

6. Neu C.M., Rauch F., Rittweger J. et al. Influence of puerty on muscle development at the forearm // Amer. J. Physiol. 2002. 283. № 1. Vol. 1. PP. E103-107.
7. Долганова Т.И. Функциональные процессы в организме при лечении аппаратом Илизарова. – Saarbrucktn. – LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2011. 376 p.
8. Щуров В.А., Долганов Д.В., Долганова Т.И., Атманский И.А. Устройство для определения силы мышц бедра / Патент 35703 РФ, МПК⁷ А 61 В 17/56 / РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова. № 2003118782/20; заявл. 23.06.03; опубл. 10.02.04. Бюл. № 4.
9. Витензон А.С. Закономерности нормальной и патологической ходьбы человека. – М.: Центральный НИИ протезирования и протезостроения ООО «Зеркало-М», 1998. 271 с.
10. Шецов В.И., Атманский И.А., Тютрин С.Г. Биомеханическое моделирование реконструкции бедренной кости у

больных с анкилозом тазобедренного сустава в порочном положении // Гений ортопедии. 1997. № 2. С. 75-81.

Владимир Алексеевич Щуров,
д-р мед. наук, профессор,
гл. научный сотрудник,
Тамара Игоревна Долганова,
д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник,
Дмитрий Владимирович Долганов,
канд. биол. наук, ст. научный сотрудник,
лаборатория функциональных исследований,
ФГБУ «Российский научный центр «ВТО»
им. акад. Г.А. Илизарова» МЗ РФ,
г. Курган,
e-mail: rjik532007@rambler.ru

В.Н. Горшенев, Ю.А. Ершов, А.Т. Телешев, Е.Д. Склянчук,
А.А. Просвирин, С.А. Григорьев

Гидроксиапатитовые биоконпозиты медицинского назначения

Аннотация

Разработаны новые технологические подходы получения композиционных, биосовместимых материалов на основе наночастиц гидроксиапатита, внедренных в коллагеновую матрицу. Обсуждены оптимальные условия получения синтетического гидроксиапатита на коллагеновых волокнах и его особенности как костного имплантата.

В последние годы активно проводятся разработки биоадекватных имплантатов для заполнения и восполнения костных дефектов, исследования биотрансформации коллаген-апатитовых композитов *in vivo*, создание биоконпозитов медицинского назначения для ортопедии различной консистенции. Активизация работы в этой области связана с внедрением инновационных технологий при получении наночастиц гидроксиапатита на коллагеновых волокнах [1]-[4].

Технологии создания костных имплантатов можно разделить на несколько групп в зависимости от свойств и условий их применения: композиты для имплантации на основе углеродных волокон (углекерамика, углепластика), гибридные и композиционные материалы на базе полимерных матриц, биорезистивные и биорезорбируемые керамические материалы, композиты с составляющими биологического происхождения. Общим в перечисленных направлениях является применение гидроксиапатита в качестве неорганической части костного имплантата.

Целью рассматриваемой работы является оптимизация синтеза гидроксиапатита и его совмещения с органическими компонентами для получения образцов биоконпозитов.

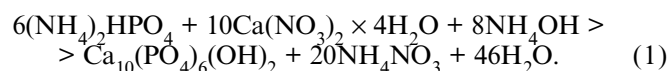
Оптимизация синтеза связана с понижением температуры, повышением удельной производительности и обусловлена приближением процессов получения гидроксиапатита медицинского назначения к промышленно значимым и его совмещения с органическими компонентами.

Экспериментальная часть

Синтез гидроксиапатита осуществлялся в двух направлениях: в стандартных лабораторных условиях и с включением в технологическую схему роторно-пульсационного аппарата (РПА).

