

PACS numbers: 62.23.Pq, 81.07.Pr, 82.35.Np, 82.70.Dd, 83.60.-a, 87.85.jj, 87.85.Rs

Твердеющие композиции на основе нанокристаллических фосфатов кальция и биосовместимых полимеров

О. Н. Мусская, А. И. Кулак, В. К. Крутько, Л. А. Лесникович,
С. А. Уласевич, Л. Ф. Суходуб*

*Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси,
ул. Сурганова, 9/1,
220072 Минск, Беларусь
*Сумской государственной университет,
ул. Римского-Корсакова, 2,
40000 Сумы, Украина*

На основе нанокристаллических фосфатов кальция (гидроксиапатита, трикальцийфосфата) и биосовместимых полимеров (натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, поливинилового спирта) получены твердеющие композиции (цементы), характеризующиеся пористостью 13–55%, временем схватывания от 1 до 60 мин. и статической прочностью 0,1–8,7 МПа. Изучены влияния концентрации геля гидроксиапатита, температуры и полимерной добавки на время схватывания и статическую прочность кальцийфосфатных цементов. Доклиническими испытаниями *in vivo* показаны биосовместимость и токсикологическая безопасность кальцийфосфатных цементов. Цементы перспективны для практического использования в качестве биосовместимых компонентов покрытий на титановых имплантатах в нейрохирургии и ортопедии, а также самотвердеющих композитов.

На основі нанокристалічних фосфатів кальцію (гідроксиапатиту, трикальційфосфату) і біосумісних полімерів (натрієвої солі карбоксиметилцеллюлози, полівінілового спирту) одержано композиції, що твердіють (цементи), які характеризуються пористістю у 13–55%, часом тужавлення від 1 до 60 хв. і статичною міцністю у 0,1–8,7 МПа. Вивчено впливи концентрації гелю гідроксиапатиту, температури й полімерної домішки на час тужавлення та статичну міцність кальційфосфатних цементів. Доклінічні випробування *in vivo* показали біосумісність і токсикологічну безпеку кальційфосфатних цементів. Цементи перспективні для практичного використання як біосумісні компоненти покриття на титанових імплантатах у нейрохірургії й ортопедії, а також самотвердні композити.

New composite calcium phosphate cements with 13–55% porosity, 1–60 mi-

nute setting time, and 0,1–8,7 MPa static strength on the base of nanocrystalline calcium phosphates (hydroxyapatite, tricalcium phosphate) and biocompatible polymers (sodium carboxymethyl cellulose, polyvinyl alcohol) are obtained. The influences of hydroxyapatite gel concentration, temperature and polymer admixture on the setting time and static strength of the composite calcium phosphate cements are studied. Biocompatibility and toxicological safety of the calcium phosphate cements are been demonstrated by pre-clinical trials *in vivo*. The cements are prospective for practical application as a biocompatible component of coatings on titanium implants for neurosurgery and orthopaedics, and as self-hardening composites.

Ключевые слова: нанокристаллические фосфаты кальция, гидроксиапатит, трикальцийфосфат, твердеющие композиции, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, поливиниловый спирт.

(Получено 18 ноября 2013 г.; после доработки — 28 ноября 2013 г.)

