Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

На правах рукописи

ШКАРИНА Светлана Николаевна

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ, СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И СВОЙСТВА КОМПОЗИТНЫХ СКЭФФОЛДОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И МОДИФИЦИРОВАННОГО ГИДРОКСИАПАТИТА, СФОРМИРОВАННЫХ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОФОРМОВАНИЯ

05.11.17 Приборы, системы и изделия медицинского назначения 01.04.07 Физика конденсированного состояния

> Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

> > Научный руководитель: кандидат физико-математических наук, доцент Сурменев Роман Анатольевич

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1. Литературный обзор	12
1.1 Тканевая инженерия в восстановлении костной ткани	12
1.3. Требования к скэффолдам, используемым в инженерии костной ткани	14
1.4. Биоматериалы для инженерии костной ткани	16
1.5. Поликапролактон: структура и свойства	21
1.6. Гидроксиапатит	23
1.6.1. Стронцийзамещенный гидроксиапатит	24
1.6.2. Кремнийзамещенный гидроксиапатит	25
1.7. Методы формирования скэффолдов	25
1.7.1 Метод электроформования	28
2. Материалы и методы исследования	32
2.1. Материалы и реактивы	32
2.2. Установка электроформования	33
2.3. Методы исследования	34
2.3.1. Определение реологических свойств растворов	34
2.3.2. Микроскопия	35
2.3.3 Компьютерная микротомография с использованием источника синхротронного излучения	36
2.3.4 Рентгенофазовый анализ	45
2.3.5 Инфракрасная спектроскопия	46
2.3.6 Исследование механических свойств	46
2.3.7 Смачиваемость поверхности и свободная поверхностная энергия	47
2.3.8 Исследование деградации в растворе натрий-фосфатного буфера	49
2.3.9 Биологические исследования in vitro и in vivo	50
2.3.10 Статистический анализ данных	53
3. Оптимизация способов получения скэффолдов, структурные особенности и физико- химические свойства композитных скэффолдов	54
3.1 Реологические свойства растворов поликапролактона различных концентраций и композитных смесей, содержащих микрочастицы порошков модифицированного гилроксиапатита	54
3.2 Влияние параметров процесса электроформования на размер и ориентацию микроволо	кон
в скэффолдах	57

3.3 Исследование физико-химических свойств микрочастиц порошков модифицированного гидроксиапатита и поликапролактона
3.4 Определение влияния минимальной концентрации кремнийзамещенного гидроксиапатита на свойства скэффолдов
3.4.1 Морфологические и физико-химические свойства
3.4.2 Оценка эффективности скэффолдов с помощью биологических <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> тестов
3.5 Краткие выводы по главе 3
4. Морфологические, структурные и физико-химические свойства композитных скэффолдов на основе поликапролактона и модифицированных гидроксиапатитов
4.1 Исследование влияние концентрации микрочастиц модифицированного гидроксиапатита на морфологические свойства и внутреннюю структуру скэффолдов методом СЭМ и РКТ 82
4.2 Влияние концентрации микрочастиц порошков модифицированного гидроксиапатита на физико-химические свойства полимерных скэффолдов
4.3 Краткие выводы по главе 4 106
5. Механические характеристики и биологическая апробация композитных скэффолдов 107
5.1 Влияние модифицированного гидроксиапатита на механические свойства композитных скэффолдов
5.2 Смачиваемость поверхности и поверхностная энергия композитных скэффолдов 109
5.3 Определение скорости биодеградация скэффолдов 112
5.4 Исследование биосовместимости полимерных композитов на основе модифицированных гидроксиапатитов в условиях <i>in vitro</i>
5.5 Краткие выводы по главе 5 122
ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ
ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 128

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации. Проблема, связанная с восстановлением и лечением поврежденных костных тканей организма человека, обусловлена комплексом социальных и физиологических причин. Традиционные подходы, в основе которых лежит лечение дефектов ауто-, гомологичными или металлическими материалами, имеют ряд недостатков и сложно устранимых ограничений. В наши дни существует огромная потребность в разработке новых способов получения биокомпозитов с заданными свойствами, позволяющих более эффективно управлять процессами регенерации костных тканей и сократить срок реабилитационного периода, что является одним из важнейших подходов медицинского материаловедения, включающих основные аспекты физики конденсированного состояния.

Одним из перспективных направлений данной области является разработка и исследование структуры и свойств биокомпозитных скэффолдов (конструкций, матриц), обладающих заданным набором физико-химических и эксплуатационных свойств. Скэффолды имитируют внеклеточный костный матрикс (ВКМ), и используются для направленного восстановления структуры и функциональности поврежденной или утраченной костной ткани. Основными требованиями при выборе материалов и методов, для создания такого рода конструкций являются: биосовместимость используемых биоматериалов; оптимальная скорость их биодеградации, соответствующая росту собственной костной ткани; нетоксичность продуктов распада; наличие адгезивной поверхности, способствующей прикреплению и пролиферации клеток; структура и пористость, способствующая распределению клеток в объеме скэффолда, образованию кровеносных сосудов, доставке питательных веществ и удалению продуктов жизнедеятельности.

Лидирующее место среди множества биоматериалов, используемых для создания скэффолдов, занимает гидроксиапатит (ГА), благодаря его сходству по элементному и фазовому составу с костной тканью. Введение следовых элементов в кристаллическую решетку ГА, содержащихся в структуре костной ткани, в частности, катионов Sr^{2+} или анионов SiO_4^{4-} , является важным этапом на пути создания биокомпозитов с улучшенными свойствами, так как позволяет управлять процессами биорастворения, ускорять процессы биоминерализации и остеоинтеграции конструкции в области дефекта, а также персонализировано решать проблемы, связанные с лечением костных тканей. Однако, низкая растворимость ГА в биологических жидкостях организма, а также высокая хрупкость, ограничивает применение данного биоматериала в чистом виде для создания скэффолдов. Ввиду того что костная ткань – это композитный материал, состоящий из ГА и природного коллагена, использование его в качестве наполнителя или модификатора матрицы-основы, которая зачастую выполняется из

биополимера, является перспективным подходом для создания подобного рода конструкции с оптимальным и заданным набором свойств. В качестве биоматериала основы конструкции может использоваться зарекомендовавший себя полиэфир – поликапролактон (ПКЛ), ввиду его биосовместимости, оптимальной для костной ткани скорости биодеградации (2–3 года) и нетоксичности продуктов распада, а также высокой механической прочности.

Одним из технологически удобных, финансово доступных и эффективных методов, позволяющих формировать скэффолды, по нашему мнению, является электроформование (ЭФ). Так как функциональность конструкций существенным образом определяется несколькими свойствами, которые включают структуру, фазовый и химический состав, то путем варьирования технологических параметров процесса ЭФ и состава технологической смеси, можно управлять этими свойства.

Таким образом, в настоящем диссертационном исследовании реализован новый подход, заключающийся в разработке технологии получения скэффолдов на основе ПКЛ, обогащенных ГА с изоморфными замещениями, ионами Sr^{2+} или SiO_4^{4-} , которые обладают требуемым сочетанием физико-химических, эксплуатационных и технологических свойств, способствующих ускоренной регенерации поврежденных костных тканей. Выявление закономерностей, определяющих достижение заданных свойств композитных скэффолдов, представляет значительный научный и практический интерес.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время активно ведутся работы, посвященные разработке технологии получения композитных скэффолдов на основе ГА, как зарубежными, так и российскими учеными. Известны работы, в которых представлены исследования скэффолдов, модифицированных чистым ГА различной концентрации [1-4]. Меньше, но также существуют работы, посвященные созданию скэффолдов на основе ГА с различными катионными и анионными замещениями [5,6]. Данный факт отчетливо свидетельствует о перспективности данного направления исследований. В опубликованных работах продемонстрирована принципиальная возможность создания скэффолдов методом ЭФ, состоящих из случайным образом ориентированных нановолокон, модифицированных наночастицами ГА и его изоморфными разновидностями. Тем не менее такие конструкции не нашли широкого применения в медицинской практике ввиду нановолокнистой структуры, которая отличается недостаточной прочностью и препятствует проникновению во внутреннее пространство скэффолда костных клеток. Кроме того, на данный момент нет работ, направленных на изучение влияния концентрации ГА, в том числе с различными катионными и анионными замещениями, на морфологию, структуру, фазовый и химический состав композитных скэффолдов с беспорядочно и упорядоченно ориентированными микроволокнами, имитирующими физическую структуру костной ткани, что обеспечивает прочность конструкции

и сохранность ее формы в процессе имплантации. Данный факт является важным этапом на пути интеграции скэффолдов в медицинскую практику. Так как внутренняя структура во многом определяет взаимодействие скэффолда с окружающей средой организма, этому вопросу в данной работе уделяется особое внимание.

Цель *диссертационного исследования* состоит в установлении закономерностей получения композитных скэффолдов на основе поликапролактона и модифицированного гидроксиапатита, сформированных методом электроформования.

Для достижения поставленной цели в диссертации были сформулированы и решены следующие *задачи*:

1. Изучить элементный, фазовый и молекулярный состав поликапролактона и микрочастиц порошков-прекурсоров модифицированного гидроксиапатита, определить влияние ионов Sr²⁺ или SiO₄⁴⁻ на удельную поверхность дисперсных систем.

2. Изучить закономерности формирования скэффолдов из поликапролактона методом ЭФ в зависимости от параметров технологического процесса и получить композитные скэффолды на основе поликапролактона и гидроксиапатита, модифицированного Sr^{2+} или $\mathrm{SiO_4^{4-}}$ ионами, с беспорядочно или упорядоченно ориентированными волокнистыми структурами; установить влияние способов получения скэффолдов на их структуру и морфологию.

3. Выявить закономерности формирования структурно-морфологических и физикохимических свойств композитных скэффолдов в зависимости от массовой доли микрочастиц стронций- или кремнийзамещенного гидроксиапатита.

 Исследовать смачиваемость поверхности и свободную поверхностную энергию композитных скэффолдов с различной концентрацией микрочастиц порошков-прекурсоров Srили Si-замещенного гидроксиапатита.

5. Определить механизм биодеградации композитных скэффолдов в модельном биологическом растворе натрий фосфатного буфера (phosphate buffered saline – PBS).

6. Провести биологические исследования *in vitro* на цитотоксичность, биоактивность и определить влияние катионов Sr^{2+} или анионов SiO_4^{4-} в структуре ГА на жизнеспособность и жизнедеятельность клеточных культур.

Научная новизна. В работе впервые:

1. Разработан способ получения композитных скэффолдов с микроструктурой, состоящей из беспорядочно (0–180°) или упорядоченно (60–120°) ориентированных относительно оси z полярной системы координат волокон с мультимодальным распределением по диаметру, модифицированных, в частности, микрочастицами гидроксиапатита, содержащим ионы Sr²⁺ или SiO₄⁴⁻.

2. Установлены физико-химические закономерности формирования композитных скэффолдов электроформования, методом состоящих ИЗ полимерных волокон, модифицированных Sr- или Si-замещенным гидроксиапатитом. Наличие микроагломератов порошков-прекурсоров в полимерной матрице приводит к увеличению разброса диаметра волокон в диапазоне 0,2–30 мкм за счет встраивания микрочастиц стронций- или кремнийзамещенного гидроксиапатита объемом 1-10⁴ мкм³ в их структуру; увеличение концентрации стронций- или кремнийзамещенного гидроксиапатита от 10 до 15 мас.% приводит к увеличению фазы модифицированного гидроксиапатита в структуре полимерного скэффолда; удельная поверхность микрочастиц порошков-прекурсоров, размер и ориентация волокон определяют пористость скэффолдов.

3. Показано, что добавление 15 мас.% Sr- или Si-замещенного гидроксиапатита в чистую полимерную матрицу приводит к уменьшению ее гидрофобности и увеличению поверхностной энергии от ~ 5 до 30 и 32 мДж/м² (беспорядочно ориентированные волокна) и от ~ 3 до 43 и 47 мДж/м² (упорядоченно ориентированные волокна) за счет полярной составляющей, благодаря наличию молекулярных PO₄^{3–} и OH[–] групп в структуре гидроксиапатита.

4. Установлено влияние Sr- или Si-замещенного гидроксиапатита модификаторов в полимерной матрице на механизмы биодеградации скэффолдов в модельной биологической среде (PBS). Установлено, что различная степень биодеградации конструкций связана с влиянием их морфологии, структуры и химического состава.

Практическая значимость работы. Сформированные методом электроформования композитные скэффолды, модифицированные гидроксиапатитом с катионным замещением ионами Sr^{2+} или анионным замещением ионами $\mathrm{SiO_4^{4-}}$ с беспорядочно или упорядоченно ориентированными волокнистыми структурами, обладают улучшенной биоактивностью, биорезорбируемостью и имеют потенциал применения в качестве готового продукта в персонифицированной медицине. Полученные в диссертационной работе результаты могут в дальнейшем быть использованы при разработке технологий синтеза скэффолдов на основе полимерных биоматериалов, включающих различные изоморфные разновидности ГА, обладающие заданным набором физико-химических и эксплуатационных свойств.

Методология и методы исследования. Методология диссертации основана на комплексном и системном подходе к анализу современных проблем в области создания биосовместимых материалов с использованием эффективных методов исследования.

В диссертационной работе были использованы следующие методы исследования: рентгенофазовый анализ, инфракрасная спектроскопия, оптическая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, энергодисперсионный рентгеновский анализ, высокоразрешающая компьютерная томография с использованием источника синхротронного излучения, а также

методы исследования смачиваемости, поверхностной энергии, и механических характеристик. Медико-биологическое обоснование применения композитных скэффолдов выполнено с использованием методик исследования на биодеградацию и биосовместимость в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Научные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Закономерности получения дисперсно-наполненных композитных скэффолдов на основе стронций- или кремний-замещенного гидроксиапатита методом электроформования с заданной беспорядочно (0–180°) или упорядоченно (60–120°) ориентированной микроархитектурой волокон относительно оси *z*, проходящей через центр полярной системы координат, со средним диаметром ~ 5,5 мкм, обеспечиваются набором следующих основных параметров технологического процесса: граничными значениями концентрации порошка-прекурсора (5–15 мас.%), вязкостью технологической смеси (1,61÷2,30 Па×сек), электрическим напряжением – 8 кВ, расходом композитного раствора – 1 мл/час, межэлектродным расстоянием – 7 см и скоростью вращения коллектора – 600 или 1000 об/мин.

2. Повышение концентрации дисперсного наполнителя в виде стронций- или кремнийзамещенного гидроксиапатита в структуре полимерного скэффолда от 10 до 15 мас.% приводит к увеличению фазы гидроксиапатита, снижению среднего диаметра волокон на ~ 17%, росту среднего диаметра микрочастиц на ~ 8% и изменению средней пористости на ~ 7%, соответственно.

3. Композитные скэффолды, содержащие 15 мас.% микрочастиц стронций- или кремнийзамещенного гидроксиапатита, обладают более высокой скоростью биодеградации (в среднем на 1,8±0,6%) в сравнении с немодифицированными и модифицированными с помощью 10 мас.% микрочастиц скэффолдами, за счет улучшенной смачиваемости благодаря повышению поверхностной энергии (в среднем от 4,1±1,2 до 37,9±8,8 мДж/м²), определяющий вклад в значение которой вносят ковалентные полярные Р–О и О–Н связи.

Достоверность результатов представленных в диссертации подтверждается их согласованностью, применением комплекса современных взаимодополняющих методов исследования и статистической обработки, а также сопоставления полученных результатов с имеющимися литературными источниками.

Апробация работы. Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на следующих конференциях и школах-семинарах: Международной научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Современные техника и технологии» (Россия, г. Томск, 2013), Международной X конференции студентов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Россия, г. Томск, 2013, 2016), Ш Международной научно-практической конференции «Новые технологии создания и применения биокерамики в

восстановительной медицине» (Россия, г. Томск, 2013, 2016), I Всероссийском конкурсе докладов студентов «Функциональные материалы: разработка, исследование, применение» (Россия, г. Томск, 2013), Конкурсе научных работ в рамках Всероссийской научной конференции «Актуальные вопросы биомедицинской инженерии» (Россия, г. Саратов, 2013), Всероссийской научной конференции с международным участием молодежной «Инновации В материаловедении» (Россия, г. Москва, 2013), XIX Международной Пущинской школеконференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Россия, г. Пущино, 2015), 27th European Conference on Biomaterials ESB 2015 (Польша, г. Краков, 2015), II International Biennial Conference «Biomaterials and Novel Technologies for Healthcare» (Италия, г. Рим, 2016), V Международной научной конференции для молодых ученых, студентов и школьников «Наноматериалы и нанотехнологии: проблемы и перспективы» (Россия, г. Саратов, 2016), V Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов «Высокие технологии в современной науке и технике» (Россия, г. Томск, 2016), The RACIRI Summer School «Convergent Science and Technology for Society» (Россия, Репино, 2016), XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (Россия, Томск, 2017), XI Международной конференция по микроциркуляции и гемореологии (Россия, Ярославль, 2017), 2017 Annual Meeting and Exposition of the Society for Biomaterials (США, Миннесота, 2017), VI Международной научной конференции «Новые оперативные технологии» (Россия, Томск, 2017), XXV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Россия, Москва, 2018), The 14th Biennial Conference on High-Resolution X-ray Diffraction and Imaging (Италия, Бари, 2018).

Публикации. Результаты диссертационной работы представлены в 27 научных публикациях, из них 11 статей входящих в базу данных SCOPUS и Web of Science, из которых 4 статьи в журналах из перечня ВАК, 1 патент.

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, посвященных разработке и исследованию композитных скэффолдов, в постановке цели и задач диссертационной работы, планировании и проведении экспериментальных исследований, и анализе полученных данных, формулировке выводов и положений, выносимых на защиту, подготовке публикаций и докладов по теме работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы № 14.587.21.0013 (уникальный идентификатор проекта 2015-14-588-0002-5599, проект INTELBIOCOMP), Госзадание «Наука» №11.1233.2017/4.6 «Исследование физических механизмов получения новых типов композитных скэффолдов с пьезоэлектрическим эффектом и поверхностным потенциалом для регенеративной медицины» (2017 г.), грант Президента для поддержки молодых ученых кандидатов наук МК-6287.2018.8 «Получение трехмерных

гибридных биодеградируемых скэффолдов на основе различных комбинаций проводящего полианилина и пьезополимеров, с различными по величине и полярности значениями поверхностного заряда (потенциала)» (2018-2019 гг.).

Структура и объём диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, пяти глав и заключения с выводами, изложенных на 143 страницах машинописного текста, включая 62 рисунков, 11 таблиц и список используемой литературы, из 213 наименований.

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, показана степень ее разработанности, определена цель работы и задачи, решение которых необходимо для достижения поставленной цели, сформулирована научная новизна и ценность исследования, показана практическая значимость, описана методология и методы исследования, сформулированы выносимые на защиту положения, обоснована достоверность результатов, приведены сведения об апробации работы, публикациях и приведено краткое содержание глав диссертации.

В первой главе приведены основные принципы тканевой инженерии, представлены требования к разработке скэффолдов и краткий обзор основных биоматериалов и методов, позволяющих формировать скэффолды, рассмотрены физические принципы и закономерности формирования скэффолдов методом ЭФ.

Во второй главе представлено описание экспериментального оборудования и даны характеристики исходных материалов, используемых для создания скэффолдов, описаны методики экспериментальных исследований.

В третьей главе приведены результаты оптимизации способа получения композитных скэффолдов методом ЭФ, установлена зависимость между структурно-морфологическими характеристиками скэффолдов и параметрами технологического процесса, изучен фазовый, молекулярный и элементный составы исходных материалов, определено влияние ионов Sr^{2+} и $\mathrm{SiO_4}^{4-}$ на дисперсность порошков-прекурсоров, проведена биологическая аттестация композитных скэффолдов с беспорядочно ориентированной волокнистой структурой, содержащих минимальную (5 мас.%) концентрацию порошка-прекурсора.

Четвертая глава посвящена исследованию закономерностей формирования структурноморфологических и физико-химических свойств композитных скэффолдов с беспорядочно и упорядоченно ориентированной структурой волокон в зависимости от массовой доли модифицированных ГА порошков с изоморфными замещениями ионами Sr²⁺ или SiO4⁴⁻.

Пятая глава посвящена исследованию влияния массовой доли модификаторов в полимерной матрице на физико-механические и биологические свойства, а также биодеградацию.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность руководителю к.ф.-м.н. **Р.А.** Сурменеву за участие в обсуждении полученных результатов и помощь в подготовке диссертационной работы; к.ф.-м.н. **М.А.** Сурменевой за помощь в организации экспериментов; **Д.С.** Сыромотиной, **Е.В.** Мельник и **А.С.** Звягину за помощь в приготовлении экспериментальных образцов и участие в выполнении экспериментов; к.ф.-м.н. **А.А.** Ивановой, **А.А.** Шароновой, **И.Ю.** Грубовой за ценные замечания и комментарии по работе. Также, немецким коллегам: профессору **Т.** Баумбаху, Др. **В.** Вайнхардт, **Р.В.** Шкарину, Др. **А. Чечилии, А.В.** Шкарину за дружественный прием, неоценимую помощь и поддержку, а также ценные идеи и замечания в проведении томографических исследований композитных скэффолдов. к.м.н. **И.И.** Селезневу и к.м.н. **В.В.** Зайцева за помощь в проведении биологических экспериментов. А также, огромное спасибо моей маме за моральную поддержку и содействие в завершении диссертационного исследования.

1. Литературный обзор

1.1 Тканевая инженерия в восстановлении костной ткани

Начиная со второй половины XX века, благодаря экономическому подъему, произошло увеличение продолжительности жизни населения. Вследствие этого, общество столкнулось с новыми проблемами, связанными с ростом числа заболеваний, включая остеопороз, остеомаляцию, остеолиз и другие виды травм ортопедического характера. До недавнего времени основным методом лечения болезней костных тканей являлось использование имплантатов. Однако, данный подход позволяет решить существующие проблемы не полностью. В основном, это связано с негативной реакцией организма на внедрение чужеродного объекта в структуру живых костных тканей человека. Кроме того, на сегодняшний день, практически все имплантаты, используемые в лечении дефектов костных тканей не обладают важными характеристиками, которые соответствуют свойствам живых тканей. К данным характеристикам можно отнести способность к стимулированию самовосстановления и васкуляризации, с возможностью поддержания кровообращения в месте дефекта без дополнительных хирургических вмешательств по истечению срока годности имплантата. Более того, благодаря значительному опыту последних лет, в настоящее время основной интерес представляет не только замена поврежденных тканей имплантатами, но и долгосрочное восстановление с направленной регенерацией в месте дефекта.

Последнее десятилетие, благодаря бурно развивающимся направлениям генной и клеточной инженерии, а также биотехнологий, зародилась и активно развивается новая область науки – *тканевая инженерия*. Данная область сосредоточила в себе, с одной стороны, медицину и науки о жизни, а с другой, основные направления инженерных дисциплин. В первую очередь, основным ориентиром тканевой инженерии является создание биоискусственных конструкций, которые способны обеспечить, как восстановление и укрепление, так и улучшение функций поврежденных органов и тканей с частичной или полной резорбцией биоматериала, без дополнительных хирургических вмешательств (рисунок 1.1). Данный вид лечения заболеваний костных тканей отличается от традиционных методов, которые основаны на использовании долгосрочных металлических имплантатов или лекарственных средств и включает в себя несколько компонентов, а именно: заимствованный у пациента клеточный материал, способный формировать действующий ВКМ; биодеградируемый скэффолд; биоактивные включения, оказывающие биостимуляцию на поврежденные клетки костной ткани [7].

Для направленной организации, а также содействия пролиферативной активности и дифференциации клеток наибольший интерес представляет создание конструкций, так называемых матриксов или скэффолдов (scaffold) из различных биоматериалов. Данный вид изделий должен способствовать закреплению на поверхности единичных клеток с последующей дифференцировкой в клетки костной ткани и образованием здоровой кости по мере биодеградации скэффолда [8].



