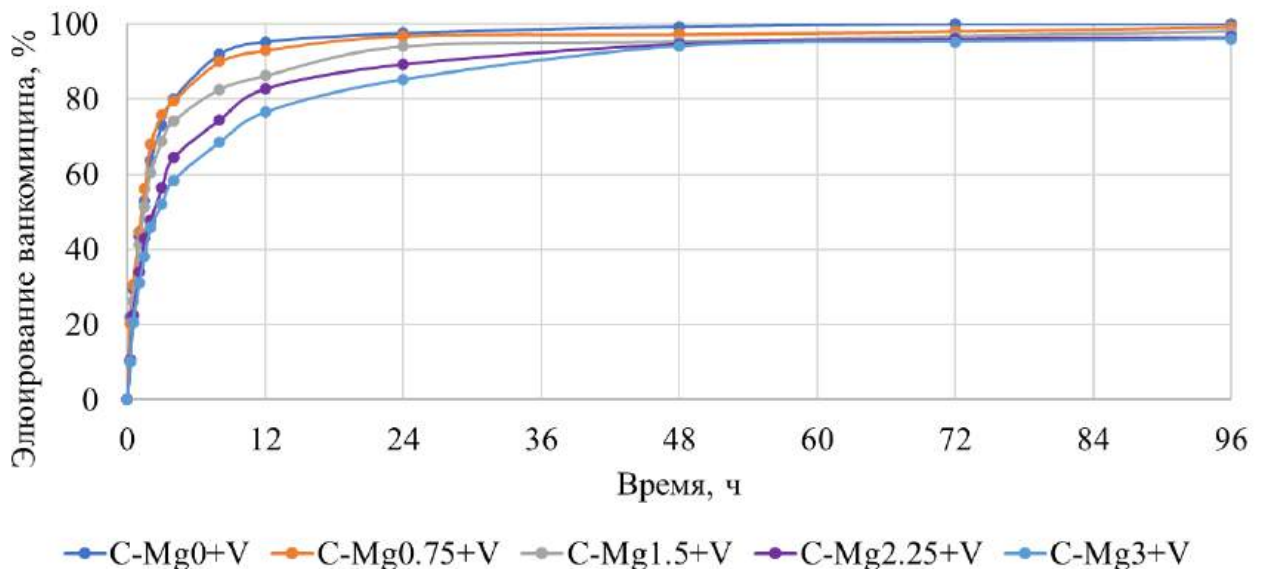


Рисунок 6.7 – Динамика выхода антибиотика из цементов

Пролонгация времени релиза находится в прямой зависимости от количества ионов магния в составе цемента. Это связано, вероятно, со снижением пористости цементного камня. Ванкомицин, растворяясь внутри цементного камня в жидкости, выходит через взаимосвязанные поры. К 24 ч количество вышедшего в раствор ванкомицина составляет 85–97 % и после 72 ч выходит на плато.

Кроме того, ванкомицин адсорбируется на исходных компонентах и конечном продукте (рисунок 6.8) и зависит от концентрации магния. Брушитно-

ньюберитный цемент (C-Mg3+V), полученный при использовании $Mg_3(PO_4)_2$ при взаимодействии с раствором ванкомицина гидрохлорида, образовал гелеобразный осадок, в связи с чем не удалось определить количество адсорбированного антибиотика.

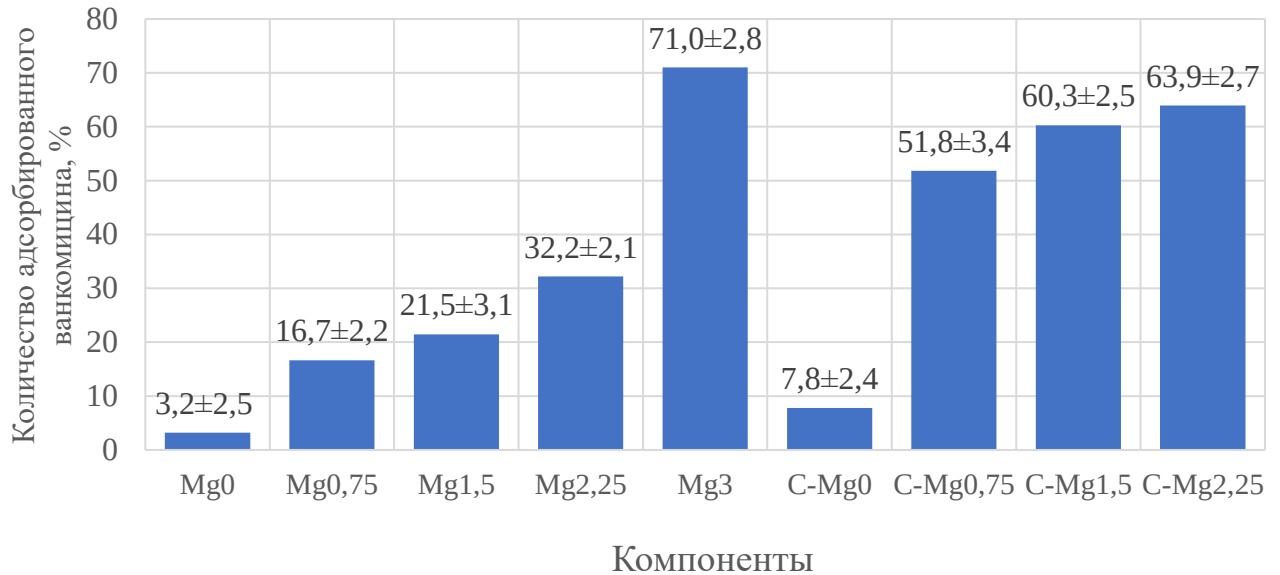


Рисунок 6.8 – Адсорбция ванкомицина на компонентах цемента

Наблюдается тенденция увеличения количества адсорбированного антибиотика при увеличении ионов магния в составе $Mg_xCa_{3-x}(PO_4)_2$ и в составе цементного камня, что связано с увеличением реакционной способности в ряду от Mg0 до Mg3, снижением пористости и увеличением размера кристаллов фаз цементного камня в ряду в ряду C-Mg0+V – C-Mg3+V. Увеличение размера кристаллов увеличивает адсорбцию.

Кинетика высвобождения ванкомицина из магниевых кальцийфосфатных цементов контролируется главным образом диффузией, но ввиду относительно высокой растворимости, возможно подключение к механизму диффузии механизма резорбции материала [292, 293]. Наблюдаемое быстрое высвобождение ванкомицина в начальные сроки с последующим медленным высвобождением – классическая модель релиза для кальцийфосфатных цементов [131]. В начальные сроки антибиотик высвобождается с поверхностного слоя, далее диффузия с внутренней поверхности матрикса несколько затруднена, что замедляет высвобождение функциональных веществ и пролонгирует тем самым выход.

В нашем эксперименте выход ванкомицина к 72 сут. произошел почти полностью. Для сравнения Saleh et.al. [131] наблюдали высвобождение антибактериальных препаратов из брушитовых цементов, допированных магнием, в течение 14 сут. Высвобождение к 72 ч составило примерно 70, 80 и 95 %, соответственно, для сульфата гентамицина, амоксициллина и тригидрата ампициллина. Результаты Cabrejos-Azama [375] схожи с результатами нашей работы: при увеличении концентрации магния в составе прекурсора для получения цемента, релиз антибиотика более длительный. К 72 ч высвобождается примерно 60–70% ванкомицина.

Высокая скорость высвобождения антибиотика из брушитно-ньюберитных цементов по сравнению с гидроксиапатитными связано как с большей растворимостью фаз, так и большей их гидратацией, что способствует более легкому переносу молекул на поверхность и с поверхности, облегчая загрузку и высвобождение лекарства. С другой стороны, гидратация поверхности ослабляет связывание белков [376–377] и аналогичный эффект может быть ответственен за быструю десорбцию ванкомицина (гликопептида). Быстрое высвобождение ванкомицина гидрохлорида из брушитно-ньюберитного цемента может быть пролонгировано, например, инкапсуляцией антибиотика, однако указанное качество может быть использовано для профилактики гнойно-септических воспалений или в качестве локальной доставки высокой начальной (в течение первых трех сут.) концентрации антибактериальных веществ самостоятельно или в совокупности с другими видами доставки.

Однако результаты других научных исследований невозможно сравнить с представленными в данной работе, поскольку были разные условия проведения эксперимента: большой объем омываемой жидкости и высокая частота вращения характерны для нашего исследования. Результаты данного эксперимента невозможно также экстраполировать на поведение цементов в организме, но можно сравнить составы между собой. По литературным данным, количество ванкомицина, высвобожденного *in vivo* в два раза меньше количества, которое высвобождалось *in vitro* [290].

Многоступенчатые профили высвобождения потенциально обладают гораздо большими преимуществами по сравнению с монотонной кинетикой элюирования лекарственного средства. Быстрое начальное высвобождение способно эффективно остановить патологический процесс, в то время как его более продолжительная вторая фаза высвобождения может поддерживать процесс лечения [299].

Так, в соответствии с результатами микробиологического исследования, цементы на основе прекурсора $Mg_xCa_{(3-x)}(PO_4)_2$, ингибировали рост бактерий *S. aureus* от 3 сут. для состава C-Mg0+V до 8 сут. для состава C-Mg2.25+V, в то время как рост бактерий *E. coli* – в течение 3 и 7 сут., соответственно (таблицы 6.5, 6.6). Зона задержки роста обеих бактерий, не уступающая положительному контролю (диск с цефтазидим с клавулоновой кислотой 30 мкг / 10 мкг (САС, 30/10 мкг/диск/ HIMEDIA®, Индия), характерна для всех составов в течение 48 ч. Более подробные результаты микробиологического исследования представлены в Приложении А4.

Таблица 6.5 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур кишечной палочки с цеменами, содержащими ванкомицин

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч
<i>E. coli</i> ATCC 25982	C-Mg0+V	48	72
	C-Mg0.75+V	48	96
	C-Mg1.5+V	48	144
	C-Mg2.25+V	48	168
	C-Mg3+V	48	168

Цементы на основе прекурсора $Mg_xCa_{(3-x)}(PO_4)_2$ ингибировали рост бактерий *S. aureus* менее продолжительное время, от 3 сут. для составов C-Mg0+V и C-Mg2.25+V до 4 сут. для составов C-Mg0.75+V, C-Mg1.5+V и C-Mg3+V, в то время как *E. coli* ингибировалась в течение 3 и 4 сут.

Таблица 6.6 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур золотистого стафилококка с цеменами, содержащими ванкомицин

Штамм	Образец	Эффективность = контролю, ч	Эффективность, ч
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	C-Mg0+V	48	72
	C-Mg0.75+V	48	96
	C-Mg1.5+V	48	144
	C-Mg2.25+V	48	192
	C-Mg3+V	48	168

Увеличение пористости увеличивало скорость высвобождения антибиотика. Однако при идентичной пористости составов C-Mg2.25+V и C-Mg3+V, первый дольше выделяет антибиотик, что подтверждает, что форма кристаллов важна при адсорбции и десорбции антибактериальных веществ. Крупные дипирамидальные кристаллы, вероятно, адсорбируют меньшее количество ванкомицина, чем призматические кристаллы, площадь поверхности которых больше. Эффективное подавление бактерий, аналогичное положительному контролю, было ограничено 2–3 сут.

6.2 Результаты доклинических исследований *in vivo* брушитно-ньюберитных цементов

6.2.1 Результаты доклинических исследований *in vivo* брушитно-ньюберитных цементов при подкожной имплантации

Биосовместимость и резорбируемость были исследованы в экспериментах *in vivo* на 3 самцах крысы линии Wistar в модели подкожной имплантации. Образцы цементов составов C-Mg0, C-Mg0.75, C-Mg1.5, C-Mg2.25, C-Mg3 диаметром 4 мм, высотой 2 мм (рисунок 6.9) имплантировались в сформированные в подкожной клетчатке карманы путем раздвигания ткани лабораторного животного. Срок имплантации – 2 мес.



Рисунок 6.9 – Образцы остеопластического экспериментального материала для экспериментов *in vivo*

При подкожной имплантации наблюдается неполная резорбция всех образцов к двум месяцам имплантации. По результатам микро-КТ исследований всей группы животных четкие границы у образцов от C-Mg1,5 до C-Mg3 отсутствуют, края цилиндров «слизаны» (таблицы 6.7, 6.8). Чем выше содержание магния, тем быстрее резорбируется материал.

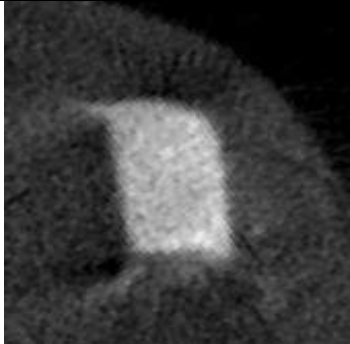
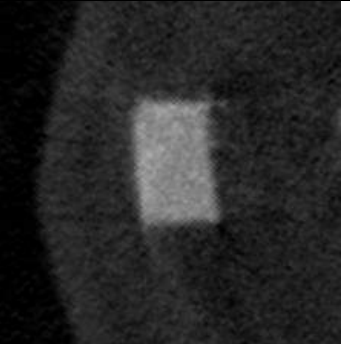
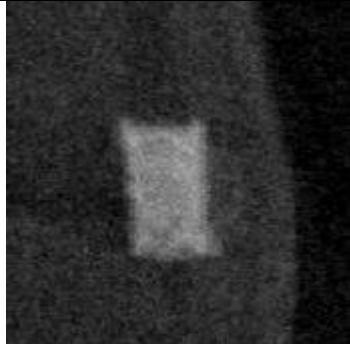
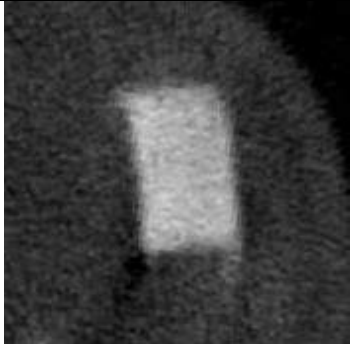
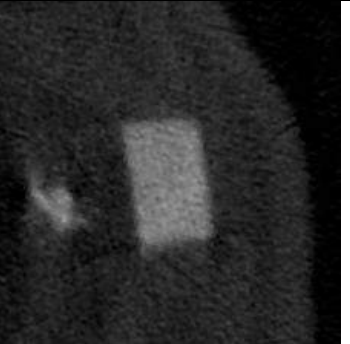
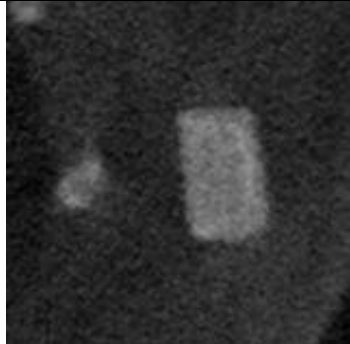
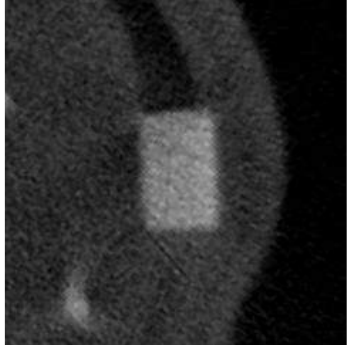
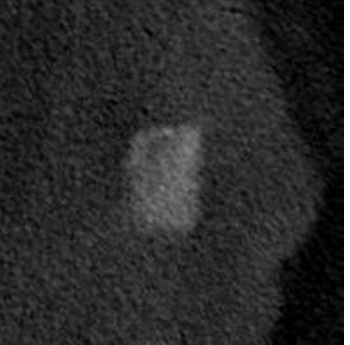
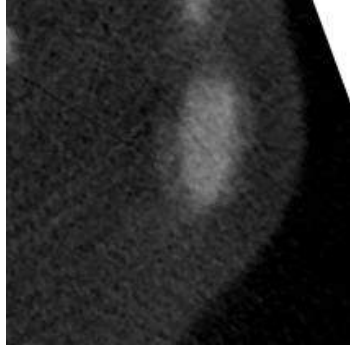
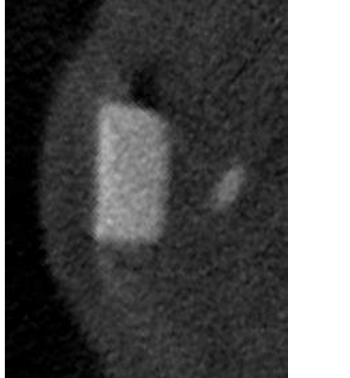
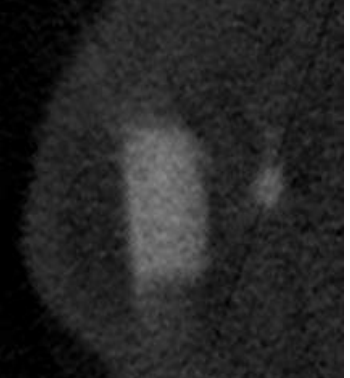
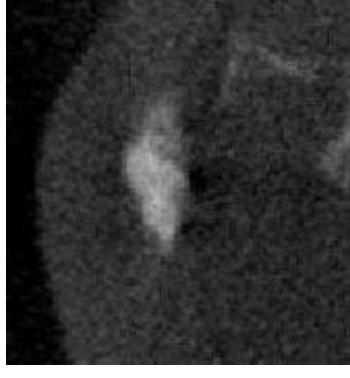
Таблица 6.7 – Результаты КТ в динамике. 3D-реконструкция

исход	1 месяц	2 месяца
*КТ на примере одного животного. Результаты микро-КТ всех животных аналогичны		

Степень резорбции величина комплексная и складывается от величины уменьшения объема образцов и от величины рентгенологической плотности. По относительной количественной оценке, потери рентгеновской плотности

(радиоденсивности) по шкале Хаунсфилда (HU) возможно в сравнительном аспекте определить скорость резорбции (таблица 6.9).

Таблица 6.8 – Рентгеновские Микроструктура имплантатов сразу после имплантации (начальной), через 1 и 2 мес.

Состав	Исход	1 месяц	2 месяца
C-Mg0			
C-Mg0.75			
C-Mg1.5			
C-Mg2.25			

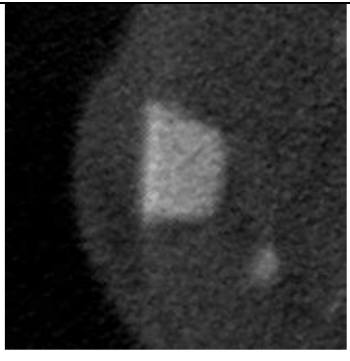
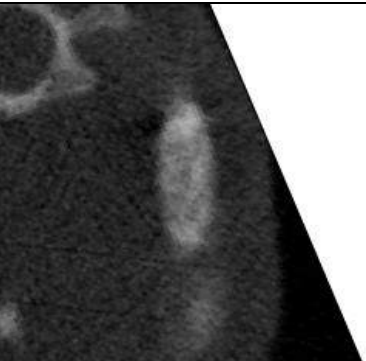
Состав	Исход	1 месяц	2 месяца
C-Mg3			
*рентгенологические фотографии на примере одного животного			

Таблица 6.9 – Степень резорбции имплантатов по рентгенологической плотности через 2 мес. после имплантации

№	Исход, HU	2 месяца, HU	% резорбции	Средний % резорбции
C-Mg0	1816,2	957,3	47,3	33,9
	1355,3	965,2	28,8	
	997,5	692,2	30,6	
C-Mg0.75	1830,4	1103,9	39,7	36,3
	1568,8	654,4	58,3	
	1493,5	1123,7	24,8	
C-Mg1.5	1210,4	502,4	58,5	55,3
	1364,1	417,1	69,4	
	997,3	559,4	43,9	
C-Mg2.25	1753,5	751,8	57,1	60,1
	1442,1	415,8	71,2	
	1591,8	724,2	54,5	
C-Mg3	1050,5	321,9	69,4	81,2
	958,9	139,2	85,5	
	899,3	68,7	92,4	

Рентгенологическая плотность цементных образцов после 2 мес. имплантации меньше исходной. Механизм уменьшения рентгенологической плотности цементного камня на основе брушита и ньюберита связаны с более интенсивным растворением фазы ньюберита (Mg^{2+} и HPO_4^{2-}) и менее интенсивным растворением фазы брушита/монетита (Ca^{2+} и HPO_4^{2-}) по всему объему и вымывание из имплантата.

Кроме пассивной резорбции за счет химического растворения в экспериментах *in vivo* наблюдается и активная (клеточно-опосредованная)

резорбция за счет присутствия макрофагов [292, 293, 316], что подтверждается результатами гистологического исследования.

Вокруг имплантата С-Mg0 соединительнотканная капсула тонкая, достаточно рыхлая, состоящая из продольно вытянутых фибробластов и пучков коллагеновых волокон (рисунок 6.10). Интенсивность васкуляризации и лимфо-макрофагальной инфильтрации в разных отделах капсулы различаются. Материал имплантата зернистой плотной структуры, который практически не резорбируется. Лишь в отдельных участках на внутренней поверхности капсулы выявляются единичные макрофаги, которые, по-видимому, начинают резорбцию материала (рисунок 6.10 в, г).

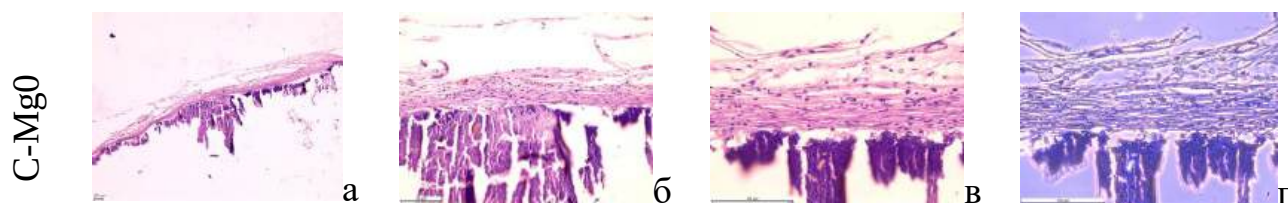


Рисунок 6.10 – Недостаточно зрелая тонкая рыхлая соединительнотканная капсула, резорбция материала минимальная: а–в – стандартная световая микроскопия; г – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение: а – $\times 50$; б – $\times 200$; в, г – $\times 400$

Вокруг имплантата С-Mg0.75 капсула несколько толще, чем в предыдущей группе, и она более зрелая, плотная, состоящая из фибробластов и продольно ориентированных пучков коллагеновых волокон (рисунок 6.11 в, г). Воспалительная инфильтрация минимальна, но местами в капсуле видны довольно многочисленные сосуды. Капсула окружает очаговые скопления материала имплантата крупнозернистой структуры (рисунок 6.11 а). При этом из капсулы внутрь материала происходит врастание соединительнотканых тяжей, богатых сосудами, фибробластами и макрофагами, окружающих очаги малоизменённого вещества и более резорбированного (рисунок 6.11 б). Сами очаги окружены скоплением крупных макрофагов и гигантских многоядерных клеток, в цитоплазме

которых содержится фагоцитированный материал (Рисунок 6.11 д, е). Резорбция в этой группе хорошая.

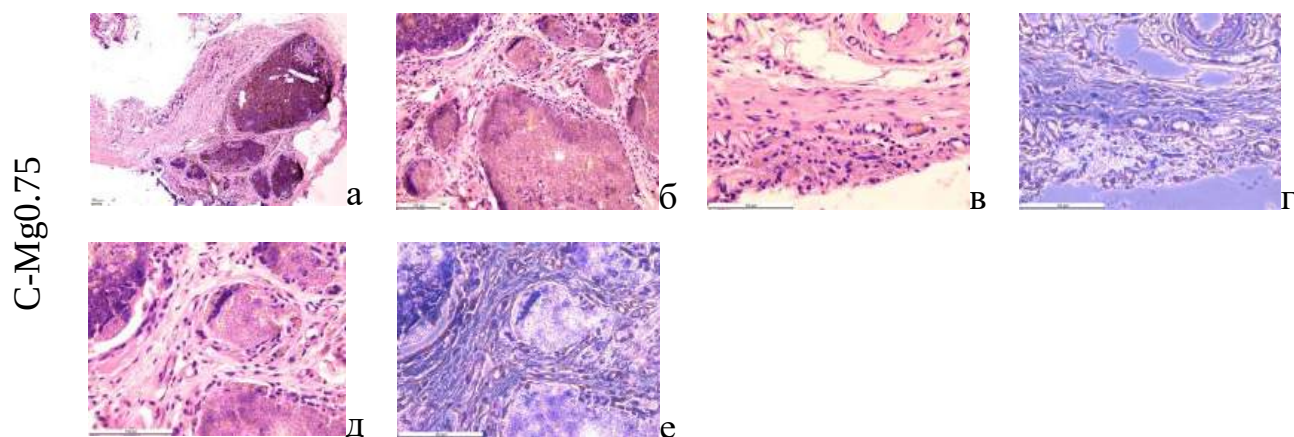


Рисунок 6.11 – Относительно зрелая плотная соединительнотканная капсула со слабой воспалительной инфильтрацией и местами с повышенной васкуляризацией, резорбция материала хорошая: а–в, д – стандартная световая микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение: а – $\times 50$; б – $\times 200$; в–е – $\times 400$

Вокруг имплантата C-Mg1.5 капсула недостаточно зрелая, неравномерной толщины и относительно рыхлой структуры с повышенной лимфо-макрофагальной инфильтрацией и умеренной васкуляризацией (рисунок 6.12). Из капсулы внутрь материала начинается врастание соединительнотканых прослоек с макрофагами, фибробластами и сосудами, разделяющих имплантат на отдельные скопления, которые постепенно резорбируются макрофагами. Резорбция материала хорошая.

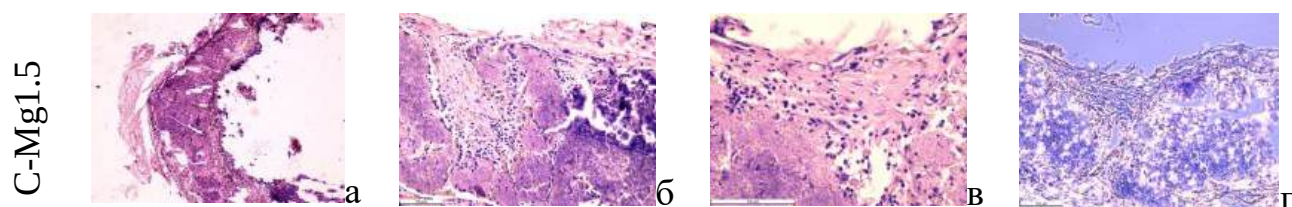


Рисунок 6.12 – Недостаточно зрелая рыхлая соединительнотканная капсула с повышенной воспалительной инфильтрацией и умеренной васкуляризацией, резорбция материала хорошая: а–в – стандартная световая микроскопия; г – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение: а – $\times 50$; б – $\times 200$; в, г – $\times 400$

Вокруг имплантата C-Mg2.25 формируется незрелая рыхлая соединительнотканная капсула с высокой лимфо-макрофагальной инфильтрацией и большим количеством сосудов (рисунок 6.13). Весь материал имплантата пронизан соединительнотканными тяжами из капсулы и разделен ими на мелкие очаги, которые активно резорбируются макрофагами и гигантскими многоядерными клетками (рисунок 6.13 в, г). В этой группе отмечается самая лучшая резорбция материала по сравнению с предыдущими группами.

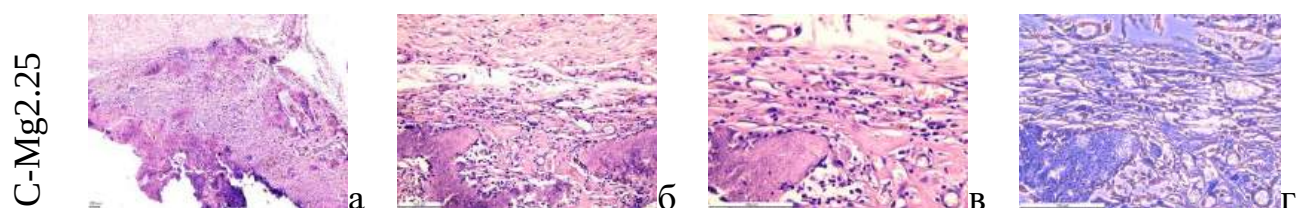


Рисунок 6.13 – Незрелая рыхлая соединительнотканная капсула с высокими воспалительной инфильтрацией и васкуляризацией, резорбция материала очень хорошая: а–в – стандартная световая микроскопия; г – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение: а – $\times 50$; б – $\times 200$; в, г – $\times 400$

Соединительнотканная капсула вокруг имплантата C-Mg3 резко истончается и уже нет различия между самой капсулой и прорастающими из неё вглубь имплантата соединительнотканными тяжами (рисунок 6.14). Отмечаются самые лучшие прорастание и резорбция материала в этой группе. В одном из образцов наблюдалось почти полная резорбция материала имплантата вплоть до формирования грануляционной ткани (рисунок 6.15).