Синтез гидроксиапатита аммиачным способом в стандартных лабораторных условиях (ГАП-1)

Уравнение реакции синтеза ГАП записывается следующим образом:



К раствору 77,8 г нитрата кальция тетрагидрата в 300 мл воды добавляли концентрированный раствор аммиака до достижения pH, равного 12, и доводили водой общий объем до 600 мл. При интенсивном перемешивании с помощью лабораторной мешалки медленно добавляли полученный раствор к раствору, содержащему 26,1 г диаммонийфосфата в 500 мл воды, который после доведения значения pH до 12 с помощью водного аммиака разбавляли до объема 800 мл. После 10 мин кипячения реакционной смеси образовавшийся осадок переносили на вакуум-фильтр и промывали 100 мл горячей воды. Продукт последовательно нагревали 2 ч при 150 °С и 1 ч при 240 °С. Выход составлял 90 %. Найдено, %: Са – 39,88; Р – 18,36. Вычислено, %: Са – 39,89; Р – 18,50.

Следует отметить, что распределение частиц гидроксиапатита по размерам в реакционной среде находится в весьма широких пределах и соответствует среднему гидродинамическому диаметру 6,4 мкм.

Синтез гидроксиапатита аммиачным способом с использованием РПА (ГАП-2)

Синтез ГАП-2 проводили согласно уравнению реакции (1). Тетрагидрат нитрата кальция в количестве 77,8 г растворяли в 3 л дистиллированной воды, добавляли концентрированный раствор аммиака до pH, равного 11,3. Объем полученного раствора доводили дистиллированной водой до 6 л (раствор № 1). Для приготовления раствора № 2 диаммонийфосфат в количестве 226 г растворяли в 5 л дистиллирован-

ной воды и концентрированным раствором аммиака задавали величину pH, равную 10,0. Затем общий объем раствора довели дистиллированной водой до 8 л.

РПА подключали по схеме (рис. 1).

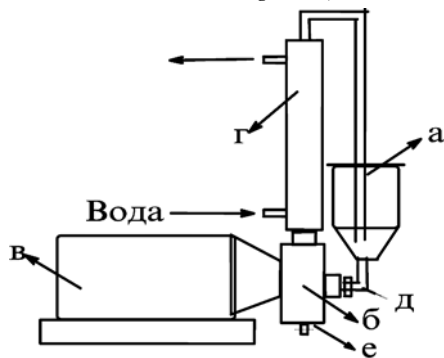


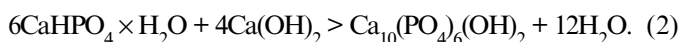
Рис. 1. Схема обвязки РПА: а) загрузочная емкость; б) РПА; в) электродвигатель; г) холодильник «труба в трубе»; д) термopapa; e) сливной кран

При включенном охлаждении в емкость 1а загружали 6 л раствора № 1 и запускали двигатель аппарата 1в (3000 мин⁻¹). Со скоростью 1 л/мин в емкость 1а вводили 8 л раствора № 2. Смесь обрабатывали в рабочем режиме аппарата 2 мин при отключенном холодильнике 1г. Белую однородную подвижную пульпу сливали, переносили на вакуум-фильтр, фильтровали и ретенат промывали горячей водой до pH промывной воды 6,5. Выход составлял 95 %. Найдено, %: Са – 39,89; Р – 18,48. Вычислено, %: Са – 39,89; Р – 18,50.

Следует отметить, что распределение частиц гидроксиапатита по размерам в реакционной среде соответствует среднему гидродинамическому диаметру 0,95 мкм, что значительно отличается в сторону уменьшения от результатов измерений, проведенных для гидроксиапатита, получаемого в стандартных лабораторных условиях (см. методику синтеза ГАП-1).

Синтез гидроксиапатита конденсационным способом с использованием РПА (ГАП-3)

Уравнение реакции записывается как



В емкость 1а помещали 5 л дистиллированной воды, включали охлаждение, запускали двигатель аппарата (1500 мин⁻¹) и загружали 700 г гидрата монофосфата кальция. Двигатель выводили на рабочий режим (3000 мин⁻¹) и выдерживали раствор 2 мин при 35 °С. Суспензию 224 г гидроксида кальция в 6 л воды вводили постепенно, со скоростью 1 л/мин. После добавления гидроксида кальция реакционную смесь обрабатывали 20 мин при температуре 70 °С, контролируя изменение величины pH до значения 6,3. Белую однородную подвижную пульпу сливали, переносили на вакуум-фильтр, фильтровали и ретенат промывали горячей водой. Выход составлял 94 %. Найдено, %: Са – 39,89; Р – 18,49. Вычислено, %: Са – 39,89; Р – 18,50.