Рисунок 1.1 – Иллюстрация лечения заболеваний костной ткани с использованием скэффолда

1.2. Базовая концепция строения костной ткани

Прежде чем приступать к разработке скэффолдов, необходимо изучить и понять основные детали состава и строения костной ткани, которые играют важную роль при выборе биоматериалов и метода изготовления конструкции.

Костная ткань обладает уникальными структурными свойствами. Это, в основном, связано с композитным составом костной ткани, состоящей из ГА, коллагена, небольших количеств протеогликанов, нековалентных белков и воды [9]. Неорганические компоненты в основном ответственны за прочность и жесткость при сжатии, в то время как органические обеспечивают соответствующие свойства при растяжении. Состав костной ткани варьируется от возраста, пола, специфики костной ткани и заболеваний. Важным аспектом, также характеризующим механические свойства, является иерархическая организация кости. С макроскопической точки зрения костная ткань является неоднородной, с пористой и анизотропной структурой. Хотя пористость кости варьируется непрерывно от 5 до 95 %, большинство костных тканей имеют либо очень низкую, либо очень высокую пористость.

Существует два типа костной ткани (рисунок 1.2). Первый тип – губчатая кость с пористостью 50–95 %, обычно встречающаяся в кубовидных, плоских костях и на концах длинных трубчатых костей. Обладает беспорядочным расположением коллагеновых волокон и минеральных кристаллов. Поры взаимосвязаны и заполнены костным мозгом (ткань, состоящая

из кровеносных сосудов, нервов и различных типов клеток, основная функция которых заключается в продуцировании основных клеток крови). Второй тип – кортикальная или компактная кость с пористостью 5–10 % и различными типами пор [9]. Формируется медленно, высокоорганизована и имеет параллельные слои или ламели, которые делают ее механически более устойчивой, в сравнении с губчатой костью.



Рисунок 1.2 – Микроскопическая структура костной ткани

Костная ткань обладает свойством ремоделирования за счет специальных типов клеток, которые можно классифицировать по их функции, но основными являются остеобласты и остеокласты. *Остеобласты* – это дифференцированные мезенхимальные стволовые клетки (МСК), продуцирующие кость. *Остеокласты* расщепляют кость, деминерализуя ее кислотой и растворяя коллаген с ферментами.

1.3. Требования к скэффолдам, используемым в инженерии костной ткани

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области тканевой инженерии, на сегодняшний день не существует идеальной технологии создания конструкций, способствующих выращиванию новых тканей, которая бы применялась в современной медицинской практике. Скэффолды могут быть сформированы с использованием различных видов биоматериалов. Однако, жёсткие критерии выбора биоматериала для создания подобного рода конструкций создают значительные трудности. Основными требованиями к скэффолдам являются:

- биосовместимость и способность к поддержанию клеточной адгезии и пролиферации, что
в свою очередь способствует межклеточному взаимодействию и миграции клеток в течение
длительного периода времени;

- способность имитировать нативный трехмерный ВКМ (эндогенное вещество, которое окружает клетки, связывая их с тканями, и обеспечивает оптимальную защитную и питательную

среду), а именно обладать макропористой структурой со взаимосвязанной и развитой макропористой структурой;

- особые механические свойства, подходящие для восстановления или замены потерянных, или поврежденных костных тканей;

- способность к биодеградации в соответствие с экспериментальными временными рамками, тем самым обеспечивая постепенное замещение биоматериала на новую ткань.

Биосовместимость – это способность материала выполнять необходимые функции, накладываемые со стороны медицинской терапии, и при этом не вызывать побочные эффекты и негативную реакцию со стороны иммунной системы. Некоторыми важными факторами, определяющими биосовместимость скэффолда являются структурно-морфологические и химические свойства, зависящие от технологических параметров процесса формирования конструкций. Скэффолды с соответствующими характеристиками – это «умные» материалы, способные имитировать ВКМ, который играет ключевую роль в архитектуре костной ткани, обеспечивая структурную поддержку и прочность. Более того, для обеспечения роста костной ткани в 3D пространстве, скэффолды должны обладать высокопористой структурой с открытой взаимосвязанной геометрией, которая обеспечит равномерное распределение клеток, а также будет способствовать неоваскуляризации конструкции.

Кроме того, важный параметр, который следует учитывать при создании пористой структуры являются средний размер и объем пор, их взаимосвязь и шероховатость стенок пор. Наличие такой структуры обеспечит снабжение клеточных организмов необходимыми питательными веществами и кислородом, а также произведет своевременное удаление продуктов жизнедеятельности от новообразованных тканей. Влияние пористости и размеров пор на степень остеогенеза *in vitro* было продемонстрировано в некоторых работах, как с остеобластами, так и с недифференцированными МСК [10]. При засевании пористых образцов первичными клеточными линиями остеобластов крыс, наибольшее количество клеток было обнаружено в каркасах с размером пор ~ 40 мкм. Также, было установлено, что миграция клеток происходит быстрее в скэффолдах с размером пор ~ 100 мкм, однако, размер пор не повлиял на глубину проникновения клеточного материала или минерализацию. Аналогичную тенденцию показал эксперимент, проведенный на пленках TiO₂ на титановой поверхности [11]. Так, образцы с меньшим размером пор (0,4–13 мкм) показали усиленную пролиферацию клеточных культур in vitro в сравнении с образцами, размер пор которых составил ~ 49 мкм. В работе [12] выявили, что волокна, диаметром от 9 до 12 мкм наиболее эффективно стимулировали активность щелочной фосфатазы и экспрессию остеокальцина. Более высокая пористость не оказывает влияния на способность клеток прикрепляться к поверхности, однако способствует более активной пролиферации благодаря более интенсивному притоку кислорода и питательных веществ. Также

в работе [13] были проведены *in vivo* исследования с использованием скэффолдов, обладающих пористостью от 80 до 88 %. Было установлено, что наибольшее врастание и образование новых тканей происходило в области с наибольшей пористостью. Кроме того, авторами [14] было проведено исследование, направленное на сравнение жизнеспособности клеточных культур на поверхности скэффолдов с величиной пористости 60 и 70 % в результате чего после имплантации наилучший результат показали образцы с 70 % пористостью.

Важным аспектом в разработке скэффолдов, который влияет на успешное использование конструкций является соответствие механическим характеристикам костной ткани для предотвращения осложнений при имплантации. Механические свойства тесно связаны с биодеградацией, так как их изменение во время резорбции скэффолда должны быть совместимы с процессом регенерации костной ткани.

1.4. Биоматериалы для инженерии костной ткани

Важным параметром при соблюдении требований, предъявляемым к скэффолдам является выбор оптимального биоматериала. Биоматериал – материал природного или искусственного происхождения, предназначенный для контакта с компонентами живой системы и используемый в качестве терапевтической или диагностической процедуры в области биомедицины. Иными словами, биоматериал предназначен для взаимодействия с биологическими тканями, с целью лечения, регенерации или замещения больных или утраченных органов [15].

Биоматериалы природного происхождения включают в себя аутотрансплантаты (материал, извлеченный из здоровой части тела и пересаженный в поврежденную часть у одного и того же человека), алотрансплантаты (материал, заимствованный у другого человека), а также ксенотрансплантаты (материал, заимствованный у животного). Однако, наряду с достоинствами каждого из вариантов, также существуют значительные недостатки, которые ограничивают их использование. К недостаткам аутотрансплантатов относится ограниченность «собственного» биологического материала, а также сложный реабилитационный период, связанный с дополнительным хирургическим вмешательством. Использование аллотрансплантатов также ограничено ввиду труднодоступности, высокой стоимости, а также приема иммуносупрессоров после имплантации, обеспечивающих подавление негативной реакции со стороны иммунной системы. Также, как и в случае алотрансплантатов, применение ксенотрансплантатов требует дополнительной генетической или химической модификации биоматериала и ограниченно ввиду иммунного отторжения организмом.

Искусственно полученные материалы, такие как металлы, керамика и полимеры могут быть успешно использованы в качестве биоматериалов для лечения заболеваний костных тканей.

Особую роль в ортопедии и травматологии до настоящего времени играли металлические имплантаты на основе нержавеющей стали, различных сплавов титана и кобальта. Благодаря механической прочности металлические материалы могут быть использованы при создании конструкций или средств фиксации, несущих нагрузку. Однако, использование металлов делает возможным замещение лишь физических и механических свойств костей, но не позволяет восстановить метаболические функции. Кроме того, благодаря существенным различиям величины модуля Юнга между металлом и костной тканью, происходит расшатывание имплантата, негативное явление называемое в литературе как «стресс-экранирование» [16]. Также, в результате эксплуатации материала благодаря процессам износа или коррозии материала происходит выход ионов металла. Это явление также носит негативный характер и может привести к инфицированию организма, воспалительной и аутоиммунной реакциям [17]. Однако, исследования в области металлических имплантатов продолжаются и на данный момент предпринимаются попытки создания пористых металлических скэффолдов, обладающих механическими свойствами, близкими к свойствам костной ткани [18]. Однако, возможность выхода различных токсичных веществ из металлической конструкции, таких как алюминий или ванадий, остается актуальной проблемой по сей день, а проведение повторных операционных вмешательств по извлечению или замене металлических имплантатов все также ограничивают их применение.

Керамические материалы представляют собой группу неорганических оксидов и солей, используемых в тканевой инженерии благодаря сходству с минеральными компонентами костной ткани, которые включают в себя фосфаты кальция и обладают пригодными для лечения заболеваний костных тканей остеоиндуктивными свойствами [19]. К представителям таких материалов относятся ГА, ТКФ, а также их производные и комбинации. Существуют экспериментальные данные подтверждающие, что кальций-фосфатная керамика положительно влияет на рост и пролиферацию клеток кости [20]. Однако срок растворения данного материала в чистом виде зачастую превышает срок ремоделирования костной ткани. Интерес к данному материалу обусловлен его гибкой кристаллической структурой, в которую можно внедрить ионы различных следовых элементов (Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Sr²⁺, F⁻, SiO₄⁴⁻ и т. д.), входящих в состав костной ткани, которые играют важную роль в процессах остеогенеза и способны улучшить клеточную активность, а также способствовать контролируемой степени деградации. Так, например, известны работы, где использовался SiГA в качестве покрытия для металлических имплантатов [21], [22]. Было установлено, что наличие силиката в кристаллической решетке ГА увеличивает биоактивность материала и стимулирует клеточную активность. Также в работе [23] были проведены исследования покрытия ИЗ SrΓA на керамической подложке. Модифицированная поверхность существенно увеличила адгезию, пролиферацию и

остеогенную дифференцировку клеток остеобластов в условиях *in vitro*. Кроме того, в литературе встречаются работы, в которых было доказано положительное влияние цинк-, магний- карбонат-, а также фторид-замещенного ГА на клеточную активность [24], [25], [26], [27]. Одними из представителей керамики являются биоактивные стеклокристаллические материалы, состоящие из SiO₂, Na₂O, CaO и P₂O₅. Основной успех их биологической активности заключается в присутствии гидратизированного силикатного слоя, появляющегося при взаимодействии с плазмой человека. Вследствие этого явления происходит формирование стабильных связей между биостеклом и костной тканью [28]. Остеокондуктивные свойства биостекла связаны с действием продуктов растворения материала на клетки остеопороза, стимулирующего рост новых тканей [29]. Не смотря на наличие современных материалов на основе биостекла, представленных на мировом рынке («Interpore-200», «Interpore-500», «Ostrix NR» и т.д.) до сих пор не доказано, что такие материалы обладают остеоиндуктивными свойствами. Кроме того, использование керамических материалов в чистом виде благодаря их хрупкости затрудняет их применение в процессе формирования и эксплуатации изделия [30].

В настоящее время полимерные материалы, благодаря их уникальным физико-химическим и механическим свойствам активно используются в качестве биоматериалов для создания скэффолдов [31], [32]. Основными видами полимерных материалов, которые описаны в литературе, являются биодеградируемые и недеградируемые полимеры природного и синтетического происхождения. Главное отличие подобного разделения заключается в способности полимера к растворению, а также к химическому и ферментативному гидролизу при взаимодействии с биологическими жидкостями и окружающими тканями организма.

Для замещения дефектов костных тканей большим преимуществом пользуются биодеградируемые полимеры, способные замещаться новообразованной тканью. Процесс биодеградации основан либо на прямом переходе полимерных молекул в раствор, либо на расщеплении материала вследствие химического или ферментативного гидролиза [33]. Скорость биодеградации является одним из главных факторов и зависит от внутренних свойств полимера, которые включают химическую структуру, наличие гидролитически неустойчивых связей, уровень гидрофильности/гидрофобности, степень кристалличности, молекулярный вес и т.д. [34]. Однако важным условием является то, что степень деградации должна соответствовать скорости роста новой ткани *in vitro* и *in vivo*.

Большинство полимеров природного происхождения относятся к группе биодеградируемых полимеров, представителями которых являются коллаген, хитозан, желатин, шелк, фибриноген, эластин, альгинат, декстран, гликозаминогликаны и др. Материалы на основе натуральных полимеров обладают высокими биоактивными свойствами, которые обеспечивают производительность клеточных культур в биологической системе [35]. Однако, высокая стоимость, быстрая скорость биорезорбции в организме и недостаточная механическая прочность, не способная обеспечить поддержание заданной структуры ткани затрудняет их использование в инженерии костной ткани в чистом виде.

В отличие от природных полимеров, синтетические зачастую стоят дешевле и их производство ведется при контролируемых условиях технологического процесса, который обеспечивает воспроизводимый результат от партии к партии даже в бо́льших масштабах. Кроме того, использование полимеров синтетического происхождения в тканевой инженерии предотвращает или снижает возникновение иммунной реакции со стороны организма при имплантации, а также обеспечивает стабильные механические свойства, сравнимые с живыми тканями, что делает возможным их использование в различных областях тканевой инженерии, и в частности для инженерии костной ткани [36].

Наиболее часто используемыми биодеградируемыми синтетическими полимерами являются, полигидроксиалканаты (ПГА) – алифатические сложные полиэфиры, которые включают в себя поли(3-гидроксибутират) (ПГБ), и сополимеры поли(3-гидроксибутират-3-гидроксивалерат) (ПГБВ), поли(4-гидроксибутират) (П4ГБ), а также поли(3-гидроксибутират-3-гидроксигексаноат) (ПГБГГ) и поли(3-гидроксиоктаноат) (ПГО). Деградация данной группы полимеров происходит за счет поглощения воды с последующим гидролизом сложноэфирных связей.

В частности, потенциал полимера ПГБ был продемонстрирован в работе С. Doyl и др. [37], где проводили имплантацию в искусственно созданный дефект в большеберцовой кости кролика. После двенадцати месяцев имплантации диагностировали благоприятный ответ со стороны регенеративной функции костной ткани без каких-либо признаков нежелательной хронической воспалительной реакции. Формирование кости происходило вблизи ПГБ материала, при этом до 80 % поверхности имплантата соприкасалось с новообразованной тканью. Основными недостатками ПГА полимеров является их трудоемкая процедура производства, ограниченная доступность, и как следствие, высокая стоимость [38], [39].

Полимеры гидроксипроизводных алкановых кислот, в состав которых входит полилактид (ПЛА), полигликолид (ПГА), и их сополимеры (ПЛГА) также привлекают внимание исследователей. ПЛА и ПГА могут быть легко синтезированы, а их скорость резорбции, физические и механические свойства регулируются в широких пределах с использованием различных молекулярных масс и сополимеров. Однако, существует риск преждевременной деградации скэффолда. Несколько работ были направлены на изучение влияния скэффолдов на основе ПЛА полимера на восстановление костных тканей [40], [41]. Так, в работе Н. Schliephake и др. [42] проводилась имплантация материала в нижнюю челюсть кроликов. На протяжении эксперимента было замечено частичное восстановление краев дефекта, однако, также была

зафиксирована преждевременная деградация материала без восстановления дефекта. Кроме того, резкое выделение кислотных продуктов распада при растворении полимера могут вызвать сильную воспалительную и остеолитическую реакции, существенно замедляющие процесс восстановления и реабилитации [43], [44].

Также, одним из известных полимеров группы алифатических полиэстеров, применяемых в инженерии костных тканей является ПКЛ [29]. Данный материал является одним из самых широко используемых материалов в тканевой инженерии благодаря его биосовместимости и механической прочности. Процесс деградации происходит аналогично механизму деградации ПЛА полимера, а именно при случайном расщеплении гидролитического эфира с последующей потерей веса за счет диффузии олигомеров из основной массы полимера. Однако ПКЛ, в сравнении с ПЛА обладает более длительным сроком резорбции, приблизительно 2–3 года до полного удаления из организма, что делает его перспективным материалом для увеличения роста и регенерации костей при лечении дефектов [45]. Однако, в отличие от графтов, натуральных полимеров и биостекла, ПКЛ обладает низкой остеоиндуктивной способностью.

Согласно вышеизложенному можно сделать вывод о том, что на данный момент не существует единого идеального материала, который сочетал бы в себе весь перечень необходимых для реконструкции костных дефектов свойств. Одной из наиболее перспективных тенденций, активно развивающейся в настоящее время является создание композитных биоматериалов, сочетающих в себе достоинства каждого семейства материалов. С точки зрения бионики, ВКМ является биокомпозитом коллагена, полисахаридов и неорганического материала, а именно различных форм ГА. Таким образом, сочетание полимера и керамики в одном материале позволит создать композит, который является схожим по составу с ВКМ. Известны работы, в которых для создания композитного полимер/керамика скэффолда использовали ПКЛ и биостекло на основе кремния [46]. Данный подход позволил существенно улучшить биосовместимость и активность костеобразующих клеток – остеобластов в условиях in vitro и повысить костеобразующую способность в условиях in vivo, а также повысить механические свойства, в сравнении с образцом из чистого биостекла. Также, известно, что использование ПЛГА полимера в комбинации с ГА при создании скэффолдов способствует усилению остеогенного потенциала в условиях in vitro и in vivo в отличие от чистого ПЛГА скэффолда [47]. Также, были проведены in vitro исследования скэффолдов с помощью стромальных клеток головного мозга, состоящих из комбинации ПЛГА, ПКЛ полимеров и ГА [48]. Было установлено, что композитные конструкции способствуют росту и миграции клеточных культур во всем объеме образца. Известны работы по внедрению пластин, состоящих из ПЛА полимера в комбинации с ГА в бедро лабораторных крыс [49]. Гистологические исследования показали, что

имплантированный композитный материал быстро резорбировался и замещался новообразованной костной тканью.

Все вышеперечисленные исследования свидетельствуют о положительном влиянии керамики в сочетании с полимерным материалом на процессы поддержания клеточной активности и костеобразования. Однако, не смотря на обилие материалов и их всевозможных композиций для создания скэффолдов способствующих регенерации костной ткани, все еще ведутся активные поиски оптимальной комбинации материалов, способных повысить биоактивность скэффолда. Установлено, что нанокристаллический ГА был широко использован в качестве модификатора полимерной матрицы, который обеспечивал увеличение биоактивных свойств скэффолда [2], [3], [50], [51]. На данный момент существуют единичные работы, в которых изучается возможность формирования скэффолдов на основе полимеров обогащенных ГА с различными изоморфными замещениями. Так, авторы работы [5] разработали композитный скэффолд, где для создания матрицы использовали ПКЛ и хитозан, с добавлением наночастиц ГА с изоморфным замещением ионом Zn²⁺. Исследование показало, что ионы Zn²⁺ в кристаллической решетке ГА активно стимулируют пролиферацию МСК. Из этого можно сделать вывод о том, что модифицированный ГА более перспективен в использовании его в качестве материала, способствующего регенерации костных тканей. Также, существует работа, в которой были проведены пилотные исследования эффективности ПЛА матрицы, модифицированной ГА с изоморфными замещениями ионами Mg²⁺ и SiO₄⁴⁻. Однако, на сегодняшний день не существует детальных работ, в которых использовались бы другие разновидности замещенных ГА, в частности SrГA и SiГA в совокупности с ПКЛ-полимером для создания скэффолдов, имитирующих ВКМ костных тканей, способствующих ее регенерации.

1.5. Поликапролактон: структура и свойства

Полимер ПКЛ представляет собой синтетический алифатический сложный полиэфир, производимый методом каталитической полимеризации ε -капролактона с раскрытием цикла с использованием различных анионных, катионных и координирующих катализаторов или через циклическую полимеризацию 2-метил-1,3 Диоксапана. Формула представлена на рисунке 1.3. Первые исследования по синтезу ПКЛ относятся к началу 1930-х годов прошлого столетия, проводимых под руководством доктора химических наук W. Carothers [52]. ПКЛ – полукристаллический полимер, степень кристалличности которого может достигать 69 %. Данный материал обладает орторомбической кристаллической решеткой с параметрами $a = 7,496\pm0,002$ Å, $b = 4,974\pm0,001$ Å и $c = 17,297\pm0,023$ Å, принадлежащей к пространственной группе $P2_12_12_1$ [53].



Рисунок 1.3 – Химическая структура ПКЛ

Важно отметить, что физические, тепловые и механические свойства материала напрямую зависят от его молекулярной массы и степени кристалличности. Так, ПКЛ обладает несколькими свойствами, которые не встречаются среди других представителей семейства алифатических полиэфиров. Наиболее примечательными свойствами являются его исключительно низкие температуры стеклования (-60°С) и плавления (55-60°С). Другим необычным свойством является его термическая стабильность. При испытаниях ПКЛ показал температуру разложения равную 350 °C, в то время как температура для других алифатических полиэфиров не превышала 255 °С [54]. Согласно исследованию механических свойств [36], ПКЛ имеет низкую прочность на растяжение (приблизительно 23 МПа), но чрезвычайно высокое удлинение при разрыве (4700 %). Благодаря тому, что данный тип полиэфира является биосовместимым и биодеградируемым, а также способен растворяться в широком диапазоне органических растворителей (хлороформ, диметилформамид, бензол, толуол и др.), и при этом однородно смешиваться с различными полимерами (ПЛА, хитозан и т.д.), создались предпосылки использования этого материала в биомедицине и тканевой инженерии для создания скэффолдов [55]. В зависимости от направления тканевой инженерии используют ПКЛ различного молекулярного веса от 2000 до 100 000 Да. Благодаря тому, что ПКЛ – гидрофобный материал, скорость деградации тем меньше, чем больше его молекулярный вес. Было отмечено, что скорость деградации ПКЛ значительно ниже в сравнении с другими полиэстерами (1–3 года), при этом разложение материала происходит на безопасные и не токсичные для человеческого организма компоненты, что является оптимальным для замещения дефектов костных тканей [31].

Согласно литературным данным, процесс деградации ПКЛ материала проходит в две стадии [31]. Первая стадия заключается в постепенном уменьшении молекулярной массы без деформирования конструкции. Во время второй стадии по мере уменьшения молекулярной массы происходит расщепление материала на фрагменты, абсорбция и выведение. В основе деградации лежит процесс гидролиза, продуктами распада которого являются вода, углекислый газ и капроновая кислота.

1.6. Гидроксиапатит

Среди многообразия кальций-фосфатных материалов, ГА представляет наибольший интерес благодаря его структурному и химическому сходству с костной тканью. ГА принадлежит к группе апатитов основанных на фосфатной группе PO₄³⁻ с формулой Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. Кристаллическая структура ГА может быть представлена в виде двух сингоний: моноклинной и гексагональной. Моноклинная сингония (P2₁) может быть получена в химически чистых условиях. Однако, чаще из-за несовершенства структуры встречается гексагональная сингония (P6₃/m), обусловленная наличием примесей, искажающих кристаллическую решетку, которая характеризуется расположением ионов кальция и фосфата вокруг столбцов одновалентных гидроксильных ионов.