1. ВВЕДЕНИЕ

Твердеющие материалы на основе фосфатов кальция известны как биоцементы для заполнения костных дефектов, благодаря высокой биоактивности, пластичности и способности затвердевать в течение определённого времени [1]. Биоактивные свойства цементам придают фосфаты кальция, главным образом, гидроксиапатит (ГА) и трикальцийфосфат (ТКФ) — основные неорганические компоненты костной ткани [2]. Следует отметить, что биоактивные свойства фосфата кальция проявляют только в кристаллогидратной форме. Полное удаление кристаллогидратной воды приводит к получению биоинертного фосфата кальция, не имеющего существенных преимуществ перед другими биосовместимыми материалами [3]. Ранее было показано, что кристаллогидраты ГА и ТКФ характеризуются нанометровым размером кристаллитов, которые, в отличие от микрорекристаллических аналогов, обладают высокой реакционной способностью, за счёт чего повышается остеокондуктивность биоматериала [4]. Кроме того, остеокондуктивные свойства биоцементов улучшаются при включении в их состав биополимерной составляющей, которая играет роль структурного остова для проникновения сосудов, материнской костной ткани, а также миграции остеогенных клеток-предшественников реципиента [5–7]. В связи с этим целью данной работы являлось получение и исследование твердеющих композиционных кальцийфосфатных цементов на основе нанокристаллических фосфатов кальция (ГА, ТКФ) в форме геля и порошка, а также влияние модифицирующих биосовместимых водорастворимых полимерных добавок — натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) и поливинилового спирта (ПВС) на свойства цементов.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гели фосфатов кальция (ГА, ТКФ) получали взаимодействием водных растворов, содержащих ионы кальция и гидрофосфат-ионы, при соотношении Ca/P 1,5 и 1,67 для ТКФ и ГА соответственно [8, 9]. Порошки фосфатов кальция получали высушиванием гелей ГА и ТКФ на воздухе при 60–70°C с последующим измельчением и разделением на фракции с размером частиц от 63 до 250 мкм.

Твердеющие кальцийфосфатные наноконпозиции получали смешиванием водного геля ГА концентрациями 4–17% с порошком фосфата кальция (ГА либо ТКФ) определенной фракции (≤ 63 ; 63–71; 71–80; 80–125; 125–200 и 200–250 мкм) при различных массовых соотношениях вода/(фосфат кальция) — 1:1; 1,2:1; 1,4:1.

Твердеющие наноконпозиции на основе ГА/полимер получали смешиванием 5–17% геля ГА с порошком ГА/полимер (ПВС либо Na-КМЦ) при массовом соотношении вода/(ГА/полимер) 1,2:1. Композиционный порошок ГА/полимер получали следующим образом: порошок ГА, высушенный при 60°C, с размером частиц ≤ 63 мкм смешивали с раствором ПВС либо Na-КМЦ концентрацией 1, 3 и 5% в массовом соотношении (порошок ГА)/(раствор полимера) 3:20; осадок отделяли от жидкой фазы на фильтре Шотта; высушивали при 60°C до постоянной массы с последующим прогревом при 85, 110, 135, 150, 170 либо 180°C в течение 1 ч. Полученный ксерогель ГА/полимер растирали и просеивали до порошка с размером частиц ≤ 63 мкм.

Пластичную массу на основе геля ГА и порошка фосфата кальция (ГА либо ТКФ) либо ГА/ПВС формовали в виде кубиков объемом 1 см³ либо наносили на титановые подложки в виде биоактивного слоя толщиной 1–2 мм. Полное затвердевание кальцийфосфатных цементов происходило в течение суток.

Реологические исследования геля ГА и твердеющих наноконпозиций на его основе выполняли на реометре RHEOLAB MC1 при постоянной температуре (20°C) в интервале скоростей сдвига 1–800 с⁻¹. Рентгенофазовый анализ синтезированных фосфатов кальция выполняли на рентгеновском дифрактометре ADVANCED D8; Ni-фильтр, CuK _{α} -излучение (длина волны 0,154 нм). Статическую прочность твердеющих композиций определяли на измерителе прочности гранул ИПГ-1; оптическую плотность измеряли с помощью спектроденситометра SpectroDens. Электронно-микроскопическое исследование кальцийфосфатных цементов выполняли с помощью сканирующего электронного микроскопа LEO 1420.

Пористость кальцийфосфатных цементов определяли по методике [10]. Пористый образец массой m_0 помещали в мерный цилиндр, содержащий известный объем этанола (V_1), и выдерживали в течение 30 мин. Объем этанола с погруженным образцом соответствует

V_2 . Затем образец, в поры которого проник этанол, извлекали из цилиндра, взвешивали (m_k) и определяли оставшийся объем спирта (V_3). Пористость (Π) цементных образцов рассчитывали по формуле:

$$\Pi = \frac{m_k - m_0}{\rho_{\text{эт}} (V_2 - V_3)} \times 100\% ,$$

где $\rho_{\text{эт}}$ — плотность этанола.