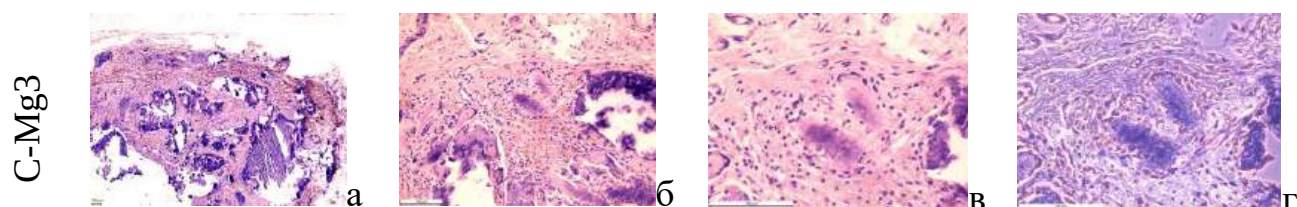


Рисунок 6.14 – Зрелая плотная соединительнотканная капсула с умеренными воспалительной инфильтрацией и васкуляризацией, резорбция материала высокая: а–в – стандартная световая микроскопия; г – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение: а – $\times 50$; б – $\times 200$; в, г – $\times 400$

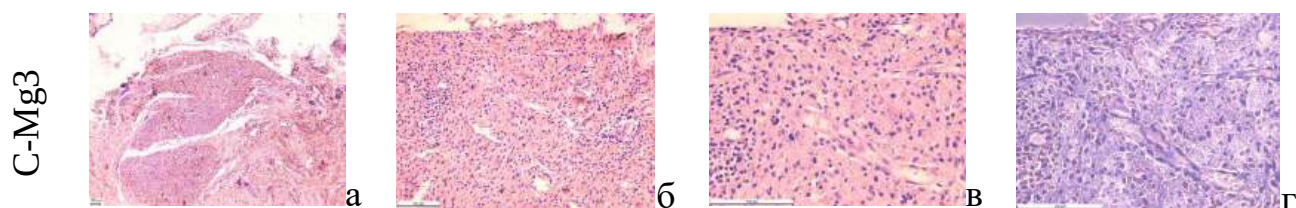


Рисунок 6.15 – Грануляционная ткань, замещающая имплантат С-Mg3, материал полностью резорбирован: а–в – стандартная световая микроскопия; г – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение: а – х50; б – х200; в, г – х400

Гистологический анализ показал, что при имплантации MgCaP-цементов чем больше было содержание Mg в составе имплантата, тем сильнее были резорбция материала и его прорастание соединительной тканью. Так, в группе С-Mg3, отмечалась самая лучшая резорбция материала. При этом MgCaP-цементы являются довольно активными материалами, тканевая реакция на него относительно сильная с привлечением многочисленных гигантских многоядерных клеток для его резорбции и формированием часто незрелых капсул рыхлой структуры с повышенной воспалительной инфильтрацией и васкуляризацией. Если сравнивать разные модификации по уровню биосовместимости, то лучшие результаты были получены в группе С-Mg3, где вокруг имплантата формировались относительно зрелые плотные капсулы с умеренными лимфо-макрофагальной инфильтрацией и васкуляризацией.

Толщина соединительнотканых капсул и площадь сосудов представлены в таблицах 6.10 и 6.11.

Таблица 6.10 – Средняя толщина соединительнотканых капсул (мкм)

Состав	С-Mg0	С-Mg0,75	С-Mg1,5	С-Mg2,25	С-Mg3
$\bar{X}$	59,4*	68,5	72,0	70,0	18,6*
σ	20,6	18,8	22,8	35,3	11,3
SE	2,5	2,8	3,9	6,2	4,0
*достоверно отличается от других групп					
$\bar{X}$ – среднее значение, σ – стандартное отклонение, SE – ошибка среднего					

Таблица 6.11 – Относительная площадь сосудов (мкм²) на 100 тыс. мкм²

Состав	C-Mg0	C-Mg0,75	C-Mg1,5	C-Mg2,25	C-Mg3
$\bar{X}$	4504,8*	3003,6	2678,5	5362,8	609,4*
σ	1629,9	1536,4	1459,8	4495,3	748,8
SE	490,9	542,9	583,9	1798,1	374,4
*достоверно отличается от других групп					
$\bar{X}$ – среднее значение, σ – стандартное отклонение, SE – ошибка среднего					

Таким образом, наилучшие результаты по биосовместимости и резорбции были получены в группе C-Mg3.

6.2.2 Результаты доклинических исследований in vivo брушитно-ньюберитных цементах при лечении гнойно-септических воспалений костной ткани

Антимикробная активность цементах была исследована в экспериментах in vivo на 9 самцах крысы линии Wistar массой 250–300 г на модели перфорации большеберцовой кости с предварительно созданным гнойно-септическим воспалением, подтвержденным морфологическим исследованием биоптатов, взятых перед имплантацией материалов. Биосовместимость и резорбируемость были исследованы в экспериментах in vivo на 9 самцах крысы линии Wistar в модели перфорации большеберцовой кости. Гранулы размером 250–500 мкм составов фигуративных точек 3, 5 и 8 были устанавливали в костные перфорации критического размера большеберцовой кости.

В большинстве биоптатов обнаруживались в фибринозном экссудате многочисленные фрагменты некротизированной кости с разной степенью некроза и деструкции (рисунки 6.16, 6.17). В части образцов отмечались достаточно крупные фрагменты некротизированной кости с преобладанием пустых лакун без остеоцитов, лишённые чёткой тонкой структуры матрикса и с фиброзированным костным мозгом (рисунок 6.16). По периферии такие костные фрагменты подвергались выраженной деструкции. Мелкие костные фрагменты были окружены макрофагами и лимфоцитами с незначительной примесью нейтрофилов,

т.е. отмечалось хроническое воспаление. Некротизированная кость при поляризационной микроскопии давала слабую анизотропию (рисунок 6.16 б, е). В других образцах выявлялись очень мелкие фрагменты некротизированной кости, между которыми наблюдалось вращение фиброзной ткани с незначительной лимфо-макрофагальной инфильтрацией (рисунок 6.17).

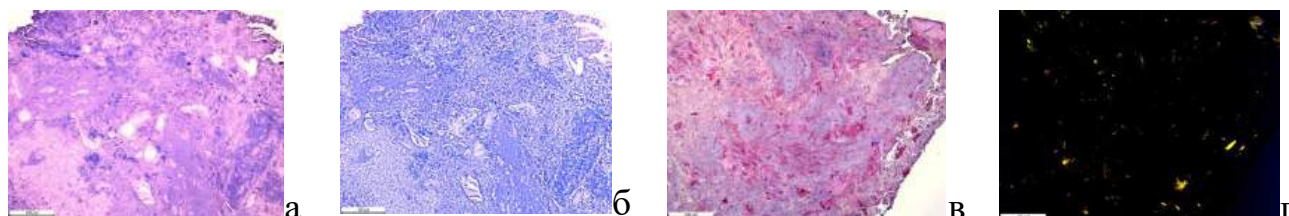


Рисунок 6.16 – Некротизированные мелкие костные фрагменты, фиброз: а, в – стандартная световая микроскопия; б – фазово-контрастная микроскопия; г – поляризационная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, б), окраска пикросириусом красным (в, г). Увеличение x200

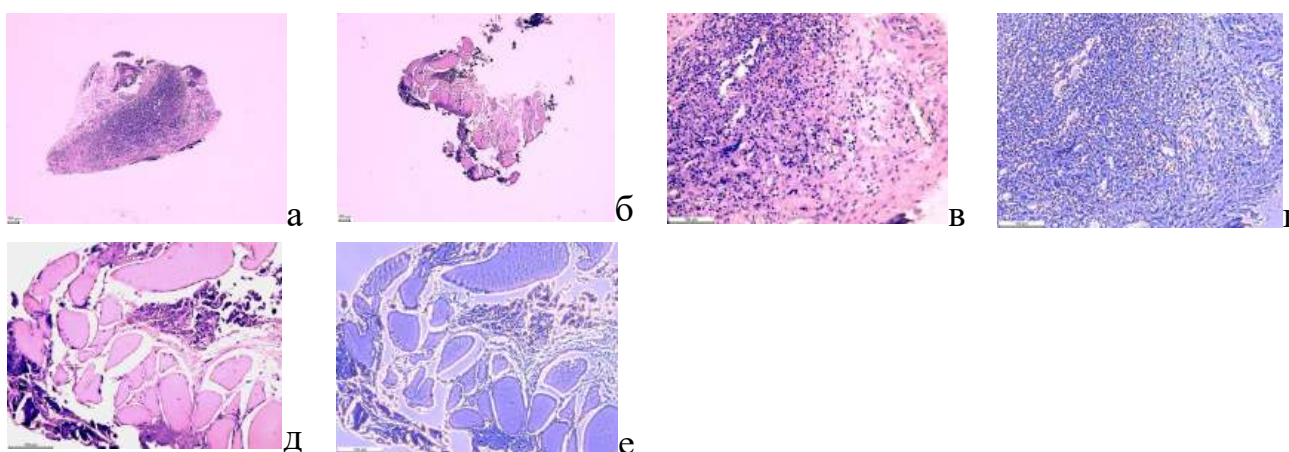


Рисунок 6.17 – Некроз соединительной и мышечной тканей, выраженная лимфо-макрофагальная инфильтрация, фиброз: а–в, д – стандартная световая микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение: а, б – x50; в–е – x200

Таким образом, во всех образцах выявляется хронический остеомиелит. Балльная оценка морфологических изменений костной ткани представлена в таблице 6.12.

Таблица 6.12 – Балльная оценка морфологических изменений костной ткани

Состав	Острое воспаление	Воспаление хроническое	Некроз кости
C-Mg1,5	0,3	2,7	2,5
C-Mg1,5+V	2,0	2,7	3,0
C-Mg2,25	1,3	2,3	3,7
C-Mg2,25+V	0,7	2,7	3,0
C-Mg3	1,0	2,3	2,7
C-Mg3+V	1,0	1,7	4,0

Для определения антибактериальной активности разработанные материалы были установлены в костные перфорации критического размера: цемент без ванкомицина (контроль) композиций C-Mg1.5, C-Mg2.25 или C-Mg-3 и цемент с ванкомицином (эксперимент) композиций C-Mg1.5+V, C-Mg2.25+V или C-Mg-3-V были установлены в разных конечностях у одного животного для сравнения.

При изучении результатов первичного томографического обследования были выявлены признаки имеющегося воспаления, надкостничные разрастания, разрушение кортикального слоя кости вне области оперированного дефекта, отек окружающих мягких тканей, выражающийся в увеличении зоны потемнения вокруг кости (рисунки 6.18 – 6.23).

При повторных исследованиях через 3 мес. миграции материала не наблюдалось. Была отмечена резорбция имплантата. В некоторых случаях цемент наблюдался только в проекции костномозгового канала. Надкостничные разрастания исчезли, целостность кости восстановилась во всех наблюдениях, размер дефекта уменьшился. В экспериментальных наблюдениях слияние происходило лучше, возможно, из-за прекращения септических процессов. Наибольшая степень восстановления костной ткани наблюдалась в композициях C- Mg2.25 и C-Mg-2.25+V.

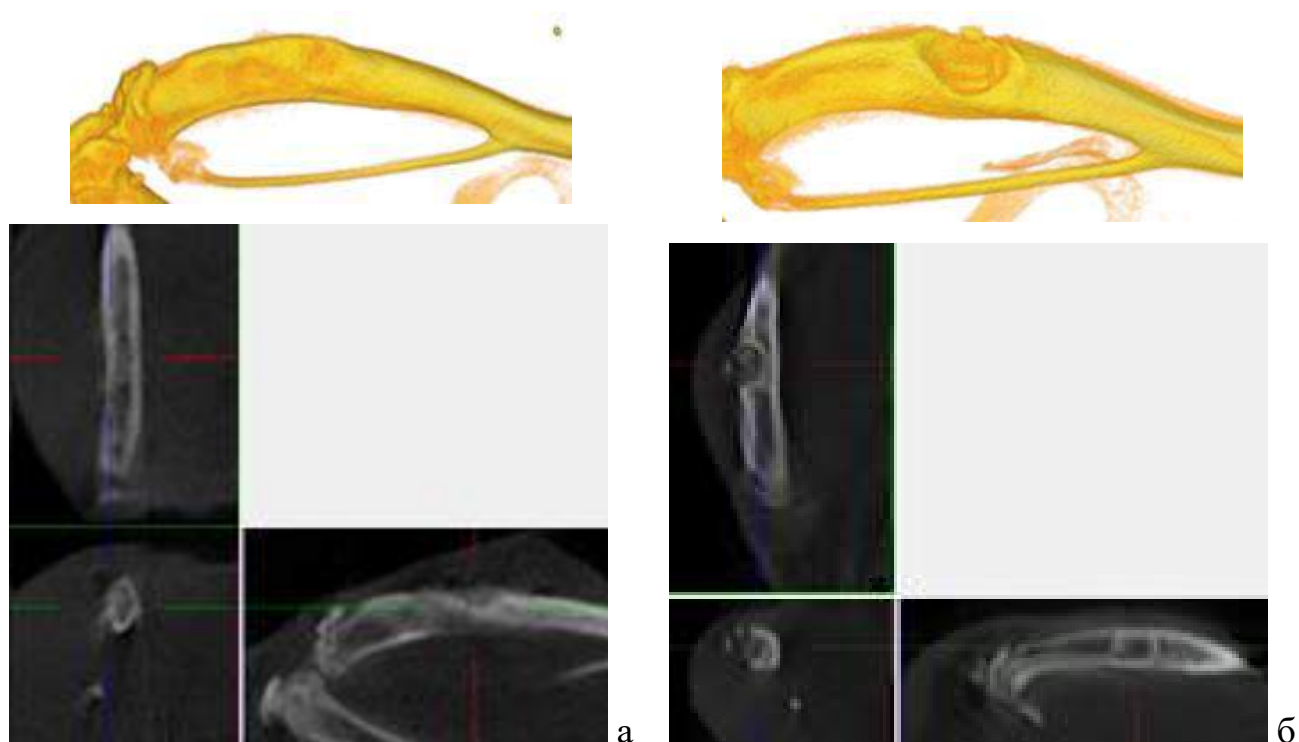


Рисунок 6.18 – 3D-модель и 2D-проекция большеберцовой кости лабораторного животного с имплантированным материалом состава C-Mg1.5, созданные по результатам компьютерной томографии: а – сразу после имплантации; б – через 3 мес. после имплантации

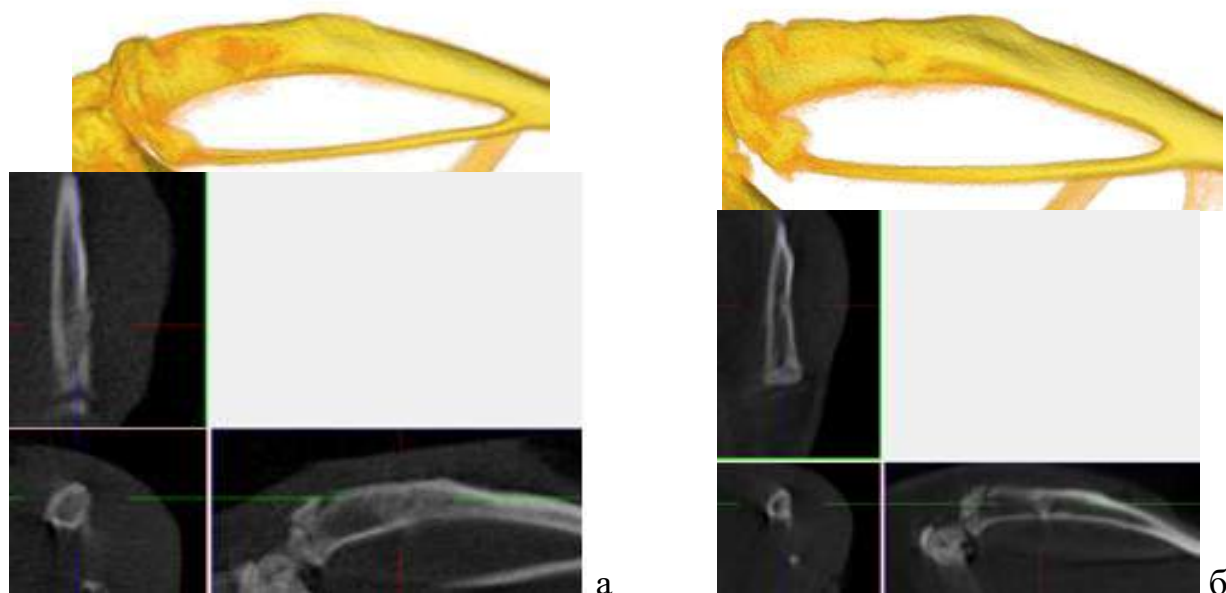


Рисунок 6.19 – 3D-модель и 2D-проекция большеберцовой кости лабораторного животного с имплантированным материалом состава C-Mg1.5+V, созданные по результатам компьютерной томографии: а – сразу после имплантации; б – через 3 мес. после имплантации

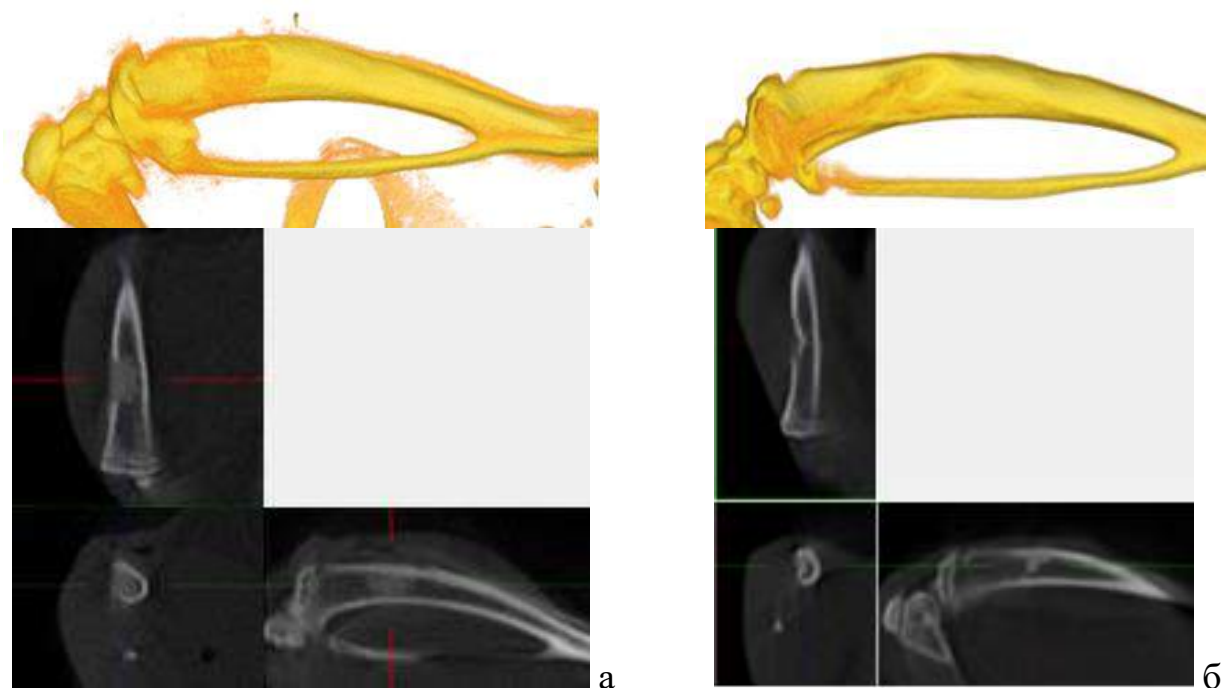


Рисунок 6.20 – 3D-модель и 2D-проекция большеберцовой кости лабораторного животного с имплантированным материалом состава C-Mg2.25, созданные по результатам компьютерной томографии: а – сразу после имплантации; б – через 3 мес. после имплантации

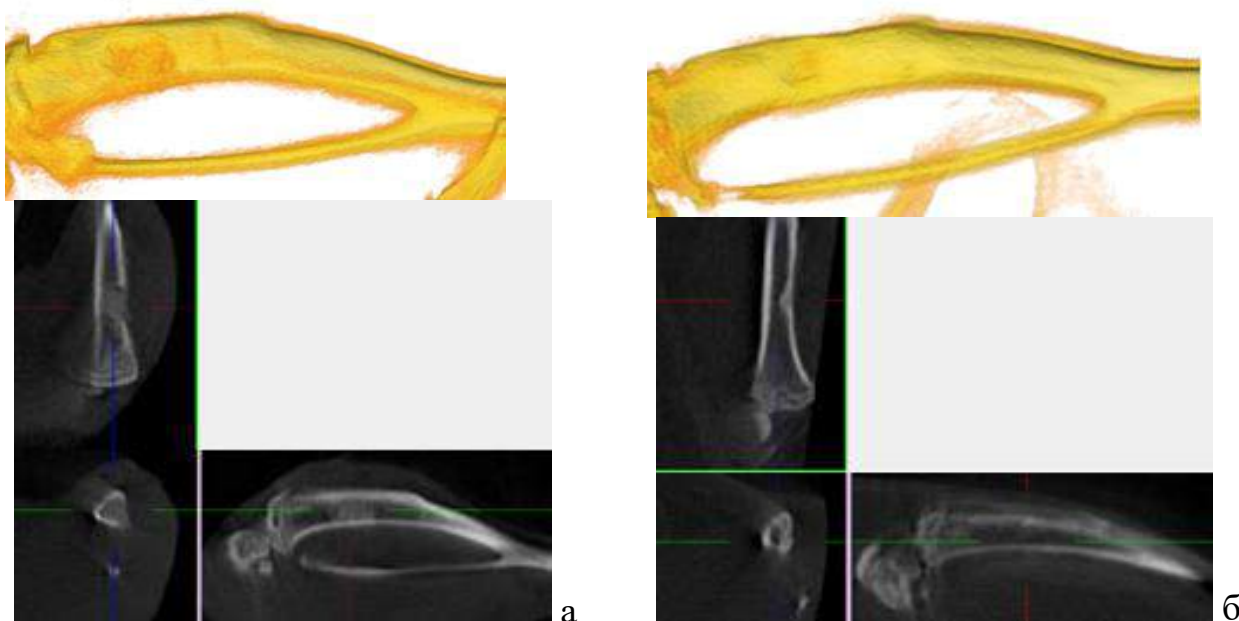


Рисунок 6.21 – 3D-модель и 2D-проекция большеберцовой кости лабораторного животного с имплантированным материалом состава C-Mg2.25+V, созданные по результатам компьютерной томографии: а – сразу после имплантации; б – через 3 мес. после имплантации

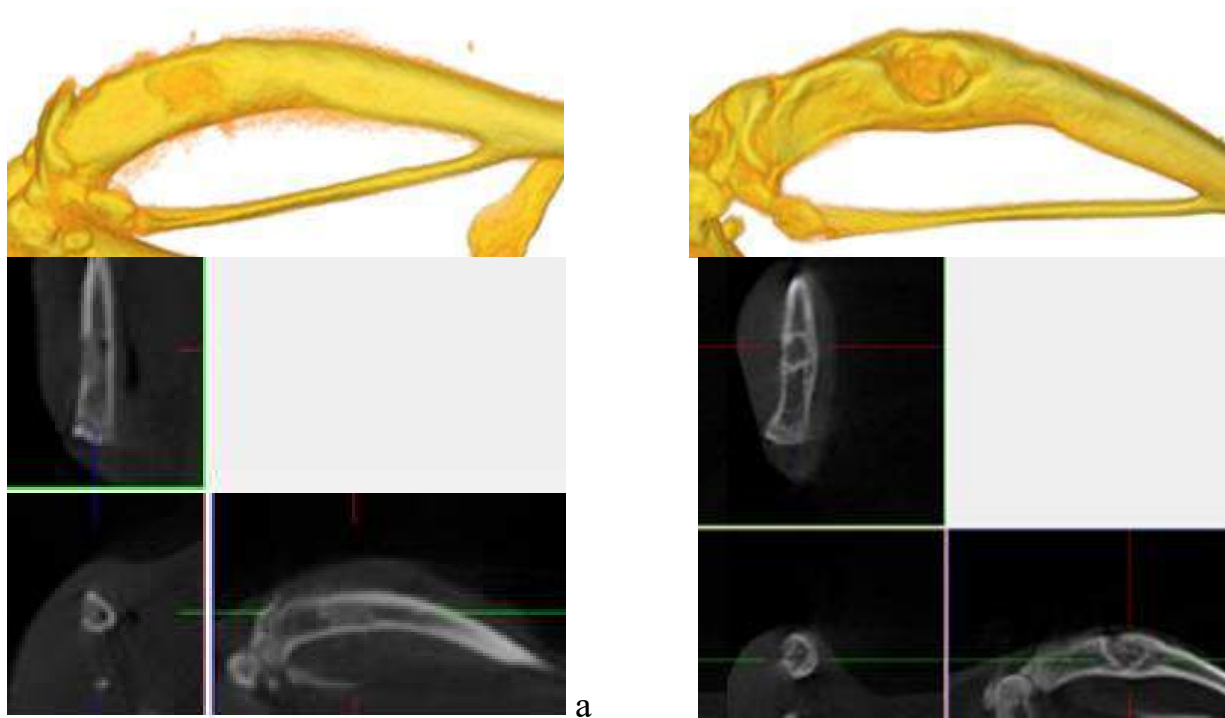


Рисунок 6.22 – 3D-модель и 2D-проекция большеберцовой кости лабораторного животного с имплантированным материалом состава C-Mg3, созданные по результатам компьютерной томографии: а – сразу после имплантации; б – через 3 мес. после имплантации

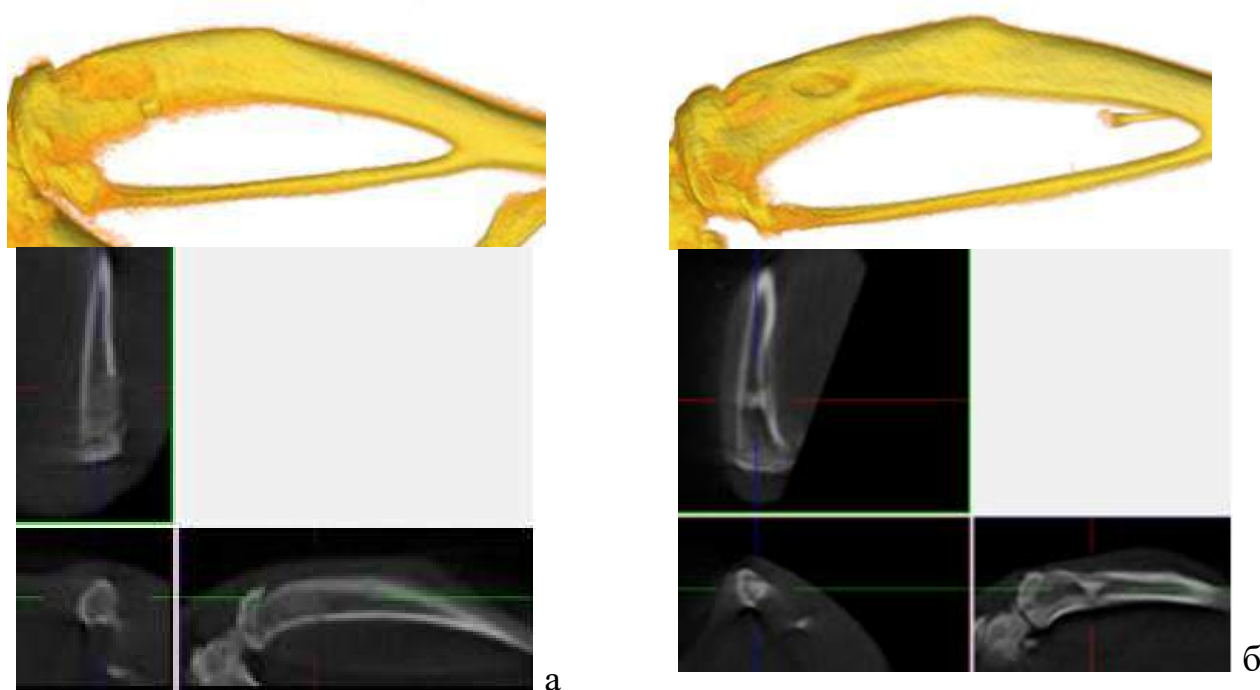


Рисунок 6.23 – 3D-модель и 2D-проекция большеберцовой кости лабораторного животного с имплантированным материалом состава C-Mg3+V, созданные по результатам компьютерной томографии: а – сразу после имплантации; б – через 3 мес. после имплантации

Уменьшение септических процессов действительно характерно для всех составов, в большей степени для тех, которые содержали ванкомицин, что подтверждается результатами гистологического исследования.

Так, в области дефекта с имплантированным составом С-Mg1,5 обнаруживались секвестры некротизированной кости в окружении фиброзной ткани со значительной макрофагальной инфильтрацией (рисунок 6.24 а–г). Острое воспаление было слабо выражено, нейтрофилы встречались редко. Регенерация кости достаточно сильная в этой группе (рисунок 6.24 д, е). Тогда как в области дефекта с имплантированным составом С-Mg1,5-V снижалось содержание некротизированных фрагментов кости (лишь в одном образце выявлялись секвестры) и хроническое воспаление было выражено слабее по сравнению с предыдущей группой (рисунок 6.25 а–г). Острое воспаление отсутствовало. Однако регенерация кости была умеренная (рисунок 6.25 д, е).

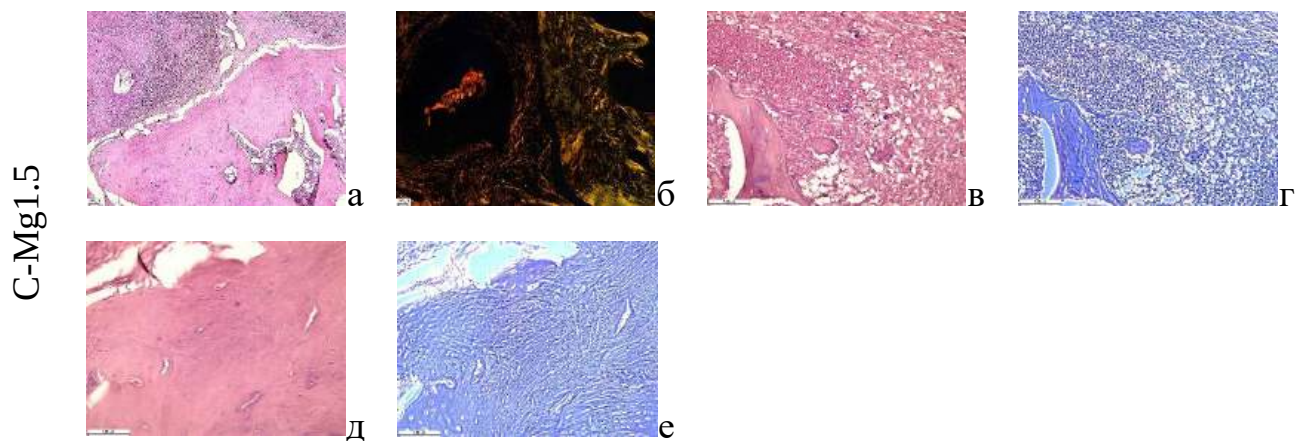


Рисунок 6.24 – Некроз кости, значительное хроническое воспаление, фиброз и выраженная костная регенерация: а, в, д – стандартная световая микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – $\times 50$; в–е – $\times 200$

Выраженная костная регенерация наблюдалась в области дефекта с имплантированными составами С-Mg2,25 и С-Mg2,25-V (рисунки 6.26 д, е, 6.27 д, е), отмечались умеренное хроническое воспаление и фиброз (рисунки 6.26 а–г, 6.27 а–г).