Элементарная ячейка ГА образована тетраэдрическим расположением фосфатной PO₄группы, которая составляет «скелет» элементарной ячейки (рисунок 1.4). Десять атомов Ca²⁺ занимают две кристаллографически различные позиции. Так, атомы Ca1 объединяют PO₄ тетраэдры, формирующие осевой канал вдоль кристаллографического направления (001), на плоскостях которых располагаются ионы кальция Ca2.



Рисунок 1.4 – Кристаллическая структура ГА: в направлении *с*-оси, расположенной перпендикулярно *а*-осям (*a*); проекция структуры ГА на базисную плоскость (001) (б) [56]

Вдоль оси сформированного канала ионами Ca2 расположены OH-группы на винтовой оси 6₃. В итоге, каждый атом Ca1 образует комплекс CaO₉, а атомы Ca2 совместно с OH группой формируют комплекс CaO₆OH. Согласно [57] для чистого ГА размер ячейки составляет *a*, *b* =

9,42 Å, *c* = 6,88 Å (база данных PDF-4 Международного центра дифракционных данных (ICDD), карточка № 00-055-0592).

Известно, что гибкая кристаллическая решетка ГА, состоящая из 42 ионов, позволяет осуществлять катионные и анионные замещения с целью варьирования различных физикохимических и биомеханических свойств материала. Так, кальций может частично замещаться одно-, двух- и трехвалентными катионами (K, Na, Sr, Zn, Mg и т. д.), а анионная группа PO₄ одно-, двух- и трехвалентными анионами (SiO₄, CO₃, HPO₄²⁻ и т.д.).

1.6.1. Стронцийзамещенный гидроксиапатит

Стронций является следовым элементом (0,008–0,01 %) кальцифицированной ткани и играет особую роль в процессах ремоделирования костей, обеспечивая стимуляцию процессов регенерации и уменьшая скорость резорбции костной ткани за счет снижения дифференцировки костных клеток остеокластов и повышения активности остеобластов, благодаря чему используется для лечения остеопороза [58]. Также установлено, что стронций обладает антибактериальным эффектом [59]. При проведении клинических исследований на пациентах с различными переломами костных тканей, было установлено, что по истечении 36 месяцев, плотность костных тканей была выше у пациентов, принимавших препарат на основе стронция, чем те, кто принимал плацебо [60].

Таким образом, катионные замещения кальция на стронций в следовых концентрациях в структуре ГА должны положительно сказываться на химических и биологических свойствах конечного продукта. Однако, как уже отмечалось ранее, количество заместителя в структуре ГА оказывает значительное влияние на кристалличность и параметры решетки. Как и чистый ГА, SrГA принадлежит к гексагональной сингонии с пространственной группой P63/m. Благодаря тому, что разница по величине ионных радиусов стронция (0,116±0,003 нм) превосходит кальций (0,100±0,003 нм), увеличение степени замещения стронция приводит к расширению и искажению кристаллической решетки ГА, что влияет на его физиологическую стабильность. Многие исследования показали, что включение ионов стронция снижает кристалличность и размер кристаллов ГА, хотя недавние исследования, проведенные Сигтап и др. доказали, что низкие концентрациях Sr²⁺ заменяет ионы кальция в ГА-решетке и занимает позицию Ca2 [61]. Однако, Вigi и др. также продемонстрировали возможные замещения позиции Ca1 ионами стронция при низких концентрациях (рисунок 1.4) [62]. Апатит, полученный путем частичного замещения Ca²⁺ на Sr²⁺ обладает более высокой скоростью растворения по сравнению с чистым ГА, что

увеличивает биоактивные свойства за счет выхода Sr²⁺. Кроме того, SrГA высвобождает ион кальция, тем самым стимулируя клеточный ответ.

1.6.2. Кремнийзамещенный гидроксиапатит

Первая работа, в которой упоминалось положительное влияние кремния на формирование костных тканей была опубликована в 1970 году. При проведении исследований на модели крысы было продемонстрировано, что кремний локализуется в зонах роста новой костной ткани. Отсутствие или недостаток кремния в рационе приводит к аномальным изменения скелета и деформациям костных тканей [63], [64].

SiГA был исследован как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, где было показано, как кремний в структуре ГА влияет на растворение материала [65]. Покрытия на основе SiГA, полученные методом плазменного напыления [66] и электрораспыления [67] продемонстрировали повышенную клеточную пролиферацию и раннее течение процесса минерализации.

Параметры кристаллической решетки и соотношение ионных радиусов элементов, используемых в качестве допанта (элемент, модифицирующий структуру ГА) определяют количество заместителя в структуре ГА. В случае SiГA происходит частичное замещение фосфатной группы (PO_4^{3-}) силикатной (SiO₄⁴⁻), при том, различия в радиусе ионов Si⁴⁺ (0,040±0,004 нм) и P⁵⁺ (0,030±0,007 нм), приводят к искажению структуры решетки при замещении иона фосфата на силикат. Четырехвалентные силикатные анионы при замещении добавляют отрицательный заряд, который компенсируется посредством участия OH⁻-групп, что определяет предел вакантных мест и ограничивает количество замещающего иона.

В работе [68] клеточная инфильтрация, неоваскуляризация и образование новой кости более выраженно в случае SiГA материала. Обнаружено, что 0,8 мас.% кремния является оптимальным значением, которое на начальном уровне способствует более быстрому врастанию костной ткани.

1.7. Методы формирования скэффолдов

Как уже отмечалось ранее, при разработке скэффолдов следует принимать во внимание не только химический состав, но и геометрию конструкции, которая обладает достаточной взаимосвязанной пористой структурой, обеспечивающей поддержание клеточной активности и образование новой костной ткани на протяжении всего периода имплантации. Выбор метода формирования скэффолда в данном вопросе играет ключевой фактор, который определяет геометрию и внутреннюю структуру изделия. Ниже рассмотрены основные, наиболее популярные методы, позволяющие создавать подобные конструкции.

Метод выщелачивания является наиболее простым и часто используемым методом для создания скэффолдов [69]. Он включает в себя смешивание водорастворимой соли (например хлорид или цитрат натрия) в совокупности со смесью биодеградируемого полимера и органического растворителя. После того, как соль равномерно распределится в полимерном растворе, его заливают в заготовленную форму желаемой геометрии. После удаления растворителя путем выпаривания или процесса лиофилизации, происходит выщелачивание частиц соли, в результате чего образуется пористая структура, пригодная для работы с культурами клеток. При этом, степень пористости готового изделия возможно контролировать путем изменения соотношения соль-полимер. Основными преимуществами данного метода являются простота контроля параметра пористости и технологического процесса. Однако, в процессе формирования скэффолдов форма пор ограничивается кристаллической формой соли, а сложность удаления растворимых частиц соли из внутреннего объема скэффолда затрудняет изготовление достаточно толстых конструкций. Кроме того, их ограниченная интерпоральная связь препятствует проникновению и росту клеточных культур, а также доставке питательных веществ в места активности клеток, что негативно сказывается на основной функции скэффолда, а именно обеспечении поддержания клеточной активности в процессе имплантации изделия [70].

Метод вспенивания газом может быть использован для изготовления высокопористых полимерных скэффолдов без использования органических растворителей [71]. Основой данного метода является насыщение полимера двуокисью углерода (CO₂) при высоком давлении с последующим вспениванием за счет снижения давления. Благодаря этому создается термодинамическая нестабильность за счет чего происходит быстрое высвобождения газа из полимерной системы, с последующим зарождением и ростом газовых пузырьков в материале. Использование данной технологии позволяет создавать скэффолды с размером пор ~ 100 мкм и пористостью до 93 %. Однако, как и в случае с методом выщелачивания, происходит образованием непористой поверхности с преимущественно закрытыми порами (10–30 % взаимосвязанных пор) [72].

Метод сублимационной сушки заключается в создании эмульсии путем гомогенизации раствора полимера (в органическом растворителе) и смеси воды. Далее, происходит быстрое замораживание эмульсии с образованием кристаллов льда для того, чтобы произошла агрегация молекул полимера в промежуточном пространстве. Далее, в процессе первичной сушки в камере понижается давление через частичный вакуум, при котором происходит процесс прямой сублимации и удаление льда. После этого, на этапе вторичной сушки в процессе десорбции удаляется остаточная жидкость. С помощью этого метода можно получать скэффолды с пористостью до 95 % и размером пор ~ 120 мкм [73]. Однако, необходимо учитывать, что при заморозке, температура должна быть подобрана таким образом, чтобы растворитель находился в

твердом состоянии. В противном случае, повышается риск пересушивания поверхности скэффолда с образованием плотного слоя. Необходимость критически низких температур объясняет высокие затраты энергии, которые являются основным недостатком данной технологии.

Метод 3D прототипирования в последнее время получил широкое распространение благодаря возможности послойной печати скэффолдов на специализированных 3D принтерах с использованием компьютерной модели. Данный метод предлагает точный контроль морфологических характеристик скэффолда, с воспроизводимыми по размеру и форме порами, а также геометрически стабильными параметрами [74]. Кроме того, благодаря этому методу в процессе создания скэффолда возможно включение биологически активных молекул в его структуру [75]. Основной недостаток данного метода заключается в том, что минимальный размер структуры скэффолда определяется низкой разрешающей способностью установки, что затрудняет проектирование и изготовление мелкоструктурных скэффолдов.

В методе $\Im \Phi$ для образования струи и осаждения на подложку полимерных волокон, используется электрическое поле [76]. В процессе $\Im \Phi$ под действием электрического потенциала на полимерный раствор создается дисбаланс заряда. При критическом напряжении дисбаланс зарядов начинает преодолевать поверхностное натяжение полимерного раствора, вследствие чего образуется заряженная струя. Далее образованная струя направляется на заземленную подложку. В процессе движения происходит испарение растворителя, и отверждение полимера на подложке. Недостатком данной технологии может считаться то, что форма готового изделия, полностью зависит от типа коллектора, а размер пор ограничен диаметром волокон. Однако, благодаря гибкости технологического процесса $\Im \Phi$ возможно изготовление полимерных скэффолдов с диаметром волокон от нескольких микрон до нанометров, при этом волокна могут располагаться как в хаотичном, так и в организованном порядке с высокой взаимосвязанностью пор, имитируя структуру ВКМ костной ткани. Кроме того, возможность использования различных полимерных материалов в сочетании с различными неорганическими добавками является несомненным преимуществом данного метода.

Таким образом, анализ методов, существующих для создания скэффолдов позволил выявить основные достоинства и недостатки каждого из них. В рамках данной работы для создания скэффолдов был выбран метод ЭФ благодаря возможности варьирования различных параметров установки с целью получения желаемого размера и направления волокон, который позволяет использовать широкий диапазон биодеградируемых полимеров в совокупности с керамическими материалами.

1.7.1 Метод электроформования

Как уже отмечалось ранее, процесс ЭФ основан на применении электрического потенциала между фильерой, через которую подается полимерный раствор и электропроводящим коллектором (рисунок 1.5). Автоматически действующее инжектирующее устройство (насос) оказывает давление на плунжер, в котором расположен полимерный раствор, тем самым на конце фильеры образуется выпуклый полимерный мениск. При выходе полимерного раствора, происходит индуцирование электрического заряда на поверхности полимерного мениска из-за приложенного электрического поля. Транспортировка и распределение зарядов создает напряжение, которое приводит к движению полимерной жидкости. Поскольку в полимере происходит накопление заряда, отталкивающее взаимодействие одноименных зарядов заставляет каплю деформироваться в соответствии с принципами электрогидродинамики, где на деформацию влияют две конкурирующие силы – силы поверхностного натяжения и силы электростатического отталкивания. Когда силы электростатического отталкивания заряда превышают поверхностное натяжение в капле, на конце фильеры происходит образование полимерного конуса, известного как конус Тейлора. При увеличении напряженности поля достигается такое значение, при котором форма конуса Тейлора трансформируется, и из его вершины происходит инжектирование струи. В результате струя дрейфует по направлению к коллектору, и во время ее движения происходит резкое испарение растворителя из полимера, после чего струя осаждается на коллектор в виде отвержденных полимерных волокон, образующих скэффолд.



Рисунок 1.5 – Схематичное изображение установки ЭФ

Физические характеристики волокнистого скэффолда регулируются при помощи нескольких технологических параметров, которые включают в себя параметры раствора,

параметры процесса и параметры окружающей среды. Все эти параметры могут быть определены при проведении теоретического анализа физических превращений, протекающих на стадиях процесса ЭФ. Однако, основные свойства и параметры, а также диапазоны величин и их взаимосвязь, которые влияют на процесс ЭФ могут быть выявлены на основе общеизвестных физических законов и анализа литературных данных.

Первым важным параметром, который определяется на предварительной стадии подготовки полимерного раствора является *величина коэффициента поверхностного натяжения*, которая определяет устойчивость струи. Считается, что наиболее приемлемой является величина натяжения менее 0,05 Н/м [77]. В этом вопросе важную роль играет выбор растворителя, который используется в смеси с полимерным порошком или гранулами, для приготовления полимерного раствора. Согласно данным, представленным в таблице 1.1, величина коэффициента поверхностного натяжения является оптимальной для всех органических растворителей, наиболее часто используемых в работе с ПКЛ для биоинженерии костной ткани.

Растворитель	Плотность, [г/см ³]	Температура кипения. [°С]	Коэффициент поверхностного
		,[-]	натяжения, [Н/м]
Ацетон	0,784	56,29	0,023
Бензол	0,873	80,07	0,029
Диметилформамид	0,901	178,3	0,036
Дихлорметан	1,316	39,75	0,026
Метанол	0,786	64,51	0,023
Триэтиламин	0,723	89,35	0,020
Уксусная кислота	1,044	117,9	0,028
Хлороформ	1,479	61,15	0,027

Таблица 1.1 – Свойства органических растворителей

Также, не менее важным параметром раствора является *динамическая вязкость*. На начальной стадии процесса вязкость выступает как нежелательный фактор, который увеличивает потери энергии, необходимой для преодоления трения в струе. Однако, с другой стороны, оптимальная величина вязкости повышает устойчивость струи благодаря гашению капиллярных волн, способных ее разрушить. Так как параметр вязкости через молекулярную массу и структуру полимера тесно связан с реологическими и прочностными характеристиками, которые в свою очередь влияют на способность раствора противостоять деформационным нагрузкам и кавитации, необходимо индивидуально подобрать оптимальную величину в случае каждого типа полимера. Как правило, вязкость регулируется путем изменения концентрации полимера в растворе. Так, недостаточная величина вязкости может приводить к неравномерности

морфологии волокна и образованию бусиной структуры, в том время как очень высокая вязкость приводит к затруднению выхода полимерного раствора из плунжера [78].

Другими параметрами раствора, влияющими на процесс ЭΦ являются его электропроводность свойства И термодинамические (температура кипения). Электропроводность определяется временем релаксации свободных электрических зарядов в растворе под действием электрического поля. Особенно сильное влияние этот параметр оказывает на струю, в процессе ее движения к коллектору. Чем выше электропроводность, тем больше вероятность расщепления полимерной струи во время процесса ЭФ, что в конечном итоге определяет его производительность. Температура кипения определяет начало и конец отверждения струи в процессе ее переноса от фильеры до коллектора и хорошо коррелирует с величиной растворителя, образующего полимерный раствор (таблица 1.1). Из литературных данных следует что оптимальным диапазоном температур кипения раствора является 50–120°.

Далее необходимо принимать во внимание задаваемые технологические параметры процесса ЭФ. К ним относятся объемный расход полимерного раствора, электрическое напряжение подаваемое на фильеру, расстояние межэлектродного пространства, а также тип электрода-коллектора.

Электрическое напряжение – один из решающих параметров, влияющих на размер волокна. Однако, для образования стационарной струи из жидкого раствора, существует узкий диапазон напряжений, который определяется индивидуально для каждого отдельного источника. Нижняя граница и диапазон значений зависят как от параметров раствора, а именно величины коэффициента поверхностного натяжения, электропроводности, так и от объема расхода и расстояния между электродами.

Существуют противоречивые работы, в которых изучалось влияние напряжения в узком диапазоне на диаметр волокна. Например, в работе [79] авторы продемонстрировали, что электрическое напряжение не оказывает большого влияния на диаметр полимерного волокна из ПЭГ, в то время, как авторы другого исследования [80] обнаружили, что при более высоком параметре напряжения происходит сужение диаметра волокон. Это может быть вызвано тем, что высокое напряжение при применении к малому объему прядильного раствора может увеличить электростатические силы отталкивания в волокне. Таким образом, важным шагом любой исследовательской работы является установление крайних пороговых значений напряжения, при которых происходит образование стабильной стационарной полимерной струи.

Расход полимерного раствора – другой не менее критический параметр технологического процесса, который тесно связан с электрическим напряжением, и который варьируется в широком диапазоне значений. Крайний нижний предел скорости подачи раствора определяется стабильностью дозирования полимера через фильеру, в то время как верхний предел

определяется временем отверждения полимерного раствора, на который оказывает влияние *расстояние между двумя электродами* (фильерой и коллектором) в зависимости от скорости испарения выбранного растворителя. Если два электрода расположены друг относительно друга на слишком малом расстоянии, то у полимерного волокна не будет достаточно времени для отверждения, в то время как слишком дальнее расстояние может привести к образованию бусиной морфологии и искажения диаметра волокна.

На морфологию и структуру волокон также влияет *mun электрода-коллектора*, основной задачей которого является сбор волокон, исходящих из фильеры. Как правило, зачастую используется алюминиевая фольга, на которую в хаотичном порядке осаждают волокна. Однако, для создания скэффолдов с направленными волокнами, например для имитации структуры кортикальной кости, были разработаны различные типы коллекторов, основные варианты которых представлены на рисунке 1.6, позволяющие осаждать полимерные волокна в желаемом порядке.



Рисунок 1.6 – Основные типы коллекторов, используемых в процессе ЭФ для разработки волокон с беспорядочным и упорядоченным ориентированием: статический (*a*); статический узорчатый (*б*); вращающийся (*в*); вращающийся узорчатый (*г*); вращающийся тонкий диск (*d*)

Параметры окружающей среды, такие как влажность и температура воздуха также оказывают влияние на диаметр волокна. Так, в работе [81] было доказано, что повышение температуры способствует формированию более тонкого волокна. Также, низкая влажность может увеличить скорость испарения растворителя и увеличить вязкость раствора [82].

Таким образом, исходя из вышеизложенного можно заключить, что на диаметр и направление волокон оказывают влияние большое количество параметров, оптимизация и контроль которых играет важное значение в исследовательской работе и напрямую влияет на формирование желаемой структуры скэффолда, которая, в конечном итоге, должна выполнять функцию каркаса, для поддержания подходящего микроокружения для регенерации поврежденных костных тканей.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Материалы и реактивы

Для получения полимерных матриц использовали ПКЛ (M = 80000 кДа) в виде гранул размером ~ 3 мм, хлороформ служил в качестве растворителя (CHCl₃) (Sigma-Aldrich, CША). В качестве наполнителей для полимерных волокон использовали механохимически синтезированные и отожженные порошки SrГA (Ca_{10-x}Sr_x(PO₄)₆(OH₂, x = 0,8) и SiГA (Ca₁₀(PO₄)₆₋ _x(SiO₄)_x(OH)_{2-x}, x = 0,8). Синтез SrГA порошка проводился с замещением 0,8 мольных долей (~ 4,61 мас.%) Ca²⁺ на катион Sr²⁺. В этом случае закон сохранения электрической нейтральности описывается следующим образом:

$$(10-x)Ca^{2+}+xSr+PO_4^{3-}+(2-x)OH^{-} \rightarrow Ca_{10-x}Sr_x(PO_4)_6(OH)_2$$
 (2.1)

Также, было проведено замещение 0,8 мольных долей (~ 2,25 мас.%) PO_4^{3-} на анион SiO₄⁴⁻ в структуре порошка SiГA, то в этом случае закон сохранения электрической нейтральности работает по следующей схеме:

$$10Ca^{2+}+(6-x)PO_4^{3-}+xSiO_4^{4-}+(2-x)OH^{-} \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}$$
(2.2)

Данные порошки были предоставлены Институтом химии твердого тела и механохимии CO PAH, г. Новосибирск, д.х.н. Чайкиной М.В. [83]. Порошки были синтезированы в планетарной мельнице АГО-3 (Новосибирский испытательный центр, Россия) в трех стальных (объем 2 л), охлаждаемых водой барабанах. Частота вращения барабанов составила 1300 об/мин. В качестве мелющих тел выступали стальные шары весом 2 кг, при этом время активации реакционной смеси составило 15 минут. Перед синтезом проводилась подготовительная автоматическая футеровка внутренней части барабанов смесью идентичного состава во избежание «натира» железа. После синтеза проводился отжиг образцов при 1000 °C в течение 5 часов. Также, для сравнения был подготовлен порошок чистого ГА, полученного механохимическим синтезом при идентичных условиях синтеза SrГA и SiГA порошков.

Растворы для ЭФ готовили путем добавления определенного количества гранул ПКЛ в хлороформ. Расчеты количества полимера определенной концентрации в растворителе производились по формуле:

$$\omega = \frac{m}{m + \rho V} \times 100\%, \qquad (2.3)$$

где \mathscr{O} – массовая доля растворённого вещества (%), \mathscr{M} – масса растворённого вещества (мг), ρ – плотность растворителя (г/мл).

Для оптимизации процесса ЭФ были приготовлены растворы с концентрацией 6, 9 и 12 мас.%. Растворы перемешивались в ротационном устройстве Rotamix RM-1 (ELMI, Латвия) при комнатной температуре в течение 180 минут до полного растворения. Для приготовления композитных смесей в раствор ПКЛ добавляли микрочастицы порошков SrГA и SiГA при различных концентрациях от общей массы полимера: 5, 10 и 15 мас.%. При этом, раствор также перемешивался в ротационном устройстве в течение 180 минут, после чего помещался в ультразвуковую ванну «Сапфир» (Россия) на 15 минут для предотвращения образования агломератов на этапе подготовки раствора, и возвращался в ротационное устройство на 10 минут для стабилизации смеси.

2.2. Установка электроформования

Для создания скэффолдов использовалась стандартная установка ЭФ, разработанная на базе Национального исследовательского Томского политехнического университета (Россия). На рисунке 2.1 приведена типичная блок-схема технологической установки, основные компоненты которой: источник высокого напряжения, электрод-фильера в виде иглы малого диаметра, инжектирующее устройство и электрод-коллектор.



Рисунок 2.1 – Блок-схема установки ЭФ: 1 – источник высокого напряжения; 2 – электродфильера; 3 – инжектирующее устройство; 4 – электрод-коллектор; 5 – расстояние между электродами; *E* – напряженность электрического поля

Для формирования полимерной струи через металлический электрод к полимерному раствору подводится постоянное отрицательное напряжение. Далее, через капиллярное сопло подается полимерный раствор с помощью инжектирующего устройства с заданной постоянной

скоростью. В растворе полимера под действием электрического поля происходит образование одноименных электрических зарядов, которые благодаря кулоновскому взаимодействию приводят к вытягиванию полимерного раствора в непрерывную, тонкую струю. Далее, по пути движения полимерной струи к коллектору растворитель испаряется, и, это, в свою очередь, приводит к отвердеванию струи в виде полимерной сети, состоящей из волокон, осажденных на коллектор.