Гигиенические исследования (токсичность, пирогенность, гемолитическое действие, органолептические показатели, величина рН, перманганатная окисляемость, стерильность) твердеющих наноконпозиций на основе геля ГА и порошка ГА выполняли в Республиканском центре гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (Беларусь) и Центральной научно-исследовательской лаборатории Белорусского государственного медицинского университета. Кальцийфосфатные цементы предварительно выдерживали при 50 кГрей в течение 8 ч (γ -стерилизация), наносили на титановые пластинки в виде биоактивного слоя и изучали гемолитические, аллергические и цитотоксические свойства *in vitro* и *in vivo* на крысах.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Твердеющие кальцийфосфатные наноконпозиции. Согласно данным сканирующей электронной микроскопии и рентгенофазового анализа, порошки фосфатов кальция (ГА, ТКФ) состоят из нанокристаллитов размером 6–50 нм. Смешивание водного геля ГА и порошка нанокристаллического фосфата кальция приводит к образованию пластичной массы, которая начинает схватываться в течение от 1 мин. до 1 ч в зависимости от концентрации геля ГА, природы фосфата кальция, размера частиц порошка фосфата кальция и соотношения вода/(фосфат кальция). После затвердевания кальцийфосфатный цемент характеризуется статической прочностью до 2,7 МПа и пористостью от 13 до 42%.

На реологических кривых геля ГА и твердеющих наноконпозиций на его основе наблюдается резкое падение вязкости в узком интервале скоростей сдвига 1–2,5 с⁻¹, что свидетельствует о протекании процессов разрушения и восстановления первичной структуры геля ГА. Дальнейшее увеличение скорости сдвига до 800 с⁻¹ способствует переходу геля ГА в текучее состояние, соответствующее разрушению связанной структуры. В таких высококонцентрированных системах наблюдаются аномальные зависимости снижения напряжения сдвига при увеличении скорости сдвига, что свидетельствует о разрыве сплошности дисперсных структур в местах локализации структурных дефектов.

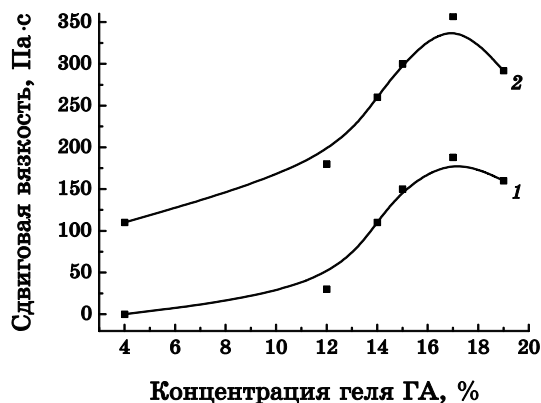


Рис. 1. Зависимость вязкости геля ГА и твердеющей композиции на его основе от концентрации геля ГА: 1 — гель ГА; 2 — твердеющая композиция гель ГА/порошок ГА (≤ 63 мкм), соотношение вода/ГА 1,2:1.

Повышение концентрации геля ГА от 4 до 17% приводит к увеличению его вязкости в 6 раз (рис. 1, кривая 1). Дальнейшее увеличение концентрации геля ГА, вероятно, способствует агрегированию дисперсной системы и, соответственно, снижению вязкости.

Аналогичная зависимость наблюдается для твердеющих композиций на основе геля и порошка ГА, что свидетельствует об увеличении прочности сцепления частиц ГА в цементной массе и способствует повышению прочности цемента после затвердевания (рис. 1, кривая 2).