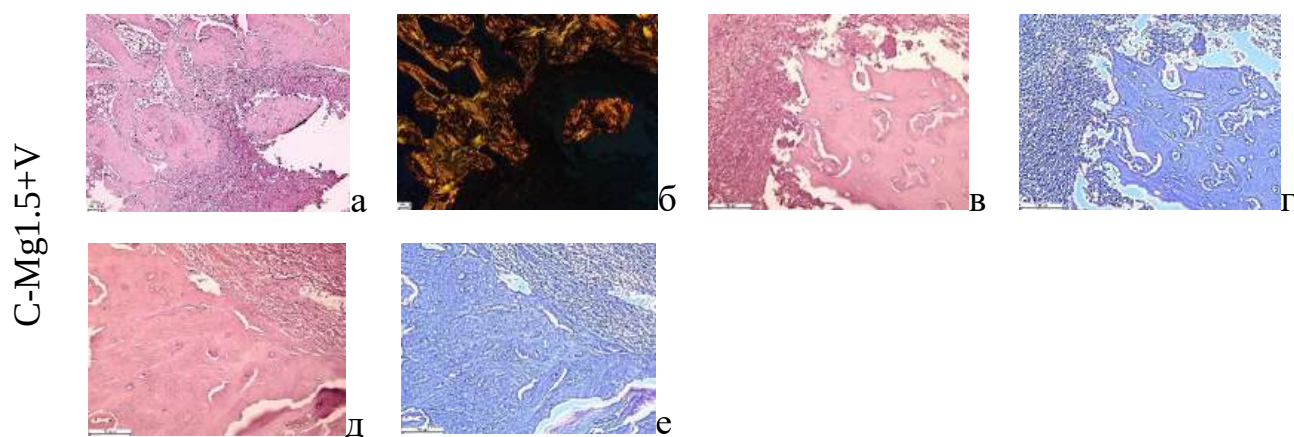


Рисунок 6.25 – Некроз кости, хроническое воспаление, фиброз и умеренная костная регенерация: а, в, д – стандартная световая микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – $\times 50$; в–е – $\times 200$

В области дефекта с имплантированным составом C-Mg2,25 секвестры не выявлялись, острое воспаление было минимальным, с составом C-Mg2,25+V признаков острого воспаления выявлено не было, некроза кости не наблюдалось.

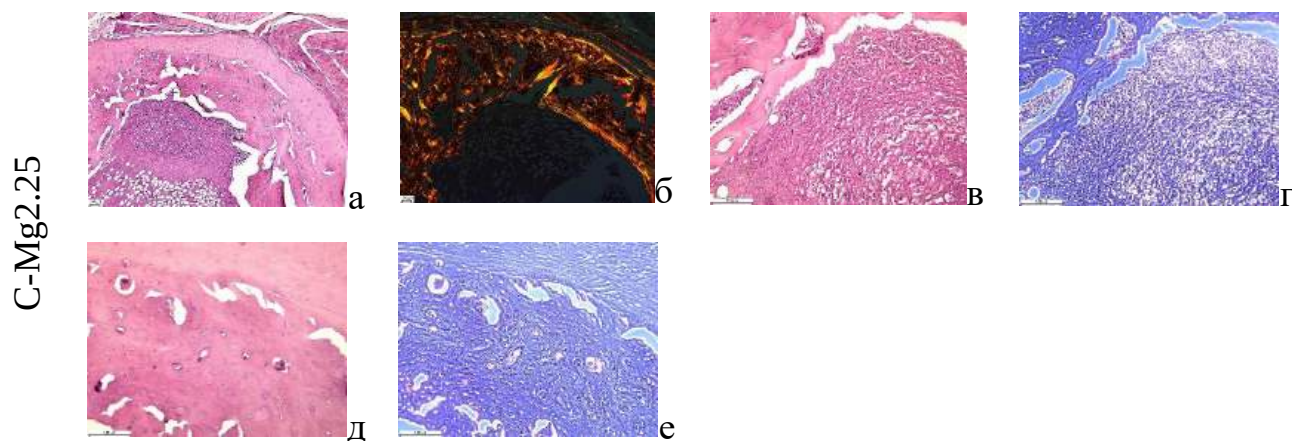


Рисунок 6.26 – Умеренное хроническое воспаление, фиброз и выраженная костная регенерация: а, в, д – стандартная световая микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – $\times 50$; в–е – $\times 200$

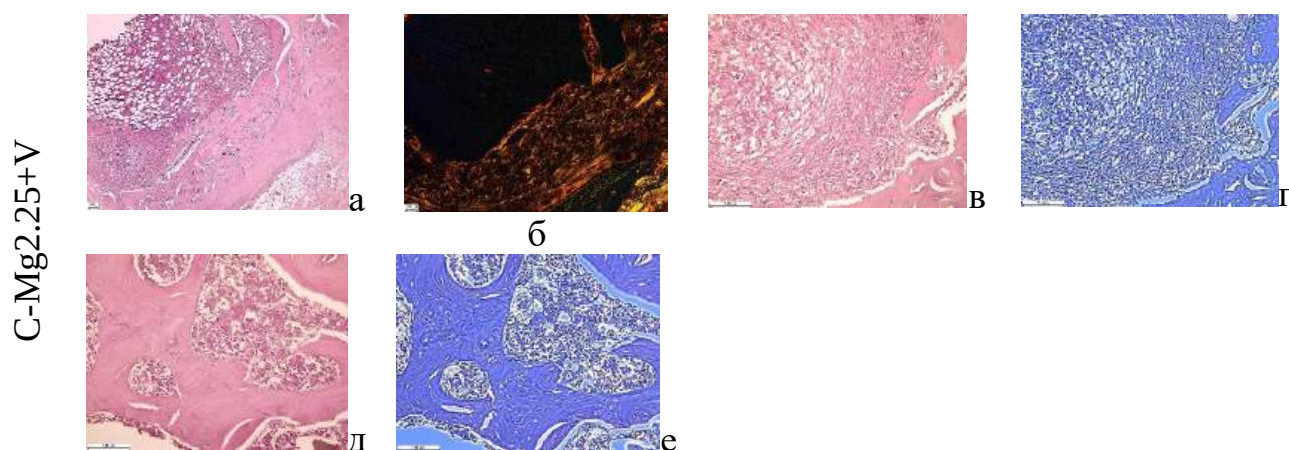


Рисунок 6.27 – Умеренное хроническое воспаление, фиброз и выраженная костная регенерация: а, в, д – стандартная световая микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – $\times 50$; в–е – $\times 200$

В области дефекта с имплантированными составами C-Mg3 и C-Mg3+V отмечалась мощная регенерация кости (рисунок 6.28 д, е, 6.29 д, е). Однако в этих группах встречались единичные мелкие секвестры кости (лишь в одном образце каждой группы), хроническое воспаление с фиброзом были слабо выражены, острое воспаление отсутствовало (рисунок 6.28 а–г, 6.29 а–г).

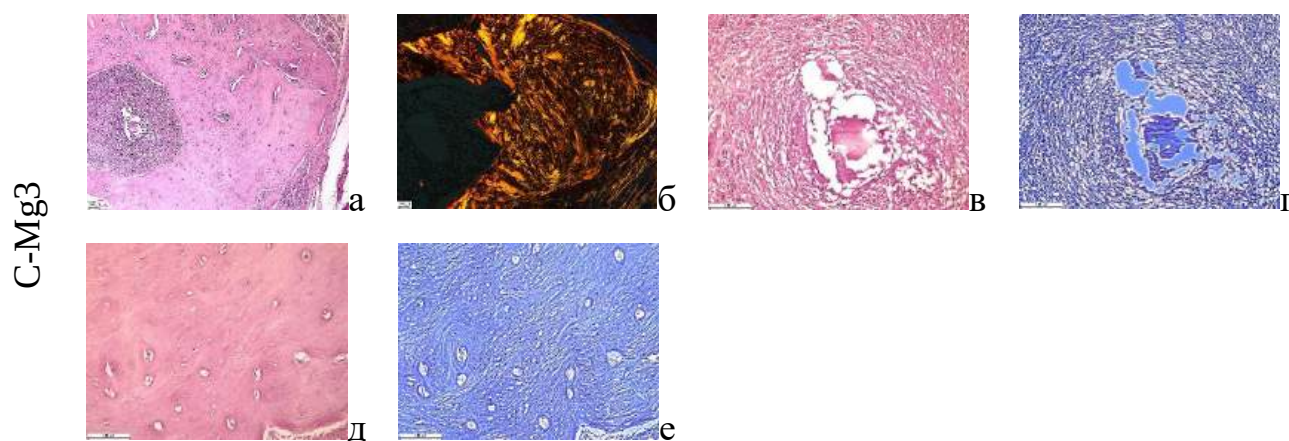


Рисунок 6.28 – Некроз кости, слабое хроническое воспаление, фиброз и мощная костная регенерация: а, в, д – стандартная световая микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – $\times 50$; в–е – $\times 200$

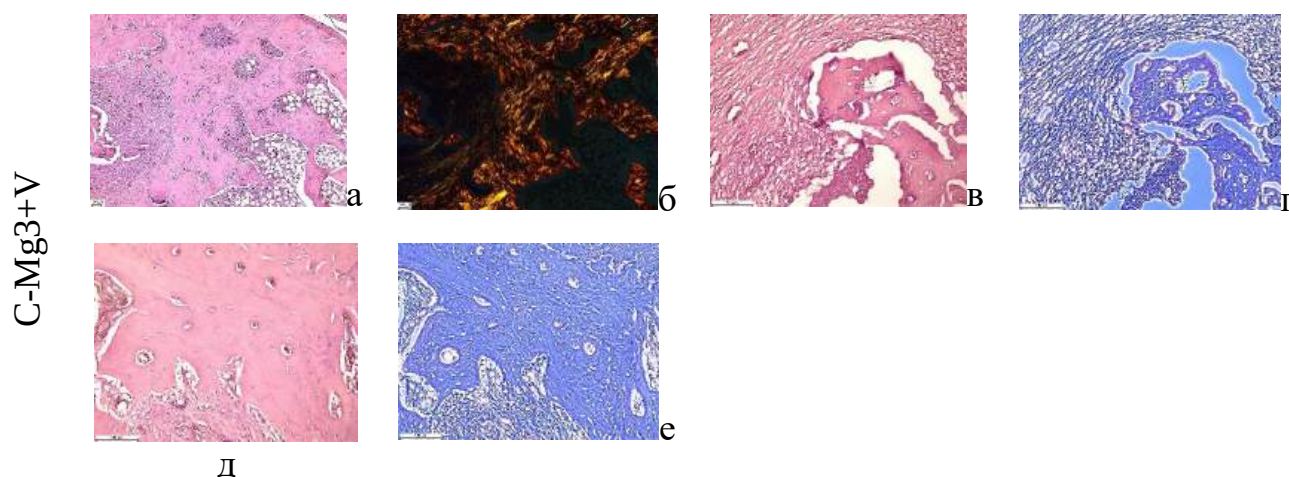


Рисунок 6.29 – Некроз кости, слабое хроническое воспаление, фиброз и мощная костная регенерация: а, в, д – стандартная световая микроскопия; б – поляризационная микроскопия; г, е – фазово-контрастная микроскопия. Окраска гематоксилином-эозином (а, в–е), окраска пикросириусом красным (б). Увеличение: а, б – $\times 50$; в–е – $\times 200$

Таким образом, при имплантации в область дефекта различных модификаций брушитно-ньюберитных цементов морфологический анализ показал, что во всех группах происходило снижение выраженности остеомиелита по сравнению с контролем: некроз кости уменьшался в среднем в 3,1 раза, а хроническое воспаление – в 1,6 раза (рисунок 6.30).

При этом слабее всего признаки остеомиелита (некроз кости, острое и хроническое воспаление) были выражены при использовании состава C-Mg2.25 и C-Mg2.25+V. В этих случаях некроза кости не наблюдалось; острое воспаление было минимальным или, вообще, отсутствовало; хроническое воспаление и фиброз были слабо выражены; костная регенерация была значительная.

Во всех группах материалов добавление ванкомицина стимулировало снижение выраженности острого и хронического воспаления, иногда уменьшение некроза. При этом слабее всего признаки остеомиелита (некроз кости, острое и хроническое воспаление) были выражены при использовании состава C-Mg2,25+V. В этих случаях некроза кости не наблюдалось; острое воспаление было минимальным или вообще отсутствовало; хроническое воспаление и фиброз были слабо выражены; костная регенерация была значительная.

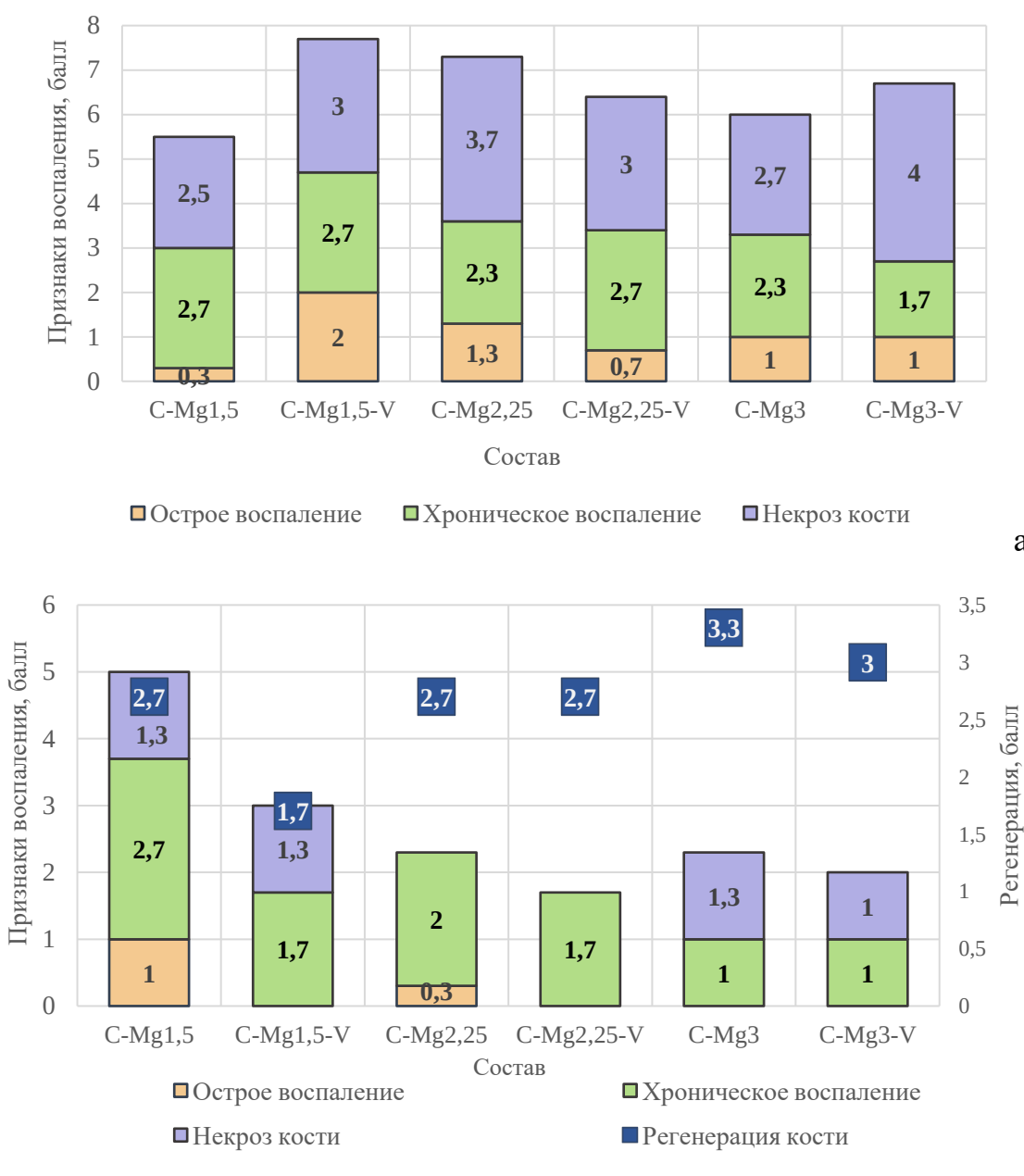


Рисунок 6.30 – Сравнительная балльная оценка выраженности остеомиелита и регенерации костной ткани: а – до имплантации MgCaPO_4 -цементов; б – через 3 мес. после имплантации

Исследование *in vivo* подтверждает биосовместимость, резорбируемость цементов, эффективность их использования в качестве носителей ванкомицина в лечении септического воспаления. После 3 мес. имплантации цементов различных составов наблюдалась резорбция материала и постепенное закрытие костного дефекта с восстановлением целостности кости в большинстве случаев. В соответствии с результатами томографического исследования более высокая

степень восстановления характерна для составов, содержащих ванкомицин, что связано со снижением степени септического воспаления. Это подтверждается результатами гистологического исследования, в соответствии с которыми наиболее выраженное уменьшение воспаления и некроза наблюдалось в составах с антибиотиком, даже в тех случаях, когда исходно некроз и воспаление характеризовались более высокими баллами по шкале в сравнении с составами, не содержащими антибиотик. Снижение степени воспаления и регенерация наблюдались в меньшей степени у составов, не содержащих ванкомицин. В соответствии с литературными данными, при введении ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} [48], снижается уровень воспалительных цитокинов, ионы магния способствуют поляризации макрофагов по фенотипу M2, демонстрирующих продукцию противовоспалительных цитокинов [378] и остеогенных факторов [379], а ионы этих элементов способны индуцировать пролиферацию остеобластов [56]. По этим причинам заполнение дефекта брушитно-ньюберитными цементами может быть эффективным способом борьбы с воспалением и способствовать восстановлению костной ткани.

6.3 Выводы

1. Замена ионов Ca^{2+} на Mg^{2+} в исходном компоненте цемента $\text{Mg}_x\text{Ca}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ обеспечивает получение брушитно-ньюберитного цемента переменного состава. Увеличение концентрации ионов магний влечет за собой повышение pH с 5,8 до близких к физиологическим значениям pH 7,2—7,4 и снижение пористости с ≈ 52 до $\approx 38\%$.
2. Ванкомицин в количестве 10 мас. % от массы цементного порошка не влияет на свойства цементного камня, такие как пористость, прочность, pH.
3. Увеличение количества ньюберита в составе брушитно-ньюберитного цемента пролонгирует выход ванкомицина за счет снижения пористости и увеличения адсорбции на поверхности кристаллов, что пролонгирует эффективность антибактериальных цементах в отношении золотистого стафилококка и кишечной палочки с трех до семи сут.

4. Брушитно-ньюберитные цементы биосовместимы, резорбируемы и эффективны в качестве носителей ванкомицина в лечении септического воспаления.

5. Резорбируемость брушитно-ньюберитного цемента прямопропорциональна увеличению ньюберита в его составе.

7 КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПО ЦЕМЕНТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ

7.1 Клиническое использование антибактериальных гранул на основе карбонатзамещенного гидроксиапатита в ветеринарии

В период май 2024 – апрель 2025 гг. в Сети Ветеринарных Центров «МЕДВЕТ» были проведены ревизионные операции в связи с несостоятельностью металлоконструкций или лечение патологий у 10 собак и кошек. При реоперациях были имплантированы блоки ксеногенного костного матрикса и кальцийфосфатных гранул состава 5.80 с ванкомицином в соотношении сухая цементная смесь / ванкомицин = 10/1. Протоколы хирургического вмешательства, рентгенограммы до, после ревизионной операции и контрольные снимки представлены по 4 животным в таблицах 7.1 – 7.8.

Марс, собака. Протокол хирургического вмешательства и рентгенологические снимки представлены в таблицах 7.1, 7.2.

Таблица 7.1 – Протокол хирургического вмешательства. Марс

Информация по животному	Марс, собака, Немецкая овчарка, чепрачный
Возраст	2 лет 1 мес 13 дн.
ОПЕРАЦИЯ. АНЕСТЕЗИЯ	
Операция: Реоперация. Диагноз: Несостоятельность металлоимплантов. Взятие бак посева.	
Анестезия Вес: 43 кг Премедикация: Амоксиклав 25 мг\кг, Транексам 15 мг\кг Индукция: Пропофол 5 мг\кг, Интубация: ЭТТ 10.0. Мониторинг: Ср.АД 78-109, ЧСС 83-121, сатурация 96-98, капнометрия 46-57. ИВЛ Интраоперационно: Изофлюран 1,3-2,0 об%, Постооперационная анальгезия: Мелоксивет 0,15 мг\кг. фентанил , кетамин , лидокаин 40 мкг/кг/мин, Амоксиклав 25мг\кг. Реверсия –	

плавная, без особенностей. Осложнения - не возникло. Пациент передан в ОРИТ для дальнейшей аналгезии и стабилизации состояния.

ЭТАПЫ

Кранио-латеральный доступ. Диссекция мягких тканей. Сопоставление отломков. Установка Блокированной Пластины VS M под винты 3,5 мм с латеральной стороны бедренной кости и VS L на краниальную поверхность, лаваж, имплантация блоков и крошка ксеногенного костного матрикса и кальцийфосфатных гранул с ванкомицином (рисунок 7.1), послойное ушивание операционной раны PDX 2-0,3-0.

По результатам микробиологического исследования обнаружен эпидермальный стафилококк (*Staphylococcus epidermidis*).

В область перелома после замены металлоконструкции были имплантированы блоки ксеногенного костного матрикса и крошки, и кальцийфосфатные гранулы с ванкомицином до момента заполнения оставшихся пустот.

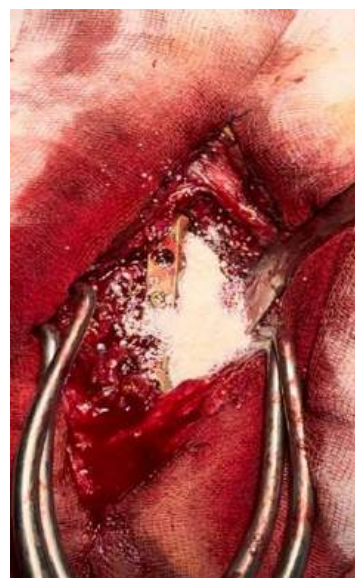
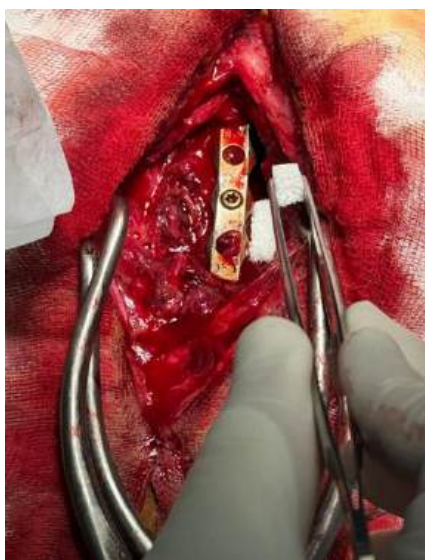


Рисунок 7.1 – Имплантация остеопластического материала в место перелома после замены металлоконструкции

Таблица 7.2 – Рентгенологические снимки. Марс

Этап	Снимки	
до операции 25.05.2024		
сразу после операции 25.05.2024		
Контроль 24.01.2025		

На рентгенограммах при поступлении определяется перипротезный перелом, ниже дистального конца эндопротеза, слом дополнительных металлоконструкций, миграция винтов.

После операции – определяется замененная ножка эндопротеза, добавление укрепляющих серкляжных проволоочных колец (для фиксации бедренной кости после интраоперационного перелома при извлечении предыдущей конструкции). Имплантированный остеопластический материал не визуализируется ввиду большого количества рентгеннепозитивных объектов. Ось конечности выправлена, сломанные металлоконструкции заменены.

Райс, собака. Протокол хирургического вмешательства и рентгенологические снимки представлены в таблицах 7.3, 7.4.

Таблица 7.3 – Протокол хирургического вмешательства. Райс

Информация по животному	Райс, собака, Немецкая овчарка
Возраст	8 лет 3 мес 26 дн
ОПЕРАЦИЯ. АНЕСТЕЗИЯ	
Операция: Ревизионная операция. Замена металлоимплантов. Диагноз – несостоятельность металлоимплантов (перелом ножки эндопротеза).	
Анестезия Вес: 48,6 кг Премедикация: цефазолин 20 мг/кг, транексам 15 мг/кг, Анальгезия: морфин (1), фентанил (8), кетамин (7) Индукция: Пропофол 2-4мг/кг. Интубация трахеи ЭТТ № 10 .0 Поддерживающая анестезия: изофлюран 1-2 об% Инфузионная терапия: Раствор стерофундина 7-9 мл/кг/час. Мониторинг состояния: ЧСС 71 ударов в минуту. ритм синусовый Среднее артериальное давление 80-90 мм.рт.ст. Сатурация 98- 99%. СО2 42 мм.рт.ст. Дыхание - ИВЛ. Температура 37,9 градусов С. Осложнений на анестезии не возникло. Реверсия: плавная, без особенностей. Послеоперационно: мелоксивет 0,1 мг/кг	

ЭТАПЫ

Краниолатеральный доступ к левому тазобедренному суставу, бедренной кости: рассечение кожи, подкожно-жировой клетчатки, рассечение поверхностной фасции бицепса, фасции латеральной головки квадрицепса, напрягателя широкой фасции бедра, поверхностной ягодичной мышцы, отведение поверхностной ягодичной и средней ягодичной мышцы дорсально, частичная миотомия глубокой ягодичной мышцы. Скелетирование наkostной пластины, извлечение винтов и снятие самой пластины. Извлечение блокируемого бикортикального винта длиной 40 мм. Частичная остэктомия бедренной кости осцилярной пилой в проксимальной части, взятие костной ткани, извлечение двух монокортикальных винтов 14мм. Вскрытие капсулы сустава, выделение и извлечение головки Head (19) и шейки Neck (L) эндопротеза. Извлечение ножки эндопротеза Stem (L) (при извлечении ятрогенная травма, перелом бедренной кости). Репозиция фрагментов бедренной кости. Установка и фиксация ножки эндопротеза Steam (XXL) и фиксация двумя блокируемыми бикортикальными винтами длиной 40 мм и тремя монокортикальным винтами 14мм. В область остэктомии аутоотрансплантация костной ткани (взятой ранее). Наложение 5-ти серкляжей проволока 1,0 мм. Контурирование и фиксация пластины VS Alfa Universal- L под винты 3,5 мм на латеральной поверхности бедра. Установки шейки XXL-S и головки размером 19 мм. Вправление головки протеза в чашку, проведение 3-х тестов (экстензия, флексия, ротация - признаков вывихивания нет). Обильный лаваж операционной раны стерильным изотоническим раствором + Бетадин. Взятие бактериологического посева (Пастер). Экспозиция р-ром SIMINI. Закладывание костного материала с антибиотиком (кальцийфосфатные гранулы с ванкомицином) в область перелома. Ушивание капсулы сустава и внутренней ягодичной мышцы. Послойное ушивание операционной раны PDX 1,2-0,3-0.

ОСЛОЖНЕНИЯ

При извлечении остинтегрируемого металлоимпланта (ножки эндопротеза) ятрогенная травма - сложный оскольчатый перелом бедренной кости.

Таблица 7.4 – Рентгенологические снимки. Райс

Этап	Снимки	
до операции 29.01.2025	 PreO	 PreOP R L
сразу после операции 29.01.2025	 PostO	 PostOp
Контроль 15.04.2025	 R L	 L

На рентгенограммах при поступлении определяется перелом шейки эндопротеза, нарушение целостности металлоконструкции.

После операции – определяется замененная ножка эндопротеза, добавление укрепляющих серкляжных проволочных колец (для фиксации бедренной кости после интраоперационного перелома при извлечении предыдущей конструкции). Имплантированный остеопластический материал не визуализируется ввиду большого количества рентгеннепозитивных объектов. Ось конечности выправлена, сломанные металлоконструкции заменены.

На контрольных рентгенограммах отмечается правильное стояние компонентов эндопротеза, регенеративное разрастание в области верхней-трети бедра, признаков воспаления, деструкции кости не обнаружено.

Шаман, собака. Протокол хирургического вмешательства и рентгенологические снимки представлены в таблицах 7.5, 7.6.

Таблица 7.5 – Протокол хирургического вмешательства. Шаман

Информация по животному	Шаман, собака, Метис
Возраст	4 лет 5 мес 8 дн
ОПЕРАЦИЯ. АНЕСТЕЗИЯ	
Операция: Ревизионная операция, замена металлоимплантов слева. Диагноз: несостоятельность импланта (перелом ножки эндопротеза). Постоперационная антиверсия – 19гр.	
Анестезия Вес : 27,5 кг Премедикация: Цефазолин 20мг/кг в/в, (в течение операции повторно 10 мг/кг каждые 40 минут), транексам 15 мг/кг ,морфин (5) Индукция : Пропофол 2-4мг/кг . Интубация трахеи ЭТТ № 10,0. Поддерживающая анестезия: изофлюран 1-2 об% Инфузионная терапия: Раствор стерофундина 7-9 мл/кг/час. Анальгезия: ИПС фентанила (2), ИПС кетамина (2). Мониторинг состояния: ЧСС 100 ударов в минуту. Среднее артериальное давление 90-95 мм.рт.ст. Сатурация 98- 99%. Дыхание - ИВЛ. Температура 36,8 градусов С.	