Оптимизация различных параметров процесса ЭФ является ключевым фактором, от стабильности и результатов которого зависят желаемые свойства полимерных волокон, из которых состоит скэффолд. Процесс оптимизации процесса ЭФ состоит в варьировании и подборе таких параметров технологического процесса, как электрическое напряжение, расход полимерного раствора и расстояние между двумя электродами. Кроме того, для создания скэффолдов с беспорядочно и упорядоченно ориентированными волокнами необходимо определить скорость вращения коллектора, при которой происходит выравнивание волокон. Режимы оптимизации технологических параметров процесса ЭФ представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Режим	мы оптимизации технологических	к параметров процесса ЭФ
---------------------	--------------------------------	--------------------------

Параметр	Значения
Электрическое напряжение, [кВ]	7; 8; 9; 10
Расход полимерного раствора, [мл/час]	1; 1,5; 2
Расстояние между двумя электродами, [см]	5; 7; 9
Скорость вращения коллектора, [об/мин]	200; 400; 600; 800; 1000; 1100

2.3. Методы исследования

2.3.1. Определение реологических свойств растворов

Вязкость раствора является одним из ключевых факторов, определяющих морфологию волокна. Для формирования гладкого и равномерного по диаметру волокна необходимо подобрать такой параметр вязкости, при котором раствор будет устойчив к деформационным нагрузкам и кавитации, а также будет способен гасить капиллярные волны при образовании заряженной жидкой струи в условиях высокой скорости деформации, что при испарении растворителя приведет к формированию достаточно прочных полимерных волокон.

Реологические характеристики растворов исследовались методом ротационной вискозиметрии с помощью реометра Physica MCR 301 (Anton Paar, Австрия). Исследование образцов происходило в режиме сдвига при постоянной скорости вращения. Для исследований была выбрана измерительная система с цилиндрической геометрией (CC17-SN17480, Anton Paar, Австрия). Радиус внутреннего вращающегося цилиндра составил 26,66 мм и внешнего неподвижного цилиндра – 28,92 мм, рассчитанная на 20 мл объема образца. Для измерения

реологических характеристик растворов была построена кривая вязкости, состоящая из 31 измерений при скорости сдвига 0,1 сек⁻¹. Время одного измерения составило 5 секунд. Реологические эксперименты проводились при 20 °C.

2.3.2. Микроскопия

Для исследования влияния параметров процесса ЭФ и сопоставления морфологических изменений, происходящих в образцах модифицированных SrГA и SiГA с различным ориентированием волокон, использовались оптическая микроскопия (OM) и сканирующая электронная микроскопии (CЭM). Метод OM основан на отражении световых лучей от исследуемого объекта, а метод CЭM основан на использовании направленного потока электронов, который выполняет роль светового луча в OM.

Первичная оценка морфологии поверхности скэффолдов при оптимизации процесса ЭФ проводилась на ОМ VHX-900 (Кеуепсе, Япония). Максимальное увеличение при съёмке изображений составило ×700.

Морфологию поверхности скэффолдов, полученных при оптимизированных параметрах процесса ЭФ, состоящих из чистого ПКЛ полимера и композитные скэффолды, состоящие из ПКЛ полимера и различных концентраций микрочастиц и их агломератов SrГA и SiГA с беспорядочно и упорядоченно ориентированными структурами волокон исследовали с помощью СЭМ Quanta 200 и Quanta 400 (FEI, Нидерланды), максимальная разрешающая способность которых составляла 3 нм. Образцы разрезались на квадраты со стороной 0,5 см. В качестве проводящего слоя использовались покрытия из золота и палладия. Ускоряющее напряжение на аноде электронной пушки составило 10 кэВ. В ходе исследований максимальное увеличение изображений составило ×20000. СЭМ-изображения были использованы для определения влияния скорости вращения коллектора и дополнительных включений в виде SrГA и SiГA порошков. Полученные изображения с ОМ и СЭМ обрабатывались в программе ImageJ (NIH, США). Для вычисления среднего диаметра волокон по полученным (не менее 200) значениям, проводились расчеты в программе Origin Pro 9.1 (Originlab Corporation, США). Также, по полученным изображениями можно оценить размер зерен порошков методом секущей [84]. Кроме того, величина удельной поверхности ($S_{\nu a}$), которая прямо пропорциональна дисперсности, также может позволить оценить размер частиц раздробленной фазы образцов дисперсной системы. Если условно предположить, что все частицы представлены в виде эллипса, то можно определить величину удельной поверхности Svd по формуле, представленную в общем виде как:

$$S_{y\partial} = \frac{S_e}{V} = k \frac{1}{a} = kD,$$
 (2.4)

где S_{s} – внешняя поверхность частиц, V – объем частиц, k – коэффициент, зависящий от формы частиц, D – дисперсность.

Для реальных порошков, которые состоят из микрочастиц различной формы и размеров, это соотношение представлено в более сложном виде, тем не менее при использовании уравнения (2.4) возможно грубо оценить величину их поверхности.

Энергодисперсионный рентгеновский анализ (ЭДРА) проводился в конфигурации с СЭМ на встроенном ЭДРА-анализаторе (система анализа EDS Genesis 4000, детектор S-UTW-Si(Li)), принцип действия которого основан на фиксировании типичных для каждого конкретного элемента испущенных рентгеновских квантов при взаимодействии электронного пучка с поверхностью.

2.3.3 Компьютерная микротомография с использованием источника синхротронного излучения

Для количественной оценки особенностей объемной структуры скэффолдов, использовался метод высокоразрешающей рентгеновской компьютерной томографии (РКТ) на основе синхротронного излучения. РКТ – неразрушающий метод исследования, который основан на многократном просвечивании рентгеновским излучением (РИ) объекта под разными углами с последующей компьютерной обработкой данных с помощью математических методов и алгоритмов. В качестве источника РИ могут выступать как традиционные рентгеновские трубки, так и различные виды ускорителей, в числе которых синхротрон. Основными достоинства синхротрона, по сравнению с рентгеновской трубкой является высокая яркость, когерентность в поперечном направлении и монохроматичность излучения с настраиваемой длинной волны, а также поляризованность и естественная высокая коллимированность пучка, обеспечивающая передачу излучения на большие расстояния без потери интенсивности. Метод РКТ базируется на построении трехмерного распределения изменения интенсивности падающего излучения на исследуемый объект, вследствие его ослабления благодаря поглощению или рассеянию на частях исследуемого объекта. На макроуровне ослабление РИ описывается законом Ламберта-Бера (формула 2.4), который составляет физическую основу метода РКТ [85]. При прохождении монохроматического РИ с заданной энергией Е и интенсивностью падающего излучения І₀ через однородное твердое вещество толщиной L, интенсивность прошедшего излучения I через материал уменьшается по экспоненциальному закону:
$$I = I_0 e^{-\mu L}, \qquad (2.4)$$

где *µ* – линейный коэффициент поглощения, который зависит от плотности вещества и длины волны падающего излучения.

РКТ проводилась на станции Торо-Тото, расположенной на источнике синхротронного излучения ANKA (Германия). Схематичный вид экспериментальной РКТ установки представлен на рисунке 2.2.



Рисунок 2.2 – Схематичный вид экспериментальной установки РКТ

Образец вращается перпендикулярно квазипараллельному пучку РИ вокруг своей оси на 180°. Во время вращения образца сигнал от прошедшего через образец излучения фиксируется через равные промежутки времени системой, которая состоит из сцинтиллятора, системы увеличения (микроскоп) и детектора в виде матрицы (ПЗС (ССD) – прибор с обратной зарядной связью или КМОП (СМОЅ) – комплементарный металл-оксидный полупроводник). Следовательно, разрешение изображения определяется несколькими факторами, которые включают в себя функцию точечного распространения сцинтиллятора, коэффициентом увеличения объектива микроскопа, функцию точечного распространения и соотношения сигнала к шуму детектора, и линейным размером пикселя. Число отснятых проекций образца, которое должно быть записано в пределах углового диапазона, задается так называемой «теоремой выборки» и равно:

$$N = N_p \times \frac{\pi}{2} , \qquad (2.5)$$

где N_p – количество пикселей в строке.

Для генерации томограмм из каждой строки детектора происходит передача послойного распределения двумерных проекций объекта в виде функции угла проекции (синограммы) на ПК.

В ходе эксперимента использовалось монохроматическое излучение (*E* = 12 кэВ), выделенное с помощью двойного многослойного монохроматора, из спектра синхротронного излучения поворотного магнита (спектр белого света). Система детектирования состояла из

сцинтиллятора – LuAG:Се (толщина 200 мкм), камеры PCO dimax (2016×2016 пикселей) (Германия) со встроенным детектора – КМОП (размер сенсора – 5,5 мегапикселей, физический размер пикселя – 11 мкм), оптического микроскопа Optique Peter (увеличение 10×), результируя на разрешении установки – 1,1 мкм и поле видимости 2,3×2,3 мкм. Для РКТ были подготовлены образцы размером $5\times5\times0,5$ мм, дистанция между детектором и образцом составила 20 мм. При съемке образцы вращались вокруг своей вертикальной оси на 180° с шагом $0,24^{\circ}$, время экспонирования составило 1 сек. Для устранения артефактов детектирующей системы и рентгеновского пучка, все проекции были нормализованы на проекции темного (проекции без объекта).

Томографическая реконструкция была выполнена с использованием алгоритма отфильтрованной обратной проекции, реализованного в рамках программного обеспечения UFO [86]. Проведенный анализ восстановленных данных состоял из количественного анализа распределения микроволокон/микрочастиц по размеру в скэффолдах, определения параметра пористости каждого образца и распределения ориентации волокнистых структур. Данный анализ включает в себя несколько этапов, перечисленных ниже.

Обработка и фильтрация является важным этапом в анализе данных. Данная операция необходима для устранения или снижения степени помех, возникших в результате дискретизации и квантования цифрового сигнала, а также устранения и подавления внешних шумов. Часто причинами шума могут быть различные факторы, которые включают в себя плохую поглощающую способность материала, пыль на объективе, качество используемых приборов и т.д. Различают две стадии обработки: предварительная фильтрация, которая выполняется на «сырых» данных, полученных с камеры, и постобработка, обычно используется для подавления нежелательных эффектов, вызываемых некоторыми операциями над данными. Например, если шум не был отфильтрован до этапа сегментации, то велика вероятность того, что шум будет сегментирован вместе с данными и потребуется дополнительная фильтрация для его нейтрализации.

Каждый этап может состоять из ряда фильтров, где выход одного фильтра, является входом другого, образуя тем самым конвейер. Существует огромное множество фильтров [87], основанных на вычислении среднего арифметического, среднего геометрического, а также среднего гармонического максимумов и минимумов, основанных на вейвлет-преобразовании, вычислении медианного значения и т.д. Более того, существует отдельная группа морфологических фильтров [88], ориентированных на работу исключительно с двоичными данными.

В данной работе, в основном использовался медианный фильтр [89] (рисунок 2.3), которой позволяет подавить импульсные помехи и малоразмерные детали объектов, при этом сохраняя резкость на границах.



Рисунок 2.3 – Пример работы медианного фильтра на двумерных данных. Красными стрелками показаны места, где видна разница между начальным и обработанным изображениями

Далее следует *процесс сегментации*, который состоит в разделении анализируемых данных на группы пикселей или вокселей близких по значению одного или нескольких свойств [90]. К таким свойствам относятся интенсивность, текстура, контрастность и т.д. Существует множество различных методов и подходов к сегментации, отличающихся областью применения, набором входных параметров и временем работы. В основе всех алгоритмов сегментации лежит идея нахождения одного или нескольких регионов данных, интенсивность пикселей или вокселей которых различается не более чем на некоторую величину, называемую порогом сегментации (рисунок 2.4).



Рисунок 2.4 – Пример работы порогового метода сегментации. Красной стрелкой показано автоматически определенное пороговое значение на гистограмме

Следующим шагом анализа сегментированных данных является *выделение связных компонент* [91], [92]. Этот процесс подразумевает под собой присвоение уникальных меток всем пикселям или вокселям, принадлежащим каждому не смежному региону на сегментированных

данных (рисунок 2.5). В последствии, данные метки будут служить в качестве идентификаторов для обращения к конкретным регионам.



Рисунок 2.5 – Демонстрация работы алгоритма выделения связных компонент

Маркирование регионов применяется практически во всех сферах распознавания образов и машинного зрения, без которого, многокомпонентные алгоритмы распознавания не были бы способны отделять объекты друг от друга, обладающих похожими признаками.

В рамках данной работы, использовался алгоритм выделения связных компонент, описанный в работе [93]. Он был применен для маркировки сегментированных частиц на томографических данных. В результате этого стало возможным проанализировать каждую микрочастицу индивидуально, вычислив ряд характеристик: объем, габариты и радиус сферы, обладающей таким же объемом.

При анализе сегментированных данных, может возникнуть задача анализа составных частей объекта представленного на данных. Для этого необходимо провести процедуру *выделения скелета объекта* из результата сегментации (рисунок 2.6).



Рисунок 2.6 – Пример работы алгоритма выделения скелета из данных

Преобразование к скелету или как его еще называют – средним осям, основано на применении метода «степного пожара» [94]. В результате данной процедуры, выделенный скелет может быть представлен в виде графа, где дуги между узлами имеют веса, пропорциональные

эвклидову расстоянию в пространстве между узлами. Последующий анализ такого графа позволит лучше понять морфологию изучаемого объекта. Помимо графового представления, скелет может быть применен в анализе, где не требуется весь объект, а только лишь его скелет. Например, определение диаметра и ориентации цилиндрических структур, таких как волокна скэффолдов.

Исследование ориентации объектов в пространстве лучше позволяет понимать их поведение и физические процессы связанные с ними. Любая волокнообразная структура, которая составляет скэффолд, состоит из отдельных волокон. Волокно может быть смоделировано в 3D пространстве с помощью единичного вектора ρ , распложенного в центре сферической системы координат (рисунок 2.7). Ориентация волокна в пространстве определяется углами θ и φ , которые обозначают азимут и возвышение. Область определения этих углов ограничена $\theta \in [0^{\circ}, 180^{\circ}]$ и $\varphi \in [0^{\circ}, 90^{\circ}]$, т.к. данные диапазоны полностью описывают правую часть северного полушария сферической системы координат, что достаточно для консистентного описания ориентации в пространстве.



Рисунок 2.7 – Модель волокна в сферической системе координат x, y, z

Вычисление ориентации структур в пространстве может быть выполнено, как для всего объема данных, представленного в градациях серого, так и для скелетов конкретных структур, выделенных из результатов сегментации.

Для расчета ориентации в выбранной точке, в рамках заданной окрестности этой точки вычисляется трехмерный структурный тензор (формула 2.6) [95].

$$J(x) = \begin{bmatrix} J_{11} & J_{12} & J_{13} \\ J_{21} & J_{22} & J_{23} \\ J_{31} & J_{32} & J_{33} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_x^2 & I_x I_y & I_x I_z \\ I_y I_x & I_y^2 & I_y I_z \\ I_z I_x & I_z I_y & I_z^2 \end{bmatrix} = \nabla I(x) \cdot \nabla I(x)^T$$
(2.6)

Используя алгоритмы факторизации матриц [96], из рассчитанного тензора выделяются собственные значения и собственные вектора, которые указывают направления наибольшего изменения данных. Таким образом, если выбрать наименьшее собственное значение и соответствующий ему собственный вектор, то он будет указывать вдоль анализируемой структуры, так как именно в этом направлении изменение данных будет минимальным, и оно будет совпадать с направлением структуры.

Каждое найденное значение угла проходит цветовое кодирование по цветовой модели *HSV* (англ. *Hue*, *Saturation*, *Value* – тон, насыщенность, значение), которая позволяет сопоставить соответствующий цвет двум значениям угла.

В данной работе ориентация волокон была рассчитана в каждом узле скелета, выделенного из результата сегментации томографических данных и последующего вычленения связных компонент (рисунок 2.8).



Рисунок 2.8 – Пример работы метода определения ориентации с помощью трехмерного структурного тензора. В увеличенном регионе показан структурный тензор, ориентированный вдоль скелета, выделенного из сегментации волокон

Расчет диаметра волокон необходимо выполнять в каждой точке скелета, выделенного из результатов сегментации. Для того чтобы вычислить диаметр волокна в выбранной точке, из неё, перпендикулярно вектору ориентации в данной точке, испускаются лучи с заданным угловым шагом *O* (рисунок 2.9).

Для каждого испущенного луча определяется расстояние, пройденное им до встречи с границей сегментации волокна. Средний радиус, а в последствии и диаметр, вычисляется как среднее из всех расстояний, пройденных лучами до границ сегментации. Настройка количества испущенных лучей, позволяет контролировать точность и время вычисления.



Рисунок 2.9 – Пример работы метода определения диаметра волокна с помощью исходящих лучей. В увеличенном регионе схематично представлено испускание лучей из точки скелета волокна, окруженного его сегментацией, лучи испускаются перпендикулярно вектору ориентации волокна с заданным угловым шагом *Ф*

Пористость представляет собой одномерную метрику (O_p) для оценки отношения воздуха к материалу в исследуемом объекте. То есть, метрика равна нулю, когда весь объем заполнен материалом, и отсутствуют полые области, заполненные воздухом. Соответственно, если метрика равна единице, то в объеме полностью отсутствует материал. Расчет данной метрики был произведен согласно формуле 2.7, используя результаты сегментации трехмерного объема данных.

$$O_p = 1 - \frac{M_{nvox}}{O_{nvox}}, \qquad (2.7)$$

где *M_{nvox}* – количество вокселей относящихся к материалу, а *O_{nvox}* – общее количество вокселей в объеме.

В рамках данной работы, томографические данные были проанализированы согласно схеме, представленной на рисунке 2.10. Для удобства восприятия схемы процесс обработки представлен для двумерного случая, однако, аналогичные шаги используются и для трехмерных данным.

На начальном этапе, из 3D данных извлекается изображение [97] (рисунок 2.10 *а*–*б*), являющееся двумерным сечением исследуемого объекта, представленного на трехмерных данных. Далее, к извлеченному сечению применяется медианный фильтр радиусом 1,8 мкм (рисунок 2.10 *в*), для подавления шума на «сырых» данных, полученных с камеры. Затем, применяется процесс обработки, конфигурация которого зависит от присутствия частиц в исследуемом образце.



Рисунок 2.10 - Схема процесса анализа томографических данных исследуемых образцов

Рассмотрим случай, когда образец содержит микрочастицы, поскольку, в таком случае, рабочий процесс будет задействован полностью. В начале производится сегментация частиц с помощью порогового метода сегментации, основанного на использовании энтропии данных [14] (рисунок 2.10 e). Далее, выполняется выделение связных компонент (рисунок 2.10 d), для разделения частиц друг от друга, после чего выполняется анализ количества, формы и размера частиц (рисунок 2.10 e). Затем, производится сегментация волокон с помощью порогового метода «Отсу» [98] (рисунок 2.10 n), алгоритм которого позволяет выделить частицы и волокна вместе, поскольку их интенсивности находятся рядом на гистограмме. Следующим шагом идет удаление частиц, оно выполняется вычитанием результата сегментации частиц (рисунок 2.10 e) от сегментации волокон (рисунок 2.10 n).

Поскольку сегментация частиц не является полностью идентичной, в связи с тем, что присутствует изменение интенсивности на границе, где частица соприкасается с волокном, то результат вычитания может вызвать артефакты, выраженные в остаточных тонких контурах микрочастиц. В связи с этим необходимо провести фильтрацию морфологической операцией «замыкания» (рисунок 2.10 *u*), тем самым, удалив границы, оставшиеся от частиц. После чего, из

отфильтрованных данных выделяется скелет (рисунок 2.10 *з*), который используется при определении ориентации волокон в пространстве (рисунок 2.10 *ж*). На рисунок 2.10 *ж* представлен результат полного анализа трехмерного объема, где анализируемое сечение располагается в центральной части и помечено пунктирной линией.

2.3.4 Рентгенофазовый анализ

Фазовый состав и микроструктура скэффолдов исследовалась методом рентгенофазового анализа (РФА). Метод основан на явлении дифракции рентгеновских лучей на кристаллической решетке, которое описывается законом Вульфа-Брэгга. Согласно закону, падающее РИ определенной длинны волны (энергии) на кристалл, отражается от его плоскости под определенным углом согласно выражению:

$$2dsin\theta = n\lambda, \tag{2.8}$$

где *d* – межплоскостное расстояние, *θ* – дифракционный угол скольжения, *n* – порядок дифракционного максимума, *λ* – длина волны излучения.

Согласно данному методу исследования возможно идентифицировать кристаллические фазы и их количество на основе значений межплоскостных расстояний и интенсивности максимумов на рентгеновском спектре (дифрактограмме), а также определить средний размер кристаллитов или, иначе говоря, размер областей когерентного рассеяния (ОКР). Также, с помощью данного метода возможно установить положение Sr в кристаллической решетке ГА. Так, сдвиг максимумом интенсивности, характерных для ГА в сторону меньших углов свидетельствует о встраивании Sr в решетку ГА и замещении ионов Са [99].

Для получения спектра РИ использовался дифрактометр Stoe STADI MP (STOE & Cie GmbH, Германия), оснащенный детектором Mythen1K. В качестве монохроматора использовался монокристалл германия. Съемка проводилась в 2θ-геометрии при Cu kα1 излучении с длинной волны 1,54059 нм, напряжении 40 кВ и токе 40 мА в диапазоне от 10–60° с угловым шагом 0,8° и временем выдержки 10 сек.

Расчет среднего размера кристаллитов производился по формуле Дебая-Шеррера [100]:

$$d = \frac{k\lambda}{\beta\cos\theta},\tag{2.9}$$

где *k* – безразмерный коэффициент (обычно равен 1), *λ* – длина волны РИ, *β* – ширина пика на полувысоте, *θ* – угол скольжения.

Дифракционные данные обрабатывались с использованием программного обеспечения Jana2006, перед расчетом размера кристаллитов производилась нормализация максимумов интенсивности с помощью функции псевдо-профиля Фойгта [101].

Идентификация фазового состава скэффолдов проводилась с помощью Международного центра дифракционных данных (ICDD) (номер карточки синтетического ГА –9-432) и литературных данных [53]. Содержание кристаллических фаз рассчитывалось в программе PowderCell 2.4. с использованием метода Ритвельда [102]. Суть метода заключается в итерационной детализации начальных приближений структурных и профильных параметров в процессе минимизации отклонения между расчетным и экспериментальным профилем дифрактограммы.

2.3.5 Инфракрасная спектроскопия

Анализ молекулярных связей, присутствующих в скэффолдах проводился с помощью метода инфракрасной (ИК) спектроскопии. Метод основан на поглощении исследуемым объектом электромагнитного излучения в диапазоне 4000–400 см⁻¹. ИК-спектры микрочастиц порошков SrГA и SiГA, а также скэффолдов были получены на ИК-спектрометре Tensor 37 (Bruker, Германия). Следует отметить, что при анионных замещениях фосфатной PO_4^{3-} группы в структуре ГА на силикатную SiO₄⁴⁻, на ИК-спектре поглощения ожидается появление полос колебания Si–O связи. Идентификация спектров поглощения производилась по таблицам характеристических частот на основании литературных и справочных данных [103], [104], [105].

2.3.6 Исследование механических свойств

Механическая прочность является одним из основных свойств, определяющих эффективность конструкции скэффолда. Испытания на растяжение проводились с помощью испытательной разрывной машины Instron 3343 (Instron, США). Физические размеры образцов составили: рабочая длина – 20 мм, ширина – 5 мм, толщина – 0,5 мм. Перед экспериментом образцы крепились зажимами испытательной машины по заранее нанесенным меткам, которые определяли положение кромок зажимов. Закрепление зажимов происходило таким образом, чтобы предотвратить проскальзывание образца во время эксперимента, но при этом в месте крепления не происходило преждевременного разрыва образца. Скорость нагружения составила 40 мм/мин. Во время испытания при разрыве фиксировалось наибольшее усилие и рассчитывалось механическое напряжение при растяжении по формуле:

$$\sigma_p = \frac{F_p}{S_0},\tag{2.10}$$

где F_p – сила, при которой произошло разрушение образца; S_0 – начальное поперечное сечение. Относительное удлинение \mathcal{E} при растяжении определяется по формуле:

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \times 100\% , \qquad (2.11)$$

где Δl – абсолютное удлинение при разрыве, l_0 – начальная длина до разрыва.