Кинетические кривые изменения вязкости твердеющих композиций на основе геля ГА и порошка ГА показывают, что в течение первых 30–60 мин. происходит снижение вязкости, вероятно, связанное с упорядочением частиц порошка ГА в геле ГА под действием постоянной скорости сдвига. Затем наблюдается линейный рост вязкости, свидетельствующий о формировании более крупных агрегатов частиц, что затрудняет их движение в геле ГА (рис. 2).

Установлено, что при соотношении вода/ГА, равном 1:1 и 1,2:1, время схватывания и статическая прочность ГА цементов практически не изменяются.

Смешивание 4% геля ГА с порошком ГА фракции 63–71 мкм при соотношении вода/ГА, равном 1,2:1 приводит к достаточно медленному схватыванию цемента в течение 50 мин. Повышение концентрации геля ГА до 16% способствует уменьшению времени схватывания пластичной композиции до 1 мин. При использовании 4–16% геля ГА и порошка ГА с размером частиц 71–80 мкм время схватывания составляет 1–5 мин. Введение в гель ГА порошка ГА с большим размером частиц (200–250 мкм) способствует увеличению времени схватывания материала до 25–65 мин.

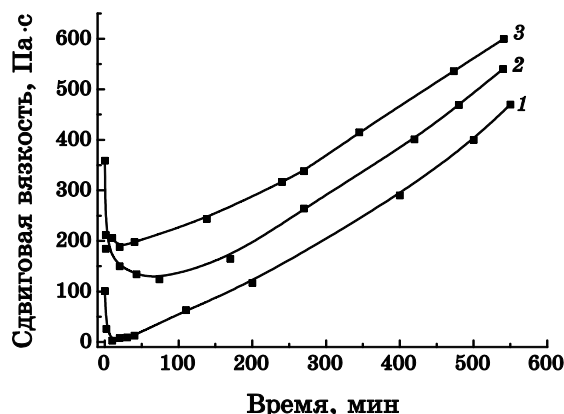


Рис. 2. Зависимость вязкости твердеющей композиции гель ГА/порошок ГА (≤ 63 мкм, соотношение вода/ГА 1,2:1) от времени при скорости сдвига 1 с^{-1} : 1 — 4% гель ГА; 2 — 12% гель ГА; 3 — 17% гель ГА.

Изменение соотношения вода/ГА до 1,4:1 приводит к увеличению времени схватывания твердеющих кальцийфосфатных цементах. В частности, при введении в 16% гель ГА порошка ГА с размером частиц 63–71 мкм время схватывания увеличивается до 30 мин., а статическая прочность материала после затвердевания составляет 0,1 МПа. Следует отметить, что после затвердевания максимальной

ТАБЛИЦА. Состав и свойства цементах на основе 4–16% геля ГА и порошка ТКФ с различным размером частиц при соотношении вода/(фосфат кальция) 1,2:1.

| Количество сухого ГА в геле, масс.% | Размер частиц порошка ТКФ, мкм | Время схватывания пластичной массы, мин. | Статическая прочность цемента, МПа |
|-------------------------------------|--------------------------------|--|------------------------------------|
| 4 | 63–71 | 35 | 0,15 |
| | 71–80 | 50 | 0,11 |
| | 80–125 | 75 | 0,02 |
| | 125–200 | 90 | 0,02 |
| 13 | 63–71 | 25 | 0,18 |
| | 71–80 | 45 | 0,13 |
| | 80–125 | 60 | 0,06 |
| | 125–200 | 70 | 0,04 |
| 16 | 63–71 | 5 | 0,20 |
| | 71–80 | 10 | 0,15 |
| | 80–125 | 20 | 0,06 |
| | 125–200 | 30 | 0,04 |

статической прочностью (2,7 МПа) характеризуется цемент на основе 17% геля ГА и порошка ГА фракции ≤ 63 мкм при соотношении вода/ГА, равном 1,2:1.