Длительность анестезии 120 мин. Осложнений на анестезии не возникло. Реверсия: плавная, без особенностей. Послеоперационно: мелоксивет 0,1 мг/кг

ЭТАПЫ

Краниолатеральный доступ к левому тазобедренному суставу, бедренной кости (рассечение кожи, подкожно-жировой клетчатки, рассечение поверхностной фасции бицепса, фасции латеральной головки квадрицепса, напрягателя широкой фасции бедра, поверхностной ягодичной мышцы, отведение поверхностной ягодичной и средней ягодичной мышцы дорсально, частичная миотомия глубокой ягодичной мышцы). Скелетирование бедренной кости. Извлечение двух бикортикальных винтов и одного монокортикального. Частичная остэктомия бедренной кости осцилярной пилой в проксимальной части. Извлечение ножки эндопротеза V@art (размер S) (при извлечении остинтегрируемого металлоимпланта (ножки эндопротеза) ятрогенная травма- сложный оскольчатый перелом бедренной кости). Репозиция фрагментов бедренной кости. Установка и фиксация ножи Эндопротеза (размер S) двумя бикортикальными винтами и одним монокортикальным винтом. Наложение 2-ух серкляжей (проволока 1,2 мм) и одного (проволока 1,0 мм). Контурирование фиксации пластины VS Alfa UNIVERSAL размером M под винты 3,5 мм на латеральной поверхности бедра, имплантация блоков ксеногенного костного матрикса. Экспозиция р-ром SIMINI. Диссекция мягких тканей, артротомия. Извлечение шейки (размер S) с частью ножки, головки (16). Установка шейки (размер M), головки (16,) вправление головки протеза в чашку, проведение 3-х тестов (экстензия, флексия, ротация - признаков вывихивания нет). Взятие бактериологического посева (Пастер). Обильный лаваж операционной раны стерильным изотоническим р-ром + бетадин. Ушивание капсулы сустава PDX 1. В область остэктомии заложен синтетический костный материал (кальцийфосфатные гранулы с ванкомицином). Послойное ушивание операционной раны с закладыванием гемостатической губки с гентамицином PDX 0, 2-0,3-0

ОСЛОЖНЕНИЯ

При извлечении остинтегрируемого металлоимпланта (ножки эндопротеза) ятрогенная травма – сложный оскольчатый перелом бедренной кости

Таблица 7.6 – Рентгенологические снимки. Шаман

Этап	Снимки	
до операции 19.03.2025		
Контроль		

На рентгенограммах при поступлении определяется перелом шейки эндопротеза, нарушение целостности металлоконструкции.

На контрольных рентгенограммах ось конечности выправлена, сломанные металлоконструкции заменены, регенерат в области верхней-трети бедра, имплантированный остеопластический материал теряется в тенях рентгеннепозитивных объектов, признаков воспаления, деструкции кости не обнаружено.

Василий, кошка. Протокол хирургического вмешательства и рентгенологические снимки представлены в таблицах 7.7, 7.8.

Таблица 7.7 – Протокол хирургического вмешательства. Василий

Информация по животному	Василий, кошка
Возраст	10 мес 5 дн
ОПЕРАЦИЯ. АНЕСТЕЗИЯ.	
Операция: Костная киста плечевой кости правой грудной конечности размерами 1х3 см инфицированная <i>Salmonella</i> sp.	
Анестезия Вес: 3,7 кг Премедикация: Цефазолин 20мг/кг, транексам 15 мг/кг. Анальгезия: анастетик 0,2 мг/кг. Вводная анестезия: пропофол 3-4 мг/кг. Интубация трахеи ЭТТ ;4.0. Проводниковая анестезия: ропивакаин 1 мг/кг. Поддерживающая анестезия: изофлюран 1-2% об. Инфузионная поддержка: стерофундин 3мл/кг/ч. Интраоперационный мониторинг: Дыхание – ИВЛ. Сатурация 98- 100%. ЧСС 104 ударов в минуту. Среднее артериальное давление 79 мм.рт.ст. Температура 36,8 °С. Особенности: гипотония, купирование – мезатон 5 мкг/кг. Длительность анестезии 60 мин. Послеоперационная анальгезия: мелоксивет 0,1 мг/кг. Реверсия плавная.	
ЭТАПЫ	
Латеральный доступ к плечевой кости правой грудной конечности. Диссекция мягких тканей, выделение лучевого нерва. Скелетирование плечевой кости. Вскрытие кисты при помощи хирургической фрезы. Взятие материала на бактериологический посев. Экспирация содержимого кисты. Материал отправлен на гистологическое исследование. Обильный лаваж р-ром NaCl + бетадин.	

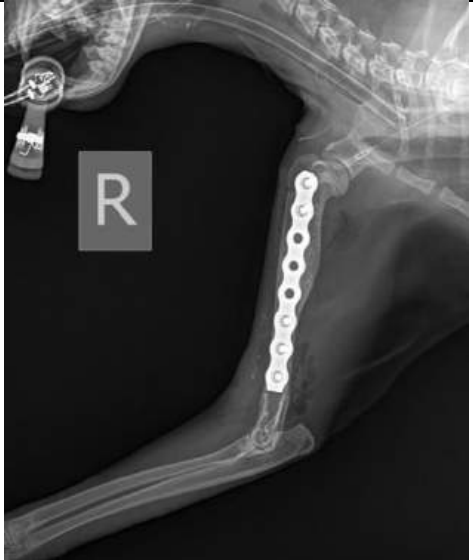
Скарификация полости кисты хирургической фрезой. Обильный лаваж р-ром NaCl + бетадин. Экспозиция р-ром SIMINI. Заполнение костного дефекта костным заменителем с антибиотиком (кальцийфосфатные гранулы с ванкомицином). Контурирование и фиксация накостной пластины на латеральной поверхности плечевой кости VS Alfa UNIVERSAL размером под М винты 2,7 мм. Послойное ушивание операционной раны с PDX 2-0, 3-0, 4-0.

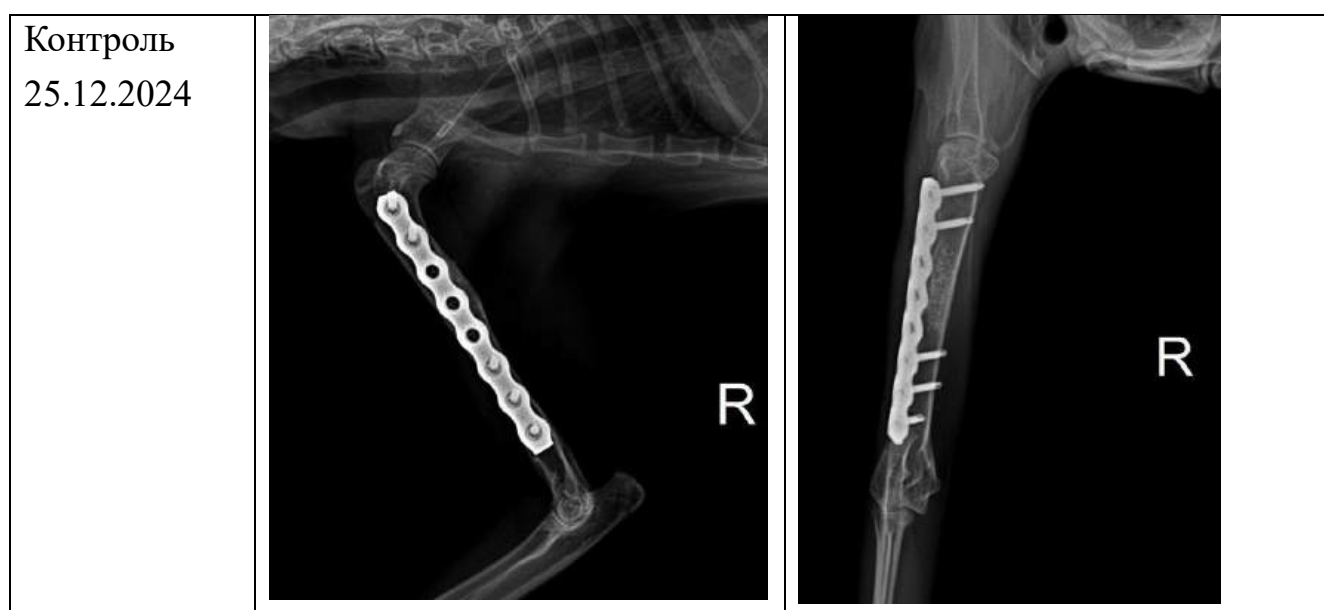
ОСЛОЖНЕНИЯ

Не возникли

Операция направлена на зачистку костной кисты и укрепление плечевой кости для предотвращения патологических переломов.

Таблица 7.8 – Рентгенологические снимки. Василий

Этап	Снимки	
до операции 21.07.2024		
сразу после операции 21.07.2024		



На рентгенограммах при поступлении определяется костная киста овальной формы в верхней трети плечевой кости, утоньшение и деформация кортикального слоя кости в зоне роста кисты.

После операции визуализируется остеопластический материал, полностью заполняющий костную полость, дополнительная фиксация пластиной с винтами.

На контрольных рентгенограммах ось конечности сохранена, сломанные металлоконструкции в правильном положении, без миграции. Остеопластический материал визуализируется больше в костномозговом канале, частично резорбирован. Деформация кортикального слоя кости уменьшена, а толщина кортикального слоя возрасла.

7.2 Возможности клинического применения кальцийфосфатных материалов

Регистрация медицинских изделий – государственная процедура, цель которой разрешить выпуск на российский рынок качественных и безопасных изделий.

Частью 4 ст. 38 Федерального закона от 21.11.2011 № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» установлено, что на территории Российской Федерации разрешается обращение медицинских изделий,

зарегистрированных в порядке, установленном Правительством Российской Федерации, уполномоченным им федеральным органом исполнительной власти.

Медицинское изделие «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций», являющееся результатом данной работы было успешно зарегистрировано в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения в 2017 г.

На момент регистрации медицинского изделия «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» действовал порядок государственной регистрации, утвержденный постановлением Правительства РФ от 27 декабря 2012 г. № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий», в соответствии с которым государственная регистрация медицинских изделий проводится на основании результатов технических испытаний, токсикологических исследований, клинических испытаний, представляющих собой формы оценки соответствия медицинских изделий с учетом классификации в зависимости от потенциального риска их применения, и экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий, а также испытаний в целях утверждения типа средств измерений (в отношении медицинских изделий, относящихся к средствам измерений в сфере государственного регулирования обеспечения единства измерений, перечень которых утверждается Министерством здравоохранения Российской Федерации).

Результаты испытаний на медицинское изделие «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» и регистрационное удостоверение, выданное Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения представлены в приложении Б.1.

7.3 Выводы

1. Кальцийфосфатные материалы на основе цемента, содержащие антибактериальные вещества, эффективно применяются в ветеринарии в качестве остеопластического материала для заполнения дефектов, стимулируют

формирование новообразованной костной ткани и предотвращают септические воспаления.

2. Технические, токсикологические, клинические испытания, представляющие собой формы оценки соответствия медицинских изделий, подтвердили надежность, эффективность, безопасность медицинского изделия «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций», что обеспечило его регистрацию в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения в 2017 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена зависимость фазового состава цементного камня от соотношения исходных компонентов цементной системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O с возможностью прогнозирования для оптимизации конечного состава, определено влияние фазового состава цементного камня на его физико-технические, физико-химические, физико-механические свойства и поведение *in vivo*. Один из составов системы является коммерческим медицинским изделием Norian Corporation (Norian SRS™, Skeletal Repair Sistem). В научной литературе приводятся исследования по регулированию сроков схватывания за счет изменения концентрации гидрофосфата натрия. Составы системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O с метастабильными соединениями и ионными замещениями впервые рассмотрены в тетраэдре состава с изменениями концентраций всех исходных компонентов и определения влияния изменения концентрации каждого из них на состав и свойства продукта, позволяя управлять характеристиками.

Разработаны медицинские изделия на основе цементов, в том числе обладающие высокой биосовместимостью и эффективностью при восстановлении костной ткани, что доказано сериями доклинических исследований *in vivo*. Некоторые из разработанных материалов прошли государственную регистрацию в Росздравнадзоре (Регистрационное удостоверение на медицинское изделие №РНЗ 2017/5739 от 22.05.2017 г.). Цементы с антибактериальной активностью являются терапевтически эффективными носителями субстанциями при заживлении костного дефекта в условиях окружающего гнойно-септического воспаления и могут быть рассмотрены в качестве носителя для проведения антибактериальной терапии локально, в месте имплантации.

Полученные в ходе исследования результаты полностью соответствуют поставленной цели работы и позволяют сделать следующие основные выводы.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Фазовый состав цементного камня зависит от соотношения исходных компонентов вяжущей системы α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – CaCO_3 – $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – H_2O , условий ионных замещений и образования метастабильной фазы ДКФД в составе цементного камня. Увеличение количества $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ приводит к увеличению $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и снижению количества ионов CO_3^{2-} в конечном составе, что позволяет управлять скоростью резорбции цементного камня. Фазовый состав влияет на физико-технические, физико-химические, физико-механические свойства цементного камня: значения pH составов 6,44–7,58, прочность составляет 29–35 МПа для составов, содержащих α -ТКФ в количестве 80 мас.% и снижается до 3–28 МПа для составов, содержащих α -ТКФ в количестве 60 мас.%; сроки схватывания уменьшаются при снижении количества α -ТКФ, наибольшие сроки начала схватывания приходятся на мольное соотношение $\text{CaCO}_3 / \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = 6,29$ и могут регулироваться в пределах от менее 1 мин. до более 1 ч.

2. Данные, полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo* коррелируют между собой: наиболее интенсивная резорбция материала *in vivo* и костная регенерация была характерна для составов, содержащих больше ДКФД (состав фигуративной точки 9 по сравнению с составами точек 6 и 9) и карбонат-групп (состав фигуративной точки 5.60 по сравнению с составами точек 5.70 и 5.80), что приводит к достаточно зрелой структуре новообразованной кости. Все исследуемые в экспериментах *in vivo* составы показывают хорошую костную регенерацию с заполнением области дефекта новообразованной костной тканью.

3. Цементная технология создания макропористых кальцийфосфатных материалов, обладающих антибактериальным эффектом, с равномерным распределением и контролируемой скоростью выхода лекарственного вещества, основанные на неводной экстракции органического гранулярного наполнителя, является эффективной для сохранения концентрации и активности инкорпорированной функциональной субстанции в пористых матриксах до 9–17 сут. в отношении *S.Aureus* и 4–22 сут. в отношении *E.coli*. Оптимальные условия

гидратации подпрессованных при 130 МПа блоков получены при температуре 60 °С, влажности 100% и среднем размере частиц α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = 6,12$ мкм для получения матриксов с открытой пористостью ≈ 46 % и прочностью на сжатие ≈ 15 МПа при использовании в качестве порошка 30 мас.% гранул полиэтиленгликоля размером 100–600 мкм. Профиль выхода антибиотика из матриксов приближенно соответствует модели Кросмейера-Пеппаса и наиболее точно модели Хигучи в начальный период высвобождения до 7 часов.

4. Резорбируемость, макропористость кальцийфосфатных цементов и химическая природа, концентрации антибиотика влияют на кинетические особенности выхода антибактериальной субстанции и антимикробную эффективность материалов, полученных по цементной технологии. Ванкомицин и рифампицин совместимы с цементами без значимого влияния на свойства цементного камня и потери антимикробной активности последних. Объемное инкорпорирование фосфомицина препятствует реакции гидратации и снижает эффективность антибиотика. Составы, обладающие более высокой скоростью растворения и пористостью, ускоряют высвобождение антибиотиков, не снижая их эффективности, с 19 сут. против *S. aureus* для состава 5.5, содержащего ванкомицин до 7 сут. для состава 9.2. Объемное инкорпорирование антибиотика в кальцийфосфатные цементы оказывает положительный эффект при лечении септических воспалений. Присутствие относительно основного карбоната кальция в составе цементного камня приводит к более выраженной резорбции материала при сохранении дефекта, что связано с высокой растворимостью при низких значениях pH в ране при воспалении. Эффективность одного состава цемента против патогенов зависит от инкорпорированного антибиотика. Наиболее пролонгированный релиз характерен для рифампицин-содержащего состава 5.5.80, наименее – для фосфомицин-содержащего: против *S. aureus* 22 сут. и 2 сут., соответственно; против *P. Aeruginosa* 8 сут. и 3 сут., соответственно.

5. Кинетические особенности деградации высокорезорбируемых брушитно-ньюберитных цементов зависят от исходного состава: варьированием соотношения ионов $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ в $\beta\text{-Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ от 0 до 3 возможно

контролирование скорости резорбции цементов переменного состава и выхода ванкомицина. Цементы на основе прекурсора $Mg_xCa_{(3-x)}(PO_4)_2$ ингибировали рост бактерий *S.aureus* от 3 сут. для состава $Ca_3(PO_4)_2$ до 8 сут. для состава $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$. Открытая пористость цемента уменьшается при увеличении количества ньюберита в составе с 52% для С-Mg0 до 38% для С-Mg3, прочность при сжатии всех составов соответствует прочности спонгиозной кости (6,3–10,3 МПа), значения pH находятся в диапазоне 5,7–6,7. Установлено наличие активной и объемной пассивной резорбции брушитно-ньюберитных цементов, основанной на разности скоростей химического растворения брушита и ньюберита, добавление ванкомицина стимулирует снижение выраженности острого и хронического воспаления, иногда уменьшение некроза при костной имплантации.

6. Технологии получения кальцийфосфатных цементов и медицинских изделий на их основе внедрены в производство, получено разрешение Росздравнадзора РФ (Регистрационное удостоверение № РЗН 2017/5739 от 22.05.2017 г.) на производство, продажу и применение в медицинской практике на территории РФ изделия медицинского назначения «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций».

Перспективы дальнейшего исследования связаны с изучением возможности функционализации кальцийфосфатных цементов инкорпорированием сочетания антибактериальных и остеогенных веществ, возможности пролонгации выхода антибактериальных веществ и получение разрешения Росздравнадзора РФ на производство, продажу и применение в медицинской практике медицинских изделий на основе кальцийфосфатных цементов с антибактериальной активностью.

Список литературы

1. Doblaré M., García J.M., Gómez M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: A review // *Eng. Fract. Mech.* – 2004. – V. 71. – P. 1809–1840. <https://doi.org/10.1016/j.engfracmech.2003.08.003>.
2. Pajarinen J., Lin T., Gibon E., Kohno Y., Maruyama M., Nathan K., Lu L., Yao Z., Goodman S.B. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing // *Biomaterials.* – 2019. – V. 196. – P. 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.025>.
3. Zhang X., Hassan M.G., Scheller E.L. Neural regulation of bone marrow adipose tissue // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2021. – V. 35. – P. 101522. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2021.101522>.
4. Li Y., Meng Y., Yu X. The unique metabolic characteristics of bone marrow adipose tissue // *Front. Endocrinol.* – 2019. – V. 10. – P. 69. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00069>.
5. Jouret F., Wu J., Hull M., Rajendran V., Mayr B., Schöfl C., Geibel J., Caplan M.J. Activation of the Ca²⁺-sensing receptor induces deposition of tight junction components to the epithelial cell plasma membrane // *J. Cell Sci.* – 2013. – V. 126. – P. 5132–5142. <https://doi.org/10.1242/jcs.127555>.
6. Kitay A.M., Geibel J.P. Stomach and bone // *Understanding the Gut-Bone Signaling Axis: Mechanisms and Therapeutic Implications*. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer, – 2017. – P. 97–131. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66653-2_6.
7. Rammelt S. Management of ankle fractures in the elderly // *EFORT Open Rev.* – 2016. – V. 1. – P. 239–246. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.1.000023>.
8. Wang W., Yeung K.W.K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review // *Bioact. Mater.* – 2017. – V. 2. – P. 224–247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.
9. Christy P.N., Basha S.K., Kumari V.S., Bashir A.K.H., Maaza M., Kaviyarasu K., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A., Ignacimuthu S. Biopolymeric nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications—A review // *J. Drug*

Deliv. Sci. Technol. –2020. – V. 55. – P. 101452.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101452>.

10. Hu C., Ashok D., Nisbet D.R., Gautam V. Bioinspired surface modification of orthopedic implants for bone tissue engineering // *Biomaterials*. –2019. – V. 219. – P. 119366. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119366>.

11. Qiu Z.-Y., Cui Y., Wang X.-M. Natural Bone Tissue and Its Biomimetic // *Mineralized Collagen Bone Graft Substitutes*. Sawston, UK: Woodhead Publishing, – 2019. –P. 1–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102717-2.00001-1>.

12. Elliott J. C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Elsevier, –2013. – P. 308.

13. Brunton P. A., Davies R. P. W., Burke J. L., Smith A., Aggeli A., Brookes S. J., Kirkham J. Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides—a clinical safety trial // *British dental journal*. – 2013. – V. 215. – № 4. – P. E6-E6.

14. Jeong J., Kim J. H., Shim J. H., Hwang N. S., Heo C. Y. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration // *Biomaterials research*. – 2019. –V. 23. – № 1. – P. 4.

15. Wopenka B., Pasteris J. D. A mineralogical perspective on the apatite in bone // *Mater. Sci. Eng.* –2005. –V. –C 25. – P. 131–143.

16. Vallet-Regí M. Ceramics for medical applications // *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* – 2001. –V. 2. –P. 97–108. <https://doi.org/10.1039/B007852M>.

17. Suchanek W., Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants // *J. Mater. Res.* –1998. – V. 13. –P. 94–117. <https://doi.org/10.1557/JMR.1998.0015>.

18. Legros R., Balmain N., Bonel G. Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone // *Calcif. Tissue Int.* –1987. – V. 41. – P. 137–144.

19. Von Euw S., Wang Y., Laurent G., Drouet C., Babonneau F., Nassif N., Azaïs T. Bone mineral: new insights into its chemical composition // *Scientific reports*. – 2019. –V. 9. –№ 1. –P. 8456.

20. Wegst U.G., Bai H., Saiz E., Tomsia A.P., Ritchie R.O. Bioinspired structural materials // *Nat. Mater.* –2015. – V. 14. – P. 23–36. <https://doi.org/10.1038/nmat4089>.
21. Currey J.D. The structure and mechanics of bone // *J. Mater. Sci.* –2012. – V. 47. –P. 41–54. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-5914-9>.
22. Reznikov N., Shahar R., Weiner S. Bone hierarchical structure in three dimensions // *Acta Biomater.* –2014. – V. 10. – P. 3815–3826. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.024>.
23. Yi H., Ur Rehman F., Zhao C., Liu B., He N. Recent advances in nano scaffolds for bone repair // *Bone Res.* –2016. –V. 4. – P. 16050. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.50>.
24. Kozielski M., Buchwald T., Szybowicz M., Błaszczak Z., Piotrowski A., Ciesielczyk B. Determination of composition and structure of spongy bone tissue in human head of femur by Raman spectral mapping // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2011. – V. 22. –P. 1653–1661. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4353-0>.
25. Cross L.M., Thakur A., Jalili N.A., Detamore M., Gaharwar A.K. Nanoengineered biomaterials for repair and regeneration of orthopedic tissue interfaces // *Acta Biomater.* –2016. – V. 42. – P. 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.023>.
26. Salhotra A., Shah H. N., Levi B., Longaker M. T. Mechanisms of bone development and repair // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* –2020. –V. 21. –№ 11. –P. 696–711. doi:10.1038/s41580-020-00279-w.
27. Кеттайл В.М. Патофизиология эндокринной системы / Кеттайл В.М., Арки Р.А. - Пер.с англ.- СПб.- М.: «Невский диалект» - Издат. Бином., –2001. –Р. 115.
28. Ньюман, У.Ф. Минеральный обмен кости / Ньюман У.Ф., Ньюман М. - М.: Изд-во ин. лит-ры, – 1961. – 270 с.
29. Mirzaali M.J., Schwiedrzik J.J., Thaiwichai S., Best J.P., Michler J., Zysset P.K., Wolfram U. Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly // *Bone.* – 2016. – V. 93. –P. 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.018>.

30. Kokubo T., Kim H.-M., Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties // *Biomaterials*. – 2003. – V. 24. – P. 2161–2175. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00044-9).
31. Augat P., Schorlemmer S. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength // *Age Ageing*. – 2006. – V. 35. – P. ii27–ii31. <https://doi.org/10.1093/ageing/afl081>.
32. Grimal Q., Laugier P. Quantitative ultrasound assessment of cortical bone properties beyond bone mineral density // *IRBM*. – 2019. – V. 40. – P. 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.irbm.2018.10.006>.
33. Boughton O.R., Ma S., Cai X., Yan L., Peralta L., Laugier P., Marrow J., Giuliani F., Hansen U., Abel R.L., Grimal Q., Cobb J.P. Computed tomography porosity and spherical indentation for determining cortical bone millimetre-scale mechanical properties // *Sci. Rep.* – 2019. – V. 9. – P. 7416. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43686-6>.
34. Bernard S., Schneider J., Varga P., Laugier P., Raum K., Grimal Q. Elasticity–density and viscoelasticity–density relationships at the tibia mid-diaphysis assessed from resonant ultrasound spectroscopy measurements // *Biomech. Model Mechanobiol.* – 2016. – V. 15. – P. 97–109. <https://doi.org/10.1007/s10237-015-0689-6>.
35. Pountos I., Georgouli T., Blokhuis T.J., Pape H.C., Giannoudis P.V. Pharmacological agents and impairment of fracture healing: What is the evidence? // *Injury*. – 2008. – V. 39. – P. 384–394. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.10.035>.
36. Toosi S., Behravan J. Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides // *Biofactors*. – 2019. – V. 46. – P. 326–340. <https://doi.org/10.1002/biof.1598>.
37. Ene R., Nica M., Ene D., Cursaru A., Cirstoiu C. Review of calcium-sulphate-based ceramics and synthetic bone substitutes used for antibiotic delivery in PJI and osteomyelitis treatment // *EFORT Open Rev.* – 2021. – V. 6. – P. 297. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.6.200083>.
38. Van de Belt H., Neut D., Schenk W., van Horn J.R., van der Mei H.C., Busscher H.J. Infection of orthopedic implants and the use of antibiotic-loaded bone

cements: A review // *Acta Orthop. Scand.* – 2001. – V. 72. – P. 557–571. <https://doi.org/10.1080/000164701317268978>.

39. Hanssen A.D. Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2005. – V. 437. P. 91–96. <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000175713.30506.77>.

40. Wiesli M.G., Kaiser J.P., Gautier E., Wick P., Maniura-Weber K., Rottmar M., Wahl P. Influence of ceftriaxone on human bone cell viability and in vitro mineralization potential is concentration-and time-dependent // *Bone Jt. Res.* – 2021. – V. 10. – P. 218–225. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.103.BJR-2020-0412>.

41. Mbese Z., Aderibigbe B.A. Bisphosphonate-Based conjugates and derivatives as potential therapeutic agents in osteoporosis, bone cancer and metastatic bone cancer // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – P. 6869. <https://doi.org/10.3390/ijms22136869>.

42. Berenson J.R., Rosen L.S., Howell A., Porter L., Coleman R.E., Morley W., Dreicer R., Kuross S.A., Lipton A., Seaman J.J. Zoledronic acid reduces skeletal-related events in patients with osteolytic metastases: A double-blind, randomized dose–response study // *Cancer.* – 2001. – V. 91. – P. 1191–1200. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010401\)91:7<1191::AID-CNCR1119>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010401)91:7<1191::AID-CNCR1119>3.0.CO;2-0).

43. Natesan V., Kim S.J. Metabolic bone diseases and new drug developments // *Biomol. Ther.* – 2022. – V. 30. – P. 309. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2022.007>.

44. Fabre S., Funck-Brentano T., Cohen-Solal M. Anti-sclerostin antibodies in osteoporosis and other bone diseases // *J. Clin. Med.* – 2020. – V. 9. – P. 3439. <https://doi.org/10.3390/jcm9113439>.

45. Lew D.P., Waldvogel F.A. Osteomyelitis // *Lancet.* – 2004. – V. 364. – P. 369–379. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16727-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16727-5).

46. Galusha A.L., Howard L.J., Kruger P.C., Marks T., Parsons P.J. Bone mineral composition among long-term parenteral nutrition patients: Postmortem assessment of calcium, phosphorus, magnesium, and select trace elements // *J. Parenter. Enteral. Nutr.* – 2020. – V. 45. – P. 175–82. <https://doi.org/10.1002/jpen.1818>.

47. Xing T., Hu Y., Wang B., Zhu J. Role of oral calcium supplementation alone or with vitamin D in preventing post-thyroidectomy hypocalcaemia: A meta-analysis // *Medicine*. – 2019. – V. 98. – P. e14455. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014455>.
48. Song Y., Xu L., Jin X., Chen D., Jin X., Xu G. Effect of calcium and magnesium on inflammatory cytokines in accidentally multiple fracture adults: A short-term follow-up // *Medicine*. – 2022. – V. 101. – P. e28538. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000028538>.
49. Chapuy M.C., Arlot M.E., Duboeuf F., Brun J., Crouzet B., Arnaud S., Delmas P.D., Meunier P.J. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women // *N. Engl. J. Med.* – 1992. – V. 327. – P. 1637–1642. <https://doi.org/10.1056/NEJM199212033272305>.
50. Notomi T., Kuno M., Hiyama A., Nozaki T., Ohura K., Ezura Y., Noda M. Role of lysosomal channel protein TPC2 in osteoclast differentiation and bone remodeling under normal and low-magnesium conditions // *J. Biol. Chem.* – 2017. – V. 292. – P. 20998–21010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780072>.
51. Ben-Nissan B. (ed.). *Advances in calcium phosphate biomaterials*. Berlin, Germany: Springer–, 2014. – V. 2. – P. 74.
52. Fujii E., Ohkubo M., Tsuru K., Hayakawa S., Osaka A., Kawabata K., Babonneau F. Selective protein adsorption property and characterization of nanocrystalline zinc-containing hydroxyapatite // *Acta Biomater.* – 2006. – V. 2. – № 1. – P. 69-74.
53. Tsapikouni T. S., Missirlis Y. F. Protein–material interactions: From micro-to-nano scale // *Materials Science and Engineering: B*. – 2008. – V. 152. – № 1-3. – P. 2-7.
54. Peacock M. Calcium metabolism in health and disease // *Clinical Journal of the American society of nephrology*. – 2010. – V. 5. – Supplement 1. – P. S23-S30.
55. Pi M., Faber P., Ekema G., Jackson P.D., Ting A., Wang N., Fontilla-Poole M., Mays R.W., Brunden K.R., Harrington J.J., Quarles L.D. Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 40201–40209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505186200>.