Синтез гидроксиапатита конденсационным способом на коллагеновой матрице с использованием РПА (ГАП-К)

В емкость 1а помещали 10 л дистиллированной воды, включали охлаждение, запускали двигатель аппарата (3000 мин⁻¹) и загружали предварительно бланшированную при температуре 40 °С в течение 10 мин дробленую

обезжиренную свиную шкуру в количестве 2,5 кг. Продукт обрабатывали в течение 30 мин, контролируя при этом температуру дисперсии (не выше 70 °С). На второй стадии к полученному РПА гидрозолью коллагена, не прерывая процесса, добавляли порошок гидрата монофосфата кальция в количестве 700 г и перемешивали в течение 10 мин при пониженном числе оборотов двигателя (2500 мин⁻¹) при температуре не выше 70 °С. На третьей стадии в РПА дробно вводили 224 г гидроксида кальция, суспендированного в 1 л воды, и реакционную смесь обрабатывали в течение 30 мин при числе оборотов двигателя 3000 мин⁻¹ и температуре не выше 70 °С. Затем полученную пульпу разливали в заданные формы и подвергали лиофильной сушке при температуре коллектора –50 °С в течение 32 ч. Согласно данным анализа зольных элементов, атомное соотношение фосфор-кальций составляет 0,6:1,0, что соответствует брутто-формуле $\text{Ca}_{10}\text{H}_2\text{O}_{26}\text{P}_6$.

Экспериментальное исследование биотрансформации материала in vivo на модели ортотопической имплантации

В исследование было включено 17 половозрелых крыс породы Вистар обоих полов весом от 270 до 350 г и возрастом от 6 до 12 месяцев. Было проведено слепое контролируемое испытание с параллельным контролем. У каждого животного под внутримышечным наркозом растворами Zooxylasin и Zoletil 100 в теменных костях черепа сверлом диаметром 3,5 мм, имеющим ограничитель глубины, формировались два костных дефекта. После сшивки материала по коллагеновым аминокетогруппам глутаровым альдегидом имплантаты моделировались по размеру дефекта диаметром 3,5 мм и толщиной 1,5 мм. Опытный дефект заполняли подготовленным имплантатом, контрольный – оставляли свободным. На сроках 1, 4, 8 недель экспериментальным животным прижизненно проводилось компьютерно-томографическое исследование (КТ), толщина срезов 0,4 мм. Оценивались размеры, распределение плотности тканей в объеме контрольного и опытного дефектов.

Оборудование и приборы

В работе использовали РПА с приводом от электродвигателя производства ОАО КПП «Авиамотор» (г. Казань). Благодаря конструктивным особенностям аппарата, жидкотекучие среды в зоне обработки подвергались комплексному механоакустическому воздействию за счет больших градиентов скоростей, вихреобразования и высокочастотных пульсаций [5].

ИК-спектры регистрировали в отражательном режиме спектрометра «Nicolet 380» на кристалле ZnSe.

Элементный анализ проводили на лазерном масс-спектрометре «ЭМАЛ-2».

Параметры пористой структуры образцов ГАП определяли на автоматической вакуумной адсорбционной установке «GRAVIMAT-4303» с чувствительностью 1 мкг при навеске до 100 мг в интервале относительных давлений от 0,0001 до 0,1.

Микрофотографии были получены при помощи сканирующего электронного микроскопа «Neon40EsB-35-09».

Компьютерно-томографическое исследование проводилось на аппарате «SOMATOM Definition AS» с разрешением kV 120 mas 36 фирмы «Siemens».

Измерение гидродинамических размеров частиц проводили для реакционных смесей при помощи метода

динамического светорассеяния на приборе «Zetasizer Nano ZS Zen3600» компании «Malvern Instruments».

Результаты и обсуждение

В ИК-спектрах синтезированного гидроксиапатита обнаруживаются все моды, характерные для этого соединения. На *рис. 2* приведены отражательные спектры гидроксиапатита и гидроксиапатита на коллагеновой матрице.