Введение в 4% гель ГА порошка ТКФ при соотношении вода/(ГА + ТКФ) 1,2:1 приводит к замедлению схватывания цемента в течение 20 мин. (порошок ТКФ 63–71 мкм) и 90 мин. (125–200 мкм) по сравнению с образцами на основе ГА. Повышение концентрации геля ГА до 16% способствует уменьшению времени схватывания цемента до 5 мин. (63–71 мкм) и 30 мин. (125–200 мкм). После затвердевания цементы ГА/ТКФ характеризуются статической прочностью до 0,2 МПа (см. табл.).

Твердеющие композиции ГА/полимер. С целью повышения механической прочности цементов в их состав вводили водорастворимые полимеры — Na-КМЦ и ПВС.

При введении Na-КМЦ в состав твердеющей кальцийфосфатной композиции статическая прочность повышается в 2 раза по сравнению с ГА цементом. Твердеющая композиция на основе 5–17% геля ГА и порошка ГА, предварительно обработанного 1–5% раствором Na-КМЦ, с последующим прогревом при 60–170°C, с размером частиц ≤ 63 мкм схватывается в течение 7–60 мин. и характеризуется пористостью 14–48%, статической прочностью до 4,5 МПа. Установлено, что повышение концентрации геля ГА от 5 до 17% уменьшает время схватывания твердеющих композиций в 2 раза. При смешивании порошка ГА/Na-КМЦ (60°C) и 5% геля ГА время схватывания составляет 15 мин., а при использовании 12–17% геля ГА — 7–8 мин. Следовательно, возрастание прочности при повышении количества ГА, введённого в материал в форме геля, может быть связано с увеличением степени структурирования исходных композиций.

С повышением температуры прогрева порошка ГА/Na-КМЦ от 60 до 170°C время схватывания кальцийфосфатных материалов увеличивается в 9 раз при использовании 5% раствора Na-КМЦ. Прогрев порошка ГА/Na-КМЦ в интервале 100–150°C обеспечивает достаточно высокую статическую прочность материала до 4,1 МПа (рис. 3, кривая 1). Последующий прогрев порошка ГА/Na-КМЦ при температурах выше 150°C приводит к получению материалов с невысокой статической прочностью 0,2–0,6 МПа, при этом наблюдается заметное увеличение (в 6 раз) оптической плотности образцов, свидетельствующее о деструкции полимера.

Согласно данным сканирующей электронной микроскопии (рис. 4), с повышением содержания полимерного связующего наблюдается более однородное склеивание частиц фосфата кальция в твердеющей композиции, что способствует упрочнению цемента.

Цемент на основе 5–17% геля ГА и порошка ГА, обработанного 1–5% раствором ПВС, с последующим прогревом при 85–180°C, схватывается в течение 1–30 мин. и характеризуется пористостью 15–

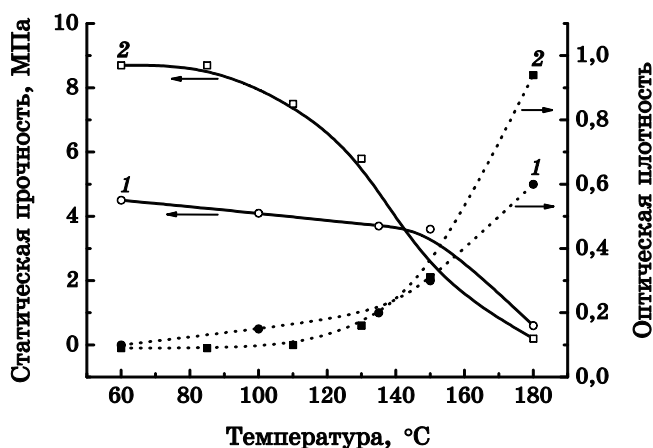


Рис. 3. Зависимость статической прочности и оптической плотности кальцийфосфатных цементов на основе 17% геля ГА и порошка ГА, обработанного 5% раствором полимера в зависимости от температуры прогрева: 1 — ГА/Na-КМЦ; 2 — ГА/ПВС.