56. Li W., Chen W., Lin Y. The efficacy of parathyroid hormone analogues in combination with bisphosphonates for the treatment of osteoporosis: A meta-analysis of randomized controlled trials // *Medicine*. – 2015. – V. 94. – P. e1156. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001156>.
57. Kuroda Y., Hisatsune C., Nakamura T., Matsuo K., Mikoshiba K. Osteoblasts induce Ca^{2+} oscillation-independent NFATc1 activation during osteoclastogenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. –2008. –V. 105. – № 25. –P. 8643-8648.
58. Liu D., Genetos D. C., Shao Y., Geist D. J., Li J., Ke H. Z., Duncan R. L. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca^{2+} -and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts // *Bone*. –2008. – V. 42. – № 4. – P. 644-652.
59. Danciu T. E., Adam R. M., Naruse K., Freeman M. R., Hauschka P. V. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts // *FEBS letters*. –2003. –V. 536. –№ 1-3. – P. 193-197.
60. Khoshniat S., Bourguine A., Julien M., Weiss P., Guicheux J., Beck L. The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals // *Cellular and molecular life sciences*. – 2011. –V. 68. – P. 205-218.
61. Tada H., Nemoto E., Foster B. L., Somerman M. J., Shimauchi H. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells // *Bone*. – 2011. –V. 48. – № 6. – P. 1409-1416.
62. Mozar A., Haren N., Chasseraud M., Louvet L., Mazière C., Wattel A., Massy Z. A. High extracellular inorganic phosphate concentration inhibits RANK–RANKL signaling in osteoclast-like cells // *Journal of cellular physiology*. – 2008. – V. 215. – № 1. – P. 47-54.
63. Che J., Yang J., Zhao B., Zhang G., Wang L., Peng S., Shang P. The effect of abnormal iron metabolism on osteoporosis // *Biol. Trace Elem. Res*. –2020. –V. 195. – P. 353–365. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01867-4>.

64. Samavedi S., Whittington A. R., Goldstein A. S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior // *Acta Biomater.* –2013. – V. 9. – № 9. – P. 8037-8045.
65. Liu Y. K., Lu Q. Z., Pei R., Ji H. J., Zhou G. S., Zhao X. L., Zhang M. The effect of extracellular calcium and inorganic phosphate on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro: implication for bone tissue engineering // *Biomedical materials.* – 2009. –V. 4. – № 2. –P. 025004.
66. Aronov D., Rosen R., Ron E. Z., Rosenman G. Tunable hydroxyapatite wettability: effect on adhesion of biological molecules // *Process Biochemistry.* –2006. – V. 41. –№ 12. –P. 2367-2372.
67. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials // *Biomaterials.* – 2000. – V. 21. – № 7. – P. 667-681.
68. Lim J. Y., Liu X., Vogler E. A., Donahue H. J. Systematic variation in osteoblast adhesion and phenotype with substratum surface characteristics // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* – 2004. – V. 68. –№ 3. – P. 504-512.
69. Krenzlin H., Foelger A., Mailänder V., Blase C., Brockmann M., Düber C., Ringel C., Keric N. Novel biodegradable composite of calcium phosphate cement and the collagen I mimetic P-15 for pedicle screw augmentation in osteoporotic bone // *Biomedicines.* –2021. –V. 9. – P. 1392. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101392>.
70. Lin Y., Huang S., Zou R., Gao X., Ruan J., Weir M.D., Reynolds M.A., Qin W., Chang X., Fu H., Xu H.H.K. Calcium phosphate cement scaffold with stem cell co-culture and prevascularization for dental and craniofacial bone tissue engineering // *Dent. Mater.* –2019. – V. 35. – P. 1031–1041. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.04.009>.
71. Van Oirschot B., Mikos A.G., Liu Q., van den Beucken J.J., Jansen J. A. Fast Degradable Calcium Phosphate Cement for Maxillofacial Bone Regeneration // *Tissue Eng. Part A.* – 2023. – V. 29. – P. 161–171. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2022.0177>.

72. Lewandrowski K.-U., DGresser J., Wise D.L., Trantolo D.J. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: A histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats // *Biomaterials*. – 2000. – V. 21. – P. 757–764. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00179-9](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00179-9).
73. Pupilli F., Ruffini A., Dapporto M., Tavoni M., Tampieri A., Sprio S. Design Strategies and Biomimetic Approaches for Calcium Phosphate Scaffolds in Bone Tissue Regeneration // *Biomimetics*. – 2022. – V. 7. – P. 112. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030112>.
74. Tavoni M., Dapporto M., Tampieri A., Sprio S. Bioactive calcium phosphate-based composites for bone regeneration // *J. Compos. Sci.* – 2021. – V. 5. – P. 227. <https://doi.org/10.3390/jcs5090227>.
75. Tamimi F., Kumarasami B., Doillon C., Gbureck U., le Nihouannen D., Cabarcos E.L., Barralet J.E. Brushite-collagen composites for bone regeneration // *Acta Biomater.* – 2008. – V. 4. P. 1315–1321.
76. Young A.M., Ng P.Yu.J., Gbureck U., Nazhat Sh.N., Barralet J.E., Hofmann M.P. Characterization of chlorhexidine-releasing, fast-setting, brushite bone cements // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – V. 4. – P. 1081–1088.
77. Skriabin A.S., Shakurov A.V., Vesnin V.R., Lukina Y.S., Tsygankov P.A., Bionyshev-Abramov L.L., Serejnikova N.B., Vorob'ev E.V. Titanium Membranes with Hydroxyapatite/Titania Bioactive Ceramic Coatings: Characterization and In Vivo Biocompatibility Testing // *ACS Omega*. – 2022. – V. 7. – P. 47880–47891. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05718>.
78. Drevet R., Benhayoune H. Electrodeposition of Calcium Phosphate Coatings on Metallic Substrates for Bone Implant Applications: A Review // *Coatings*. – 2022. – V. 12. – P. 539. <https://doi.org/10.3390/coatings12040539>.
79. Lodoso-Torrecilla I., van den Beucken J.J., Jansen J.A. Calcium phosphate cements: Optimization toward biodegradability // *Acta Biomater.* – 2021. – V. 119. – P. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.10.013>.

80. Safronova T.V., Selezneva I.I., Tikhonova S.A., Kiselev A.S., Davydova G.A., Shatalova T.B., Larionov D.S., Rau J.V. Biocompatibility of biphasic α , β -tricalcium phosphate ceramics in vitro // *Bioact. Mater.* – 2020. – V. 5. – P. 423–427. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.03.007>.
81. Yuan H., Li Y., de Bruijn J., de Groot K., Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: A study in dogs // *Biomaterials.* – 2000. – V. 21. – P. 1283–1290. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00016-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00016-8).
82. Hofmann M.P., Mohammed A.R., Perrie Y., Gbureck U., Barralet J.E. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities // *Acta Biomater.* – 2009. – V. 5. – P. 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.08.005>.
83. Tamimi F., Sheikh Z., Barralet J. Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite // *Acta Biomater.* – 2012. – V. 8. – № 2. – P. 474–487. [doi:10.1016/j.actbio.2011.08.005](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.08.005).
84. Hurle K., Neubauer J., Böhner M., Doeblin N., Goetz-Neunhoeffler F. Effect of amorphous phases during the hydraulic conversion of α -TCP into calcium-deficient hydroxyapatite // *Acta Biomater.* – 2014. – V. 10. – P. 3931–3941. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.017>.
85. Irbe Z., Loca D. Soluble phosphate salts as setting aids for premixed calcium phosphate bone cement pastes // *Ceram. Int.* – 2021. – V. 47. – P. 24012–24019. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.05.110>.
86. Wang X.H., Jia S.J., Hao D.J. Advances in the modification of injectable calcium-phosphate-based bone cements for clinical application // *Chin. Med. J.* – 2020. – V. 133. – P. 2610–2612. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001092>.
87. Böhner M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery // *Eur. Spine J.* – 2001. – V. 10. – Suppl. 2. – P. S114–S121. <https://doi.org/10.1007/s005860100276>.
88. Criado A., Yokhana S., Rahman T., McCarty S., Andreacovich C., Ren W., Yassir W.K. Biomechanical strength comparison of pedicle screw augmentation using poly-dicalcium phosphate dihydrate (P-DCPD) and polymethylmethacrylate (PMMA)

cements // *Spine Deform.* –2020. –V. 8. –P. 165–170. <https://doi.org/10.1007/s43390-019-00022-2>.

89. Barba A., Maazouz Y., Diez-Escudero A., Rappe K., Espanol M., Montufar E.B., Öhman-Mägi C., Persson C., Fontecha P., Manzanares M.-C. et al. Osteogenesis by foamed and 3D-printed nanostructured calcium phosphate scaffolds: Effect of pore architecture // *Acta Biomater.* – 2018. – V. 79. – P. 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.003>.

90. Takeyama H., Maruta M., Sato T., Kajimoto N., Fujii E., Matsuura T., Tsuru K. Fabrication of bioresorbable hydroxyapatite bone grafts through the setting reaction of calcium phosphate cement // *Dent. Mater. J.* – 2022. – V. 41. –P. 882–888. <https://doi.org/10.4012/dmj.2022-045>.

91. Lukina Y., Panov Y., Panova L., Senyagin A., Bionyshev-Abramov L., Serejnikova N., Kireynov A., Sivkov S., Gavryushenko N., Smolentsev D. et al. Chemically Bound Resorbable Ceramics as an Antibiotic Delivery System in the Treatment of Purulent–Septic Inflammation of Bone Tissue // *Ceramics.* – 2022. –V. 5. – P. 330–350. <https://doi.org/10.3390/ceramics5030026>.

92. Guo H., Su J., Wei J., Kong H., Liu C. Biocompatibility and osteogenicity of degradable Ca-deficient hydroxyapatite scaffolds from calcium phosphate cement for bone tissue engineering // *Acta Biomater.* – 2009. – V. 5. – P. 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.018>.

93. Wu Y., Woodbine L., Carr A.M., Pillai A.R., Nokhodchi A., Maniruzzaman M. 3D printed calcium phosphate cement (CPC) scaffolds for anti-cancer drug delivery // *Pharmaceutics.* – 2020. – V. 12. – P. 1077. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111077>.

94. Trombetta R.P., Ninomiya M.J., El-Atawneh I.M., Knapp E.K., Bentley K.L.D.M., Dunman P.M., Schwarz E.M., Kates S.L., Awad H. Calcium Phosphate Spacers for the Local Delivery of Sitafloracin and Rifampin to Treat Orthopedic Infections: Efficacy and Proof of Concept in a Mouse Model of Single-Stage Revision of Device-Associated Osteomyelitis // *Pharmaceutics.* – 2019. – V. 11. – P. 94. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020094>.

95. Lukina Y.S., Panova L.V., Panov Y.M., Krut'ko D.P., Gavryushenko N.S., Lemenovskii D.A. Application of SC-CO₂ in the Technology of the Preparation of Calcium Phosphate Matrices for the Treatment of Septic Purulent Inflammations of Bone Tissues // *Russ. J. Phys. Chem. B.* – 2022. – V. 16. – P. 1221–1230. <https://doi.org/10.1134/S1990793122070120>.
96. Bagnol R., Sprecher C., Peroglio M., Chevalier J., Mahou R., Büchler P., Richards G., Eglin D. Coaxial micro-extrusion of a calcium phosphate ink with aqueous solvents improves printing stability, structure fidelity and mechanical properties // *Acta Biomater.* –2021. –V. 125. – P. 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.02.022>.
97. Kucko N.W., Li W., García Martínez M.A., Rehman I.U., Ulset A.S.T., Christensen B.E., Leewenburgh S.C.G., Herber R.P. Sterilization effects on the handling and degradation properties of calcium phosphate cements containing poly (D, L–lactic–co–glycolic acid) porogens and carboxymethyl cellulose // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2019. – V. 107. – P. 2216–2228. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34306>.
98. Cichoń E., Czechowska J.P., Krok-Borkowicz M., Allinson S.L., Stępień K., Smith A., Douglas T.E.L., Zima A. Biosurfactants as foaming agents in calcium phosphate bone cements // *Biomater. Adv.* – 2023. – V. 145. – P. 213273. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213273>.
99. De Lacerda Schickert S., Jansen J.A., Bronkhorst E.M., van den Beucken J.J., Leeuwenburgh S.C. Stabilizing dental implants with a fiber-reinforced calcium phosphate cement: An in vitro and in vivo study // *Acta Biomater.* –2020. –V. 110. – P. 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.026>.
100. Fosca M., Rau J.V., Uskoković V. Factors influencing the drug release from calcium phosphate cements // *Bioact. Mater.* – 2022. – V. 7. – P. 341–363. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.032>.
101. Schröter L., Kaiser F., Stein S., Gbureck U., Ignatius A. Biological and mechanical performance and degradation characteristics of calcium phosphate cements in large animals and humans // *Acta Biomater.* – 2020. –V. 117. – P. 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.031>.

102. Safronova T.V. Inorganic Materials for Regenerative Medicine // *Inorg Mater.* –2021. – V. 57. – P. 443–474. <https://doi.org/10.1134/S002016852105006X>.
103. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphates // *J. Mater. Sci.* – 2007. –V. 42. – P. 1061–1095.
104. Справочник Chemwhat. База данных химических и биологических препаратов: электр. Ресурсы <https://www.chemwhat.ru/>
105. Fernandez E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. Calcium phosphate bone cement for clinical applications. Part II: Precipitate formation during setting reactions // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* –1999. – V. 10. – P. 177-183.
106. TenHuisen K.S., Brown P.W. Effects of magnesium on the formation of calcium-deficient hydroxyapatite from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1997. – V. 36. – P. 306–314. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19970905\)36:3<306::AID-JBM5>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970905)36:3<306::AID-JBM5>3.0.CO;2-I).
107. Liu C., Shen W., Gu Y., Hu L. Mechanism of the hardening process for a hydroxyapatite cement // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1997. – V. 35. – P. 75-80.
108. Brown P.W., Fulmer M. Kinetics of Hydroxyapatite Formation at Low Temperature // *Am. Ceram. Soc.* – 1991. – V. 74. – № 5. –P. 934-940.
109. Liu C., Shao H., Chen W., Zheng H. Effect of granularity of raw materials on the hydration and hardening process of calcium phosphate cement // *Biomaterials.* – 2003. – V. 24. –P. 4103–4113. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00238-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00238-2).
110. Brown P.W., Hocker N., Hoyle S. Variations in Solution Chemistry During the Low-Temperature Formation of Hydroxyapatite // *J. Am. Ceram. Soc.* – 1991. – V. 74. – P. 1848–1854. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1991.tb07798.x>.
111. Bermudez O., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. Development of an octocalcium phosphate cement // *Mater. Sci. Mater. Med.* – 1994. – V. 5. – P. 144–146. <https://doi.org/10.1007/BF00053334>.
112. Pat. 5,683,461 United States. Synthesis of reactive amorphous calcium phosphates / Lee D. D. [et al]; Assignee: Etek Corporation –№ 08/581,441; field: 29.12.95; date of patent 04.11.97.

113. Pat. 6,214,368 B1 United States. Bone substitution material and a method of its manufacture / Lee D. D. [et al]; Assignee: Etex Corporation – № 08/650,764; field: 20.05.96; date of patent 10.04.01.

114. Ooms E.M., Wolke J.G.C., van de Heuvel M.T., Jeschel B., Jansen J.A. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone // *Biomaterials*. – 2003. – V. 24. – P. 989-1000.

115. Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A. Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement // *Biomaterials*. – 1997. – V. 18. – P. 1535-1539.

116. Fernandez E., Planell J.A., Best S. M., Bonfield W. Synthesis of dahllite through a cement setting reaction // *J. Mat. Sci: Mat. Med.* – 1998. – V. 9. – P. 789–792.

117. Christoffersen J., Christoffersen M.R., Kibalczyk W., Andersen F.A. A contribution to the understanding of the formation of calcium phosphates // *Journal of Crystal Growth*. – 1989. – V. 94. – P. 767-777.

118. Abbona F., Baronnet A. A XRD and TEM study on the transformation of amorphous calcium phosphate in the presence of magnesium // *Journal of Crystal Growth*. – 1996. – V. 165. – P. 98-105.

119. Driessens F. C. M., Boltong M.G., Bermudez O., Planell J.A., Ginebra M.P., Fernandez E. Effective formulations for the preparation of calcium phosphate cements // *J. Mater. Sci: Mater. Med.* – 1994. – V. 5. – P. 164-170.

120. Barralet J.E., Grover L.M., Gbureck U. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part II: Hypodermic injection and strength improvement of brushite cement // *Biomaterials*. – 2004. – V. 25. – P. 2197–2203. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.085>.

121. Apelt D., Theiss F., El-Warrak A.O., Zlinszky K., Bettschart-Wolfisberger R., Böhner M., Matter S., Auer J.A., von Rechenberg B. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements // *Biomaterials*. – 2004. – V. 25. – P. 1439–1451. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.073>.

122. Lukina Y., Kotov S., Bionyshev-Abramov L., Serejnikova N., Chelmodeev R., Fadeev R., Toshev O., Tavitorkin A., Ryndyk M., Smolentsev D., Gavryushenko N.,

Sivkov S. Low-Temperature Magnesium Calcium Phosphate Ceramics with Adjustable Resorption Rate // *Ceramics*. – 2023. – V. 6. – P. 168–194. <https://doi.org/10.3390/ceramics6010011>.

123. Aberg J., Brisby H., Henriksson H., Lindahl A., Thomsen P., Engqvist H. Premixed acidic calcium phosphate cement: Characterization of strength and microstructure // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2010. – V. 93. – P. 436–441. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31600>.

124. Bohner M., Doebelin N., Baroud G. Theoretical and experimental approach to test the cohesion of calcium phosphate pastes // *Eur. Cell. Mater.* – 2006. – V. 12. – P. 26–35. <https://doi.org/10.22203/eCM.v012a03>.

125. Martin R.I., Brown P.W. Formation of hydroxyapatite in serum // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 1994. – V. 5. – P. 96–102. <https://doi.org/10.1007/BF00121697>.

126. Eanes E., Hailer A. Anionic Effects on the Size and Shape of Apatite Crystals Grown from Physiological Solutions // *Calcif. Tissue Int.* – 2000. – V. 66. – P. 449–455. <https://doi.org/10.1007/s002230010090>.

127. Miyamoto Y., Ishikawa R., Fukao H., Sawada M., Nagayama M., Kon M., Asaoka K. In vivo setting behavior of fast-setting calcium phosphate cement // *Biomaterials*. – 1995. – V. 16. – P. 855–860. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)94147-D](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)94147-D).

128. Moreno D., Vargas F., Ruiz J., López M.E. Solid-state synthesis of alpha tricalcium phosphate for cements used in biomedical applications // *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.* 2019. V. 59. P. 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2019.11.004>.

129. Brunner T.J., Grass R.N., Bohner M., Stark W.J. Effect of particle size, crystal phase and crystallinity on the reactivity of tricalcium phosphate cements for bone reconstruction // *J. Mater. Chem.* – 2007. – V. 17. – P. 4072–4078. <https://doi.org/10.1039/b707171j>.

130. Bohner M., Brunner T.J., Stark W.J. Controlling the reactivity of calcium phosphate cements // *J. Mater. Chem.* – 2008. – V. 18. – P. 5669–5675. <https://doi.org/10.1039/b811953h>.

131. Saleh A.T., Ling L.S., Hussain R. Injectable magnesium-doped brushite cement for controlled drug release application // *J. Mater. Sci.* – 2016. – V. 51. – P. 7427–7439. <https://doi.org/10.1007/s10853-016-0017-2>.
132. Mirtchi A., Lemaitre J., Munting E. Calcium phosphate cements: Action of setting regulators in the properties of the β -tricalcium phosphate—Monocalcium phosphate cements // *Biomaterials.* – 1989. – V. 10. – P. 475–480. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(89\)90120-8](https://doi.org/10.1016/0142-9612(89)90120-8).
133. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements // *Injury.* – 2000. – V. 31. – P. 37–47.
134. Penel G., Leroy N., Van Landuyt P., Flautre B., Hardouin P., Lemaitre J., Leroy G. Raman microspectrometry studies of brushite cement: In vivo evolution in a sheep model // *Bone.* – 1999. – V. 25. – P. 81S–84S. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00139-8](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00139-8).
135. Luo J., Ajaxon I., Ginebra M. P., Engqvist H., Persson C. Compressive, diametral tensile and biaxial flexural strength of cutting-edge calcium phosphate cements // *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials.* – 2016. – V. 60. – P. 617–627. [doi:10.1016/j.jmbbm.2016.03.028](https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.03.028).
136. Espanol M., Perez R.A., Montufar E.B., Marichal C., Sacco A., Ginebra M.P. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications // *Acta Biomater.* – 2009. – V. 5. – P. 2752–2762. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.03.011>.
137. Geffers M., Groll J., Gbureck U. Reinforcement strategies for load-bearing calcium phosphate biocements // *Materials.* – 2015. – V. 8. – № 5. – P. 2700–2717.
138. Yin Y., Ye F., Yao K., Cui J., Song X. Gelatin manipulation of latent macropores formulation in brushite cement // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2003. – V. 14. – P. 255–261. <https://doi.org/10.1023/A:1022836824968>.
139. Lodoso-Torrecilla I., Stumpel F., Jansen J.A., van den Beucken J.J. Early-stage macroporosity enhancement in calcium phosphate cements by inclusion of poly (N-vinylpyrrolidone) particles as a porogen // *Mater. Today Commun.* – 2020. – V. 23. – P. 100901. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.100901>.

140. Li X., Wang Y., Chen F., Chen X., Xiao Y., Zhang X. Design of macropore structure and micro-nano topography to promote the early neovascularization and osteoinductivity of biphasic calcium phosphate bioceramics // *Mater. Des.* – 2022. – V. 216. –P. 110581. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.110581>.
141. Zhang J., Luo X., Barbieri D., Barradas A.M.C., de Bruijn J.D., van Blitterswijk C.A., Yuan H. The Size of Surface Microstructures as an Osteogenic Factor in Calcium Phosphate—Ceramics // *Acta Biomater.* – 2014. – V. 10. – P. 3254–3263. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.021>.
142. Chan O., Coathup M.J., Nesbitt A., Ho C.Y., Hing K.A., Buckland T., Champion C., Blunn G.W. The effects of microporosity on osteoinduction of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials // *Acta Biomater.* – 2012. – V. 8. –P. 2788–2794. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.038>.
143. Sugawara Y., Kamioka H., Honjo T., Tezuka K.I., Takano-Yamamoto T. Three-dimensional reconstruction of chick calvarial osteocytes and their cell processes using confocal microscopy // *Bone.* – 2005. – V. 36. – P. 877–883. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.10.008>.
144. Iviglia G., Kargozar S., Baino F. Biomaterials, current strategies, and novel nano-technological approaches for periodontal regeneration // *J. Funct. Biomater.* – 2019. – V. 10. –P. 3. <https://doi.org/10.3390/jfb10010003>.
145. Rouahi M., Champion E., Gallet O., Jada A., Anselme K. Physico-chemical characteristics and protein adsorption potential of hydroxyapatite particles: influence on in vitro biocompatibility of ceramics after sintering // *Colloids Surf. B. Biointerfaces.* – 2006. – V. 47. –P. 10–19.
146. Li X., van Blitterswijk C. A., Feng Q., Cui F., Watari F. The effect of calcium phosphate microstructure on bone-related cells in vitro // *Biomaterials.* – 2008–. V. 29. – P. 3306–3316.
147. Zhu X. D., Zhang H. J., Fan H. S., Li W., Zhang X. D. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption // *Acta Biomater.* –2010. – V. 6. – P. 1536–1541.

148. Haugen H.J., Lyngstadaas S.P., Rossi F., Perale G. Bone grafts: Which is the ideal biomaterial? // *J. Clin. Periodontol.* – 2019. – V. 46. – P. 92–102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>.

149. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis // *Biomaterials.* – 2005. – V. 26. – P. 5474–5491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.

150. Yan Y., Chen H., Zhang H., Guo C., Yang K., Chen K., Cheng R., Qian N., Sandler N., Zhang Y.S., Shen H. Vascularized 3D printed scaffolds for promoting bone regeneration // *Biomaterials.* – 2019. – V. 190–191. – P. 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.033>.

151. Itala A.I., Ylanen H.O., Ekholm C., Karlsson K.H., Aro H.T. Pore diameter of more than 100 micron is not requisite for bone ingrowth in rabbits // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2001. – V. 58. – P. 679–683. <https://doi.org/10.1002/jbm.1069>.

152. Abbasi N., Hamlet S., Love R.M., Nguyen N.T. Porous scaffolds for bone regeneration // *J. Sci. Adv. Mater. Devices.* – 2020. – V. 5. – P. 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>.

153. Collins M.N., Ren G., Young K., Pina S., Reis R.L., Oliveira J.M. Scaffold fabrication technologies and structure/function properties in bone tissue engineering // *Adv. Funct. Mater.* – 2021. – V. 31. – P. 2010609. <https://doi.org/10.1002/adfm.202010609>.

154. Jodati H., Yilmaz B., Evis Z. A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features // *Ceram. Int.* – 2020. – V. 46. – P. 15725–15739. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.03.192>.

155. Van de Belt H., Neut D., Uges D., Schenk W., van Horn J.R., van der Mei H.C., Busscher H.J. Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release // *Biomaterials.* – 2000. – V. 21. – P. 1981–1987. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00082-x](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00082-x).

156. Stallmann H.P., Faber C., Bronckers A.L.J.J., Amerongen A.V.N., Wuisman P.I.J.M. In vitro gentamicin release from commercially available calcium-phosphate bone

substitutes influence of carrier type on duration of the release profile // *BMC Musculoskelet. Disord.* –2006. –V. 7. – P. 18. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-7-18>.

157. Mukai M., Uchida K., Sugo K., Nakasu M., Nakajima T., Takata K., Takaso M., Urabe K. Long-term antibacterial activity of vancomycin from calcium phosphate cement in vivo // *Bio-Medical Mater. Eng.* – 2022. – V. 33. – P. 41–50. <https://doi.org/10.3233/bme-211243>.

158. Barba A., Diez-Escudero A., Maazouz Y., Rappe K., Espanol M., Montufar E.B., Bonany M., Sadowska J.M., Guillem-Marti J., Öhman-Mägi C. et al. Osteoinduction by Foamed and 3D-Printed Calcium Phosphate Scaffolds: Effect of Nanostructure and Pore Architecture // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2017. – V. 9. – P. 41722–41736. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b14175>.

159. Duan J., Shao H., Liu H., Xu J., Cong M., Zhao K., Lin T. 3D gel-printing of hierarchically porous BCP scaffolds for bone tissue engineering // *J. Eur. Ceram. Soc.* –2023. – V. 43. –P. 2646–2653. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2023.01.010>.

160. Hympanova M., Oliver-Urrutia C., Vojta M., Macháček M., Krupka P., Kukla R., Celko L., Montufar E.B., Marek J. Assessment of *Streptococcus mutans* biofilm formation on calcium phosphate ceramics: The role of crystalline composition and microstructure // *Biomater. Adv.* – 2022. – V. 135. – P. 212750. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212750>.

161. Takagi S., Chow L. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants // *Mater. Sci. Mater. Med.* – 2001. – V. 12. – P. 135–139. <https://doi.org/10.1023/a:100891791046>.

162. Patent 6,547,866 B1 United States. Porous calcium phosphate cement / Edwards B. [et al]; Assignee: Howmedica Osteonics Corp. – № 09/699,662; field: 30.10.00; date of patent 15.04.03.

163. Yoshikawa T., Suwa Y., Ohgushi H., Tamai S., Ichijima K. Self-setting hydroxyapatite cement as a carrier for bone-forming cells // *Biomed. Mater. Eng.* –1996. – V. 6. –P. 345–351. <https://doi.org/10.3233/BME-1996-6504>.

164. Vasconcellos L.A., dos Santos L.A. Calcium phosphate cement scaffolds with PLGA fibers // *Mater. Sci. Eng. – C.* 2013. –V. 33. –P. 1032–1040.