2.3.7 Смачиваемость поверхности и свободная поверхностная энергия

Степень смачивания поверхности скэффолдов исследовалась с помощью измерения величины водного краевого угла θ , образованного при соприкосновении капли жидкости с поверхностью твердого тела, который определяется по закону Юнга:

$$\cos\theta = \frac{\sigma_{m_c} - \sigma_{\mathcal{M}m}}{\sigma_{\mathcal{M}c}}, \qquad (2.12)$$

где σ_{m_2} , σ_{m_2} и σ_{m_2} межфазные поверхностные энергии на границе разделов: твердое тело-газ, жидкость-твердое тело, жидкость-газ.

Процесс взаимодействия жидкости с поверхностью может протекать по двум механизмам (рисунок 2.11).



Рисунок 2.11 – Степень смачивания поверхности твердого тела: ограниченно смачивается (гидрофобная поверхность) (*a*); хорошо смачивается (гидрофильная поверхность) (*б*)

В первом случае может происходить наиболее сильное притяжение между молекулами жидкости, чем между молекулами жидкости и твердого тела, что приведет к формированию

шарообразной капли жидкости. В этом случае считается, что жидкость ограниченно смачивает поверхность, где $90^{\circ} < \cos \theta < 180^{\circ}$, что характеризует поверхность как гидрофобную. Во втором случае притяжение между молекулами жидкости происходит слабее, чем между молекулами жидкости и твердого тела. В этом случае считается, что жидкость смачивает поверхность, где 0 $<\cos \theta < 90^{\circ}$, что характеризует поверхность как гидрофильную. В теории считается, что при абсолютном смачивании $\cos \theta = 0$, при абсолютном несмачивании $\cos \theta = 180^{\circ}$.

Свободная поверхностная энергия (СПЭ) представляет собой термодинамическую функцию, которая определяет молекулярное взаимодействие между твердым телом и жидкостью и рассчитывается на основе величины краевого угла *θ* различных экспериментальных жидкостей.

Среди методов, которые применяются для вычисления СПЭ наиболее часто используемым является метод Оуэнса-Вендта-Рабеля-Каелбле (OBPK) в котором считается, что энергия поверхности твердого тела включает полярную и дисперсионную компоненты. Полярная составляющая включает в себя силы Ван-дер-Ваальса и различные неспецифические межмолекулярные взаимодействия, в то время как дисперсионная составляющая включает водородные связи и сильные межмолекулярные взаимодействия. На основании этого можно вывести следующее уравнение:

$$\frac{\sigma_{\mathcal{K}}(\cos\theta+1)}{\sqrt[2]{\sigma_{\mathcal{K}}^{\mathcal{I}}}} = \frac{\sqrt{\sigma_{T}^{\mathcal{I}}} \cdot \sqrt{\sigma_{T}^{\mathcal{I}}}}{\sqrt{\sigma_{\mathcal{K}}^{\mathcal{I}}}} + \sqrt{\sigma_{T}^{\mathcal{I}}}, \qquad (2.13)$$

где $\sigma_{\mathcal{K}}$ – общее поверхностное натяжение смачивающей жидкости, $\sigma_{\mathcal{K}}^{\mathcal{I}}$ – дисперсионная компонента поверхностного натяжения смачивающей жидкости, $\sigma_{T}^{\mathcal{I}}$ – полярная компонента СПЭ твердого тела, $\sigma_{T}^{\mathcal{I}}$ – дисперсионная компонента СПЭ твердого тела.

Для определения СПЭ твердого тела требуется по меньшей мере две жидкости с известными дисперсионными и полярными составляющими, причем по крайней мере одна из жидкостей должна иметь полярную компоненту > 0. При известных данных составляющих жидкости, возможно, в последующем, определить составляющие поверхности исследуемого объекта.

Измерения краевых углов смачивания поверхности скэффолдов производились при помощи метода «сидячей капли» с использованием оборудования OCA 15 Plus (DataPhysics Instruments GmbH, Германия) при температуре 22±1°C. В качестве стандартных жидкостей использовались деионизированная вода (в) и глицерин (г), объем капли составил 5 мкл. Для подтверждения достоверности результатов исследования, измерения для каждого типа образца повторялись не менее пяти раз.

2.3.8 Исследование деградации в растворе натрий-фосфатного буфера

Характер деградации скэффолдов играет важную роль в процессе ремоделирования костной ткани. При длительном сроке регенерации костных тканей, скэффолд должен характеризоваться длительным сроком биодеградации в условиях *in vivo*, соответствующий сроку регенерации костной ткани, который в последующем полностью растворится и заместится новообразованной тканью. Однако, для первичной оценки скорости деградации конструкций принято использовать *in vitro* исследования в жидкости, имитирующей реальные жидкости организма человека, которые в последующем будут контактировать со скэффолдом.

В качестве модельной жидкости использовался раствор натрий-фосфатного буфера (PBS), осмолярность и концентрация ионов в растворе которого соответствуют концентрациям ионов в межклеточных жидкостях в теле человека. Раствор PBS был приготовлен согласно стандартному протоколу, состав которого представлен в таблице 2.2 [106]. Для достижения необходимого pH = 7,4 в дистиллированную воду вводилась соляная кислота (HCl) (Sigma-Aldrich, Poccuя). Для исследования были подготовлены образцы площадью 0,25 см². Для полного погружения образцов в PBS-раствор проводили предварительное смачивание в этаноле (70 %) в течение часа. После этого, образцы помещались в PBS при 37°С и выдерживались в течение 6, 12, 18 и 24 дней. После инкубации образцы извлекались, промывались дистиллированной водой, остатки удалялись безворсовой салфеткой, после чего взвешивались и помещались в термостат на сутки при температуре 37° С для удаления оставшейся жидкости, после чего повторно взвешивались.

Количество поглощенной жидкости ($W_{\Pi \mathcal{K}}$) рассчитывались по формуле:

$$W_{\Pi \mathcal{K}}(\%) = \left(\frac{W_C - W_B}{W_B}\right) \times 100 , \qquad (2.14)$$

где W_C – вес смоченного образца после удаления остаточной жидкости, W_B – вес высушенного образца.

Потеря массы рассчитывается по следующей формуле:

$$W_{\Pi M}(\%) = \left(\frac{W_0 - W_B}{W_0}\right) \times 100 ,$$
 (2.15)

где *W*₀ – начальная масса образца.

Соль	Концентрация [ммоль/л]	Концентрация [г/л]
NaCl	137	8,00
KCl	2,7	0,20
Na ₂ PO ₄	10	1,44
KH ₂ PO ₄	1,76	0,24

Таблица 2.2 – Содержание солей в 1 л однократного PBS-раствора (рН 7,4)

2.3.9 Биологические исследования in vitro и in vivo

Биологическая совместимость скэффолдов в условиях *in vitro* проводилось с помощью оценки цитотоксичности и путем культивирования на поверхности образцов клеток.

Для клеточных экспериментов были подготовлены образцы размером 0,25 см². Изучение адгезивных свойств скэффолдов и определение цитотоксичности проводилось с помощью метода прямого контакта. Для эксперимента были взяты первичная культура МСК человека, выделенная из костного мозга и мышиные фибробласты линии NCTC L929.

Для культивирования клеток готовилась среда, которая включала в себя смесь ДМЕМ (Sigma-Aldrich, США) и F12 (Life technologies, США) в соотношении 1:1 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (Biological Industries, Израиль), пенициллина, L-глутамина, стрептомицина, а также раствора витаминов (ПанЭко, Россия). Приготовленная среда выдерживалась при 37°C в атмосфере 5 % CO₂. По мере образования субконфлюентного монослоя проводилась обработка клеток 0,25 % раствором трипсин-ЭДТА, после чего их пассировали в новые сосуды в соотношении 1:2. Для проведения исследований использовали клетки на 4 пассаже. Посев клеток на поверхность осуществлялся в ячейки 24-луночного планшета в концентрации 40 тыс/см². В качестве контроля служили покровные стекла.

Для МТТ-теста, который позволяет оценивать метаболическую активность живых клеток, использовались первые вытяжки. Соотношение массы материала и объема модельной среды составляло 1:10, вытяжки приготавливались из 100–120 мг материала. Культуральная среда, которая подвергалась идентичным условиям и процедурам исследования, что и исследуемые образцы, использовалась в качестве контроля. После начала культивирования на первые сутки культуральная среда удалялась, после чего в каждую лунку добавляли 100 мкл раствора МТТ 0,5 мг/мл, смешанного с культуральной средой ДМЕМ/F12. После того, как образцы были выдержаны при 37 °С в увлажненной атмосфере 5 % CO₂ в течение 3,5 часов, жидкость удалялась. Далее в лунки вносилось по 100 мкл ДМСО и при встряхивании планшетов при комнатной температуре в течение 10 минут, происходило растворение образовавшихся солей формазана. Процесс формирования окраски регистрировался с помощью фотометра путем анализа оптической плотности раствора (длина волны 540 нм, модель 680 BIO-RAD, США).

Оценка жизнеспособности клеточных культур на поверхности скэффолдов после окончания культивирования проводилась с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200 (Carl Zeiss, Германия). Клетки окрашивались флуоресцентными красителями как SYTO 9 и иодид пропидия. Морфологические особенности клеток на поверхности скэффолдов исследовались методом СЭМ с автоэмиссионным источником Tescan Vega II (TESCAN, Чехия) во вторичных электронах (детектор типа SE) при ускоряющем напряжении 20 кВ. В качестве подготовки производилась промывка образцов (0,1 M PBS (pH 7.4)) и фиксация (2,5 % буферный раствор глутарового альдегида) на 12 часов при температуре 5°С. После фиксации производилась промывка образцов и последовательная дегидрация при 4°С с помощью батареи водного раствора этанола возрастающей концентрации. На каждой стадии образцы дважды погружались в раствор этилового спирта соответствующей концентрации на 5 минут. Удаление спирта производилось путем помещения образцов в ГМДС на 30 минут, после чего производилось сушка на воздухе.

Фенотипический экспрессионный профиль культивируемых МСК оценивали методом ПЦР в реальном времени. Исследовали экспрессию генов-маркеров, отображающих процессы пролиферации и дифференцировки (таблица 2.3).

Ген	Функции	
BGLAP		
BMP1		
BMPR1A		
COL1A1		
COL3A1		
EGFR		
FGF-2		
FGFR1		
IGF1	Маркеры МСК и их дифференцировки	
IGFR1		
RUNX2		
SMAD2		
SMAD4		
SMAD5		
SPP1		
TGFBR1		
VDR		
ALPL		
JAG1	Поддержание стволовости (Notch сигналинг)	
NOTCH1		
CD34	Маркер уменьшения стволовости	
BMP7	Маркер самообновления	
TWIST1	Маркер миграции клеток	

Таблица 2.3 – Функциональные группы генов, экспрессия которых оценивалась в работе

Маркерные гены были взяты из баз данных Qiagen для ПЦР профилирования (Qiagen, Германия). Праймеры для каждого маркерного гена подбирали с помощью программы PrimerEpress (Applied Biosystems, США). Для выделения общей матричной РНК из клеток использовали набор № К0600 (Силекс, Россия). Далее, полученная мРНК использовалась для синтеза комплементарной ДНК (кДНК), с помощью набора № К0203 (Силекс, Россия).

В качестве матрицы для ПЦР в реальном времени использовали кДНК (ABI Prism 7500 SDS, Applied Biosystems, США), при использовании набора, содержащего интеркалирующий краситель SybrGreen и референсный краситель ROX (Синтол, Россия). Специфичность реакции поверялась путем исследования продуктов амплификации ЭФ в 2 % агарозе и на кривых температурной диссоциации полученных ампликонов.

Биосовместимость и время резорбции скэффолдов также оценивали *in vivo*, используя экспериментальную модель подкожной имплантации. Организация работы соответствовала этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных (Европейская конвенция EST № 123 от 18 марта 1986 г. о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург); приказ Минздрава РФ № 267 от 19 июня 2003 г. "Об утверждении правил лабораторной практики"). Исследования выполняли на половозрелых самцах крысы линии Wistar массой 250 г, полученных из питомника РАМН "Столбовая" (Московская область, Россия). Исследуемый полимерный материал имплантировали в асептических условиях после внутрибрюшинного кетаминового наркоза.

Кожный разрез выполняли на спине экспериментального животного, в подкожной клетчатке формировали карманы, куда помещали исследуемый стерильный материал. Одному животному одновременно имплантировали шесть вариантов полимерного матрикса, в индивидуально сформированные карманы в подкожной клетчатке.

Животные выводились из эксперимента на 7, 14 и 21 сутки, после чего образцы фиксировались в нейтральном формалине с концентрацией 5 %. Полученные образцы последовательно помещались в спирты возрастающей концентрации (40, 50, 60, 70, 80, 95, 100 %). Длительность пребывания образцов в каждом спирте составляла 12 часов, в 100 %-спирте образцы находились 24 часа. Следующим этапом было погружение в хлороформ на 1 час, затем в смесь хлороформа с парафином на 1,5 часа. В дальнейшем образцы помещались в парафин (три порции) – по 1,5 часа в каждую порцию. После этого образцы заливались парафином и остужались при комнатной температуре.

При помощи полуавтоматического микротома "МЗП-01 Техном" (Техном, Россия) изготавливали срезы полученных парафиновых блоков толщиной 6 мкм – не менее пяти срезов на одно гистологическое стекло. Стекла окрашивали гематоксилином и эозином. После окрашивания на срезы наносили канадский бальзам и закрывали покровным стеклом. Для

микроморфоскопии проводили съемку не менее пяти репрезентативных изображений из различных регионов образца при увеличении ×200 на микроскопе Leica DM-1000 (Leica Microsystems, Германия) при помощи фотокамеры (Nikon, Япония) с разрешением 7 Мпикселей. Микроскопическое строение исследовали с использованием программы ImageTool 3.0 (Department of Dental Diagnostic Science, CIIIA).

2.3.10 Статистический анализ данных

Данные были получены путем многократного повторения экспериментов (минимум n = 3) и измерений и представлены как среднее \pm среднее квадратичное отклонение в программе Origin (Originlab, CША). Обработка и вычисление статистической значимости были проведены с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (тест Тьюки), который представлен модулем Statsmodels для языка программирования Python (*p<0,01, **p<0,25, ***p<0,5).

3. Оптимизация способов получения скэффолдов, структурные особенности и физикохимические свойства композитных скэффолдов

3.1 Реологические свойства растворов поликапролактона различных концентраций и композитных смесей, содержащих микрочастицы порошков модифицированного гидроксиапатита

Вязкость полимерного раствора оказывает значительное влияние на процесс экструзии в процессе ЭФ и находится в прямой зависимости от концентрации (С) исходного полимера в смеси. Обычно, увеличение концентрации раствора приводит к увеличению его вязкости [107]. Тип растворителя также играет важную роль в оптимизации концентрации раствора для процесса ЭФ при заданных параметрах технологического процесса. Известны работы, в которых использовался чистый полимер ПКЛ (М = 80000 кДа) в совокупности с такими растворителями как хлороформ, дихлорметан, метанол, диметилформамид, ацетон, этанол, уксусная и муравьиная кислоты, как в чистом виде, так и в смеси. К примеру, в работе Reneker и др. исследовалась возможность использования растворенного в ацетоне ПКЛ, при варьировании концентрации исходной смеси от 14 до 18 мас.%. В данной работе наиболее оптимальным показал себя раствор с концентрацией 15 мас.%, который был в дальнейшем использован для оптимизации и изучения процесса ЭФ при различных параметрах [108]. Yoshimoto и др. успешно использовали ПКЛ при 10 мас.% в растворе хлороформа при ЭФ скэффолдов, предназначенных для замещения дефектов костных тканей [109], a Shin и др. электроформовали раствор ПКЛ при использовании смеси хлороформа и метанола в соотношении 1:1 аналогичной концентрации для создания сердечного трансплантата [110]. Также, в работе Yu и др. была использована аналогичная концентрация полимерного раствора ПКЛ в смеси дихлорметана и этанола в соотношении 4:1 для создания волокнистых структур с целью обеспечения направленной регенерации костных тканей [111]. Fujihara и др. электроформовали скэффолды для регенерации костных тканей раствором полимера ПКЛ и наночастиц карбоната кальция (CaCO₃) в смеси хлороформа и метанола (75:25 мас.%) с концентрацией от 3 до 7,5 мас.%. Наиболее оптимальный вариант с равномерной пористой волокнистой структурой был получен в случае раствора с концентрацией 7 мас. %. Из литературных данных следует, что концентрация раствора из одного и того же полимерного материала с одинаковой молекулярной массой варьируется от типа используемого растворителя.

Существует четыре режима концентрации полимерного раствора: разбавленный, полуразбавленный с несвязанными в комплекс полимерными цепями, полуразбавленный со связанными в комплекс полимерными цепями и концентрированный [112]. Переход между

разбавленным и полуразбавленным режимами несвязанных в комплекс полимерных цепей происходит при концентрации, известной как концентрация перекрытия полимерных клубков (С*). При данной концентрации отдельные полимерные цепи, которые были разделены молекулами растворителя в разбавленном режиме, начинают перекрываться друг с другом, но все еще остаются в значительной степени неспутанными. Для достижения стабильности полимерной струи в процессе ЭФ, концентрация полимера должна быть несколько выше значения С*.

В ходе данного исследования, при оптимизации концентрации формовочного раствора, диапазон значений был выбран на основании существующих работ, в которых использовался полимер ПКЛ с М = 80000 кДа. Для экспериментального определения значения С* были подготовлены полимерные растворы различной концентрации в диапазоне от 3 до 15 мас.%, после чего была измерена их вязкость, выявлена зависимость между вязкостью и концентрацией, а также определена точка пересечения линейный аппроксимаций между областями разбавленных и концентрированных растворов (рисунок 3.1).



Рисунок 3.1 – Зависимость вязкости от величины концентрации полимерного раствора

По завершении эксперимента было установлено значение C* = 7,9 мас.%, из чего следует, что стабильность струи во время формирования скэффолдов будет сохранятся при значениях выше значения 7,9 мас.%. Для практического подтверждения были подготовлены формовочные растворы с концентрацией 6, 9 и 12 мас.% с учетом найденного значения C*. Далее, был проведен процесс ЭФ при следующих технологических параметрах: электрическое напряжение – 8 кВ,

расход полимерного раствора – 1 мл/час, расстояние между двумя электродами – 7 см, скорость вращения коллектора – 600 об/мин. На рисунке 3.2 представлены снимки, полученные с ОМ.

В ходе эксперимента из полимерного раствора с концентрацией 6 мас.%, были получены полимерные образцы состоящие из волокон, характеризующихся наличием веретенообразных дефектов в виде «бусин» или «капель». При этом было отмечено, что во время процесса ЭФ при этой концентрации периодически происходит скопление полимерных сгустков на конце фильеры, которые периодически срываются с острия и оседают на новообразованной полимерной подложке. Предположительно, при использовании более низкой концентрации будет происходит электрораспыление полимерных растворов [77]. Использование полимерного раствора с концентрацией 12 мас.% привело к образованию полимерных подложек с неразвитой пористостью, состоящих из структур субмикронного размера.

Подача полимерного раствора, ввиду слишком высокой вязкости происходила затруднительно, и, с течением времени полностью прекращалась. Однако, при использовании полимерного раствора с концентрацией 9 мас.%, были получены полимерные подложки с развитой пористой и волокнистой структурой (диаметр волокон 5,52±0,27 мкм), имеющей межволоконные пустоты (поры), которые необходимы для направленного роста клеточных культур.



Рисунок 3.2 – Изображения поверхности сформированных ПКЛ полимерных образцов из растворов различной концентрации (*a*) 6 мас.%, (*б*) 9 мас.%, (*в*) 12 мас.%. Стрелками показаны бусинные, дефектные структуры на поверхности полимерной подложки

В результате комплексного анализа и визуальной оценки течения процесса ЭФ, были установлены приблизительные области электрогидродинамического распыления раствора $C \le 5$ мас.%, его неустойчивого $6 \le C < 8$ мас.%, и устойчивого ЭФ 8 < C < 10 мас.%, а также зона прекращения волокнообразования $C \ge 11$ мас.%, вследствие высокого параметра вязкости.

На основании полученных данных для исследований выбран полимерный раствор с концентрацией 9 мас.% и вязкостью 1,6 Па × сек.

Для исследования влияния микрочастиц порошков модифицированного ГА на вязкость композитных растворов, были проведены дополнительные измерения вязкости композитных растворов, содержащих в составе микрочастицы SrГA и SiГA в концентрациях 5, 10 и 15 мас.%. Результаты исследования вязкости растворов представлены на рисунке 3.3. Как видно из графика, отчетливо прослеживается тенденция увеличения вязкости композитных растворов с увеличением концентрации микрочастиц порошков модифицированного ГА в полимерном растворе. При этом, наблюдаются отличия между типом замещенного ГА. Так, для композитных растворах, содержащих SrГA. В последующем, эти изменения могут оказать влияние на морфологию волокна в скэффолдах.



Рисунок 3.3 – Результаты исследования параметра вязкости композитных растворов, содержащих различную концентрацию SiГA и SrГA в растворе ПКЛ полимера и хлороформа с концентрацией 9 мас.%

3.2 Влияние параметров процесса электроформования на размер и ориентацию микроволокон в скэффолдах

Важным этапом в оптимизации процесса ЭФ является подбор оптимальных параметров, обеспечивающих стабильность получения микроволокнистых структур. Такие параметры включают в себя: электрическое напряжение, расход полимерного раствора, расстояние между двумя электродами, а также скорость вращения коллектора. В данной работе был выполнен поиск оптимального способа получения скэффолдов путем подбора значений основных параметров технологического процесса. В эксперименте использовался полимерных ПКЛ-раствор с

концентрацией 9 мас.%. Для оценки влияния каждого параметра на структурно-морфологические свойства образца была выполнена серия экспериментов, в которых в процессе ЭФ искомый параметр изменялся, а значения остальных оставались фиксированными. После этого производилась оценка поверхности полученных скэффолдов методом ОМ.

На первом этапе изучалось влияние значения электрического напряжения. Для этого значения параметра варьировались в диапазоне от 7 до 10 кВ, в то время как расход полимерного раствора составлял 1 мл/час, расстояние между двумя электродами было установлено на 7 см, а скорость вращения коллектора составила 600 об/мин. Данные, полученные с помощью ОМ, и зависимость среднего диаметра волокна от установленного напряжения представлены на рисунке 3.4. Следует отметить, что в данном конкретном случае значение напряжения равное 7 кВ является граничным, ниже которого не происходит образования полимерной струи.



Рисунок 3.4 – Зависимость между средним диаметром волокон и электрическим напряжением. Нумерация на микрофотографиях поверхности скэффолдов соответствует порядковым номерам

Из микрофотографий видно, что независимо от значения электрического напряжения была сформирована взаимосвязанная пористая структура с равномерной морфологией волокон. Однако, средний диаметр волокон уменьшился с 7,13 \pm 0,30 мкм до 3,53 \pm 0,17 мкм при увеличении напряжения от 7 до 10 кВ (R² = 0,9452), что обусловлено увеличением напряженности электрического поля, и, как следствие кулоновских сил, действующих на полимерный раствор, и приводящих к вытяжке струи. При превышении максимально заданного значения (10 кВ), происходила дестабилизация раствора, приводящая к разрушению полимерной струи. Для дальнейшей работы было выбрано значение электрического напряжения равное 8 кВ, ввиду стабильного образования волокон с минимальным отклонением диаметра от среднего значения.

На втором этапе, для определения оптимальной величины расхода полимерного раствора, значение параметра варьировалось в диапазоне от 1 до 2,5 мл/час. Остальные параметры оставались постоянными: электрическое напряжение – 8 кВ, расстояние между двумя электродами – 7 см, скорость вращения коллектора – 600 об/мин. В результате была выявлена зависимость между скоростью расхода полимерного раствора и средним диаметром волокон ПКЛ, которая представлена на рисунке 3.5. Установлено, что средний диаметр волокон изменился от 5,52±0,28 мкм при 1 мл/час до 8,36±0,33 мкм при 2,5 мл/час ($R^2 = 0,9021$). Для сохранения высокой пористости полимерного скэффолда, зависящей от диаметра волокон, в дальнейшей работе скорость расхода полимера была принята равной 1 мл/час.