55%. Использование 5% раствора ПВС способствует увеличению статической прочности цемента до 5,8–8,7 МПа. Однако при повышении температуры прогрева порошка ГА/ПВС, как и в случае с композициями на основе ГА/Na-КМЦ, наблюдается заметное увеличение оптической плотности образцов при 150°C, свидетельствующее о деструкции полимера, что приводит к получению цемента с невысокой статической прочностью 0,2 МПа (рис. 3, кривая 2).

Медико-биологические испытания. Твердеющие кальцийфосфатные композиции на основе геля ГА и порошка ГА после γ -

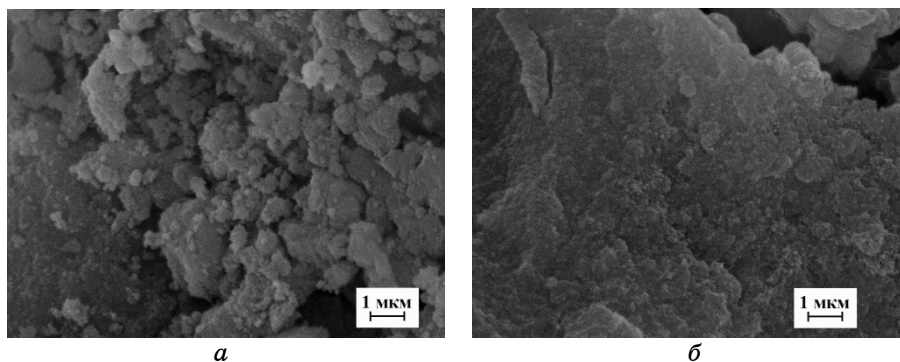


Рис. 4. Электронно-микроскопическое изображение поверхности твердеющей композиции на основе 17% геля ГА и порошка ГА/Na-КМЦ, высушенного при 60°C: а — 1% раствор Na-КМЦ; б — 5% раствор Na-КМЦ.

стерилизации (50 кГрей, 8 ч) соответствуют требованиям на продукцию по органолептическим, санитарно-химическим и микробиологическим показателям.

Доклинические исследования *in vitro* и *in vivo* на крысах показали, что подкожная имплантация титановых пластин с покрытием на основе ГА цемента не оказывает негативного влияния на клеточный состав периферической крови крыс, а также на активность аланин- и аспаргатаминотрансфераз, содержание белка, глюкозы, креатинина, мочевины в сыворотке крови в течение 1–3 месяцев после имплантации (рис. 5). Введение вытяжки ГА цемента контрольной группе крыс через 6 и 24 ч после инъекции не приводит к появлению отёка, что свидетельствует об отсутствии аллергенных свойств.

Клинические испытания титановых трансплантатов с биопокрытием на основе кальцийфосфатного цемента для пластики черепа показали, что у всех пациентов не отмечалось сухого невроза кожного лоскута, нарушений мозгового кровообращения, внутричерепных гематом, гидром и интракраниального смещения трансплантата; отмечался удовлетворительный косметический эффект, частичный регресс неврологической симптоматики.

Таким образом, твердеющие кальцийфосфатные композиции на основе геля ГА и порошка ГА могут применяться для имплантации в различные костные дефекты с целью активации остеорепаративных процессов и формирования новой костной ткани в месте введения материала.