165. Tajima S., Kishi Y., Oda M., Maruta M., Matsuya S., Ishikawa K. Fabrication of Biporous Low-crystalline Apatite Based on Mannitol Dissolution from Apatite Cement // *Dental Materials Journal*. –2006. – № 25 (3). – P. 616—620.
166. Ф и л и п п о в Я.Ю. Реакционно-связанные композиты на основе фосфатов кальция для регенерации костных тканей / автореф. дисс. на соиск. уч. ст. к.х.н. М., 2013.
167. Patent USA № 5,525,148.
168. Patent USA № 5,820,632.
169. Gelinsky M., Welzel P.B., Simon P., Bernhardt A., Köning U. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralized collagen: preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone // *Chemical Engineering Journal*. – 2008. –V. 137. – P. 84–96.
170. Barralet J.E., Lilley K.J., Grover L.M., Farrar D.F., Ansell C., Gbureck U. Cement from nanocrystalline hydroxyapatite // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* –2004. – V. 15. – P. 407-411.
171. Lucas-Aparicio J., Manchón Á., Rueda C., Pintado C., Torres J., Alkhraisat M.H., López-Cabarcos E. Silicon-calcium phosphate ceramics and silicon-calcium phosphate cements: Substrates to customize the release of antibiotics according to the idiosyncrasies of the patient // *Mater. Sci. Eng. C*. – 2020. – V. 106. – P. 110173. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110173>.
172. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials // *J. Mater. Sci.* –2009. – V. 44. –P. 2343–2387.
173. Blatter T.R., Jestaedt L., Weckbach A. Suitability of a calcium phosphate cement in osteoporotic vertebral body fracture augmentation a controlled, randomized, clinical trial of balloon kyphoplasty comparing calcium phosphate versus polymethylmethacrylate // *Spine*. – 2009. –V. 34. – P. 108–114.
174. Tarsuslugil S.M., O'Hara R.M., Dunne N.J., Buchanan F.J., Orr J.F., Barton D.C., Wilcox R.K. Development of calcium phosphate cement for the augmentation of

traumatically fractured porcine specimens using vertebroplasty // *J. Biomech.* – 2013. – V. 46. – P. 711–715.

175. Barralet J.E., Gaunt T., Wright A.J., Gibson I.R., Knowles J.C. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – V. 63. – P. 1–9.

176. Del Real R., Wolke J.G., Vallet-Regí M., Jansen J. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements // *Biomaterials.* – 2002. – V. 23. – P. 3673–3680. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00101-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00101-1).

177. Vorndran E., Geffers M., Ewald A., Lemm M., Nies B., Gbureck U. Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier // *Acta Biomater.* – 2013. – V. 9. – P. 9558–9567.

178. Gbureck U., Spatz K., Thull R., Barralet J.E. Rheological enhancement of mechanically activated alpha-tricalcium phosphate cements // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2005. – V. 73. – P. 1–6.

179. Lopez-Heredia M.A., Sariibrahimoglu K., Yang W., Bohner M., Yamashita D., Kunstar A., van Apeldoorn A.A., Bronkhorst E.M., Lanao R.P.F., Leeuwenburgh S.C.G. et al. Influence of the pore generator on the evolution of the mechanical properties and the porosity and interconnectivity of a calcium phosphate cement // *Acta Biomater.* – 2012. – V. 8. – P. 404–414.

180. Barralet J.E., Hofmann M., Grover L.M., Gbureck U. High-strength apatitic cement by modification with alpha-hydroxy acid salts // *Adv. Mater.* – 2003. – V. 15. – P. 2091–2094.

181. Cama G., Barberis F., Botter R., Cirillo P., Capurro M., Quarto R., Scaglione S., Finocchio E., Mussi V., Valbusa U. Preparation and properties of macroporous brushite bone cements // *Acta Biomater.* – 2009. – V. 5. – P. 2161–2168.

182. Grover L.M., Knowles J.C., Fleming G.J.P., Barralet J.E. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement // *Biomaterials.* – 2003. – V. 24. – P. 4133–4141.

183. Engstrand J., Persson C., Engqvist H. The effect of composition on mechanical properties of brushite cements // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* – 2014. – V. 29. – P. 81–90.

184. Unosson J.E., Montufar E.B., Engqvist H., Ginebra M.P., Persson C. Brushite foams—The effect of Tween 80 and Pluronic F-127 on foam porosity and mechanical properties // *J. Biomed. Res. B Appl. Biomater.* – 2015. – doi:10.1002/jbm.b.33355.
185. Xu H.H.K., Eichmiller F.C., Giuseppetty A.A. Reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with different fibers // *J. Biomed. Mater. Res.* –2000. –V. 52. – P. 107–114. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200010\)52:1<107::AID-JBM13>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200010)52:1<107::AID-JBM13>3.0.CO;2-0).
186. Nezafati N., Moztarzadeh F., Hesarakhi S., Mozafari M. Synergistically reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with bioactive glass fibers // *Ceram. Int.* – 2011. –V. 37. –P. 927–934. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.11.002>.
187. White A.A., Best S.M., Kinloch I.A. Hydroxyapatite–carbon nanotube composites for biomedical applications: A review // *International J. Appl. Ceram. Technol.* – 2007. – V. 4. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7402.2007.02113.x>.
188. Ebrahimi S., Stephen Sipaut C. The Effect of Liquid Phase Concentration on the Setting Time and Compressive Strength of Hydroxyapatite/ Bioglass Composite Cement // *Nanomaterials.* – 2021. – V. 11. – P. 2576. <https://doi.org/10.3390/nano11102576>.
189. Zuo Y., Yang F., Wolke J.G., Li Y., Jansen J.A. Incorporation of biodegradable electrospun fibers into calcium phosphate cement for bone regeneration // *Acta Biomater.* – 2010. – V. 6. – P. 1238–1247. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.036>.
190. Maenz S., Kunisch E., Mühlstädt M., Böhm A., Kopsch V., Bossert J., Kinne R.W., Jandt K.D. Enhanced mechanical properties of a novel, injectable, fiber-reinforced brushite cement // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* – 2014. – V. 39. – P. 328–338. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.07.028>.
191. Kucko N.W., de Lacerda Schickert S., Sobral Marques T., Herber R.P., Van den Beuken J.J., Zuo Y., Leeuwenburgh S.C. Tough and osteocompatible calcium phosphate cements reinforced with poly (vinyl alcohol) fibers // *ACS Biomater. Sci. Eng.* –2019. – V. 5–. P. 2491–2505. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00226>.

192. Pan Z., Jiang P., Fan Q., Ma B., Cai H. Mechanical and biocompatible influences of chitosan fiber and gelatin on calcium phosphate cement // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. – 2007. – V. 82. – P. 246–252. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30727>.
193. O'Hara R.M., Orr J.F., Buchanan F.J., Wilcox R.K., Barton D.C., Dunne N.J. Development of a bovine collagen-apatitic calcium phosphate cement for potential fracture treatment through vertebroplasty // Acta Biomater. – 2012. – V. 8. – P. 4043–4052.
194. Dos Santos L.A., Carrodeguas R.G., Boschi A.O., de Arruda A.C.F. Dual-setting calcium phosphate cement modified with ammonium polyacrylate // Artif. Org. – 2003. – V. 27. – P. 412–418.
195. Böhner M., Baroud G. Injectability of calcium phosphate pastes // Biomaterials. – 2005. – V. 26. – P. 1553–1563.
196. Л а р и о н о в Д.С., Путляев В. И., Сафронова Т.В., Филиппов Я.Ю. Низкотемпературные» методы получения кальцийфосфатных биоматериалов: цементы и реакционно-связанные композиты // Вестник РФФИ. – 2011. – V. 72. – № 4. – P. 97–105.
197. Lukina Yu.S., Svetskaya N.V., Golikova P.V., Sivkov S.P., Beletskii B.I., Zaitsev V.V. Reaction-bonded bioresorbable composite material // Glass and Ceramics. – 2013. – V. 70. – № 5–6. – P. 195–199.
198. Ф и л и п п о в Я.Ю., Ларионов Д.С., Путляев В.И., Колягин Ю.Г., Георгиевский Д.В., Агахи К.А., Ковальков В.К., Соколов А.В. Кинетические особенности формирования реакционно-связанных фосфатных биоматериалов // Наносистемы: физика, химия, математика. – 2013. – V. 4. – № 1. – P. 54–65.
199. Nie Y., Wang T., Wu M., Qi Y., Wei W., Wang Q. Characterization of a high strength hydroxyapatite cement with dual chelate-setting using phytic acid and citric acid // International Journal of Applied Ceramic Technology. – 2022. – V. 19. – № 3. – P. 1498–1510.

200. Tamimi F., Torres J., Bettini R., Ruggera F., Rueda C., López-Ponce M., Lopez-Cabarcos E. Doxycycline sustained release from brushite cements for the treatment of periodontal diseases // *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* – 2008. – V. 85. – № 3. – P. 707-714. doi:10.1002/jbm.a.31610.
201. Cui X., Huang C., Chen Z., Zhang M., Liu C., Su K., Wang J., Li L., Wang R., Li B. et al. Hyaluronic acid facilitates bone repair effects of calcium phosphate cement by accelerating osteogenic expression // *Bioact. Mater.* – 2021. – V. 6. – P. 3801–3811. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.03.028>.
202. Morilla C., Perdomo E., Hernández A.K., Regalado R., Almirall A., Fuentes G., Mora Y.C., Schomann T., Chan A., Cruz L.J. Effect of the Addition of Alginate and/or Tetracycline on Brushite Cement Properties // *Molecules.* – 2021. – V. 26. – P. 3272. <https://doi.org/10.3390/molecules26113272>.
203. Grosfeld E.-C., Hoekstra J.W.M., Herber R.-P., Ulrich D.J.O., Jansen J.A., van den Beucken J.J.J.P. Long-term biological performance of injectable and degradable calcium phosphate cement // *Biomed. Mater.* – 2016. – V. 12. – P. 015009. <https://doi.org/10.1088/1748-605x/12/1/015009>.
204. Leroux L., Hatim Z., Freche M., Lacout J.L. Effect of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement // *Bone.* – 1999. – V. 25. – P. 31S–34S. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00130-1](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00130-1).
205. Sugawara A., Antonucci J.M., Takagi S., Chow L.C., Ohashi M. Formation of hydroxyapatite in hydrogels from tetracalcium phosphate/dicalcium phosphate mixtures // *J. Nihon Univ. Sch. Dent.* – 1989. – V. 31. – P. 372–381.
206. Hurle K., Oliveira J.M., Reis R.L., Pina S., Goetz-Neunhoeffler F. Ion-doped brushite cements for bone regeneration // *Acta Biomater.* – 2021. – V. 123. – P. 51–71. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.01.004>.
207. Nasrollahi N., Deh kordi A. N., Jamshidizad A., Chehelgerdi M. Preparation of brushite cements with improved properties by adding graphene oxide // *International Journal of Nanomedicine.* – 2019. – V. 14. – P. 3785-3797. doi:10.2147/ijn.s196666.

208. Roy M., DeVoe K., Bandyopadhyay A., Bose S. Mechanical property and in vitro biocompatibility of brushite cement modified by polyethylene glycol // *Materials Science and Engineering: C*. – 2012. – V. 32. – № 8. – P. 2145-2152. doi:10.1016/j.msec.2012.05.020.
209. Bohner M., Merkle H. P., Landuyt P. V., Trophard G., Lemaitre J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2000. – V. 11. – № 2. – P. 111-116. doi:10.1023/A:1008997118576.
210. Ooms E.M., Wolke JG, C., van der Waerden JP, C.M., Jansen J.A. Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca-P) cement // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – V. 61. – P. 9–18. <https://doi.org/10.1002/jbm.10029>.
211. Lu J., Descamps M., Dejou J., Koubi G., Hardouin P., Lemaitre J., Proust J.P. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – V. 63. – P. 408–412. <https://doi.org/10.1002/jbm.10259>.
212. LeGeros R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2002. – V. 395. – P. 81–98. Available online: https://journals.lww.com/clinorthop/Fulltext/2002/02000/Properties_of_Osteoconductive_Biomaterials_.9.aspx (accessed on 20 April 2023).
213. Holzapfel B.M., Reichert J.C., Schantz J.T., Gbureck U., Rackwitz L., Noth U., Jakob F., Rudert M., Groll J., Hutmacher D.W. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2013. – V. 65. – P. 581–603.
214. Grossardt C., Ewald A., Grover L.M., Barralet J.E., Gbureck U. Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells // *Tissue Eng Part A*. – 2010. – V. 16. – P. 3687–3695. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0281>.
215. Montazerolghaem M., Rasmusson A., Melhus H., Engqvist H., Karlsson Ott M. Simvastatin-doped pre-mixed calcium phosphate cement inhibits osteoclast differentiation and resorption // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2016. – V. 27. – P. 83. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5692-7>.

216. Davison N.L., Gamblin A.-L., Layrolle P., Yuan H., de Bruijn J.D., Barrère-de Groot F. Liposomal clodronate inhibition of osteoclastogenesis and osteoinduction by submicrostructured beta-tricalcium phosphate // *Biomaterials*. – 2014. – V. 35. – P. 5088–5097. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.013>.
217. Odgren P.R., Witwicka H., Reyes-Gutierrez P. The cast of clasts: Catabolism and vascular invasion during bone growth, repair, and disease by osteoclasts, chondroclasts, and septicoclasts // *Connect. Tissue Res.* – 2016–. V. 57–. P. 161–174. <https://doi.org/10.3109/03008207.2016.1140752>.
218. Teitelbaum S.L. Bone resorption by osteoclasts // *Science*. – 2000. – V. 289. – P. 1504–1508. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1504>.
219. Hu Q., Tan Z., Liu Y., Tao J., Cai Y., Zhang M., Tang R. Effect of crystallinity of calcium phosphate nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells // *Journal of Materials Chemistry*. – 2007. – V. 17. – № 44. – P. 4690-4698.
220. Bodhak S., Bose S., Bandyopadhyay A. Role of surface charge and wettability on early stage mineralization and bone cell–materials interactions of polarized hydroxyapatite // *Acta Biomater.* – 2009. – V. 5. – P. 2178–2188.
221. Gustavsson J., Ginebra M. P., Planell J., Engel E. Osteoblast-like cellular response to dynamic changes in the ionic extracellular environment produced by calcium-deficient hydroxyapatite // *JMSMM*. – 2012. – V. 23. – P. 2509–2520.
222. Klammert U., Ignatius A., Wolfram U., Reuther T., Gbureck U. In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model // *Acta Biomater.* – 2011. – V. 7. – P. 3469–3475. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.022>.
223. Alkhraisat M.H., Cabrejos-Azama J., Rodríguez C.R., Jerez L.B., Cabarcos E.L. Magnesium substitution in brushite cements // *Mater. Sci. Eng. C*. – 2013. – V. 33. – P. 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.017>.
224. Sayahi M., Santos J., El-Feki H., Charvillat C., Bosc F., Karacan I., Milthorpe B., Drouet C. Brushite (Ca,M)HPO₄·2H₂O doping with bioactive ions (M = Mg²⁺, Sr²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, and Ag⁺): A new path to functional biomaterials? // *Mater.*

Today Chem. – 2020. – V. 16. – P. 100230.
<https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2019.100230>.

225. Sikder P., Ren Y., Bhaduri S. B. Microwave processing of calcium phosphate and magnesium phosphate based orthopedic bioceramics: A state-of-the-art review // *Acta Biomaterialia*. – 2020. – V. 111. – P. 29-53.
[doi:10.1016/j.actbio.2020.05.018](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.05.018).

226. Zhu L., Luo D., Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration // *International J. Oral Sci.* – 2020. – V. 12. – P. 6.
<https://doi.org/10.1038/s41368-020-0073-y>.

227. Lanao R.F., Leeuwenburgh S.C.G., Wolke J.G.C., Jansen J.A. In vitro degradation rate of apatitic calcium phosphate cement with incorporated PLGA microspheres // *Acta Biomater.* – 2011. – V. 7. – P. 3459–3468.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.05.036>.

228. Spence G., Pate N., Brooks R., Bonfield W., Rushton N. Osteoclastogenesis on hydroxy-apatite ceramics: the effect of carbonate substitution // *J Biomed Mater Res A*. – 2010. – V. 92. – P. 1292–130. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32373>.

229. Mano T., Akita K., Fukuda N., Kamada K., Kurio N., Ishikawa K., Miyamoto Y. Histological comparison of three apatitic bone substitutes with different carbonate contents in alveolar bone defects in a beagle mandible with simultaneous implant installation // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* – 2020. – V. 108. – P. 1450–1459. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34492>.

230. Fujisawa K., Akita K., Fukuda N., Kamada K., Kudoh T., Ohe G., Mano T., Tsu-ru K., Ishikawa K., Miyamoto Y. Compositional and histological comparison of carbonate apatite fabricated by dissolution-precipitation reaction and Bio-Oss® // *J Mater Sci Mater Med.* – 2018. – V. 29. – № 8. – P. 121. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6129-2>.

231. Hu F., Pan L., Zhang K., Xing F., Wang X., Lee I., Zhang X., Xu J. Elevation of extracellular Ca²⁺ induces store-operated calcium entry via calcium-sensing receptors: a pathway contributes to the proliferation of osteoblasts // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 9. – P. e107217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107217>.

232. Fujioka-Kobayashi M., Tsuru K., Nagai H., Fujisawa K., Kudoh T., Ohe G., Ishikawa K., Miyamoto Y. Fabrication and evaluation of carbonate apatite-coated calcium carbonate bone substitutes for bone tissue engineering // *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. – 2018. – V. 12. – № 10. – P. 2077-2087. <https://doi.org/10.1002/term.2742>.

233. Doi Y., Iwanaga H., Shibutani T., Moriwaki Y., Iwayama Y. Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1999. – V. 47. – P. 424–433. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19991205\)47:3<424::AID-JBM19>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19991205)47:3<424::AID-JBM19>3.0.CO;2-0).

234. Ishikawa K. Carbonate apatite bone replacement: Learn from the bone // *J. Ceram. Soc. Jpn.* – 2019. – V. 127. – P. 595–601. <https://doi.org/10.2109/jcersj2.19042>.

235. Hesarakı S., Nazarian H., Pourbaghi-Masouleh M., Borhan S. Comparative study of mesenchymal stem cells osteogenic differentiation on low-temperature biomineralized nanocrystalline carbonated hydroxyapatite and sintered hydroxyapatite // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2014. – V. 102. – P. 108–118. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32987>.

236. Egashira Y., Atsuta I., Narimatsu I., Zhang X., Takahashi R., Koyano K., Ayu-kawa Y. Effect of carbonate apatite as a bone substitute on oral mucosal healing in a rat extraction socket: in vitro and in vivo analyses using carbonate apatite // *International Journal of Implant Dentistry*. – 2022. – V. 8. – № 1. – P. 1-9. <https://doi.org/10.1186/s40729-022-00408-4>.

237. Kudoh K., Fukuda N., Kasugai S., Tachikawa N., Koyano K., Matsushita Y., Ogino Y., Ishikawa K., Miyamoto Y. Maxillary sinus floor augmentation using low crystalline carbonate apatite granules with simultaneous implant installation: first-in-human clinical trial // *J Oral Maxillofac Surg.* – 2019. – V. 77. – P. 985.e1-1. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.11.026>.

238. Nakagawa T., Kudoh K., Fukuda N., Kasugai S., Tachikawa N., Koyano K., Miyamoto Y. Application of low-crystalline carbonate apatite granules in 2-stage sinus floor augmentation: a prospective clinical trial and histomorphometric evaluation //

Journal of Periodontal & Implant Science. – 2019. – V. 49. – № 6. P. 382-396.
<https://doi.org/10.5051/jpis.2019.49.6.382>.

239. Chow L. C., Markovic M., Takagi S. A dual constant-composition titration system as an in vitro resorption model for comparing dissolution rates of calcium phosphate biomaterials // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. – 2003. – V. 65. – № 2. – P. 245-251. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10009>.

240. Tsuchiya A., Freitas P. P., Nagashima N., Ishikawa K. Influence of pH and ion components in the liquid phase on the setting reaction of carbonate apatite granules // Dental materials journal. – 2022. – V. 41. – № 2. – P. 209-213. <https://doi.org/10.4012/dmj.2021-211>.

241. Shariff K.A., Tsuru K., Ishikawa K. Fabrication of dicalcium phosphate dihydrate-coated β -TCP granules and evaluation of their osteoconductivity using experimental rats // Mater Sci Eng. – 2017. – V. 75. – P. 1411-1499. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.004>.

242. Tsuchiya A., Sato M., Takahashi I., Ishikawa K. Fabrication of apatite-coated gypsum granules and histological evaluation using rabbits // Ceram Int. – 2018. – V. 44. – P. 20330-20336.

243. Kim J.-A., Lim J., Naren R., Yun H., Park E.K. Effect of the biodegradation rate controlled by pore structures in magnesium phosphate ceramic scaffolds on bone tissue regeneration in vivo // Acta Biomater. – 2016. – V. 44. – P. 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.039>.

244. Kanter B., Vikman A., Brückner T., Schamel M., Gbureck U., Ignatius A. Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model // Acta Biomater. – 2018. – V. 69. – P. 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.035>.

245. Arkin V.H., Narendrakumar U., Madhyastha H., Manjubala I. Characterization and in vitro evaluations of injectable calcium phosphate cement doped with magnesium and strontium // ACS Omega. – 2021. – V. 6. – P. 2477–2486. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03927>.

246. Lee D., Kumta P.N. Chemical synthesis and stabilization of magnesium substituted brushite // *Mater. Sci. Eng.* – 2010. – V. 30. – P. 934–943. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.04.007>.

247. Klammer U., Reuther T., Blank M., Reske I., Barralet J.E., Grover L.M., Kübler A.C., Gbureck U. Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement // *Acta Biomater.* – 2010. – V. 6. – P. 1529–1535. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.021>.

248. Wu L., Luthringer B.J., Feyerabend F., Schilling A.F., Willumeit R. Effects of extracellular magnesium on the differentiation and function of human osteoclasts // *Acta Biomater.* – 2014. – V. 10. – P. 2843–2854. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.010>.

249. Yang F., Yang D., Tu J., Zheng Q., Cai L., Wang L. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling // *Stem Cells.* – 2011. – V. 29. – P. 981–991. <https://doi.org/10.1002/stem.646>.

250. Li X., Sogo Y., Ito A., Mutsuzaki H., Ochiai N., Kobayashi T., Nakamura S., Yamashita K., LeGeros R.Z. The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo // *Mater. Sci. Eng.* – 2009. – V. 29. – P. 969–975. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.08.021>.

251. Cama G., Nkhwa S., Gharibi B., Lagazzo A., Cabella R., Carbone C., Dubruel O., Haugen H., Di Silvio L., Deb S. The role of new zinc incorporated monetite cements on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells // *Mater. Sci. Eng.* – 2017. – V. 78. – P. 485–494. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.086>.

252. Han P., Wu C., Xiao Y. The effect of silicate ions on proliferation, osteogenic differentiation and cell signalling pathways (WNT and SHH) of bone marrow stromal cells // *Biomater. Sci.* – 2013. – V. 1. – P. 379–392. doi: 10.1039/C2BM00108J.

253. Lu T., Wang J., Yuan X., Tang C., Wang X., He F., Ye J. Zinc-doped calcium silicate additive accelerates early angiogenesis and bone regeneration of calcium phosphate cement by double bioactive ions stimulation and immunoregulation //

Biomater. Adv. –2022. – V. 141. – P. 213120.
<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213120>.

254. Glenske K., Donkiewicz P., Köwitsch A., Milosevic-Oljaca N., Rider P., Rofall S., Barbeck M. Applications of metals for bone regeneration // International journal of molecular sciences. –2018. – V. 19. – № 3. – P. 826.

255. Rau J.V., Fosca M., Graziani V., Egorov A.A., Zobkov Y.V., Fedotov A.Y., Ortenzi M., Caminiti R., Baranchikov A.E., Komlev V.S. Silver-Doped Calcium Phosphate Bone Cements with Antibacterial Properties // J. Funct. Biomater. – 2016. – V. 7. –P. 10. <https://doi.org/10.3390/jfb7020010>.

256. Drynda A., Drynda S., Kekow J., Lohmann C. H., Bertrand J. Differential effect of cobalt and chromium ions as well as cocr particles on the expression of osteogenic markers and osteoblast function // Int. J. Mol. Sci. –2018. –V. 19. – P. 3034. doi: 10.3390/ijms19103034.

257. Pylostomou A., Demir-Oguz O., Loca D. Calcium phosphate bone cements as local drug delivery systems for bone cancer treatment // Biomater. Adv. –2023. – V. 148. –P. 213367. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213367>.

258. Cohen-Solal M. Strontium overload and toxicity: Impact on renal osteodystrophy // Nephrol. Dial. Transplant. – 2002. – V. 17. – P. 30–34. https://doi.org/10.1093/ndt/17.suppl_2.30.

259. Paul K., Lee B.Y., Abueva C., Kim B., Choi H.J., Bae S.H., Lee B.T. In vivo evaluation of injectable calcium phosphate cement composed of Zn- and Si-incorporated β -tricalcium phosphate and monocalcium phosphate monohydrate for a critical sized defect of the rabbit femoral condyle // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. – 2017. –V. 105. – P. 260–271. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33537>.

260. С к у г о р е в а С.Г., Ашихмина Т.Я., Фокина А.И., Лялина Е.И. Химические основы токсического действия тяжёлых металлов (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. –2016. –№ 1. –Р. 4-13.

261. Ф а р ш а т о в а Е.Р. Механизмы токсического действия химических факторов производственной среды на костную ткань

(экспериментальное исследование) / автор. дис. на соис. уч. ст. д.м.н. Екатеринбург, 2015.

262. Bigi A., Foresti E., Gregorini R., Ripamonti A., Roveri N., Shah J.S. The role of magnesium on the structure of biological apatites // *Calcif. Tissue Res.* –1992. – V. 50. –P. 439–444.

263. Hussain A., Bessho K., Takahashi K., Tabata Y. Magnesium calcium phosphate as a novel component enhances mechanical/physical properties of gelatin scaffold and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells // *Tissue Eng. Part A.* –2011. –V. 18. – P. 768–774.

264. Witte F., Ulrich H., Palm C., Willbold E. Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: Peri-implant bone remodeling // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2007. –V. 81. – P. 757–765.

265. Brown A., Zaky S., Ray H., Jr., Sfeir C. Porous magnesium/PLGA composite scaffolds for enhanced bone regeneration following tooth extraction // *Acta Biomater.* –2015. – V. 11. –P. 543–553.

266. Golafshan N., Vorndran E., Zaharievski S., Brommer H., Kadumudi F. B., Dolatshahi-Pirouz A., Malda J. Tough magnesium phosphate-based 3D-printed implants induce bone regeneration in an equine defect model // *Biomaterials.* – 2020. –V. 261. – P. 120302.

267. Grünewald T. A., Rennhofer H., Hesse B., Burghammer M., Stanzl-Tschegg S. E., Cotte M., Lichtenegger H. C. Magnesium from bioresorbable implants: Distribution and impact on the nano-and mineral structure of bone // *Biomaterials.* – 2016. –V. 76. – P. 250-260.

268. Soudee E., Pera J. Mechanism of setting reaction in magnesia-phosphate cements // *Cem Concr Res.* –2000. – V. 30. –P. 315–21.

269. Grobardt C., Ewald A., Grover L.M., Barralet J.E., Gbureck U. Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells // *Tissue Eng.* – 2010. – V. 16. –P. 3687–3695.

270. Ewald A., Kre czy D., Brückner T., Gbureck U., Bengel M., Hoess A., Fuchs A. Development and bone regeneration capacity of premixed magnesium phosphate cement pastes // *Materials*. – 2019. – V. 12. – P. 2119.
271. Mestres G., Ginebra M.-P. Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties // *Acta Biomater*–. 2011. – V. 7. – P. 1853–1861.
272. Mestres G., Abdolhosseini M., Bowles W., Huang S.-H., Aparicio C., Gorr S.-U., Ginebra M.-P. Antimicrobial properties and dentin bonding strength of magnesium phosphate cements // *Acta Biomater*. – 2013. –V. 9. – P. 8384–8393.
273. Goldberg M. A., Smirnov V. V., Antonova O. S., Khairutdinova D. R., Smirnov S. V., Krylov A. I., Barinov S. M. Magnesium-substituted calcium phosphate bone cements containing MgO as a separate phase: synthesis and in vitro behavior // *Mendeleev Communications*. – 2018. – V. 28. – № 3. – P. 329-331.
274. Lu J., Wei J., Yan Y., Li H., Jia J., Wei S., Liu C. Preparation and preliminary cytocompatibility of magnesium doped apatite cement with degradability for bone regeneration // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2011. – V. 22. – P. 607-615.
275. Wei J., Jia J., Wu F., Wei S., Zhou H., Zhang H., Liu C. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium–calcium phosphate for bone tissue regeneration // *Biomaterials*. –2010. –V. 31. – № 6. – P. 1260-1269.
276. Santos G., Nunes V., Marinho S., Santos S., Rossi A., Miguel F. Biological Behavior of Magnesium-Substituted Hydroxyapatite during Bone Repair // *Braz. J. Biol.* –2021. – V. 1. – P. 53–61.
277. Pina S., Ferreira J.M.F. Injectability of brushite-forming Mg-substituted and Sr-substituted α -TCP bone cements // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* –2010. –V. 21. – P. 431–438. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3890-2>.
278. TenHuisen K.S., Brown P.W. Variations in solution chemistry during calcium-deficient and stoichiometric hydroxyapatite formation from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$ // *J. Biomed. Mater. Res.* –1997. – V. 36. – P. 233-241.

279. Rousseau S., Lemaitre J., Bohner M., Frei C. Long-Term aging of brushite cements in physiological conditions: An in vitro study // *Eur. Cells Mater.* – 2002. – V. 5. – P. 83.
280. Sheikh Z., Zhang Y.L., Grover L., Merle G.E., Tamimi F., Barralet J. In vitro degradation and in vivo resorption of dicalcium phosphate cement based grafts // *Acta Biomater.* – 2015. – V. 26. – P. 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.031>.
281. Sheikh Z., Abdallah M.N., Hanafi A.A., Misbahuddin S., Rashid H., Glogauer M. Mechanisms of in vivo degradation and resorption of calcium phosphate based biomaterials // *Materials.* – 2015. – V. 8. – P. 7913–7925. <https://doi.org/10.3390/ma8115430>.
282. Mariño F.T., Torres J., Hamdan M., Rodríguez C.R., Cabarcos E.L. Advantages of using glycolic acid as a retardant in a brushite forming cement // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2007. – V. 83. – P. 571. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30830>.
283. Timimi F., Kumarasami B., Doillon C., Gbureck U., Le Nihouannen D., Cabarcos E.L., Barralet J.E. Brushite-collagen composites for bone regeneration // *Acta Biomater.* – 2008. – V. 4. – P. 1315–1321. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.04.003>.
284. Yoshikawa T., Suwa Y., Ohgushi H., Tamai S., Ichijima K. Self setting hydroxyapatite cement as a carrier for bone-forming cells // *Biomed. Mater. Eng.* – 1996. – V. 6. – P. 345–351.
285. Khairoun I., Driessens FCM, M., Boltong M.G., Planell J.A., Wenz R. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements // *Biomaterials.* – 1999. – V. 20. – P. 393–398. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00202-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00202-6).
286. Ginebra M.P., Canal C., Espanol M., Pastorino D., Montufar E.B. Calcium phosphate cements as drug delivery materials // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2012. – V. 64. – P. 1090–1110. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.008>.
287. Chen G., Liu B., Liu H., Zhang H., Yang K., Wang Q., Ding J., Chang F. CPC loaded with 10% VCM delivering high early and late local antibiotic concentration in vitro // *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research.* – 2018. – V. 104. – P. 1271–1275. [doi:10.1016/j.otsr.2018.07.007](https://doi.org/10.1016/j.otsr.2018.07.007).