На следующем этапе, была определена зависимость между изменением межэлектродного расстояния и средним диаметром волокон ПКЛ (рисунок 3.6). Для этого, расстояние варьировалось от 5 до 9 см. В ходе исследования, параметры процесса, за исключением оптимизируемого, оставались постоянными: электрическое напряжение – 8 кВ, расход полимерного раствора – 1 мл/час, скорость вращения коллектора – 600 об/мин.

Было отмечено, что при расстоянии равном 5 см, происходило образование дефектной структуры в виде спаянных волокон, свидетельствующих о неполном испарении растворителя из полимерного раствора при достижении коллектора. Однако, при увеличении расстояния от 7 до 9 см было отмечено, что средний диаметр волокон уменьшался от $6,96\pm0,24$ до $4,39\pm0,15$ мкм ($R^2 = 0,9875$). Данная тенденция связана с увеличением времени движения струи от электрода к коллектору, за которое полимерное волокно может дополнительно вытягиваться, что приводит к уменьшению диаметра. Также, известно, что низкие значения рабочего расстояния могут приводить к образованию бусинных дефектов [113]. В случае расстояния 9 см были образованы волокна меньшего диаметра, однако при визуальном анализе при данных условиях наблюдалась низкая производительность работы вследствие того, что часть полимерных волокон не попадала на коллектор ввиду сильных флуктуаций полимерной струи в направлении движения к

коллектору. Таким образом, в дальнейшей работе рабочее межэлектродное расстояние было установлено на 7 см.



Рисунок 3.5 – Зависимость между средним диаметром волокон и скоростью расхода полимерного раствора. Порядковые номера на микрофотографиях поверхности скэффолдов соответствуют порядковым номерам на графике

На последнем этапе было изучено влияние скорости вращения коллектора. Известно, что с увеличением скорости вращения возможно варьировать степень выравнивания волокон, образуя тем самым беспорядочно и упорядоченно ориентированные волокнистые структуры [114]. Для выявления зависимости между скоростью вращения коллектора и степенью выравнивания волокон, значения скорости варьировались от 200 до 1000 об/мин (рисунок 3.7). Остальные параметры процесса были установлены согласно вышеизложенным результатам: электрическое

напряжение – 8 кВ, расход полимерного раствора – 1 мл/час, расстояние между двумя электродами – 7 см. На основании проведенной оценки диаметров волокон выявлено, что скорость вращения коллектора равная от 200 до 800 об/мин, позволяет получить беспорядочно ориентированные волокна. При этом, с увеличением скорости вращения коллектора значения диаметров уменьшаются от 6,17±0,25 до 2,82±0,14 мкм, что объясняется вытяжением волокон вдоль сечения крутящегося вала. Увеличение скорости вращения коллектора до 1000 об/мин приводит к ориентированию волокон вдоль продольной оси, что в свою очередь результирует на сокращении количества пор. Однако, полученные скэффолды сохраняют взаимосвязанную пористую структуру, и средний диаметр волокон составляющих поверхность равен 1,47±0,12 мкм.



Рисунок 3.6 – Зависимость среднего диаметра волокон от межэлектродного расстояния. Порядковые номера на микрофотографиях поверхности скэффолдов соответствуют порядковым номерам на графике

В результате проведенного исследования были определены оптимальные значения параметров технологического процесса ЭФ. Таким образом, для дальнейшей работы использовался следующий режим: электрическое напряжение – 8 кВ, расход полимерного раствора – 1 мл/час, расстояние между двумя электродами – 7 см. При этом для получения волокон с беспорядочным ориентированием, скорость вращения коллектора была установлена

на 600 об/мин, а для получения структуры с упорядоченным ориентированием волокон была выбрана скорость равная 1000 об/мин.



Рисунок 3.7 – Зависимость между средним диаметром волокон и скоростью вращения коллектора. Порядковые номера на микрофотографиях поверхности скэффолдов соответствуют порядковым номерам на графике

3.3 Исследование физико-химических свойств микрочастиц порошков модифицированного гидроксиапатита и поликапролактона

Согласно качественному анализу, проведенному методом РФА, результаты которого представлены на рисунке 3.8, на рентгенограммах микрочастиц порошков присутствуют характерные для гексагональной кристаллической решетки ГА четкие пики, в частности при 25,9° (002), 31,8° (211), 32,2° (112), 32,9° (300) (ICDD, № 9-432). Также, отмечается небольшое уширение линий дифракционных максимумов на дифрактограммах SrГA (рисунок 3.8 δ) и SiГA (рисунок 3.8 δ) микроагломератов порошков, относительного чистого ГА, что может быть обусловлено присутствием структурных дефектов, которые включают в себя несовершенства кристаллической решетки, микродеформации и микронапряжения [115]. Присутствие вторичных фаз, таких как СаО, α - или β -ТКФ не обнаружено.



Рисунок 3.8 – Рентгенограммы ГА (*a*) и модифицированных SrГА (*б*) и SiГA(*в*) микрочастиц порошков. Вертикальные линии демонстрируют положение линий ГА. Индексы Миллера приведены для ромбоэдрической сингонии элементарной ячейки ГА

В случае микрочастиц SrГA на дифрактограмме происходит небольшое уширение и смещение дифракционных максимумов в сторону меньших углов. Подобного рода явление указывает на процесс увеличения межплоскостного расстояния (*d*) в кристаллической решетке,

что в свою очередь приводит к увеличению параметров решетки происходящих во время встраивания ионов Sr в структуру ГА, так как ионный радиус Sr больше, чем у Ca (0,116 и 0,100 нм соответственно) [116].

В случае микрочастиц SiГA, как отмечается в литературных данных, направленных на исследование влияния замещения фосфатной PO_4^{3-} группы на силикатную SiO₄⁴⁻ в структуре ГА, при визуальном рассмотрении Si не оказывает значительного влияния на дифракционную картину ГА. Однако, также, как и в случае SrГA наблюдается уширение дифракционных максимумов [117], [118], [119].

Для уточнения влияния замещений в кристаллической решетке модифицированных микрочастиц порошков SrГA и SiГA были рассчитаны параметры кристаллической решетки методом Ритвельда (таблица 3.1).

Образцы	Параметры решетки			
	<i>a</i> , [Å]	<i>c</i> , [Å]	<i>V</i> , [Å ³]	ОКР, [нм]
ГА	9,4266	6,8856	529,89	85
SrΓA	9,4489	6,9107	534,34	123
SiΓA	9,4159	6,9008	530,85	64

Таблица 3.1 – Экспериментальные значения параметров кристаллической решетки

При расчете параметров кристаллической решетки SrГA отмечается увеличение *a* от 9,4266 Å до 9,4489 Å и параметра *c* от 6,8856 Å до 6,9107 Å, что приводит к увеличению объема кристаллической решетки от 529,89 Å³ до 534,34 Å³. Расчет ОКР показал, что при встраивании Sr²⁺ в решетку ГА средний размер кристаллитов увеличился от 85 до 123 нм.

В сравнении со значениями параметров кристаллической решетки чистого ГА, в случае SiГA происходит небольшое уменьшение параметра *a* от 9,4266 Å до 9,4159 Å и увеличение параметра *c* от 6,8856 Å до 6,9008 Å. Данные изменения согласуются с работой [118] и обусловлены сравнительно небольшими отличиями ионных радиусов PO_4^{3-} (0,238 нм) и SiO₄⁴⁻ (0,240 нм), что также повлияло на увеличение объема элементарной ячейки от 529,85 Å³ до 530,85 Å³. При сравнении средних значений размеров кристаллитов для чистого ГА и SiГA, рассчитанных по формуле Дебая-Шеррера (2.6), показали уменьшение значения с 85 до 64 нм соответственно. Данными расчетами объясняется причина уширения линий на дифрактограмме SiГA [118]. Из литературных данных известно, что с увеличением концентрации Si в кристаллической структуре ГА параметр *a* также увеличивается [120], [121], однако, в нескольких работах наблюдалась противоположная тенденция [117], [122]. С другой стороны, в литературе не представлено спорных данных относительно изменения параметра *c*, который, как было показано в данной работе увеличивается с добавлением иона SiO4⁴⁻.

Молекулярный состав микроагломератов порошков был исследован методом ИКспектроскопии. На рисунке 3.9 представлены ИК-спектры для чистого ГА, а также модифицированных SiГA и SrГA.



Рисунок 3.9 – ИК-спектры ГА (*a*) и модифицированных SrГА (*б*) и SiГА (*в*). Вертикальные линии демонстрируют положение полос, соответствующих колебаниям молекулярных связей в кристаллической решетке ГА

В исследуемом не модифицированном ГА порошке наблюдаются полосы поглощения, соответствующие колебаниям кристаллической решетки ГА в диапазоне волновых чисел 1100–400 см⁻¹ [123]. Так, характерные полосы, соответствующие колебаниям фосфатной группы при 1087, 1024 и 962 см⁻¹ относятся к ассиметричным v_3 и симметричным v_1 валентным P–O колебаниям. Также, полосы поглощения в интервале волновых чисел 601–565 см⁻¹ относятся к деформационными v_4 колебаниям O–P–O связей. Присутствие дублета в этой области свидетельствует об упорядоченном расположении ионов P–O в структуре апатита. Известно, что по мере увеличения кристалличности дублет становится более разделенным или раздробленным, а при снижении кристалличности максимумы при 601 и 565 см⁻¹ уширяются и становиться плохо различимыми между друг другом [124]. Колебание при 474 см⁻¹ относится к деформационными v_2 колебаниям O–P–O связей О–С–O в кристаллической структуре ГА. Полосы при 3575 и 632 см⁻¹ частотах обусловлены колебаниями связей O–H–группы.

ИК-спектры отожженного SrГA хорошо согласуются с характерными колебаниями PO_4^{3-} и OH⁻ в решетке ГА. В работе [125] было установлено, что включение Sr²⁺ в кристаллическую решетку ГА влияет на полосы поглощения фосфатов кальция, а именно, происходит сдвиг

сигнала на более низкие волновые числа. В настоящей работе также наблюдается схожий эффект, а именно, полосы поглощения, наблюдаемые при 962 см⁻¹ (v_1 P–O), 601 и 565 см⁻¹ (v_4 P–O), сдвигаются до 958, 597 и 563 см⁻¹, соответственно. Также отмечен небольшой сдвиг O–P–O связи при 474 см⁻¹ до 471 см⁻¹. При этом, полосы поглощения, характерные для OH⁻-группы в решетке ГА при 3575 и 632 см⁻¹, менее интенсивны, в сравнении с чистым ГА. Из анализа ИК-спектра следует, что Sr²⁺ вызывает изменения в локальной химической среде функциональных PO₄^{3–} и OH⁻ групп, что приводит к явно наблюдаемым изменениям в спектре.

Гидроксильные группы расположены вдоль оси c, внутри промежутков, сформированных тремя катионами Ca²⁺, образующими плоские треугольники, перпендикулярные O–H-связям. Присутствие ионов Sr²⁺ в этом положении создает сильное возмущение в решетке по ионному радиусу и электроотрицательности. Более того, анизотропное удлинение кристаллической решетки за счет ионного радиуса Sr²⁺ вдоль оси c влечет за собой уменьшение пространственной плотности связей O–H, т. е. ограничивает набор O–H связей на единицу объема. Влияние Sr²⁺ на ИК-спектр ГА подтверждается схемой компенсации заряда, описанной формулой 2.1.

При анализе микрочастиц отожженного порошка, содержащего 0,8 моль SiO₄^{4–} также присутствуют колебания, характерные для фосфатной группы (деформационные колебания O– P–O при 602 и 564 см⁻¹ и валентные колебания P–O при 1087, 1024 и 962 см⁻¹) чистого ГА. Однако, в сравнении с ИК-спектром чистого ГА, на спектре SiГA также, как в случае с SrГA обнаружены изменения в ИК-спектре (рисунок 3.9 *в*). Так, на спектре присутствуют полосы поглощения при 945, 890, 830, которые относятся к Si-O колебаниях в SiO₄^{4–} ионах в кристаллической решетке ГА. Кроме того, было отмечено, что присутствие Si в кристаллической решетке гА. Кроме того, было отмечено, что присутствие Si в кристаллической отлощения, относящихся к OH-группам (при 3572 и 630 см⁻¹) [126].

Так как процесс замещения PO_4^{3-} на SiO₄⁴⁻ носит не изовалентный характер, это значит, что дополнительный отрицательный заряд, введенный SiO₄⁴⁻ должен быть компенсирован с помощью какого либо механизма, например создания новых анионных вакансий [127]. Изменения в ИК-спектре при добавлении SiO₄⁴⁻ в кристаллическую структуру ГА подтверждают схему компенсации заряда посредством участия OH⁻, описанную формулой 2.2.

При характеристике фосфатов кальция важное значение имеет соотношение Ca/P, которое определяет скорость растворения и механические свойства материала [128], [129], [130]. Так, чем ниже значение Ca/P, тем выше растворимость материала и ниже механические свойства. Далее, с увеличением значения Ca/P до значения 1,67 скорость растворения снижается, а механические свойства увеличиваются и достигают пикового значения, при этом если величина Ca/P>1,67, то механические свойства также снижаются. В минеральной фазе природного ГА соотношение Ca/P

варьируется в зависимости от различных факторов (тип костной ткани, половая принадлежность, условия жизнедеятельности и т.д.) от 1,37 до 2,07 [131], [132].

Согласно исследованию методом ЭДРА в исследуемых порошках присутствуют такие элементы как Ca, P, O, Sr и Si. Количественное содержание Ca, P, Sr и Si элементов в ГA, SrГA и SiГA представлено в таблице 3.2. При этом, для чистого ГA отношение Ca/P равно 1,66±0,01, для SrГA отношение Ca+Sr/P составляет 1,74±0,08, а для SiГA и отношение Ca/P+Si равно 1,70±0,03. Эти значения близки к стехиометрическому ГA с формулой элементарной ячейки Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂. В сравнении с ГA, увеличение соотношения Ca/P в случае модифицированных ГA может служить доказательством катионных и анионных замещений в кристаллической решетке. Также в случае SrГA происходит уменьшение Ca, что косвенно может служить доказательством замещения Ca²⁺ на Sr²⁺. В случае SiГA происходит уменьшение количества P, что также свидетельствует о замещении PO₄³⁻ на SiO₄⁴⁻ [133].

Элемент	Количественное содержание, [ат. %]				
	ГА	SrΓA	SiΓA		
Ca	62,32±0,25	57,74±1,52	62,39±0,54		
Р	37,68±0,25	37,21±0,21	32,84±0,99		
Si	_	_	5,76±0,48		
Sr	_	4,87±0,28	_		
Отношение -	Ca/P	Ca+Sr/P	Ca/P+Si		
	1,66±0,01	$1,74{\pm}0,08$	1,70±0,03		

Таблица 3.2 – Элементный состав ГА и модифицированных SrГA и SiГA

Для изучения пространственной структуры, размера и формы микрочастиц порошков, были получены СЭМ-изображения, представленные на рисунке 3.10. Данные порошкообразные субстанции являются полидисперсными кристаллическими системами, которые состоят из агломератов наночастиц, тем самым образующими макро- и мезопористую структуру. Агломерация может происходить на стадии отжига, в процессе приготовления порошка [134].

При увеличении изображения в 10000 раз видно, что выступающие агломераты имеют форму близкую к овальной или сферической (рисунок 3.10, правая колонка). Если условно предположить, что агломераты порошка имеют сферическую форму, то можно грубо оценить величину удельной поверхности (S_{уд}) с использованием формулы 2.5, по которой также можно судить о степени дисперсности порошка.

Так, после расчетов установлено, что S_{yg} , которая прямо пропорциональна дисперсности, уменьшается в следующем порядке: SiГA (16,7±6,2 см²/см³) > ГА (11,4±5,6 см²/см³) > SrГA (7,7±3,1 см²/см³), что визуально подтверждается СЭМ-изображениями (рисунок 3.10 – правая колонка).



Рисунок 3.10 – СЭМ-изображения поверхности ГА (*a*), SrГА (*б*) и SiГА (*в*). Слева – увеличение ×10000, справа – увеличение ×50000

Известно, что при добавлении различных модификаторов в структуру ГА наблюдается уменьшение размеров зерна [135], [134]. При увеличении в 50000 раз возможно различить зеренную структуру, составляющую агломераты порошков (рисунок 3.10 – правая колонка).

Согласно результатам статистического анализа (рисунок 3.11) распределение зерен для всех образцов является одномодальным. Для ГА размер зерен находится преимущественно в диапазоне от 100 до 500 нм, при этом также встречаются зерна размером 600–700 нм. В случае SrГA преимущественное распределение размера зерен составляет от 100 до 400 нм, при этом также, как и в случае чистого ГА встречаются более крупные зерна размером 600–800 нм. Однако, в случае SiГA наблюдается широкий разброс в размере зерна от ~ 50 нм до 400 нм. При этом также встречаются зерна размером 600–800 нм. При этом также встречаются зерна размером 600–800 нм. Однако, в случае SiГA наблюдается широкий разброс в размере зерна от ~ 50 нм до 400 нм. При этом также встречаются зерна размером 600–800 нм. При сравнении среднего размера зерен модифицированных порошков с чистым ГА можно заключить, что пики локализованы в области 308±136 нм (ГА), 292±154 нм (SrГA) и 266±156 (SiГA).



Рисунок 3.11 – Распределение зерен по размеру в ГА (*a*), SrГА (*б*) и SiГА (*в*). d_{cp} – средний размер зерна, σ_d – среднее квадратичное отклонение

При детальном рассмотрении единичных агломератов, представленных на рисунке 3.12, в случае SrГA порошка можно обнаружить более угловатую, треугольную форму. Изменение формы также может свидетельствовать о влиянии замещения Ca²⁺ на Sr²⁺ в структуре ГА [136]. Однако, данные наблюдения носят единичный характер и в основной массе форма частиц идентична вне зависимости от типа ГА. Некоторые исследования, представленные в литературе показали, что условия синтеза (такие как pH, температура и т.д.) влияют на результирующую морфологию частиц [137], [138]. Поскольку в настоящем исследовании порошки готовились при одинаковых условиях, это объясняет отсутствие значительных изменений в морфологии частиц.

Таким образом, проведенный комплексный анализ порошков, полученных методом механохимического синтеза показал, что выбранные для дальнейшей работы SrГA и SiГA являются однофазными и нанокристаллическими с размером кристаллитов 123 и 64 нм для SrГA и SiГA, соответственно. Вхождение Sr и Si элементов в структуру элементарной ячейки обусловлено дефектностью кристаллической решетки за счет изменения ее параметров, что предположительно повышает скорость растворения материала в жидкостях организма, тем самым ускоряя процесс ремоделирования. Установлено, что образцы микрочастиц порошков

имеют молекулярные связи, характерные для природного ГА, а соотношение элементов в порошках близки к стехиометрическому ГА (1,67).



Рисунок 3.12 – Единичные агломераты SrГA (а) и SiГA (б) порошков

Выбор концентрации Sr и Si в структуре ГА, равной 0,8 моль, основывался на анализе литературных данных, направленных на исследование различного количества замещений в кристаллической решетке ГА [139], [134], Так как количество замещения носит ограниченный характер, считается что небольшого количества 0,5–1 мас.% уже достаточно для достижения значительных биомиметических улучшений [140], [141].

Для изучения химического и молекулярного составов используемого в данной работе полимера ПКЛ, были подготовлены экспериментальные образцы в виде пленок методом ЭФ.

На рентгенограмме полимера (рисунок 3.13 *a*) наблюдается обширное аморфное гало с угловой шириной ~ 10–30° и рефлексы, характерные для фазы ПКЛ при 21,3°, 21,9° и 23,7°, которые соответствуют плоскостям (110), (111) и (200), что подтверждает поликристаллическую структуру полимера.

Из литературных данных известно, что ПКЛ обладает орторомбической кристаллической решеткой, принадлежащей к $P2_12_12_1$ пространственной группе. На основании этих данных были рассчитаны параметры кристаллической решетки ПКЛ с использованием метода Ритвельда. В результате были получили следующие значения: a = 7,521(4) Å, b = 17,186(6) Å, c = 4,9885(12) Å, $V^3 = 644,8(4)$ Å³, которые соответствуют представленным в литературе результатам [53]. Молекулярный состав полимера представлен на рисунке 3.13 *б*.



Рисунок 3.13 – рентгенограмма (а) и ИК-спектр (б) полимера ПКЛ

На ИК-спектре показаны основные полосы, характерные для ПКЛ при 2943 и 2864 см⁻¹ (ассиметричные и симметричные вибрационные колебания CH₂), 1722 см⁻¹ (колебания C=O), 1294 см⁻¹ (колебания C–O и C–C в кристаллической фазе), 1240 см⁻¹ (ассиметричные колебания COC), 1186 см⁻¹ (колебания OC–O), 1163 см⁻¹ (симметричные колебания COC) и 1157 см⁻¹ (колебания C–O и C–C в аморфной фазе).

3.4 Определение влияния минимальной концентрации кремнийзамещенного гидроксиапатита на свойства скэффолдов

На начальном этапе создания композитных скэффолдов, содержащих в составе SrГA и SiГA микрочастицы порошков, были проведены предварительные исследования, позволившие определить эффективность минимальной концентрации порошка на различные свойства конечного образца. Значение минимальной концентрации было выбрано равным 5 мас.%. В качестве экспериментального материала был синтезирован ПКЛ скэффолд в сочетании с 5 мас.% SiГA имеющий беспорядочное ориентирование волокон. Кроме того, дополнительно в качестве эталонного образца был синтезирован скэффолд из чистого ПКЛ материала.

3.4.1 Морфологические и физико-химические свойства

Морфология ПКЛ и ПКЛ5SiГА композитных скэффолдов представлена на рисунке 3.14. Скэффолды, состоящие из ПКЛ материала, обладают пористой, взаимосвязанной структурой и площадью поверхности, необходимой для клеточной пролиферации и интеграции [142]. Согласно микрофотографиям морфология является однородной, со средним диаметром волокон 6,85±1,14 мкм, и средним размером пор 39,53±11,84 мкм. В случае композитного скэффолда, содержащего в составе наночастицы SiГA, наблюдается также, как и в случае чистого ПКЛ, взаимосвязанная пористая структура, однако распределение размера волокна находится от нано- до микромасштаба.

Средний диаметр волокон составил 6,89±3,96 мкм, при этом средний размер пор равен 57,25±36,30 мкм. Скэффолд, предназначенный для направленной регенерации тканей, должен содержать, с одной стороны, поры малого диаметра для предотвращения быстрого роста и миграции клеток соединительной и эпителиальной ткани а, с другой стороны, макропоры, способствующие росту и интеграции костной ткани [143].

При добавлении частиц SiГA наблюдаются заломы и неравномерная толщина волокна по всей площади поверхности. Схожий эффект наблюдался в работах [144], [145] при смешивании различных неорганических частиц с полимерами в процессе ЭФ. В случае SiГA данный эффект может быть связан с неравномерностью распределения порошковой составляющей в растворе полимера, влияющей на увеличение проводимости полимерного раствора. Присутствие нано- и микрочастиц в структуре полимера в процессе ЭФ позволяет увеличить пористость и создать бимодальное распределение диаметра волокон от нано- до микромасштаба, что, в свою очередь, способно благотворно сказываться на пролиферации клеток костной ткани [146].