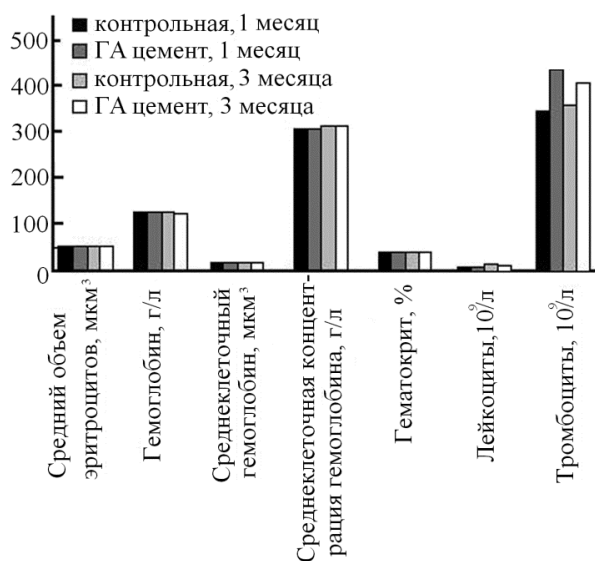


Рис. 5. Показатели периферической крови крыс через 1 и 3 месяца после имплантации титановых пластин с покрытием на основе ГА цемента.

4. ВЫВОДЫ

На основе нанокристаллических фосфатов кальция и биосовместимых полимеров (Na-КМЦ, ПВС) разработаны новые композиционные кальцийфосфатные биоцементы. Полученные цементы характеризуются пористостью 13–55%, временем схватывания от 1 мин. до 1 ч, статической прочностью до 8,7 МПа и могут использоваться в качестве биорезорбируемого слоя на титановых имплантатах при краниопластических операциях. Доклинические испытания *in vitro* и *in vivo* на крысах показали, что титановые имплантаты с биопокрытием на основе ГА цемента обладают высокой биосовместимостью и токсикологической безопасностью.

Работа выполнена в рамках совместного проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Х13К-057) и Государственного фонда фундаментальных исследований Украины (грант № Ф54.4-012). Авторы благодарят сотрудников Центральной научно-исследовательской лаборатории Белорусского государственного медицинского университета Б. В. Дубовика и Республиканского центра гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (Беларусь) А. В. Щемелева за проведение медико-биологических испытаний цемента на основе ГА.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. O. N. Musskaya, A. I. Kulak, V. K. Krut'ko, L. A. Lesnikovich, and S. A. Ulasevich, *Glass. Phys. Chem.*, **37**: 525 (2011).
2. Т. В. Сафронова, В. И. Путляев, *Наносистемы: физика, химия, математика*, **4**: 24 (2013).
3. О. Н. Мусская, А. И. Кулак, Л. А. Лесникович, Г. В. Бутовская, С. А. Уласевич, В. К. Крутько, О. А. Сычева, *Журн. общ. химии*, **82**: 1258 (2012).
4. V. K. Krut'ko, A. I. Kulak, L. A. Lesnikovich, I. V. Trofimova, O. N. Musskaya, G. K. Zhavnerko, and I. V. Paribok, *Russ. J. Gen. Chem.*, **77**: 336 (2007).
5. S. N. Danilchenko, O. V. Kalinkevich, V. N. Kuznetsov, A. N. Kalinkevich, T. G. Kalinichenko, I. N. Poddubny, V. V. Starikov, A. M. Sklyar, and L. F. Sukhodub, *Cryst. Res. Technol.*, **45**: 553 (2010).
6. L. F. Sukhodub, *Mater. Sci. Eng. Technol.*, **4**: 318 (2009).
7. S. N. Danilchenko, O. V. Kalinkevich, M. V. Pogorelov, A. N. Kalinkevich, A. M. Sklyar, T. G. Kalinichenko, V. Y. Plyashenko, V. V. Starikov, V. I. Bumeyster, V. Z. Sikora, and L. F. Sukhodub, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **96A**: 639 (2011).
8. V. K. Tsuber, L. A. Lesnikovich, A. I. Kulak, I. V. Trofimova, P. T. Petrov, T. V. Trukhacheva, Yu. D. Kovalenko, and V. L. Krasil'nikova, *Pharm. Chem. J.*, **40**: 455 (2006).
9. Л. Н. Щегров, *Фосфаты двухвалентных металлов* (Киев: Наукова думка 1987).
10. N. Pramanik, S. Mohapatra, P. Bhargava, and P. Pramanik, *Mater. Sci. Eng. C*, **29**: 228 (2009).