288. Zhou J., Zhang Z., Joseph J., Zhang X., Ferdows B.E., Patel D.N., Chen W., Banfi G., Molinaro R., Cosco D. et al. Biomaterials and nanomedicine for bone regeneration: Progress and future prospects // *Exploration*. – 2021. – V. 1. – P. 20210011. <https://doi.org/10.1002/EXP.20210011>.

289. Pasqual J.A.R., Pereira B.L.R., Colpo J.C., Egea J.R.J., Santos L.A.L., Sousa V.C. Monitoring of the interaction of calcium phosphate cement and lidocaine hydrochloride by electrochemical impedance spectroscopy during the drug release process // *J. Appl. Electrochem.* – 2021. – V. 51. – P. 463–471. <https://doi.org/10.1007/s10800-020-01520-2>.

290. Uchida K., Sugo K., Nakajima T., Nakawaki M., Takano S., Nagura N., Takaso M., Urabe K. In Vivo Release of Vancomycin from Calcium Phosphate Cement // *BioMed. Res. Int.* – 2018. – V. 2018. – P. 4560647. <https://doi.org/10.1155/2018/4560647>.

291. Liu S.-M., Chen W.-C., Ko C.-L., Chang H.-T., Chen Y.-S., Haung S.-M., Chang K.-C., Chen J.-C. In Vitro Evaluation of Calcium Phosphate Bone Cement Composite Hydrogel Beads of Cross-Linked Gelatin-Alginate with Gentamicin-Impregnated Porous Scaffold // *Pharmaceuticals*. – 2021. – V. 14. – P. 1000. <https://doi.org/10.3390/ph14101000>.

292. Haghbini-Nazarpak M., Moztarzadeh F., Solati-Hashjin M., Mirhabibi A.R., Tahriri M. Preparation, characterization and gentamicin sulfate release investigation of biphasic injectable calcium phosphate bone cement // *Ceramics–Silikáty*. – 2010. – V. 54. – P. 334–340.

293. Khashaba R.M., Lockwood P.E., Lewis J.B., Messer R.L., Chutkan N.B., Borke J.L. Cytotoxicity, calcium release, and pH changes generated by novel calcium phosphate cement formulations // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* – 2010. – V. 93. – P. 297–303. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31494>.

294. Ramteke K.H., Dighe P.A., Kharat A.R., Patil S.V. Mathematical models of drug dissolution: A review // *Sch. Acad. J. Pharm.* – 2014. – V. 3. – P. 388–396.

295. Qiu G., Huang M., Liu J., Wang P., Schneider A., Ren K., Oates T.W., Weir M.D., Xu H.H.K., Zhao L. Antibacterial calcium phosphate cement with human

periodontal ligament stem cell-microbeads to enhance bone regeneration and combat infection // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2021. – V. 15. – P. 232–243. <https://doi.org/10.1002/term.3169>.

296. Uskoković V. Mechanism of formation governs the mechanism of release of antibiotics from calcium phosphate nanopowders and cements in a drug-dependent manner // *Journal of Materials Chemistry B.* – 2019. – V. 7. – № 25. – P. 3982–3992.

297. Ghosh S., Wu V., Pernal S., Uskoković V. Self-setting calcium phosphate cements with tunable antibiotic release rates for advanced antimicrobial applications // *ACS applied materials & interfaces.* – 2016. – V. 8. – № 12. – P. 7691–7708.

298. Jiang P. J., Patel S., Gbureck U., Caley R., Grover L. M. Comparing the efficacy of three bioceramic matrices for the release of vancomycin hydrochloride // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* – 2010. – V. 93. – № 1–. P. 51–58.

299. Lu Z., Tsai M., Lu D., Wang J., Wientjes M.G., Au J.L.S. Tumor-penetrating microparticles for intraperitoneal therapy of ovarian cancer // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – V. 327. – P. 673–682. <https://doi.org/10.1124/jpet.108.140095>.

300. Uskoković V., Desai T. A. Phase Composition Control of Calcium Phosphate Nanoparticles for Tunable Drug Delivery Kinetics and Treatment of Osteomyelitis. II. Antibacterial and Osteoblastic Response // *J. Biomed. Mater. Res., Part A.* – 2013. – V. 101. – P. 1427–1436.

301. Lee W., Zavgorodniy A. V., Loo C., Rohanizadeh R. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite with Different Crystallinity: Effects on Protein Adsorption and Release // *J. Biomed. Mater. Res., Part A.* – 2012. – V. 100. – P. 1539–1549.

302. Palazzo B., Iafisco M., Laforgia M., Margiotta N., Natile G., Bianchi C.L., Walsh B., Mann S., Roveri N. Biomimetic Hydroxyapatite–Drug Nanocrystals as Potential Bone Substitutes with Antitumor Drug Delivery Properties // *Adv. Funct. Mater.* – 2007. – V. 17. – P. 2180–2188. <https://doi.org/10.1002/adfm.200600361>.

303. Zhuang Z., Aizawa M. Protein adsorption on single-crystal hydroxyapatite particles with preferred orientation to a(b)- and c-axes // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2013. – V. 24. – P. 1211–1216. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4879-4>.
304. Akashi A., Matsuya Y., Unemori M., Akamine A. Release profile of antimicrobial agents from α -tricalcium phosphate cement // *Biomaterials.* – 2001. – V. 22. – P. 2713–2717. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00438-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00438-5).
305. Hesaraki S., Zamanian A., Moztarzadeh F. The influence of the acidic component of the gas-foaming porogen used in preparing an injectable porous calcium phosphate cement on its properties: Acetic acid versus citric acid // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* – 2008. – V. 86. – P. 208–216. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31008>.
306. Peroos S., Du Z., de Leeuw N.H. A computer modelling study of the uptake, structure and distribution of carbonate defects in hydroxy-apatite // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27. – P. 2150–2161. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.025>.
307. Matsumoto T., Okazaki M., Inoue M., Yamaguchi S., Kusunose T., Toyonaga T., Hamada Y., Takahashi J. Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein // *Biomaterials.* – 2004. – V. 25. – P. 3807–3812. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.081>.
308. Cabrejos-Azama J., Alkhraisat M. H., Rueda C., Torres J., Pintado C., Blanco L., López-Cabarcos E. Magnesium substitution in brushite cements: Efficacy of a new biomaterial loaded with vancomycin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections // *Materials Science and Engineering*: –2016. – V. 61. – P. 72-78.
309. Stähli C., Böhner M., Bashoor-Zadeh M., Doeblin N., Baroud G. Aqueous impregnation of porous β -tricalcium phosphate scaffolds // *Acta Biomater.* – 2010. – V. 6. – P. 2760–2772. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.018>.
310. Uskoković V. Entering the Era of Nanoscience: Time to Be So Small Vuk Uskoković // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2013. – V. 9. – P. 1441–1470. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1642>.
311. Mestres G., Fernandez-Yague M.A., Pastorino D., Montufar E.B., Canal C., Manzanares-Céspedes M.C., Ginebra M.P. In vivo efficiency of antimicrobial inorganic

bone grafts in osteomyelitis treatments // *Mater. Sci. Eng.* –2019. – V. 97. – P. 84–95.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.064>.

312. Su W.-Y., Chen Y.-C., Lin F.-H. A New Type of Biphasic Calcium Phosphate Cement as a Gentamicin Carrier for Osteomyelitis // *Evid. Based Complement. Altern. Med.* – 2013. – V. 2013. – P. 801374. <https://doi.org/10.1155/2013/801374>.

313. Mestres G., Kugiejko K., Pastorino D., Unosson J., Öhman C., Ott M.K., Ginebra M-P, Persson C. Changes in the drug release pattern of fresh and set simvastatin-loaded brushite cement // *Mater. Sci. Eng.* – 2016. – V. 58. – P. 88–96.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.016>.

314. Ratier A., Freche M., Lacout J.L., Rodriguez F. Behaviour of an injectable calcium phosphate cement with added tetracycline // *Int. J. Pharm.* – 2004. – V. 274. –P. 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.021>.

315. Alkhraisat M.H., Rueda C., Cabrejos-Azama J., Lucas-Aparicio J., Mariño F.T., García-Denche J.T., Blanco Jerez L., Gbureck U., Cabarcos E.L. Loading and release of doxycycline hyclate from strontium-substituted calcium phosphate cement // *Acta Biomater.* 2–010. – V. 6. – P. 1522–1528.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.043>.

316. Chen A., Holt-Hindle P. Platinum-based nanostructured materials: Synthesis, properties, and applications // *Chem. Rev.* –2010. – V. 110. – P. 3767–3804.
<https://doi.org/10.1021/cr9003902>.

317. Schnieders J., Gbureck U., Vorndran E., Schossig M., Kissel T. The effect of porosity on drug release kinetics from vancomycin microsphere/calcium phosphate cement composites // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2011. – V. 99. – P. 391–398.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.31910>.

318. Qiu G., Huang M., Liu J., Wang P., Schneider A., Ren K., Oates T.W., Weir M.D., Xu H.H.K., Zhao L. Antibacterial calcium phosphate cement with human periodontal ligament stem cell-microbeads to enhance bone regeneration and combat infection // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2021. – V. 15. – P. 232–243.
<https://doi.org/10.1002/term.3169>.

319. Boyle K.K., Sosa B., Osagie L., Turajane K., Bostrom M.P., Yang X. Vancomycin-laden calcium phosphate-calcium sulfate composite allows bone formation in a rat infection model // PLoS ONE. – 2019. – V. 14. – P. e0222034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222034>.
320. Hu M.-H., Chu P.-Y., Huang S.-M., Shih B.-S., Ko C.-L., Hu J.-J., Chen W.-C. Injectability, Processability, Drug Loading, and Antibacterial Activity of Gentamicin-Impregnated Mesoporous Bioactive Glass Composite Calcium Phosphate Bone Cement In Vitro // Biomimetics. –2022. – V. 7. – P. 121. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030121>.
321. Di Filippo M.F., Dolci L.S., Albertini B., Passerini N., Torricelli P., Parrilli A., Fini M., Bonvicini F., Gentilomi G.A., Panzavolta S., Bigi A. A radiopaque calcium phosphate bone cement with long-lasting antibacterial effect: From paste to injectable formulation // Ceram. Int. – 2020. – V. 46. – P. 10048–10057. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.12.272>.
322. Lang Z.G., Zhang X., Guo Q., Liang Y.X., Yuan F. Clinical observations of vancomycin-loaded calcium phosphate cement in the 1-stage treatment of chronic osteomyelitis: A randomized trial // Ann. Palliat. Med. – 2021. – V. 10. – P. 6706–6714. <https://doi.org/10.21037/apm-21-1290>.
323. Pradeep A., Varma P.K., Arumugam T., Vijayan A.M., Vasudevan A.K., Rangasamy J. Antibacterial bone adhesive cement for preventing sternal infections after cardiac surgery // Ceram. Int. – 2023. – V. 49. – P. 16110–16122. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.01.209>.
324. Li K., Guo A., Ran Q., Tian H., Du X., Chen S., Wen Y., Tang Y., Jiang D. A novel biocomposite scaffold with antibacterial potential and the ability to promote bone repair // J. Biomater. Appl. – 2021. – V. 36. – P. 474–480. <https://doi.org/10.1177/0885328221994448>.
325. Ribeiro N., Reis M., Figueiredo L., Pimenta A., Santos L.F., Branco A.C., Alves de Matos A.P., Salema-Oom M., Almeida A., Pereira M.F.C. et al. Improvement of a commercial calcium phosphate bone cement by means of drug delivery and increased

injectability // *Ceram. Int.* – 2022. – V. 48. – P. 33361–33372.
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.07.279>.

326. Son Y.J., Lee I.C., Jo H.H., Chung T.J., Oh K.S. Setting behavior and drug release from brushite bone cement prepared with granulated hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate // *J. Korean Ceram. Soc.* – 2019. – V. 56. – P. 56–64.
<https://doi.org/10.4191/kcers.2019.56.1.06>.

327. Ruskin E.I., Coomar P.P., Sikder P., Bhaduri S.B. Magnetic Calcium Phosphate Cement for Hyperthermia Treatment of Bone Tumors // *Materials.* – 2020. – V. 13. – P. 3501. <https://doi.org/10.3390/ma13163501>.

328. Martinez T., Sarda S., Dupret-Bories A., Charvillat C., Progetti F., Drouet C. Toward a doxorubicin-loaded bioinspired bone cement for the localized treatment of osteosarcoma // *Future Oncology.* – 2021. – V. 17. – P. 3511–3528.
<https://doi.org/10.2217/fon-2021-0128>.

329. Goldin A.N., Healey R.M. The Effectiveness and Mechanical Properties of Chemotherapy-Impregnated Cement in Ewing Sarcoma // *J. Orthop. Res.* – 2023. in press.
<https://doi.org/10.1002/jor.25561>.

330. Demir-Oğuz Ö., Ege D. Effect of zoledronic acid and graphene oxide on the physical and in vitro properties of injectable bone substitutes // *Mater. Sci. Eng.* – 2021. – V. 120. – P. 111758. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111758>.

331. Kamal N.H., Heikal L.A., Ali M.M., Aly R.G., Abdallah O.Y. Development and evaluation of local regenerative biomimetic bone-extracellular matrix scaffold loaded with nano-formulated quercetin for orthopedic fractures // *Biomater. Adv.* – 2023. – V. 145. – P. 213249. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213249>.

332. Lv T., Liang W., Li L., Cui X., Wei X., Pan H., Li B. Novel calcitonin gene-related peptide/chitosan-strontium-calcium phosphate cement: Enhanced proliferation of human umbilical vein endothelial cells in vitro // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* – 2019. – V. 107B. – P. 19–28. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34091>.

333. Gunnella F., Kunisch E., Horbert V., Maenz S., Bossert J., Jandt K.D., Plöger F., Kinne R.W. In Vitro Release of Bioactive Bone Morphogenetic Proteins (GDF5, BB-1, and BMP-2) from a PLGA Fiber-Reinforced, Brushite-Forming Calcium Phosphate

Cement // Pharmaceutics. – 2019. – V. 11. – P. 455.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090455>.

334. Luo G., Huang Y., Gu F. The osteogenesis effect of rhBMP2-loaded calcium phosphate cements in repairing dental extraction sockets // Am. J. Transl. Res. – 2022. – V. 14. – P. 7172–7177.

335. Kim S.H., Hwang C., Park S.H. Cell-laden Gelatin Fiber Contained Calcium Phosphate Biomaterials as a Stem Cell Delivery Vehicle for Bone Repair // J. Biomed. Eng. Res. – 2022. – V. 43. – P. 61–70. <https://doi.org/10.9718/JBER.2022.43.1.61>.

336. Campbell E. A. et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase // Cell. – 2001. – V. 104. – № 6. – P. 901-912. doi:10.1016/s0092-8674(01)00286-0.

337. Rubini K., Boanini E., Bigi A. Role of Aspartic and Polyaspartic Acid on the Synthesis and Hydrolysis of Brushite // Journal of Functional Biomaterials. – 2019. – V. 10. – № 1. – P. 11. <https://doi.org/10.3390/jfb10010011>.

338. Р у д а к о в а Л.В., Нифталиев С.И., Натарова Е.С. Конверсионный карбонат кальция как наполнитель термопластов // Изв. вузов. Химия и хим. технология. – 2017. – V. 60. – Вып. 4. – P. 100-107. DOI: 10.6060/tcct.2017604.5547.

339. Kreidler E. R., Hummel F. A. Phase relations in the system SrO-P₂O₅ and the influence of water vapor on the formation of Sr₄P₂O₉ // Inorganic Chemistry. – 1967. – V. 6. – № 5. – P. 884–891. doi:10.1021/ic50051a007.

340. Ginebra M.P., Espanol M., Montufar E.B., Perez R.A., Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine // Acta Biomater. – 2010. – V. 6. – P. 2863–2873.

341. Wang P., Qiao L., Dong F., Li T., Xu Q., Xie. Microencapsulated rBMSCs/calcium phosphate cement for bone formation in vivo // Bio-Med. Mater. Eng. – 2014. – V. 24.

342. Loca D., Sokolova M., Locs J., Smirnova A., Irbe Z. Calcium phosphate bone cements for local vancomycin delivery // Mater. Sci. Eng. – 2015. – V. 49. – P. 106–113.

343. Vásquez Niño A. F., Santos L. A. L. dos. Preparation of an Injectable Macroporous α -TCP Cement // *Materials Research*. –2016. –V. 19. –№ 4. –P. 908-913. Epub July 18.

344. Carrodegua R.G., De Aza S. α -Tricalcium phosphate:synthesis, properties and biomedical applications // *Acta Biomater.* – 2011. –V 7. –P. 3536–3546.

345. Torres P.M.C.C., Abrantes J.C.C.C., Kaushal A., Pina S., Döbelin N., Bohner M., Ferreira J.M.F.F. Influence of Mg-doping, calcium pyrophosphate impurities and cooling rate on the allotropic -tricalcium phosphate phase transformations // *J. Eur. Ceram. Soc.* –2016. – V. 36. –P. 817–827.

346. García-Páez I. H., Pena P., Baudin C., Rodríguez M. A., Córdoba E., De Aza A. H. Processing and in vitro bioactivity of a β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ ceramic with the eutectic composition // *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*. 2016. –V. 55. –№ 1. –P. 1–12. doi:10.1016/j.bsecv.2015.10.004.

347. Betts F., Posner A.S. An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate // *Mater Res Bull.* –1974. – V. 9. – P. 353–60.

348. Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis // *Biomaterials*. – 2004. – V. 25. – P. 3453–62.

349. К а з а й к и н В.Н., Пономарев В.О., Вохминцев А.С., Вайнштейн И.А. Определение концентрации ванкомицина в витреальной полости для оптимизации лечения острых бактериальных послеоперационных эндофтальмитов // *Практическая медицина*. –2016. – V. 1. – № 2 (94) –. P. 85 – 89.

350. Smeltzer M.S., Thomas J.R., Hickmon S.G., Skinner R.A., Nelson C.L., Griffith D., Parr Jr. T.R., Evans R.P. Characterization of a rabbit model of staphylococcal osteomyelitis // *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* –1997. –V. 15. – P. 414-421.

351. Guo D., Xu K., Zhao X., Han Y. Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement // *Biomaterials*. –2005. –V. 26. – № 19. – P. 4073-4083.

352. Driessens F. C., Boltong M., de Maeyer E. A., Wenz R., Nies B., Planell J. The Ca/P range of nanoapatitic calcium phosphate cements // *Biomaterials*. –2002–. V. 23. – № 19. – P. 4011–4017. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00151-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00151-5).

353. Ishikawa K., Munar M. L., Tsuru K., Miyamoto Y. Fabrication of carbonate apatite honeycomb and its tissue response // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2019. – V. 107. – № 5. – P. 1014-1020. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36640>.
354. Cahyanto A., Maruta M., Tsuru K., Matsuya S., Ishikawa K. Fabrication of bone cement that fully transforms to carbonate apatite // *Dental materials journal*. – 2015. – P. 2014-328. <https://doi.org/10.4012/dmj.2014-328>.
355. Fleet M. E. Infrared spectra of carbonate apatites: n2-Region bands // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30. – P. 1473–148.
356. Fernández E., Boltong M. G., Ginebra M. P., Bermúdez O., Driessens F. C. M., Planell J. A. Common ion effect on some calcium phosphate cements // *Clinical Materials*. – 1994. – V. 16. – № 2. – P. 99–103.
357. Fulmer M. T., Brown P. W. Effects of Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 on hydroxyapatite formation // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1993. – V. 27. – № 8. – P. 1095–1102. <https://doi.org/10.1002/jbm.820270815>.
358. Gbureck U., Barralet J.E., Radu L., Klinger H.G., Thull R. Amorphous α -tricalcium phosphate, preparation and aqueous setting reaction // *J. Am. Ceram. Soc.* – 2004. – V. 87. – P. 1126–1132.
359. Monma H., Kanazawa T. Hydration of α -tricalcium phosphate // *J. Ceram. Soc. Jpn.* – 2000. – V. 108. – P. 575–580.
360. Jack V., Buchanan F.J., Dunne N.J. Particle attrition of α -tricalcium phosphate, effect on mechanical, handling, and injectability properties of calcium phosphate cements // *Proc. Inst. Mech. Eng. H J. Eng. Med.* – 2008. – V. 222. – P. 19–28.
361. Maeno S., Niki Y., Matsumoto H., Morioka H., Yatabe T., Funayama A., Toyama Y., Taguchi T., Tanaka J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – № 23. – P. 4847–4855. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.006>.

362. Espanol M. et al. Investigation of the hydroxyapatite obtained as hydrolysis product of α -tricalcium phosphate by transmission electron microscopy // *CrystEngComm*. – 2010. – T. 12. – №. 10. – C. 3318-3326.

363. Filippov Y.Y., Larionov D.S., Putlyaev V.I., Sokolov A.V., Kovalkov V.K., Agakhi K.A., Selezneva I.I., Nikonova Y.A. Reaction-associated resorbable phosphate materials: production and testing in vitro // *Glass and Ceramics* (English translation of *Steklo i Keramika*). – 2013. – V. 70. – № 7-8. – P. 306–310.

364. Boles L. R., Awais R., Beenken K. E., Smeltzer M. S., Haggard W. O., Jessica A. J. Local delivery of amikacin and vancomycin from chitosan sponges prevent polymicrobial implant-associated biofilm // *Military Medicine*. – 2018. – V. 183. – suppl_1. P. 459–465.

365. Mossaad C., Tan M.-C., Starr M., Payzant E. A., Howe J. Y., Riman R. E. Size-Dependent Crystalline to Amorphous Uphill Phase Transformation of Hydroxyapatite Nanoparticles // *Cryst. Growth Des.* – 2011. – V. 11. – P. 45–52.

366. Walter G., Kemmerer M., Kappler C., Hoffmann R. Treatment algorithms for chronic osteomyelitis // *Dtsch Arztebl Int.* – 2012. – V. 109. – P. 257–26.

367. Fraimow H.S. Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis // *In Seminars in plastic surgery*. Stuttgart: Thieme Medical Publishers, – 2009. – P. 90–9.

368. Riedel D. J., Weekes E., Forrest G. N. Addition of rifampin to standard therapy for treatment of native valve infective endocarditis caused by *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2008. – T. 52. – №. 7. – C. 2463-2467.

369. Н а к а н и с и К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. – Рипол Классик, – 2013.

370. Uskoković V., Desai T. A. Phase composition control of calcium phosphate nanoparticles for tunable drug delivery kinetics and treatment of osteomyelitis. I. Preparation and drug release // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2012. – V. 101 A. – № 5. – P. 1416–1426. doi:10.1002/jbm.a.34426.

371. Araújo J. C., Sader M. S., Moreira E. L., Moraes V. C. A., LeGeros R. Z., Soares G. A. Maximum substitution of magnesium for calcium sites in Mg- β -TCP

structure determined by X-ray powder diffraction with the Rietveld refinement // *Materials Chemistry and Physics*. – 2009. – V. 118. – № 2-3. – P. 337–340. doi:10.1016/j.matchemphys.2009.07.064.

372. Carrodegua R. G., De Aza A. H., Turrillas X., Pena P., De Aza S. New Approach to the $\beta \rightarrow \alpha$ Polymorphic Transformation in Magnesium-Substituted Tricalcium Phosphate and its Practical Implications // *Journal of the American Ceramic Society*. – 2008. – V. 91. – № 4. – P. 1281–1286. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2008.02294.x>.

373. Enderle R., Götz-Neunhoeffler F., Göbbels M., Müller F. A., Greil P. Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of β -TCP ceramics examined by Rietveld refinement // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – № 17. – P. 3379–3384. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.017.

374. Sikirić M., Babić-Ivančić V., Milat O., Sarig S., Füredi-Milhofer H. Factors influencing additive interactions with calcium hydrogenphosphate dihydrate crystals // *Langmuir*. – 2000. – V. 16. – P. 9261–9266. <https://doi.org/10.1021/la000704m>.

375. Cabrejos-Azama J., Alkhraisat M.H., Rueda C., Torres J., Blanco L., López-Cabarcos E. Magnesium substitution in brushite cements for enhanced bone tissue regeneration // *Mater. Sci. Eng.* – 2014. – V. 43. – P. 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.036>.

376. Hanein D., Geiger B., Addadi L. Fibronectin Adsorption to Surfaces of Hydrated Crystals. An Analysis of the Importance of Bound Water in Protein-Substrate Interactions // *Langmuir*. – 1993. – V. 9. – P. 1058–1065.

377. Flade K., Lau C., Mertig M., Pompe W. Osteocalcin Controlled Dissolution-Reciprecipitation of Calcium Phosphate under Biomimetic Conditions // *Chem. Mater.* – 2001. – V. 13. – P. 3596–3602.

378. Sun L., Li X., Xu M., Yang F., Wang W., Niu X. In Vitro Immunomodulation of Magnesium on Monocytic Cell toward Anti-Inflammatory Macrophages // *Regen. Biomater.* – 2020. – V. 7. – P. 391–401. doi: 10.1093/rb/rbaa010.

379. Hu Y., Huang J., Chen C., Wang Y., Hao Z., Chen T., Wang J., Li J. Strategies of Macrophages to Maintain Bone Homeostasis and Promote Bone Repair: A

Narrative Review // J. Funct. Biomater. – 2023. – V. 14. – P. 18. doi:
10.3390/jfb14010018.

Приложение А.1

Результаты. *E. coli* ATCC 25982, *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* 3057

	Состав / время		24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	336	360	384	408	432	456	480	504	528	552	576	600
			42	40	38	32	28	32	30	28	28	28	26	23	20	20	19	17	15	14	12	12	9	8	0	0	0
S. aureus ATCC 6538	5.80 + рифампицин		42	40	38	32	28	32	30	28	28	28	26	23	20	20	19	17	15	14	12	12	9	8	0 <td>0<td>0</td></td>	0 <td>0</td>	0
	5.80 + рифампицин + фосфомидин		42	42	40	30	22	28	16	18	16	14	14	9	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.80 + фосфомидин		46	44	26	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.80 + ванкомицин		20	20	20	22	20	20	20	18	18	18	18	17	17	16	16	16	12	10	10	9	6	0	0	0	0
	5.70 + ванкомицин		21	21	21	20	20	20	20	18	14	16	18	15	14	14	12	11	11	10	10	7	0	0	0	0	0
	5.80		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.70		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	K-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K+		32	34	34	33	32	33	32	32	33	31	33	32	32	32	32	31	30	34	31	29	30	31	30	33	31
	5.80 + рифампицин		13	10	9	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E. coli ATCC 25982	5.80 + рифампицин + фосфомидин		14	7	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.80 + фосфомидин		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.80 + ванкомицин		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.70 + ванкомицин		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.80		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.70		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K+		34	36	36	35	34	33	32	31	32	32	31	31	32	34	33	35	34	31	32	31	34	31	32	33	31
	5.80 + рифампицин		28	20	18	16	10	12	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.80 + рифампицин + фосфомидин		30	24	20	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P. aeruginosa 3057	5.80 + фосфомидин		30	23	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.80 + ванкомицин		20	20	21	20	22	20	20	18	18	18	18	17	17	16	16	15	13	15	14	12	12	10	8	0	0
	5.70 + ванкомицин		21	22	21	20	18	20	19	18	16	16	15	13	13	12	10	10	9	11	9	7	7	0	0	0	0
	5.80		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5.70		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K-		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K+		42	41	42	42	42	44	43	41	40	42	41	42	41	43	40	41	41	42	40	40	39	42	41	42	44

Примечание: K₁+ - тест - диск с Ципрофлоксацин (CIP³⁰ – Ciprofloxacin, 30 мкг, SD142. HiMedia, Индия), K₂+ - раствор порошкового ванкомицина концентрацией 30 мг / мл в физиологическом растворе, K⁻ - отрицательный контроль 0,9% NaCl, SG (second grows) – вторичный рост одиночных или множественных колоний в зоне задержки роста.