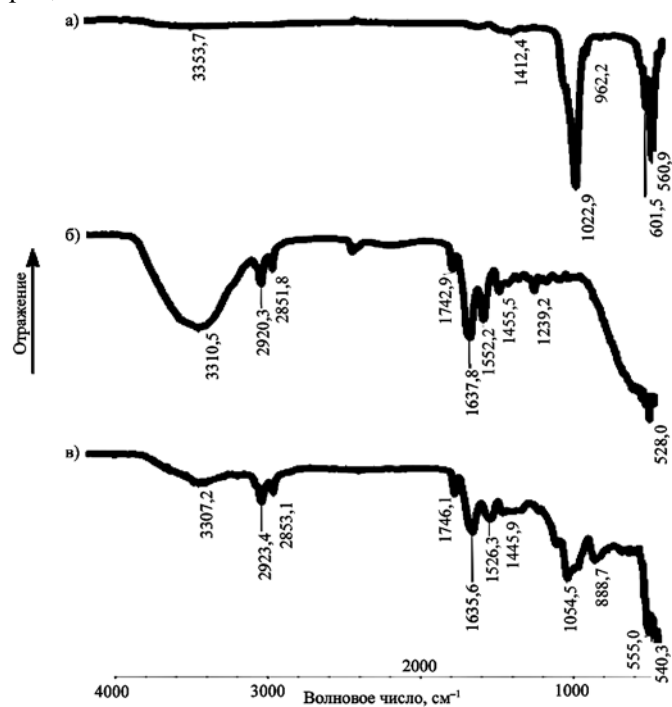


Рис. 2. ИК-спектры: а) ГАП-3; б) коллагенового сырья; в) ГАП на коллагеновой матрице после лиофильной сушки (ГАП-К)

Наиболее характеристичные моды для синтезированных образцов гидроксиапатита находятся в области 560 и 1029 cm^{-1} , что соответствует поглощению $\nu(\text{PO}_4)$ [6].

Параметры пористой структуры исследуемых образцов гидроксиапатита определяли из изотермы адсорбции паров азота при температуре 77 К.

Общую удельную поверхность определяли методом БЭТ (СБЭТ) и с применением сравнительного метода (SMP) [7]–[9]. Для образцов ГАП-1 и ГАП-2 величины СБЭТ были равны соответственно 79 и 78 $\text{m}^2/\text{г}$, а SMP – 81 и 78 $\text{m}^2/\text{г}$. Необходимо отметить, что в области относительных давлений от 0 до 0,2 изотермы адсорбции для исследуемых образцов гидроксиапатита практически совпадают. Однако в области более высоких давлений наблюдаются существенные различия, обусловленные, по-видимому, капиллярно-конденсационными явлениями. В этом случае можно предположить, что образцы ГАП-1 и ГАП-2 характеризуются разными формами пор.

Синтезированные порошки гидроксиапатита смешивались с альгинатом натрия, полиакриламидным гелем и другими связующими компонентами для получения композиционных материалов, которые могут применяться в ортопедии и травматологии. Коллагеновая дисперсионная среда с частицами ГАП является близкой по своему составу к костной ткани организма человека и может быть положена в основу создания искусственного заменителя костной ткани. В результате синтеза гидроксиапатита в коллагеновой дисперсионной среде (ГАП-К), в заданных формах после лиофильного высу-

шивания были получены пористые образцы плотностью 0,2 $\text{г}/\text{см}^3$.

На микрофотографии поверхности образца ГАП-К наблюдаются волокна коллагена, частицы гидроксиапатита и пористая структура образца материала (*рис. 3*).

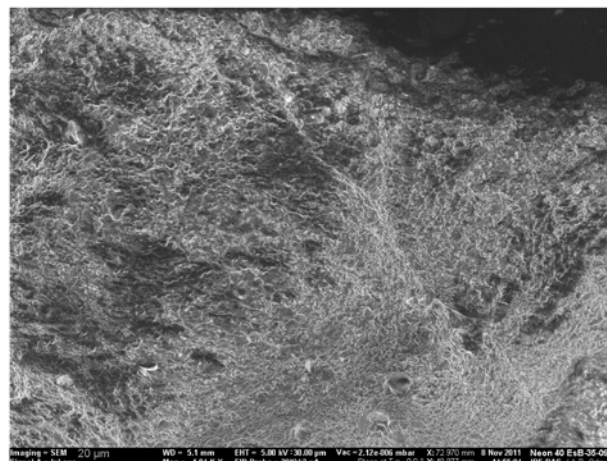


Рис. 3. Микрофотографии образца ГАП-К (масштаб 20 мкм)