Исследование дифракции рентгеновских лучей в композитном скэффолде (рисунок 3.15 б) показало характеристические пики, соответствующие полимерному материалу ПКЛ. Наиболее узкие и интенсивные дифракционные максимумы, характерные для ПКЛ, наблюдаются при углах $2\theta = 21,3^{\circ}$, $21,9^{\circ}$ и $23,8^{\circ}$, соответствующих ромбической кристаллической решетке полимерного материала с отражающими плоскостями (110), (111) и (200). Однако, фаза порошкового материала SiГA представлена слабовыраженной. Можно отметить наиболее заметные рефлексы при $31,8^{\circ}$ (211), $32,2^{\circ}$ (112), $32,9^{\circ}$ (300) и $34,1^{\circ}$ (202). Также можно отметить слабые пики 222 и 213 при $2\theta = 46,7^{\circ}$ и $49,5^{\circ}$ соответственно. Идентификация фазы Siгидроксиапатита в области 10° – 20° была затруднена ввиду перекрывающих по интенсивности пиков ПКЛ. По сравнению с дифрактограммой микрочастиц порошка (рисунок 3.15 a) для композитного скэффолда наблюдается уширение дифракционных пиков, что говорит об уменьшении размера кристаллитов.


Рисунок 3.14 – СЭМ-изображения поверхности: ПКЛ (увеличение ×100) (*a*); ПКЛ5SiГА (увеличение ×100) (*b*); ПКЛ (увеличение ×1000) (*b*); ПКЛ (увеличение ×1000) (*b*); ПКЛ распределение диаметра волокна (*d*); ПКЛ5SiГА – распределение диаметра волокна (*e*)

Среднюю величину кристаллического зерна в составе ПКЛ скэффолда определяли по рефлексу 211 в соответствии с формулой 2.9. Таким образом, рассчитанное значение составило 14,4 нм.



Рисунок 3.15 – Рентгенограммы скэффолдов: (а) микрочастицы SiГA; б) ПКЛ; в) ПКЛ5SiГA

ИК-спектры поглощения ПКЛ5SiГА скэффолдов (рисунок 3.16) демонстрируют молекулярные связи, типичные для ПКЛ и наночастиц SiГА.



Рисунок 3.16 – ИК-спектры: микрочастицы SiГA (*a*); ПКЛ5SiГA (*б*); ПКЛ (*в*). Справа в увеличенном масштабе представлена выделенная область

В частности, характерными для ПКЛ являются линии при 2943, 2864, 1722, 1294, 1240, 1186, 1163, и 1157 см⁻¹ (рисунок 3.16 *в*) [104]. В случае гибридного скэффолда была выявлена полоса поглощения 630 см⁻¹, характерная для гидроксильной группы ОН⁻ и полосы 600 и 573 см⁻¹, соответствующие деформационным колебаниям группы PO₄³⁻ (рисунок 3.16 *б*). Следует

отметить, что интенсивный пик 962 см⁻¹, характерный для валентных колебаний PO_4^{3-} в SiГA, не наблюдается в ИК-спектре композитного скэффолда, предположительно вследствие перекрытия интенсивным пиком колебаний связей С–О в полимере. Кроме того, молекулярные связи, характерные для SiO4⁴⁻, также не были зафиксированы на спектре, предположительно ввиду малой концентрации микрочастиц порошка в структуре полимерной матрицы.

Таким образом, по результатам анализа, кроме характерных дифракционных максимумов и линий, соответствующих ПКЛ и SiГA, сторонние примеси зафиксированы не были. Результаты смачивания поверхности образцов на основе чистого ПКЛ и ПКЛ5SiГA показали, что образцы обладают гидрофобной поверхностью (угол смачивания > 90°) и значения краевого угла для ПКЛ и ПКЛ5SiГA составили 132,26±3,38° и 128,24±3,56°. Однако на данном этапе не удалось выявить существенных различий в значении краевого угла смачивания, предположительно из-за малой концентрации частиц в структуре ПКЛ-скэффолда.

3.4.2 Оценка эффективности скэффолдов с помощью биологических in vitro и in vivo тестов

Результаты исследования адгезионной и пролиферативной активности МСК человека при культивировании на поверхности гибридных скэффолдов, проведенного методами СЭМ и флуоресцентной микроскопии, приведены на рисунках 3.17 и 3.18. Клетки, культивируемые на поверхности всех исследуемых материалов, имеют характерную МСК для фибробластоподобную морфологию. Введение в состав материала 5 мас.% SiГA несколько снижает его адгезионные свойства, что выражается в изменении морфологии клеток на начальном этапе культивирования. Однако, к 7 суткам культивирования в результате пролиферативной активности клеток на поверхности всех материалов формируется клеточный монослой. Количество нежизнеспособных клеток не превышает 2–3 % (данные не приведены), что свидетельствует о биосовместимости материалов и их способности поддерживать адгезию и пролиферацию МСК человека. Для определения влияния физико-химических характеристик скэффолдов на остеогенную дифференцировку МСК человека были исследованы изменения профиля экспрессии генов в клетках на 7 сутки при культивировании на поверхности исследуемых материалов. Методом ПЦР в реальном времени оценивали экспрессию 22 геновмаркеров, отображающих процесс дифференцировки МСК (таблица 3.3).



Рисунок 3.17 – Внешний вид клеток при инкубации на поверхности чистого ПКЛ скэффолда: сутки инкубации (*a*, *б*); 7 сутки инкубации (*в*, *г*)



Рисунок 3.18 – Внешний вид клеток при инкубации на поверхности композитного ПКЛ5SiГA скэффолда: сутки инкубации (*a*, *б*); 7 сутки инкубации (*b*, *c*)

Исследование показало, что уже на 7 сутки культивирования клеток на поверхности исследуемых ПКЛ и ПКЛ5SiГA скэффолдов наблюдаются различия в степени активации экспрессии генов маркеров остеогенной дифференцировки. В приведенной таблице 3.3 указана кратность изменения уровня транскриптов по отношению к стартовому значению после культивирования МСК.

При росте клеток, вне зависимости от материала, в них увеличивалось количество мРНКreнов TWIST, JAG1, NOTCH1 и TGFBR1. Продукт гена TWIST является одним из ключевых модуляторов остегенной и хондрогенной дифференцировки и, таким образом, определяет общую направленность дифференцировки МСК на ранних стадиях [147]. Продукты генов JAG1, NOTCH1 активируют и контролируют ранние стадии остеогенеза, одновременно при этом являясь ингибиторами поздних стадий дифференцировки [148]. Ген TGFBR1 стимулирует пролиферацию остеобластов, но при этом ингибирует их дифференцировку [149]. В клетках при росте на всех материалах существенно повышена экспрессия генов BMPR1A, BMP7, FGF-2, FGFR1, IGFR1, SMAD2 и SMAD5, что также говорит дифференцировке МСК в остеогенном направлении [150].

На некоторых материалах наблюдалась параллельная активация экспрессии и некоторых других генов. Так, на чистых ПКЛ-скэффолдах увеличивается уровень транскрипции генов SMAD4 и BMP1. Помимо этого на скэффолдах обоих типов возросло количество мPHK-коллагенов COL1A1 и COL3A1, отражающих процесс пролиферации и дифференцировки остеобластов. Кроме того наблюдалась активация транскрипции гена RUNX, являющегося ключевым транскрипционным фактором, регулирующим все этапы дифференцировки MCK в остеоциты и остеобласты [151]. Однако стоит обратить внимание на то, что транскрипция генов ALPL и VDR-маркеров терминальной дифференцировки и минерализации не отличалась от контрольных значений. Это явление обусловлено тем, что при данной длительности культивирования (7 дней) клетки еще не достигают терминальной дифференцировки.

При гистологическом исследовании чистых ПКЛ и композитных скэффолдов используя экспериментальную модель подкожной имплантации, были получены следующие результаты, представленные на рисунке 3.19. На 7 сутки после имплантации скэффолдов по краям образцов всех типов наблюдалась слабовыраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация (рисунок 3.19 *a*, *г*). В случае чистого ПКЛ-скэффолда на краю образца хорошо выражена полоса соединительной ткани. Данный факт свидетельствует об отсутствии врастания собственной соединительной ткани и, как следствие, инкапсуляции материала. Также в материале имеются полости различных размеров округлой формы.

Ген	ПКЛ	ПКЛ5ЅіГА
BGLAP	**3,3692	***-1,1192
BMP1	**2,4223	***1,152
BMPR1A	**4,6149	**13,3707
BMP7	**29542,41	**68827,62
FGF-2	**8,3218	**6,8074
FGFR1	**2,2082	**2,5867
IGF1	***1,4165	**1,1781
EGFR	*-2,9721	**5,0602
IGFR1	**10420,23	**6433,999
COL1A1	**2,4744	1,7928
COL3A1	**4,2228	**2,648
ALPL	***-1,3385	***-1,2178
SPP1	**7,9156	*-10,4781
RUNX2	**4,2178	**2,4225
SMAD2	**58,3556	**3,9125
SMAD4	**6,1415	***1,1401
SMAD5	**7,383	**3,7061
TWIST1	**9,6847	**5,2343
VDR	***-1,8445	*-5,9352
TGFBR1	**34,6672	**32,6384
JAG1	**63,9579	**14,1384
NOTCH1	**18,4807	**5,9182

Таблица 3.3 – Изменения фенотипического профиля МСК человека при культивировании на 7-е сутки на поверхности исследуемых материалов

* достоверное снижение уровня, ** достоверное увеличение уровня, ***отсутствие достоверных изменений.

В случае композита ПКЛ5SiГА выявлены полости небольших размеров полигональной формы. Данные полости не имеют содержимого, что косвенно свидетельствует о слабой биоинтеграции. Однако, на краю имплантата встречаются клеточные элементы преимущественно фибробластического ряда, которые проникают в толщу имплантата по балкам материала, в отличие от чистого ПКЛ-скэффолда, содержащего клетки частично фибробластического ряда. В ПКЛ-скэффолде встречаются единичные новообразованные кровеносные сосуды в собственной соединительной ткани на краю контакта с образцом, а в композитном – на некотором удалении от края.

На 14 сутки после имплантации скэффолдов наблюдалась небольшая лимфогистиоцитарная инфильтрация и, как следствие, практически полное отсутствие воспалительного процесса (рисунок 3.19 б, д). На этом фоне в случае чистого ПКЛ-скэффолда активизировались процессы биоинтеграции соединительной ткани и врастание собственной соединительной ткани по краю без проникновения в толщу образца. В случае композитного образца процессы биоинтеграции собственной соединительной ткани в имплантат были слабо

активизированы. Микроскопически это проявлялось в небольшом увеличении толщины балок материала за счет прироста соединительной ткани. Просвет полостей имел небольшие размеры. В обоих случаях новообразованные кровеносные сосуды встречались в малом количестве и в непосредственной близости от края имплантата.



Рисунок 3.19 – Поперечные срезы ПКЛ и ПКЛ5SiГA скэффолда: 7-е сутки после имплантации (*a*, *г*); 14-е сутки после имплантации (*б*, *д*); 21-е сутки после имплантации (*в*, *е*). Окраска гематоксилином и эозином, ×200

При исследовании ПКЛ-скэффолда на 21 сутки после имплантации наблюдалась выраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация по краю образца, и также отмечалось пропитывание образца инфильтратом (рисунок 3.19 *в*). Однако, оценить врастание соединительной ткани не представляется возможным. В материале имеются полости различных размеров округлой формы. В случае композитного скэффолда (рисунок 3.19 *e*) отмечается врастание собственной соединительной ткани в образец, что свидетельствует о выраженном процессе биоинтеграции. На балках между ячейками располагаются клетки фибробластического ряда. Кроме того, наблюдаются новообразованные кровеносные сосуды в собственной соединительной ткани на краю непосредственного контакта с образцом. На всех этапах анализа при использовании доступных методов окраски, солей кальция выявлено не было.

3.5 Краткие выводы по главе 3

Проведено комплексное исследование влияния вязкости полимерных растворов различной концентрации и параметров технологического процесса на стабильность полимерной струи в процессе ЭФ. На основании полученных данных было установлено, что стабильность струи во время формирования скэффолдов сохраняется при концентрации полимерного раствора 9 мас.% и вязкости 1,6 Па×сек. Добавление SrГA и SiГA микрочастиц и повышение их концентрации с 10 мас.% до 15 мас.% в полимерном растворе (концентрация 9 мас.%) приводит к увеличению параметра вязкости, при этом прослеживается разница между типом замещенного ГА. Так, для растворов ПКЛSiГA вязкость выше, чем для растворов ПКЛSiГA.

Установлено, что на величину диаметра волокон влияют такие параметры, как электрическое напряжение, расход полимерного раствора, расстояние между двумя электродами, а также скорость вращения коллектора. В ходе оптимизации процесса получения скэффолдов методом ЭФ был выбран режим, обеспечивающий наилучшую стабильность технологического процесса со следующими параметрами: электрическое напряжение – 8 кВ, расход полимерного раствора – 1 мл/час, расстояние между двумя электродами – 7 см. Степень выравнивания волокна зависит от скорости вращения коллектора. Для получения беспорядочно и упорядоченно ориентированных волокон скорость вращения коллектора была установлена на 600 и 1000 об/мин, соответственно.

Исследован фазовый, молекулярный и элементный составы ПКЛ-полимера и микрочастиц порошков SrГA и SiГA. Рентгенограмма и ИК-спектр ПКЛ показали характерные для полукристаллического полимера рентгеновские рефлексы и полосы поглощения. В микрочастицах порошков методом РФА установлено наличие Sr^{2+} и SiO4⁴⁻ ионов в кристаллической структуре ГА за счет изменения параметров кристаллической решетки, и, дополнительно, в случае SrГA, сдвига рефлексов в сторону меньших углов. Размер кристаллитов однофазных нанокристаллических порошков равен 123 и 64 нм для SrГA и SiГA, соответственно. На ИК-спектре SrГA происходит сдвиг сигнала в сторону более низких волновых чисел, свидетельствуя о присутствии Sr²⁺ в кристаллической решетке ГА. В случае SiГA наблюдаются характерные Si–O колебания в SiO₄^{4–} ионах. Элементный анализ поверхности SrГA и SiГA подтвердил присутствие таких элементов как Ca, P, Sr и Si, a их соотношение близко к стехиометрическому ГА (1,67).

При морфологическом анализе модифицированного ГА можно заключить, что удельная поверхность дисперсной системы уменьшается в следующем порядке: SiГA (16,7±6,2 см²/см³) > ГА (11,4±5,6 см²/см³) > SrГA (7,7±3,1 см²/см³), при этом средний размер зерен распределен следующим образом: 308±136 нм (ГА), 292±154 нм (SrГA) и 266±156 (SiГA).

Присутствие 5 мас.% микрочастиц SiГA в структуре полимерной матрицы позволяет увеличить пористость и создать бимодальное распределение диаметра волокон от нано- до микромасштаба. Предварительные биологические исследования свидетельствуют 0 биосовместимости образцов. При культивировании МСК на поверхности образцов происходит индукция и коммитирование дифференцировки МСК по остеогенному пути. Благодаря пористой структуре и биосовместимости используемых материалов скэффолды из ПКЛЅіГА могут быть использованы в изготовлении конструкций для восстановления дефектов костных тканей в организме пациента. Однако, на данном этапе исследования по результатам in vitro и in vivo тестов, затруднительно оценить влияние 5 мас.% частиц SiГA на биоактивные свойства ПКЛ скэффолда. Поэтому, требуется повысить концентрацию порошкового материала. В следующих главах приведены результаты исследования скэффолдов с 10 и 15 мас.% с беспорядочно и упорядоченно ориентированными волокнистыми структурами.

4. Морфологические, структурные и физико-химические свойства композитных скэффолдов на основе поликапролактона и модифицированных гидроксиапатитов

4.1 Исследование влияние концентрации микрочастиц модифицированного гидроксиапатита на морфологические свойства и внутреннюю структуру скэффолдов методом СЭМ и РКТ

В данной главе представлены результаты исследования морфологии, внутренней структуры беспорядочно и упорядоченно ориентированных волокон, а также фазовый, элементный и молекулярный составы скэффолдов, содержащих 10 и 15 мас.% микрочастицы порошков SrГA и SiГA. Морфология и структура скэффолда в значительной степени определяют эксплуатационные характеристики конструкции и представляют значительный интерес как для материаловедения, так и для физики конденсированного состояния.

Основываясь на результатах, представленных в главе 3, было увеличено содержание массовой доли микрочастиц порошков модифицированных ГА в процессе ЭФ до 10 и 15 мас.% с целью улучшения биоактивности скэффолдов. Предположительно, увеличение концентрации микрочастиц порошка в полимерной суспензии в процессе ЭФ позволит повысить содержание массовой доли микрочастиц порошков модифицированного ГА в полимерной матрице [152]. Для создания композитных скэффолдов использовались следующие параметры процесса ЭФ: электрическое напряжение – 8 кВ, расход полимерного раствора – 1 мл/час, расстояние между двумя электродами – 7 см. Экспериментально установлено, что электроформование полимерной суспензии, содержащей в составе концентрацию дисперсных наполнителей в виде SrГА или SiГА выше 15 мас.% невозможно ввиду снижения проходимости фильеры вследствие большого количества агломератов микронного размера.

Из литературных источников известно, что ориентация волокон в полимерном скэффолде оказывает значительное влияние на морфологию клеток [153], [154]. В частности, кортикальная кость обладает значительными анизотропными механическими свойствами, с высоко ориентированным ВКМ. В связи с этим, для успешной эксплуатации скэффолдов при их формировании необходимо учитывать природную структуру костной ткани [155]. Помимо влияния на морфологию, ориентация волокон также обеспечивает дополнительные преимущества. Так, например, в работе [156] было показано, что волокна с высокой степенью ориентации обладали улучшенной механической прочностью в продольном направлении. Для имитации иерархической организации структуры костной ткани, описанной в п. 1.2 были сформированы скэффолды с беспорядочно (имитация структуры губчатой кости) и упорядоченно (имитация структуры кортикальной кости) ориентированными вдоль оси

волокнистыми структурами при 600 и 1000 об/мин, соответственно. Известно, что в композитных материалах морфология и внутренняя структура, а также распределение компонентов порошковой составляющей в скэффолде оказывают существенное влияние на свойства материалов [156]. На рисунке 4.1 представлены СЭМ-изображения поверхности бПКЛ и уПКЛ скэффолдов.



Рисунок 4.1 – Микрофотографии скэффолдов и распределение диаметра волокон для: бПКЛ скэффолда (*a*–*в*), увеличение в 1000 раз (*a*), увеличение в 5000 раз (*б*); уПКЛ скэффолда (*z*–*e*), увеличение в 1000 раз (*c*), увеличение в 5000 раз (*d*). *d*_{*cp*} – средний размер зерна, *σ*_{*d*} – среднее квадратичное отклонение (300 измерений). Стрелками указано направление ориентирования

Морфология волокна характеризуются гладкой и равномерной поверхностью без видимых дефектов с взаимосвязанной пористой структурой, способной благоприятно влиять на жизнедеятельность клеточных культур [142], разброс значений диаметра волокон колеблется от 2 до 10 мкм. Скэффолды с беспорядочным ориентированием обладают развитой, пористой поверхностью со средним диаметром волокон $5,53\pm1,39$ мкм, при этом функция распределения диаметра носит одномодальный характер. Преимущественный значения диаметра волокон сосредоточены в области от 4 до 7 мкм (~ 73 %) при этом максимальный пик приходится на область от 6 до 7 мкм (~ 33 %).

В сравнении со скэффолдами с беспорядочно ориентированными волокнами, скэффолды с упорядоченным ориентированием имеют более плотную упаковку, вследствие чего происходит сокращение воздушного пространства между волокнами, и, как следствие уменьшение параметра пористости [157], что визуально подтверждается СЭМ-изображениями (рисунок 4.1 г-е). Средний диаметр волокон уменьшается до 5,35±0,93 мкм, при этом одномодальность распределения также, как и в случае уПКЛ скэффолда сохраняется. Из приведенного анализа видно, что около 50 % полученных значений лежат в диапазоне от 5 до 6 мкм и 22 % от 4 до 5 мкм, что также подтверждает снижение диаметра волокон. Предположительно причиной этого служит тангенциальная сила инерции, проявляющаяся при высокоскоростном вращении коллектора, вследствие чего происходит растяжение исходящей полимерной струи, приводящее к уменьшению диаметра волокон [154]. Меньший разброс в значениях диаметров уПКЛ в сравнении с бПКЛ образцами можно также связать со скоростью вращения коллектора, так как при высоких значениях скорости сокращается время влияния силовых линий электрического поля на полимерную струю во время прохождения расстояния между фильерой и коллектором. При введении добавок в виде микрочастиц порошков SrГA (рисунок 4.2, 4.3) и SiГA (рисунок 4.4, 4.5) происходит изменение характера распределения размера волокон с одномодального на би- и мультимодальный. В сравнении с диаметром волокон чистых ПКЛ образцов отмечается значительный разброс значений, колеблющийся от 0 до 30 мкм.

На гистограммах распределения диаметра волокон бПКЛ10SrГА и уПКЛ10SrГА скэффолдов (рисунок 4.2 *е, в*) видимы три максимальных пика. В случае бПКЛ10SrГА основные максимумы лежат в областях от 0 до 4 мкм, от 8 до 11 мкм и от 11 до 14 мкм. При сравнении, в случае уПКЛ10SrГА заметен сдвиг в область меньших значений, так как второй пик смещается в область от 4 до 7 мкм, а третий в область от 7 до 11 мкм. Средний диаметр волокон для бПКЛ10SrГА и уПКЛ10SrГА составил 4,73±4,86 мкм и 4,04±2,86, соответственно. Для бПКЛ15SrГА (рисунок 4.3 *в*) также характерно мультимодальное распределение диаметра волокон. Основные значения сосредоточены в областях от 0 до 4 мкм, от 5 до 9 мкм, от 9 до 14 мкм и от 19 до 22 мкм. В случае уПКЛ15SrГА (рисунок 4.3 *е*) наблюдается бимодальное

распределение диаметра волокон, основные пики располагаются от 0 до 5 мкм и от 10 до 15 мкм. Средний диаметр волокон для бПКЛ15SrГА составил 5,67±5,26 и 3,00±4,38 для уПКЛ15SrГА.



Рисунок 4.2 – Микрофотографии скэффолдов и распределение диаметра волокон для: бПКЛ10SrГА скэффолда (*a*–*e*), увеличение в 500 раз (*a*), увеличение в 2200 раз (*б*); уПКЛ10SrГА скэффолда (*z*–*e*), увеличение в 500 раз (*г*), увеличение в 2200 раз (*д*). *d_{cp}* – средний размер зерна, *σ_d* – среднее квадратичное отклонение (300 измерений). Стрелками указаны нанои микрочастицы модифицированного SrГА порошка



Рисунок 4.3 – Микрофотографии скэффолдов и распределение диаметра волокон для: бПКЛ15SrГА скэффолда (*a*–*в*), увеличение в 500 раз (*a*), увеличение в 2200 раз (*б*); уПКЛ15SrГА скэффолда (*z*–*e*), увеличение в 500 раз (*z*), увеличение в 2200 раз (*d*). *d_{cp}* – средний размер зерна, *σ_d* – среднее квадратичное отклонение (300 измерений). Стрелками указаны нанои микрочастицы модифицированного SrГА порошка

В случае бПКЛ10SiГА на гистограмме распределения диаметра волокон (рисунок 4.4 *в*) наблюдаются три максимальных пика, расположенных в интервалах от 0 до 4 мкм, от 4 до 7 мкм,

от 10 до 13 мкм и от 28 до 29 мкм. Максимальный пик расположен в области от 4 до 7 мкм и среднее значение диаметра волокон составило $6,19\pm5,44$ мкм. В случае уПКЛ10SiГA (рисунок 4.4 *e*) произошел сдвиг пиков в сторону меньших значений, занимающие области от 0 до 3, от 3 до 7 и от 8 до 12 мкм. Максимальный пик сместился в область от 3 до 7 мкм и среднее значение диаметра волокон при этом составило $4,67\pm3,19$ мкм. При увеличении концентрации микрочастиц порошка SiГA до 15 мас.% также как и в случае 10 мас.%, наблюдается мультимодальное распределение диаметра волокон (рисунок 4.5 *b*). Основные пики для 6ПКЛ15SiГA сосредоточены в области от 0 до 2, от 2 до 5 и от 7 до 10 мкм, при этом максимальный пик находится в области от 0 до 2 мкм и средний диаметр имеет значение 3,54±3,85 мкм. В случае уПКЛ15SiГA наблюдается схожая картина, максимальное количество значений сосредоточено в области от 0 до 2 мкм, свидетельствующие о преобладающем диаметре волокон в наноразмерной области (рисунок 4.5 *e*). Среднее значение диаметра волокон составило $2,72\pm3,10$ мкм.