Приложение А.2

Результаты *E. coli* ATCC 25982

Микро- организм	Образец	Время выкола (часы)															
		24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	336	360	384
<i>E. coli</i> ATCC 25982	5.5+	17.8 ± 0.44	15.6 ± 0.54	13.4 ± 0.54	14.8 ± 0.4	14 ± 0.1	12.9 ± 0.7	13.8 ± 0.44	13.2 ± 0.44	12.7 ± 0.44	12.6 ± 0.54	12.4 ± 0.54	11.4 ± 0.54	11.8 ± 0.83	10.8 ± 0.44	10 ± 0.7	8.4 ± 0.54
	Ванкомицин																
	6.2+	18.4 ± 0.54	16.8 ± 0.83	16.2 ± 0.44	15.2 ± 0.83	14.9 ± 0.7	14.2 ± 0.44	13.8 ± 0.44	13.6 ± 0.54	13.2 ± 0.44	12.4 ± 0.54	10.2 ± 0.44	10.6 ± 0.54	9.8 ± 0.44	9.2 ± 0.83	9.4 ± 0.54	8.6 ± 0.54
	Ванкомицин																
	9.2+	17.5 ± 0.81	15.2 ± 0.75	14.4 ± 0.53	12.5 ± 0.54	11.3 ± 0.51	9.3 ± 0.51	9.2 ± 0.41	6 SG	6 SG	7 SG	0	0	0	0	0	0
	Ванкомицин																
	5.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	K1+	22.8 ± 0.83	23 ± 1	22.8 ± 0.84	23 ± 1	23.2 ± 0.83	22.8 ± 0.83	22.4 ± 0.54	22 ± 1.2	21.6 ± 1.14	22 ± 0.71	21.8 ± 0.84	22 ± 0.7	21.6 ± 0.81	22.3 ± 0.81	21.6 ± 0.81	21.8 ± 0.4
	Ванкомицин																
	K2+	22.5 ± 1.8	21.3 ± 0.81	21.5 ± 0.83	21.6 ± 0.51	21.8 ± 0.54	21.3 ± 0.52	21.2 ± 0.75	20.8 ± 0.75	20.5 ± 0.54	20.6 ± 0.81	22.5 ± 1.8	21.2 ± 0.75	21.3 ± 0.52	20.8 ± 0.75	20.5 ± 0.54	20.5 ± 0.82
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	K-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ванкомицин																
	K-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 2. Результаты *S. aureus* ATCC 6538

Микро- организм	Образец	Время выкола (часы)															
		24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	336	360	384
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5.5+	17 ± 0.7	16.8 ± 0.44	16.5 ± 0.54	15 ± 0.71	14.8 ± 0.44	14.4 ± 0.54	14 ± 0.71	13.6 ± 0.54	13.2 ± 0.44	13 ± 0.7	11 ± 0.63	13.2 ± 0.45	10.8 ± 0.75	10.6 ± 0.54	10 ± 1	9.6 ± 0.79
	Ванкомицин																
	6.2+	18 ± 0.71	17.6 ± 0.54	16.8 ± 0.83	15.6 ± 0.89	15 ± 0.71	14.6 ± 0.54	14.4 ± 0.54	13.6 ± 0.54	13.4 ± 0.54	12.6 ± 0.54	12.2 ± 0.44	9.8 ± 0.83	10 ± 0.7	9.8 ± 0.44	9 ± 1	8.6 ± 0.89
	Ванкомицин																
	9.2+	17.6 ± 0.54	17.4 ± 0.55	15.2 ± 0.44	14.2 ± 1.1	11 ± 0.7	9 ± 0.7	9.2 ± 0.45	6 SG	6 SG	6 SG	6 SG	0	0	0	0	0
	Ванкомицин																
	5.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	K1+	20.7 ± 0.84	20.6 ± 0.51	20.5 ± 0.82	20 ± 1.19	19.6 ± 1.06	19.5 ± 1.04	19.3 ± 1.06	19.5 ± 1.04	20.7 ± 0.84	20.6 ± 0.54	20.5 ± 0.82	20.5 ± 0.82	19.6 ± 1.06	20.7 ± 0.84	20.5 ± 0.82	19.6 ± 1.06
	Ванкомицин																
	K2+	21 ± 0.89	20.8 ± 0.75	20.5 ± 0.54	20.3 ± 0.51	20.2 ± 0.41	20.3 ± 0.51	20.5 ± 0.81	20.5 ± 0.83	20.3 ± 0.81	20.6 ± 0.81	20.5 ± 0.54	20.5 ± 0.82	20 ± 0.89	20.5 ± 0.83	21 ± 0.89	20.6 ± 0.81
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	K-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ванкомицин																
	K-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: K₁+ - тест - диск с Ципрофлоксацин (CIP³⁰ – Ciprofloxacin, 30 мкг, SD142. HiMedia, Индия), K₂+ - раствор порошкового ванкомицина концентрацией 30 мг / мл в физиологическом растворе, K⁻ - отрицательный контроль 0,9% NaCl, SG (second grows) – вторичный рост одиночных или множественных колоний в зоне задержки

	St. aureus ATCC 6538																															
	Количество гранул ПЭГ в сухой смеси - 30%																															
Время, ч	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	336	360	384	408	432	456	480	504	528	552	576	600	624	648	672	696	720	744	
K+	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	
K ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
150 мг	18	17	15	14	13	14	14	14	13	12	12	12	11	11	11	10	9	9	9	8	7	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200 мг	22	18	17	16	16	17	16	16	15	14	13	13	13	12	11	10	10	9	9	8	8	7	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0
250 мг	21	19	17	16	16	16	16	16	16	15	14	14	14	14	12	11	10	10	10	9	9	8	7	7	6	0	0	0	0	0	0	0
300 мг	20	18	19	16	18	18	18	17	16	15	15	14	14	14	14	12	12	11	11	10	10	9	9	8	7	6	0	0	0	0	0	0
	Количество гранул ПЭГ в сухой смеси - 40%																															
K+	17	16	17	16	16	17	16	16	17	16	16	16	16	16	16	17	17	16	16	16	17	16	16	17	16	16	16	16	16	16	16	
K ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
150 мг	20	17	16	15	14	15	15	14	14	13	13	11	10	10	10	10	8	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200 мг	20	18	16	16	15	16	15	14	14	13	12	11	10	10	10	8	7	7	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250 мг	21	19	18	16	16	17	17	16	16	15	14	14	14	14	13	11	11	11	10	10	9	8	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0
300 мг	22	20	19	18	18	18	17	17	16	15	14	14	13	13	13	11	11	10	9	9	8	8	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	Количество гранул ПЭГ в сухой смеси - 50%																															
K+	17	17	16	16	15	16	16	17	15	16	16	17	17	17	16	16	15	16	16	17	15	16	16	17	16	16	16	16	16	16	17	
K ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
K ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
150 мг	21	18	17	16	13	16																										

K₁+ - тест - диск с Ципрофлоксацин (CIP³⁰ – Ciprofloxacin, 30 µg, SD142. HiMedia, Индия), K₁+ - отрицательный контроль, цементный камень без ванкомицина, K₂- отрицательный контроль 0,9% NaCl

Диаметры зон задержки роста бактериальных культур *Escherichia coli* цементного камня, содержащего ванкомицин, в сравнении с отрицательным и положительным контролями

		E. coli ATCC 25922																											
Время, ч.	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	336	360	384	408	432	456	480	504	528	552	576	600	624	648	672	
		Количество гранул ПЭГ в сухой смеси - 30%																											
	K+	18	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	
	K ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	K ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	150 мг	20	16	15	14	13	14	12	11	10	10	9	8	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200 мг	21	18	17	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	8	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	250 мг	20	19	17	17	16	16	15	15	14	14	13	12	11	10	9	9	8	8	7	6	6	0	0	0	0	0	0	
	300 мг	21	20	18	18	16	16	16	15	14	14	14	13	13	12	10	10	9	9	8	8	7	6	0	0	0	0	0	
		Количество гранул ПЭГ в сухой смеси - 40%																											
	K+	17	16	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	
	K ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	K ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	150 мг	20	17	16	15	14	15	13	12	12	11	10	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200 мг	20	18	16	16	15	14	12	11	10	8	8	6	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	250 мг	21	19	18	16	16	16	15	15	14	14	13	12	12	10	9	9	8	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	300 мг	22	20	19	18	16	16	16	14	14	13	12	11	10	9	8	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Количество гранул ПЭГ в сухой смеси - 50%																											
	K+	17	16	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	
	K ₁	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	K ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	150 мг	21	18	17	16	13	16	13	11	9	9	6	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	200 мг	21	19	18	16	14	13	14	11	10	7	9	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	250 мг	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	300 мг	22	21	19	18	16	16	16	14	13	12	11	10	9	9	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

K₁+ - тест - диск с Ципрофлоксацин (CIP³⁰ – Ciprofloxacin, 30 µg, SD142. HiMedia, Индия), K₁+ - отрицательный контроль, цементный камень без ванкомицина, K₂- - отрицательный контроль 0,9% NaCl

Приложение А.4

Диаметры зон задержки роста бактериальных культур золотистого стафилококка с цемен- тами на основе

Штамм	Образец	Время (ч)								
		24	48	72	96	120	144	168	192	216
St. aureus ATCC 6538	C-Mg0-V	19 ± 0,5	15,4 ± 0,2	8 ± 0,35	0	0	0	0	0	0
	C-Mg0.75-V	21,6 ± 0,5	18,6 ± 0,27	14,4 ± 0,5	8 ± 0,6	0	0	0	0	0
	C-Mg1.5-V	22,4 ± 0,4	17,8 ± 0,2	14 ± 0,35	9,4 ± 0,2	6,6 ± 0,2	5,6 ± 0,2	0	0	0
	C-Mg2.25-V	21,4 ± 0,4	18,4 ± 0,2	15,4 ± 0,2	12,4 ± 0,2	9,4 ± 0,27	7,4 ± 0,2	6,6 ± 0,2	6,2 ± 0,22	0
	C-Mg3-V	21 ± 0,5	16,6 ± 0,27	14,2 ± 0,22	9,2 ± 0,4	5,6 ± 0,2	5,4 ± 0,2	6 ± 0,35	0	0
K+	18,6 ± 0,27	19,8 ± 0,5	20,4 ± 0,27	21,4 ± 0,4	20,8 ± 0,4	19,6 ± 0,4	21,4 ± 0,4	20,8 ± 0,4	19,8 ± 0,5	0
K- (NaCl)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K- (C-Mg0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K- (C-Mg2.25)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 18 – Диаметры зон задержки роста бактериальных культур кишечной палочки с цемен- тами на основе

Штамм	Образец	Время, ч.								
		24	48	72	96	120	144	168	192	216
E. coli ATCC 25982	C-Mg0-V	19,6 ± 0,24	12 ± 0,3	8,6 ± 0,24	0	0	0	0	0	0
	C-Mg0.75-V	21,4 ± 0,24	17,2 ± 0,3	14,4 ± 0,24	8,6 ± 0,24	0	0	0	0	0
	C-Mg1.5-V	21,6 ± 0,24	15 ± 0,4	13 ± 0,1	7,8 ± 0,2	6,2 ± 0,2	5,4 ± 0,24	0	0	0
	C-Mg2.25-V	20,4 ± 0,2	16,4 ± 0,2	14,6 ± 0,2	10,4 ± 0,2	8,4 ± 0,25	6,8 ± 0,2	6,6 ± 0,24	0	0
	C-Mg3-V	21,8 ± 0,2	19 ± 0,4	15,2 ± 0,3	11,8 ± 0,2	6,8 6,8 ± 0,2	5,4 ± 0,25	5,6 ± 0,24	0	0
	K+	16 ± 0,5	12,6 ± 0,4	12,6 ± 0,4	14,4 ± 0,27	13,4 ± 0,7	16 ± 0,5	14,4 ± 0,27	16 ± 0,5	12,6 ± 0,4
	K- (NaCl)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K- (C-Mg0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K- (C-Mg2.25)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

- «K- (NaCl)» - отрицательный контроль 0,9% NaCl;
- «K- (C-Mg0)» - отрицательный контроль (состав C-Mg0);
- «K- (C-Mg2.25)» - отрицательный контроль (состав C-Mg2.25);

Приложение Б.1



Аттестат аккредитации
№ RA.RU.21ИМ04

ИНН 7707083893 КПП 775003035 р/с 40703810338090000830 в Московском банке ПАО «Сбербанк, г.Москва»,
к/с 3010181040000000225 БИК 044525225

АВТОНОМНАЯ НЕКОММЕРЧЕСКАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
И ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ
Испытательный Центр медицинских изделий

129301, г. Москва, ул. Касаткина, 3

e-mail: ra3dix@mail.ru

тел (499)187-37-23

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ИЦ МИ
АНО «ВНИИИМТ»

Б. В. Рябоконт
« 03 » июня 2016 г.

АКТ

оценки результатов технических испытаний медицинского изделия

№ 16-844 от « 03 » июня 2016 г.

Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций»

наименование медицинского изделия

Составлен Испытательным Центром Медицинских изделий АНО «ВНИИИМТ»

наименование организации, проводящей испытания,

129301, г. Москва, ул. Касаткина, д.3

с указанием места проведения испытаний

Полномочия на проведение испытаний, аккредитация на техническую компетентность и независимость для проведения работ по испытаниям.

Аттестат аккредитации испытательной организации Аттестат аккредитации № RA.RU.21ИМ04 от 30.11.2015 г.

№, дата выдачи, область аккредитации

1. В период с « 01 » июня 2016 г. по « 03 » июня 2016 г.

Испытательным Центром Медицинских Изделий АНО «ВНИИИМТ»

наименование испытательной организации

проведена оценка результатов технических испытаний в форме поведения испытаний изделия

Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» в потребительной упаковке:

1) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-Брушит»;

2) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-ТКФ»;

3) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-ГАП»;

4) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-Брушит гранулы»;

5) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-ГАП гранулы».

наименование медицинского изделия (с указанием принадлежностей, необходимых для применения медицинского изделия по назначению)

ООО «Ксеноплант», г. Москва, Россия

наименование производителя, страна производства

ТУ 9391-002-45194881-2016, Инструкция

наименование и обозначение технической документации

на соответствие требованиям ГОСТ Р 50444, ГОСТ Р ИСО 14630

наименование и обозначение нормативной и технической документации (Техническим регламентам, ГОСТ, ГОСТ Р, ГОСТ Р ИСО, СанПиН, МУ, МУК, приказам и постановлениям, международным документам (имеющим статус ссылочного документа), научным данным и т.д.)

2. Для проведения технических испытаний представлены:

Письмо-заявка;

Технические условия ТУ 9391-002-45194881-2016;

Инструкция по применению;

Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» в потребительной упаковке:

1) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-Брушит» 3 шт.

2) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-ТКФ» 3 шт.

3) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-ГАП» 3 шт.

4) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-Брушит гранулы» 3 шт

5) Имплантат на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций-ГАП гранулы» 3 шт.

6) Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» в транспортной упаковке 3 шт.

Сведения о нормативной документации на медицинское изделие;

Фотографии общего вида МИ.

перечень документов, данных, образцов медицинского изделия (количество)

3. Испытательным Центром Медицинских Изделий АНО «ВНИИИМТ»

наименование испытательной организации

проведена оценка результатов технических испытаний изделия

Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций»

наименование медицинского изделия

в соответствии с утвержденной программой и методикой испытаний № 16-844 ПМ от « 01 » июня 2016 г.

3.1 Техническая и эксплуатационная документация представлены в полном и достаточном для проведения испытаний и оценки соответствия объеме

оценка представленной документации

Комплект документов соответствует требованиям пункта 9 «Порядка проведения оценки соответствия медицинских изделий в форме технических испытаний, токсикологических исследований, клинических испытаний в целях государственной регистрации медицинских изделий» (утвержден приказом Минздрава от 09.01.2014 № 2н).

Технические характеристики, нормированные в ТУ 9391-002-45194881-2016, указаны полно и правильно.

Физические величины выражены в соответствии с ГОСТ 8.417-2002

Методы и средства контроля выражены в ТУ 9391-002-45194881-2016 полно и правильно.

Изложение, построение, оформление, содержание, согласование и утверждение технической и эксплуатационной документации выполнено в соответствии с распространяющимися на них НТД (ТУ – ГОСТ 2.114-95, ГОСТ 2.105-95, эксплуатационная документация – ГОСТ 2.601-2006, ГОСТ 2.105-95).

Инструкция по применению содержит все необходимые сведения для безопасного использования изделия, а также условия и правила эксплуатации, использование по назначению, хранение и транспортировка, гарантированные производителем значения основных параметров, характеристик (свойств) медицинского изделия, гарантийные обязательства, а также сведения о его утилизации или уничтожении.

3.2 Замечания к технической документации отсутствуют
рекомендации по устранению отдельных недостатков

3.3 Вид МИ -105460

вид медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий

3.4 Класс потенциального риска применения МИ: 3

класс потенциального риска применения медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий

4. Краткое изложение результатов испытаний Основные параметры и технические характеристики (цвет, размер фракций, масса, значения pH вытяжки из имплантатов, влажность, фазовый состав, упаковка, маркировка) соответствуют требованиям нормативной документации на МИ: ТУ 9391-002-45194881-2016 «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций»;

ГОСТ Р 50444-92 «Приборы, аппараты и оборудование медицинские. Общие технические условия»;

ГОСТ Р ИСО 14630-2011 «Имплантаты хирургические неактивные. Общие требования».

Результаты испытаний приведены в протоколе испытаний № 16-844 от «03» июня 2016 г.

5. Выводы по результатам испытаний «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» по основным параметрам и техническим характеристикам отвечают требованиям, предъявляемым к МИ.

6. Выводы о соответствии требованиям технической документации производителя Медицинское изделие «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» производства ООО «Ксеноплант», г. Москва соответствуют требованиям ТУ9391-002-45194881-2016, инструкции по применению.

7. Оценка результатов технических испытаний Технические испытания проведены в полном объеме. По результатам технических испытаний медицинского изделия «Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» подтверждены качество и безопасность его применения.

5
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

«Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» производства ООО «Ксеноплант», г. Москва, Россия

наименование медицинского изделия

СООТВЕТСТВУЮТ требованиям нормативной документации, технической и эксплуатационной документации производителя.

Приложения:

- а) фотографические изображения общего вида медицинского изделия;
- б) программа и методика испытаний № 16-844 ПМ от « 01 »июня 2016 г. (с перечнем проверок, оценок, которые следует проводить при испытаниях);
- в) протокол испытаний № 16-844 от «03» июня 2016 г.

Приложения являются неотъемлемой частью Акта.

Испытания проводили:

 Б.В. Рябоконт

Ведущий по испытаниям

 Т.М. Борисова

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ
(ИСПЫТАТЕЛЬНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ «ТОКСИКОЛОГ»)**

129301, Москва, ул. Касаткина, 3



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор ННЦ
д.т.н., профессор
Н.Е.Беняев
"18" мая 2016 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ № 72-16 от 18.05.2016 г.

по результатам токсикологических исследований медицинского изделия

**Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и
реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» ТУ 9391-002-45194881-2016**
варианты исполнения (см. Приложение 3)

наименование медицинского изделия

производство: Общество с ограниченной ответственностью «Ксеноплант»
(ООО «Ксеноплант») Россия

Составлено: ИЛ «Токсиколог» ООО «ННЦ токсикологической и биологической безопасности изделий медицинского назначения»

Полномочия на проведение испытаний, аккредитация на техническую компетентность и независимость для проведения работ по испытаниям:

ИЛ «Токсиколог» включена в Перечень организаций, осуществляющих проведение технических испытаний изделий медицинского назначения отечественного и зарубежного производства для целей государственной регистрации (Письмо ФС РОСЗДРАВНАДЗОРА № 01-15742/09 от 31.07.2009 г.); Аттестат аккредитации № РОСС RU.0001.21ИМ55 выдан Федеральной Службой по Аккредитации 25.03.2016 г. (дата внесения в реестр аккредитованных лиц 07.09.2015 г.)

1. В период с 04.04.2016 г. по 18.05.2016 г. ИЛ «Токсиколог» ООО «ННЦ токсикологической и биологической безопасности медицинских изделий» проведены токсикологические исследования имплантатов на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» ТУ 9391-002-45194881-2016 варианты исполнения (см. Приложение 3)

производство: ООО «Ксеноплант» в соответствии с нормативными документами:

ГОСТ ISO 10993-1-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.1.Оценка и исследования;

ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.2. Требования к обращению с животными;

ГОСТ ISO 10993-4-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.4 Исследование изделий, взаимодействующих с кровью

ГОСТ ISO 10993-5-2011 Изделия медицинские Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.5. Исследование на цитотоксичность: методы «in vitro»;

МУ 1.1.037-95 "Биотестирование продукции из полимерных и других материалов"

ГОСТ ISO 10993-6-2011 Изделия медицинские Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.6. Исследование местного действия после имплантации.

ГОСТ ISO 10993-9-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деградации

ГОСТ ISO 10993-10-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.10. Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия;

ГОСТ ISO 10993-11-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.11. Исследование общетоксического действия;

ГОСТ ISO 10993-12-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.12. Приготовление проб и стандартные образцы

заключение № 72-16 от 18. 05.2016 г. страница 1 из 4-х

ГОСТ ISO 10993-13-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть.13.Идентификация и количественное определение продуктов деградации полимерных медицинских изделий

ГОСТ ISO 10993-18-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий.

Часть.18. Исследование химических свойств материалов.

ГОСТ ISO 11737-2-2011 "Стерилизация медицинских изделий. Микробиологические методы.

Часть 2. Испытания на стерильность, проводимые при валидации процессов стерилизации"

ГОСТ Р ИСО 14630-2011 Имплантаты хирургические неактивные. Общие требования.

ГОСТ Р 52770-2007 Изделия медицинские. Требования безопасности. Методы санитарно-химических и токсикологических испытаний.

ГОСТ 31209-2003 "Контейнеры для крови и ее компонентов. Требования химической и биологической безопасности" 5.4.7.2 Испытания на пирогенность методом реакции связывания комплемента

ГОСТ 31214-2003 Изделия медицинские.Требования к образцам и документации, представляемым на

токсикологические, санитарно-химические испытания, испытания на стерильность и пирогенность

«Методические рекомендации по контролю стерильности изделий медицинского назначения»

(Приложение №6 к Приказу МЗ СССР от 17.01.79г. № 60)

МУК 4.2.2942-11 «Методы санитарно-бактериологического исследования объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях»

Государственная Фармакопея XII издания, часть 1, раздел 26. Пирогенность (ОФС 42-0061-07)

ГН 2.3.3.972-00 "Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами"

2. Для проведения токсикологических исследований представлены:

- заявление о проведении токсикологических исследований
- сведения о нормативной документации на медицинское изделие
- техническая и эксплуатационная документация с перечнем национальных стандартов, требованиям которых соответствует медицинское изделие;
- заявление на проведение регистрации медицинского изделия;
- количество отобранных для испытаний образцов медицинского изделия - имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» в количестве 5 потребительских упаковок каждого варианта исполнения (см.Приложение 3)

перечень документов,данных, образцов медицинского изделия (количество)

3. ИЛ «Токсиколог» ООО «ННЦ токсикологической и биологической безопасности медицинских изделий» проведены токсикологические исследования имплантатов на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» ТУ 9391-002-45194881-2016 варианты исполнения (см. Приложение 3)

производство: **ООО «Ксеноплант»** в соответствии с утвержденной программой (приложение 2)

3.1.Оценка представленной документации: документация представлена в полном объеме

3.2 Назначение изделия:

Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии предназначены для заполнения и закрытия дефектов тканей человека в травматологии и ортопедии, нейрохирургии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии, оториноларингологии. Имплантат является изделием однократного использования и предназначен для применения в условиях лечебных медицинских учреждений с помощью хирургического вмешательства в асептических условиях квалифицированным медицинским персоналом, в соответствии с правилами, установленными в данных учреждениях.

3.3. Вид и длительность контакта с организмом человека:

Длительный контакт с внутренней средой и тканями организма

3.4. Класс потенциального риска применения медицинского изделия в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий – 3; код ОКП 93 9180

3.5. Наименование применяемых материалов или рецептурный состав:

Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» представляют собой сыпучее вещество белого цвета с размером фракции до 0,125 мм или от 0,5 до 5 мм в зависимости от варианта исполнения.

Упаковка:

Индивидуальная двойная упаковка имплантата по ГОСТ Р 50444 - пленка бумага герметично запаена. Индивидуальная упаковка с имплантатами уложена в количестве одной штуки в картонную коробку типа П по ГОСТ 12303, изготовленную из картона по ГОСТ 7933. Коробка оклеена в местах закрытия клапанов лентой полиэтиленовой с липким слоем по ГОСТ 20477.

3.6. Способ стерилизации медицинских изделий: радиационный стерилизующая доза 15,0 кГр (максимально допускаемая доза 35,0 кГр)

4. Краткое изложение результатов испытаний:**4.1. Результаты санитарно-химических испытаний:**

Содержание восстановительных примесей в водных вытяжках из образцов имплантатов «Нео-Ост-Кальций», выраженное в объеме 0,02н раствора тиосульфата натрия, затраченного на их определение, составляет менее 0,02 мл (допустимое – 1,00 мл). Изменение значения pH вытяжек из образцов в сравнении с контролем не превышает допустимого значения и составляет $0,96 \pm 0,02$ (допустимое $\pm 1,00$). Максимальная оптическая плотность в интервале длин волн 220-360 нм составляет $0,070-0,077 \pm 0,001$ (допустимое – 0,300).

Миграция металлов в водную вытяжку, определяемая атомно-абсорбционным методом, не обнаружена при минимальной определяемой концентрации (в мг/л): кадмий – 0,0005; свинец – 0,001; мышьяк – 0,001. Допустимое содержание указанных металлов составляет соответственно: 0,001; 0,030; 0,050.

4.2. Результаты токсикологических испытаний:

Изучение острой токсичности проводили в условиях внутрибрюшинного введения вытяжек из образцов имплантатов на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост_Кальций» белым мышам. На протяжении всего периода наблюдения не отмечено гибели подопытных животных, изменений внешнего вида, поведения, двигательной активности по сравнению с контрольной группой.

На вскрытии животных макроскопически не выявлено патологических изменений внутренних органов и тканей. ОСП (органо-соматические показатели) подопытных животных не имеют статистически достоверных отличий от аналогичных показателей контроля.

Проведено исследование цитотоксичности на суспензионной культуре подвижных клеток с определением индекса токсичности. Индекс токсичности составил 85,2-109,5% при допустимом значении 70-120%. Вытяжки из образцов не проявили гемолитического действия в опытах «in vitro» с изолированными эритроцитами кроликов: гемолиз – 0- 0,49% при допустимом значении показателя менее 2,00%.

В токсикологическом эксперименте с использованием предварительной внутрикожной сенсibilизации, многократных эпукутанных аппликаций и провокационной внутрикожной пробы установлено, что имплантаты на основе фосфата кальция «Нео-Ост-Кальций» не обладают сенсibilизирующим действием, о наличии которого судили по реакции специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ), соотношению ОСП (органо-соматические показатели) иммунокомпетентных органов и раздражающему действию на кожу, не обнаружено.

При подкожной имплантации образцов имплантатов на основе фосфата кальция «Нео-Ост-Кальций» подопытным животным макроскопическими исследованиями установлено, что имплантаты не вызывают реакции отторжения, воспаления или нагноений, не обладают местнораздражающим действием при сравнении с контрольным образцом (отрицательный контроль). Признаки патологических изменений или значительного воспаления в окружающих имплантат тканях отсутствуют. При гистологическом исследовании внутренних органов, периферических органов иммуногенеза и окружающих тканей выраженных патологических изменений в сравнении с контролем и физиологической нормой не выявлено.

4.3. Результаты испытаний на стерильность и пирогенность:

Представленные изделия стерильны и апиогенны.

5. Выводы по результатам испытаний:

В условиях эксперимента Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» ТУ 9391-002-45194881-2016, производство: ООО «Ксеноплант» обладали достаточной химической стабильностью, не оказывали неблагоприятного воздействия на организм экспериментальных животных, на жизнеспособность биологического клеточного тест-объекта и изолированные эритроциты «ин витро». Образцы стерильны и апиrogenны.

Результаты испытаний распространяются на все варианты исполнения (см. Приложение 3).

6. Выводы о соответствии требованиям технической документации:

Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» по ТУ 9391-002-45194881-2016, варианты исполнения (см. Приложение 3) производство: ООО «Ксеноплант» Россия соответствуют требованиям нормативно-технической, эксплуатационной документации, действующих национальных стандартов

7. Оценка результатов токсикологических испытаний и рекомендации о возможности проведения клинических испытаний

Результаты токсикологических исследований позволяют рекомендовать Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» ТУ 9391-002-45194881-2016, варианты исполнения (см. Приложение 3), производство: ООО «Ксеноплант» Россия для проведения клинических испытаний

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и
реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» ТУ 9391-002-45194881-2016
варианты исполнения (см. Приложение 3)**

наименование медицинского изделия

**производство: Общество с ограниченной ответственностью «Ксеноплант»
(ООО «Ксеноплант») Россия**

СООТВЕТСТВУЮТ требованиям безопасного применения

Приложение к Заключению:

Приложение 1	Протокол токсикологических испытаний
Приложение 2	Утвержденная программа токсикологических испытаний
Приложение 3	Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций» варианты исполнения

Приложения являются неотъемлемой частью Заключения

Ответственные за испытания:

Руководитель санитарно-химической
группы, вед.н.сотр., к.х.н.

Ланина С.Я.

Руководитель токсикологической
группы, ст.н.сотр.

Каминская Н.М.



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)

РЕГИСТРАЦИОННОЕ УДОСТОВЕРЕНИЕ НА МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДЕЛИЕ

от 22 мая 2017 года

№ РЗН 2017/5739

На медицинское изделие

Имплантаты на основе фосфата кальция для пластической и реконструктивной хирургии «Нео-Ост-Кальций»

Настоящее регистрационное удостоверение выдано

Общество с ограниченной ответственностью "КСЕНОПЛАНТ"

(ООО "КСЕНОПЛАНТ"), Россия, 109044, Москва, Крутицкий Вал, д. 14, оф. 314

Производитель

Общество с ограниченной ответственностью "КСЕНОПЛАНТ"

(ООО "КСЕНОПЛАНТ"), Россия, 109044, Москва, Крутицкий Вал, д. 14, оф. 314

Место производства медицинского изделия

ООО "КСЕНОПЛАНТ", 123458, Москва, ул. Твардовского, д. 8, стр. 1

Номер регистрационного досье № РД-10452/1643 от 02.03.2016

Вид медицинского изделия 105460

Класс потенциального риска применения медицинского изделия 3

Код Общероссийского классификатора продукции по видам экономической деятельности 32.50.50.000

Настоящее регистрационное удостоверение имеет приложение на 1 листе

приказом Росздравнадзора от 22 мая 2017 года № 4773
допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере здравоохранения



М.А. Мурашко

0032618