Композиционный материал на основе коллагена имеет небольшую прочность на сжатие (2 МПа) и значительную величину разрывной деформации $\epsilon = 65\%$. В воде такой образец с течением времени (10 дней) превращается в желеобразную текучую массу. В связи с этим образец ГАП-К дополнительно модифицировали 5%-ным раствором глутарового альдегида. В результате сшивки коллагеновых волокон форма образца при выдержке в воде не меняется, а материал приобретает способность восстанавливать исходную форму после деформации.

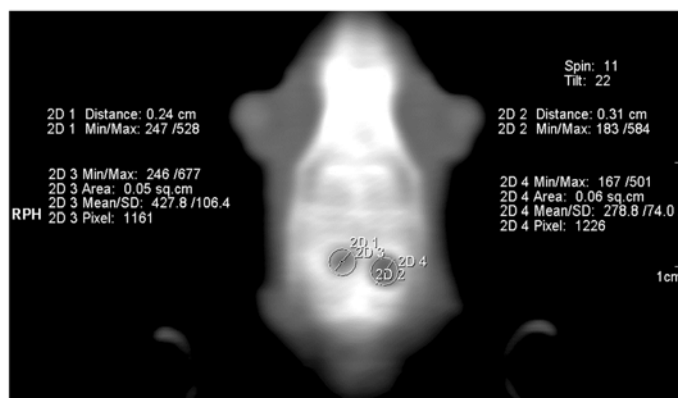


Рис. 4. Компьютерная томография (8 недель эксперимента): среднее значение плотности в опытном дефекте составляет 427,8

При исследовании материала на модели дефекта черепа у крыс во всех наблюдениях воспалительной реакции тканей на материал не выявлено. При КТ-исследовании в течение 8 недель эксперимента размеры контрольных дефектов не изменялись. Признаков оссификации не было обнаружено ни по краям, ни в центре дефекта. Статистически достоверной разницы средних значений показателей плотности тканей по срокам исследования обнаружено не было. Абсолютные величины не выходили за границы плотности, соответствующей рыхлой соединительной и жировой тканям. В опытных наблюдениях с течением времени также не отмечено существенного уменьшения размеров границ дефектов, но в объеме имплантированного материала наблюдались нарастающие процессы исчезновения равномерности КТ-

плотности в виде ее постепенного снижения по периферии. В то же время средние значения совокупной плотности нарастали и составили: на 1-й неделе – 141,2; на 5-й неделе – 190,2 и до 500 – к 8-й неделе (рис. 4).

Однако различия показателей по срокам исследования, как и контрольных значений, статистически незначимы. Полученные значения соответствуют фиброзно-хрящевой мозоли по шкале показателей КТ плотностей тканей. Различия с контрольными значениями статистически значимы ($p < 0,01$).

Таким образом, разработанный способ изготовления костного имплантата технологичен в производстве. Созданный биокомпозит с использованием гидроксиапатита имеет состав, по процентному соотношению содержания коллаген-гидроксиапатит (40:60) приближенный к нативной кости. Пористость представлена несколькими взаимно сообщающимися уровнями: макропористость – от 50 до 200 мкм, микропоры – от 1 до 20 мкм и нанопоры – в пределах 200 нм. Биокомпозит имеет нейтральную реакцию, гидрофилен, обладает хорошей клеточной адгезией, необходимой для создания тканеинженерных конструкций. В костном дефекте биокомпозит трансформируется с образованием остеогенного регенерата в сроки, близкие к физиологическому заживлению костной раны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда РФФИ, проект 13-08-01006.

Список литературы:

1. Лекишвили М.В., Панасюк А.Ф. Новые биопластические материалы в реконструктивной хирургии // Вестник РАМН. 2008. № 9. С. 33-36.
2. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Коллаген: получение, свойства и применение. – М.: ГОУ ВПО «МГУЛ», 2007. 336 с.
3. Еришов Ю.А., Горшенев В.Н. Коллаген-гидроксиапатитовые имплантаты для ортопедии / Материалы конференции «Нанотехнологии в онкологии-2008». Москва, 2008. С. 127.
4. Горшенев В.Н., Телешев А.Т., Еришов Ю.А., Казиев Г.З., Колесов В.В., Скляничук Е.Д. Способ получения пористого костного биокомпозита / Патент РФ № 2482880, 2013. Бюл. изобретений № 15. 2013.
5. Кесель Б.А., Федоров А.Д., Гимушин И.Ф., Волков Г.А., Гамауллин Р.Ш., Воскобойников Д.В., Весельев Д.А. Роторно-пульсационный аппарат (РПА) / Патент РФ. № 2166986. 2001. Бюл. изобретений № 21. 2003.
6. Голощапов Д.Л., Кашкаров В.М., Румянцев Н.А., Середин П.В., Леньшин А.С., Агапов Б.Л., Домашевская Э.П. Получение

нанокристаллического гидроксиапатита методом химического осаждения с использованием биогенного источника кальция // Конденсированные среды и межфазные границы. 2011. Т. 13. № 4. С. 427-441.

7. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. – М.: Мир, 1984. 306 с.
8. Волощук А.М., Дубинин М.М., Московская Т.А., Ларионова А.О. Пористая структура и химическое состояние поверхности углеродных адсорбентов // Изв. АН СССР. Серия «Химия». 1988. С. 2203-2208.
9. Волощук А.М., Дубинин М.М., Московская Т.А., Ивахнюк Т.К., Федоров Н.Ф. Пористая структура и химическое состояние поверхности углеродных адсорбентов // Изв. АН СССР. Серия «Химия». 1988. С. 277-283.

Владимир Николаевич Горшенев,
канд. физ.-мат. наук, ст. научный сотрудник,
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
Юрий Алексеевич Еришов,
д-р хим. наук, профессор,
кафедра БМТ2,
Московский государственный технический
университет им. Н.Э. Баумана,
Андрей Терентьевич Телешев,
д-р хим. наук, профессор,
химический факультет,
Московский педагогический государственный университет,
Евгений Дмитриевич Скляничук,
д-р мед. наук, профессор,
зав. ортопедическим отделением,
Центр травматологии и ортопедии,
Дорожная клиническая больница им. Н.А. Семашко
на станции Люблино ОАО «РЖД»,
Александр Александрович Просвиринов,
ассистент,
кафедра травматологии, ортопедии
и военно-полевой хирургии,
Московский государственный медико-стоматологический
университет им. А.И. Евдокимова,
Сергей Александрович Григорьев,
врач отделения лучевой диагностики,
Центр травматологии и ортопедии,
Дорожная клиническая больница им. Н.А. Семашко
на станции Люблино ОАО «РЖД»,
г. Москва,
e-mail: ershov_54@mail.ru

Д.Д. Егорова, Я.Е. Казаков, В.С. Кубланов

Применение метода главных компонент при анализе вариабельности сердечного ритма

Аннотация

Приводятся результаты анализа информативного множества показателей вариабельности сердечного ритма (ВСР) с помощью метода главных компонент. Определены наиболее чувствительные из них к функциональным изменениям организма: оценки вегетативного баланса, определяемые отношением LF_{en} / HF_{en} , где HF_{en} – вейвлет-преобразование интенсивности спектра ВСР в полосе частот от 0,4 до 0,15 Гц, а LF_{en} – в полосе частот от 0,15 до 0,04 Гц, и дисфункции функционала $F[LF_{en} / HF_{en}]$, где N – их число; A_{max} – максимальное значение; A – интенсивность на интервале наблюдения. На группе больных, страдающих гипертонической болезнью II-III стадий, выполнена проверка эффективности метода в ходе лечебного процесса с применением гипотензивной терапии и аппарата «СИМПАТОКОР-01».

Введение

При анализе вариабельности сердечного ритма (ВСР) применяют различные способы, основными из которых являются статистические, пульсометрические и спек-

ральные [1]. Каждый из этих способов в той или иной степени характеризует изменения функциональных процессов в организме и позволяет оценивать параметры вегетативной нервной регуляции сердца. Однако чувствительность таких оценок к изменениям ВСР, возникаю-