Зависимость изменения диаметра волокон от концентрации частиц и скорости вращения коллектора представлены на рисунке 4.6. При сравнении образцов с беспорядочно и упорядоченно ориентированными волокнистыми структурами хорошо прослеживается тенденция уменьшения диаметра волокон, как в композитных, так и в чистых скэффолдах. Это подтверждает влияние тангенциальной силы инерции при высокоскоростном вращении коллектора на изменение диаметра волокна. Помимо этого, неоспоримое влияние на диаметр волокон оказывает концентрация микрочастиц модифицированного порошка ГА. В работе [158] увеличением концентрации авторы установили, что с микрочастиц порошка немодифицированного ГА происходит увеличение диаметра волокон благодаря высокой степени агломерации частиц ГА.

В данной работе величина среднего квадратичного отклонения с увеличением концентрации во всех случаях свидетельствует о волатильности полученного ряда значений. Это объясняется наличием агломератов большого объема в полимерной суспензии, которые препятствует инициированию равномерной струи, благодаря чему происходит дополнительное вытяжение волокон [159]. Таким образом в процессе ЭФ в фильере, где скопление частиц или агломератов достигает критического значения, происходит скопление полимерного материала, обеспечивающее диаметр волокон выше, чем было получено в случае чистых ПКЛ-скэффолдов. После высвобождения скопившегося сгустка, содержащего частицы, происходит выход остаточного полимера, что приводит к образованию нановолокон. При этом, чем выше концентрация частиц, тем сильнее колеблется значение диаметра волокон в сторону максимальных и минимальных значений.



Рисунок 4.4 – Микрофотографии скэффолдов и распределение диаметра волокон для: бПКЛ10SiГA скэффолда (*a*–*в*), увеличение в 500 раз (*a*), увеличение в 2200 раз (*б*); уПКЛ10SiГA скэффолда (*e*–*e*), увеличение в 500 раз (*e*), увеличение в 2200 раз (*d*). *d_{cp}* – средний размер зерна, *σ_d* – среднее квадратичное отклонение (300 измерений). Стрелками указаны нанои микрочастицы модифицированного SiГA порошка



Рисунок 4.5 – Микрофотографии скэффолдов и распределение диаметра волокон для: бПКЛ15SiГA скэффолда (*a*–*в*), увеличение в 500 раз (*a*), увеличение в 2200 раз (*б*); уПКЛ15SiГA скэффолда (*c*–*e*), увеличение в 500 раз (*c*), увеличение в 2200 раз (*d*). *d_{cp}* – средний размер зерна, σ_d – среднее квадратичное отклонение (300 измерений). Стрелками указаны нанои микрочастицы модифицированного SiГA порошка

Дополнительные включения в виде микрочастиц в полимерной матрице приводят к изменению гладкой поверхности волокон на шероховатую, благодаря наличию частиц порошков от нано- до микроразмера. Кроме того, зафиксировано наличие крупных агломератов наночастиц порошков модифицированного ГА, которые, по-видимому, внедрены в наиболее крупные полимерные волокна (рисунок 4.5 *д* – левый нижний угол), в то время как наноразмерные волокна, занимают свободное пространство между ними.

SrГA и SiГA являются непроводящими материалами, которые, как было установлено в работе по исследованию чистого ГА в полимерной матрице [160], уменьшают электропроводность рабочего раствора, и одновременно увеличивают его вязкость (рисунок 3.3). Как отмечалось ранее в п. 3.1, вязкость раствора является одним из ключевых параметров, влияющих на диаметр волокон, что также может служить причиной обширных колебаний диаметра композитных скэффолдов.



Рисунок 4.6 – Зависимость изменения диаметра волокон от концентрации частиц модифицированных SrГA и SiГA

Для детального изучения размеров и направления волокон, размера и распределения частиц в объеме была выполнена визуализация и проведен анализ 3D структуры скэффолдов. С целью улучшения восприятия данных, для представления была выделена область интереса (ОИ) размером 400×400×230 пикселей, соответствующая микрообъему 720×720×414 мкм³. Из 3D визуализации и центральных поперечных срезов ОИ, показанных на рисунке 4.7, видно, что в полученных полимерных скэффолдах направленность волокнистых структур полностью соответствует заявленной (беспорядочно и упорядоченно ориентированная) и сохраняется на протяжении всего объема.



Рисунок 4.7 – 3D визуализация структуры (справа) и поперечные срезы восстановленных трехмерных данных (слева) для: бПКЛ (*a*); уПКЛ (*б*). Сиреневым цветом представлены микроволокна ПКЛ

На рисунке 4.8 представлены результаты 3D визуализации волокнистых структур в случайно выбранной области скэффолда, соответствующей микрообъему размером $154 \times 154 \times 154$ мкм³ (слева) и анализа их ориентации (справа) методом, основанном на расчете 3D структурного тензора. Волокна, расположенные в одном направлении, представлены идентичным цветом, и, в зависимости от высоты изменяют свое преференциальную ориентацию, демонстрируя разницу в осаждении слоев. Данный феномен также связан с действием электрических сил в процессе ЭФ [154]. На рисунке 4.8 (слева) представлены гистограммы распределения ориентации волокон в пространстве, которое определяется углами θ (азимут) и φ (возвышение) (рисунок 2.7).

В случае анализа φ -направления, гистограммы распределения для двух типов образцов выглядят практически идентично, и основное направление волокон сосредоточено в области 60– 90°, что характерно для осаждения волокон в горизонтальной плоскости на вращающийся тип коллектора. При анализе гистограммы, демонстрирующей результаты θ -направления для уПКЛ-скэффолда был зафиксирован максимум, свидетельствующий о том, что большинство волокон ориентировано в диапазоне 60–120°. В сравнение, для бПКЛ преференциальной направленности волокон не наблюдается и значения направления находятся в диапазоне от 0 до 180°. В случае распределения диаметра волокон результаты РКТ согласуются с результатами СЭМ, однако в случае РКТ производится анализ бо́льшего количества структур в микроразмере, что позволяет составить статистически более полную картину существующего диаметра волокон.



Рисунок 4.8 – 3D визуализация (справа) и результаты анализа ориентации волокнистых структур (слева) в: бПКЛ (*a*); уПКЛ (*б*)

На рисунке 4.9 представлены круговые диаграммы, демонстрирующие процентное соотношение диаметров волокон в чистых скэффолдах. В рамках анализируемых скэффолдов были зафиксированы значения диаметра волокон в диапазоне 2,19–28,6 мкм в случае бПКЛ и 2,19–26,40 мкм в случае уПКЛ. Наибольшее количество зафиксированных значений находится в диапазоне от 1 до 5 мкм. Установлено, что в случае с уПКЛ происходит увеличение количества волокон диаметром от 1–5 мкм. При этом диаметр волокон в диапазоне 10–30 мкм сокращается практически в два раза с 21,8 % до 11,9 %. В этом случае данные РКТ полностью коррелируют с данными СЭМ подтверждая действие скорости вращения коллектора на диаметр волокон в процессе ЭФ.



93

Рисунок 4.9 – Круговые диаграммы распределения диаметра волокон для: бПКЛ (*a*); уПКЛ (б) скэффолдов

При анализе объемных данных композитных скэффолдов (рисунок 4.10–4.13) обнаружено, что в структуре скэффолдов имеется меньшее количество волокон, однако в некоторых местах более крупного размера, в сравнении с чистыми ПКЛ-скэффолдами. Однако они по-прежнему сохраняют заданное беспорядочное и упорядоченное ориентирование волокон, при этом направление не зависит от сторонних примесей в виде добавок микрочастиц модифицированных порошков SrГA и SiГA и их агломератов. Также следует отметить, что волокна объемом 1,33 мкм не были задетектированы ввиду разрешающей способности установки.

Из 3D визуализации направления волокон (рисунок 4.12–4.13, справа) видно, что в случае скэффолдов с упорядоченной структурой большинство волокон лежат в одной плоскости по сравнению со скэффолдами с беспорядочным ориентированием, где волокна хаотично распределены в объеме образца. На гистограммах ориентации волокон (рисунок 4.12–4.13, слева) в случае φ -направления совпадают с данными для чистых скэффолдов и при этом сохраняют основное направление в области 60–90°. Для θ -направления в случае образцов с упорядоченной структурой также наблюдаются максимумы в диапазоне углов ~ 40–130°, при этом образцы с беспорядочно ориентированной структурой характеризуются хаотичным ориентированием волокон и значения углов колеблются в широком диапазоне от 0 до 180°.



Рисунок 4.10 – 3D визуализация структуры (справа) и поперечные срезы восстановленных 3Dданных (слева) для: бПКЛ10SrГА (*a*); уПКЛ10SrГА (*б*); бПКЛ15SrГА (*в*); уПКЛ15SrГА (*г*). Стрелками указаны микрочастицы SrГА порошка



Рисунок 4.11 – 3D визуализация структуры (справа) и поперечные срезы восстановленных 3Dданных (слева) для: бПКЛ10SiГА (*a*); уПКЛ10SiГА (*б*); бПКЛ15SiГА (*в*); уПКЛ15SiГА (*г*). Стрелками указаны микрочастицы SiГА порошка



Рисунок 4.12 – 3D визуализация (справа) и результаты анализа ориентации волокнистых структур (слева): бПКЛ10SrГА (*a*); уПКЛ10SrГА (*б*); бПКЛ15SrГА (*в*); уПКЛ15SrГА (*г*)



Рисунок 4.13 – 3D визуализация (справа) и результаты анализа ориентации волокнистых структур (слева): бПКЛ10SiГA (*a*); уПКЛ10SiГA (*б*); бПКЛ15SiГA (*в*); уПКЛ15SiГA (*г*)

Как и на СЭМ-изображениях, на данных РКТ также наблюдается искажение структуры волокон. Отметим, что феномен искажения полимерных волокон, причиной которого являлись микрочастицы ГА и микрочастицы карбоната кальция (CaCO₃) уже описывался в литературе [6]. На срезах с РКТ (рисунок 4.10–4.11, слева) отчетливо видны микрочастицы, встроенные в структуру полимерных волокон.

В результате сравнения композитных скэффолдов с различной концентрацией микрочастиц SrГA установлено, что при увеличении концентрации до 15 мас.% в скэффолдах с беспорядочно ориентированной структурой происходит уменьшение количества волокон с диаметром от 1 до 5 мкм на 9,2 %, и увеличение от 10 до 30 мкм на 12,8 % (рисунок 4.14 *a, в*). В скэффолдах с упорядоченной волокнистой структурой для случая с 15 мас.% также можно отметить уменьшение количества волокон диаметром в диапазоне 1–5 мкм на 3,9 % и увеличение в диапазоне 5–30 мкм на 4,5 % (рисунок 4.14 *б, г*).



Рисунок 4.14 – Круговые диаграммы распределения диаметра волокон для композитных скэффолдов: бПКЛ10SrГA (*a*); уПКЛ10SrГA (*б*); бПКЛ15SrГA (*b*); уПКЛ15SrГA (*b*); уПКЛ15Sr

Аналогичная тенденция также наблюдается для скэффолдов содержащих SiГA. Для беспорядочно ориентированных структур (рисунок 4.15 *a*, *в*) при увеличении концентрации до 15 мас.% диапазон значений диаметра волокон в области 1–5 мкм уменьшился на 19,8 %, а в области 5–60 мкм увеличился на 19,7 %. Для упорядоченной структуры уменьшение в области от 1–5 мкм происходит на 11,7 %, а в области 10–60 мкм увеличивается на 13,3 %. В одном из исследований показано, что скэффолды с диаметром волокон около 2 мкм препятствовали полному прикреплению клеток за счет меньшего по размеру диаметра волокна в сравнении с телом клетки. При этом наиболее оптимальный результат был продемонстрирован на

скэффолдах с волокнами диаметром 9–22 мкм, на которых происходила наиболее эффективная стимуляция активности щелочной фосфатазы и экспрессии остеокальцина [161].



Рисунок 4.15 – Круговые диаграммы распределения диаметра волокон для композитных скэффолдов: бПКЛ10SiГA (*a*); уПКЛ10SiГA (*б*); бПКЛ15SiГA (*b*); уПКЛ15SiГA (*b*); уПКЛ15Si

Различие диаметров волокон при увеличении концентрации частиц можно объяснить наличием порошковых агломератов, содержащихся на начальной стадии подготовки суспензии для процесса ЭФ. Для более полной аргументации данного процесса следует обратить внимание на результаты анализа объема частиц, распределенных во внутренней структуре скэффолдов (рисунок 4.16, 4.17). В случае композитных скэффолдов, содержащих StГA, при увеличении концентрации до 15 мас.% с беспорядочно и упорядоченно ориентированными волокнистыми структурами, происходит уменьшение количества частиц объемом от 1 до 25 мкм³ на 4,4 % и 9,4 %, соответственно. При этом количество частиц объемом от 25 до 10^4 мкм³ увеличивается для бПКЛ15SiГA образцов на 19,7 %, а для уПКЛ15SiГA на 11,6 %. Интересно, что в скэффолдах с SrГA находится больше микрочастиц объемом от 10 до 60 мкм³ по сравнению с SiГA. Наличие SrГA агломератов такого размера, как отмечается в литературных источниках [162], [163], связано с удельной поверхностью частиц порошка (результаты представлены в п. 3.2).



Рисунок 4.16 – Круговые диаграммы распределение объема частиц в композитных скэффолдах: бПКЛ10SrГА (*a*); уПКЛ10SrГА (*б*); бПКЛ15SrГА (*в*); уПКЛ15SrГА (*г*)



Рисунок 4.17 – Круговые диаграммы распределение объема частиц в композитных скэффолдах: бПКЛ10SiГA (*a*); уПКЛ10SiГA (*б*); бПКЛ15SiГA (*в*); уПКЛ15SiГA (*г*)

В процессе ЭФ при создании скэффолдов неизбежны потери микрочастиц порошка на этапе прохождения полимерной суспензии от инжектирующего устройства до электрода-фильеры. Так как начальная масса микрочастиц порошков SrГA и SiГA была одинакова (10 и 15 мас.%), в рамках данной работы было определенно количество частиц и их агломератов в объеме каждого полученного образца. На рисунке 4.18 *a*, при сравнении аналогичных по составу и структуре образцов, отчетливо видно, что в скэффолдах содержащих SiГA находится больше микрочастиц и их агломератов, чем в скэффолдах с SrГA порошком. При совокупности данных объема и количества микрочастиц в скэффолдах можно заключить, что в SrГA образцах наблюдается

100

меньшее по количеству, но большее по объему количество микрочастиц. Данные также согласуются со значениями удельной поверхности для SrГA и SiГA. С увеличением концентрации микрочастиц порошков происходит увеличение количества частиц и их агломератов. Так, в SrГA скэффолдах с беспорядочно и упорядоченно ориентированными волокнистыми структурами с увеличением концентрации с 10 до 15 мас.%, количество частиц возросло на 44,51 % и 45,33 %, а в SiГA скэффолдах на 79,58 % и 77,93 %, соответственно. Сформулированное в начале этой главы предположение полностью подтверждается полученными результатами.

На сегодняшний день существует множество работ, в которых показано влияние величины пористости и диаметра волокон на различные процессы, происходящие с клетками в условиях *in vitro* [164], [165], [166]. Однако ученые не могут дать категоричного ответа какая пористость является наиболее оптимальной. Так, в работах [167], [168] показано, что пористость ~ 90 % является необходимым условием для надлежащего процесса васкуляризации и врастания ткани. В другой работе отмечали что образцы с пористостью 92 % показали более высокий результат по содержанию остеокальцина, влияющего на образование костной ткани в сравнении с 97–98 % [161]. Кроме того, существуют работы, в которых был продемонстрирован положительный эффект пористости величиной 70–86 % на пролиферацию клеток [169], [170].

На рисунке 4.18 представлены результаты исследования пористости чистых и композитных скэффолдов. В случае чистых ПКЛ-скэффолдов значения пористости находятся в пределах ~ 86 (беспорядочно ориентированные волокна) и ~ 82 % (упорядоченно ориентированные волокна). В композитных скэффолдах значения пористости варьируются в пределах 58–87 %, в зависимости от массовой доли SrГA или SiГA модификатора и ориентации волокон. Полученные значения соответствуют пористости губчатой кости. При анализе влияния различной ориентации волокон и концентрации микрочастиц модифицированных порошков на пористость, установлено, что упорядочение волокон приводит к понижению пористости скэффолда, приближая ее к кортикальной костной ткани. Для образцов с упорядоченной структурой, содержащих SrГA пористость понизилась на 14,26 % и 23,54 % для скэффолдов с 10 и 15 мас.%, соответственно.

Пористость скэффолдов с беспорядочно ориентированной структурой волокон, содержащих 10 мас.% SrГA повысилась на 0,56 %, что может быть связано с заполнившими межволоконное пространство нановолокнами, которые не были зафиксированы методом PKT. Однако, для 15 мас.% SrГA пористость также, как и в случае упорядоченных структур повысилась на 3,84 %. Для скэффолдов с микрочастицами SiГA также наблюдается уменьшение пористости на 5,46 %, 11,89 % и 5,13 % для бПКЛ10SiГA, уПКЛ10SiГA и уПКЛ15SiГA, соответственно. Для случая бПКЛ15SiГA пористость увеличилась на 1,16 % также предположительно ввиду наличия нановолокон, не зафиксированных PKT. Таким образом, с

увеличением концентрации микрочастиц порошка, в случае SrГA скэффолдов пористость уменьшается, а в случае с SiГA – увеличивается. Уменьшение пористости связано в первую очередь с бо́льшими, в отличии от SiГA порошка агломератами, которые заполняют свободное межволоконное пространство, приводя к уменьшению порового пространства.



Рисунок 4.18 – распределение частиц и их агломератов в скэффолдах (*a*) и гистограмма распределения пористости для чистых и композитных скэффолдов (*б*) (*p<0,01, **p<0,25, ***p<0,5)

4.2 Влияние концентрации микрочастиц порошков модифицированного гидроксиапатита на физико-химические свойства полимерных скэффолдов

На рисунке 4.19 приведены рентгенограммы ПКЛSrГА и ПКЛSiГА скэффолдов, полученных методом ЭФ, которые содержат 10 и 15 мас.% микрочастиц порошка в полимерной матрице. Так как для получения беспорядочно и упорядоченно ориентированных структур волокон состав исходной смеси был идентичен, для РФА анализа были использованы образцы с беспорядочно ориентированной структурой волокон.

Расшифровка рентгеновских дифрактограмм показала, что в скэффолде, содержащем 10 мас.% SrГA (рисунок 4.19 *a*) и SiГA (рисунок 4.19 *б*) наряду с характерными для поликристаллического полимера ПКЛ пиков при 21,3°, 21,9° и 23,8°, так же можно наблюдать наличие пиков кристаллического ГА. Так, наиболее интенсивные из них отображаются при 25,9°, 31,8°, 32,2°, 32,9°, 34,1°, 46,7° и 49,5°. Схожие результаты также наблюдаются для скэффолдов, содержащих 15 мас.% SrГA и SiГA, однако при этом интенсивность пиков незначительно увеличилась. При анализе были произведены расчеты соотношения ПКЛ/SrГA в скэффолдах методом Ритвельда. Было установлено, что основной фазой скэффолдов является ПКЛ. В случае

образца ПКЛ10SrГА соотношение ПКЛ/SrГА равно 90/10 %. С увеличением концентрации микрочастиц порошка происходит увеличение фазы ГА в структуре скэффолдов, для образца ПКЛ15SrГА соотношение составило 80/20 %. Идентичный результат был получен для образцов с 10 и 15 мас.% SiГA, что подтверждает реализацию предложенной концепции увеличения массовой доли микрочастиц порошков модифицированного ГА в полимерном скэффолде в процессе ЭФ в рамках данной работы.

Параметры кристаллических решеток полученных скэффолдов представлены в таблице 4.1. В случае ПКЛ в зависимости от типа образца кристаллическая решетка претерпевает несущественные изменения и ее объем колеблется от 639 до 643 Å³. Наибольший вклад в изменения объема кристаллической решетки вносит параметр *a*, который изменяется в пределах от 7,484 до 7,503 Å. При анализе микрочастиц порошков модифицированного ГА в зависимости от типа образца, распределение параметров кристаллической решетки носит хаотичный характер и наличие взаимосвязи между типом и количественным содержанием микрочастиц порошка прослеживается слабо. Тем не менее, при сравнении параметров элементарной ячейки используемых порошков с параметрами элементарной ячейки чистого ГА (таблица 3.1), можно заключить, что объем элементарной ячейки увеличился, а это может служить доказательством наличия изоморфных замещений в структуре модифицированных ГА, входящих в состав скэффолдов.



Рисунок 4.19 – Рентгенограммы композитных скэффолдов содержащих SrГA (*a*), содержащих SiГA (б)

Также, в случае как SrГA, так и скэффолдов, содержащих в составе изоморфный SrГA, происходит сдвиг дифракционных максимумов в сторону меньших углов. А именно, максимумы при 31,81°, 32,20°, 32,89°, 34,11°, 46,73°, 49,49° смещаются на 31,74°, 32,14°, 32,88°, 34,00°, 46,61°, 49,35°, что также свидетельствует о присутствии замещенного Sr^{2+} иона в решетке ГА.

	Параметры кристаллической решетки								
Скэффолд	ПКЛ				SrHA/SiHA				
	а	b	С	V	ОКР	а	С	V	ОКР
		[Å]		[Å ³]	[HM]	[/	Å]	[Å ³]	[HM]
ПКЛSrHA (10 мас.%)	7,499	4,991	17,16	642,1	33	9,415	6,913	535,0	76
ПКЛSrHA (15 мас.%)	7,484	4,991	17,13	639,9	24	9,436	6,901	532,1	43
ПКЛЅіНА (10 мас.%)	7,499	4,986	17,16	641,5	26	9,415	6,904	530,1	30
ПКЛSiHA (15 мас.%)	7,503	4,987	17,18	642,7	27	9,411	6,900	528,8	32

Таблица 4.1 – Параметры кристаллических решеток фаз ПКЛ, SrГA и SiГA в составе скэффолдов методом ЭФ, содержащих 10 и 15 мас.% порошков модифицированного ГА

На основании рассчитанных параметров кристаллической решетки SrГA и SiГA (таблица 4.1), а также литературных данных [171], [172] была вычислена концентрация Sr и Si в кристаллической решетке ГА, встроенных в полимерную матрицу:

$$Ca_9Sr_1(PO_4)_6(OH)_2 \to Mac.\% (Sr^{2+}) = 8,3$$
 (3.1)

Количественное содержание элементов в скэффолдах на основе ПКЛ с 10 и 15 мас.% модифицированного ГА представлено в таблице 4.2. Как видно, при увеличении содержания микрочастиц порошка с 10 до 15 мас.% происходит увеличение отношения Са/Р с 1,53 до 2,01 для ПКЛ-SrГА и с 1,52 до 1,58 для ПКЛ-SiГА. Такая закономерность может быть связана с хаотичным распределением неравномерных по размеру частиц SrГA и SiГA в пористом скэффолде, что затрудняет определение точного содержания и отношения элементов в полимерной матрице методом ЭДРА. Однако, исследования подтвердили наличие таких элементов как Sr и Si в ПКЛ-SiГA и ПКЛ-SiГA скэффолдах соответственно.

Также как и в случае РФА, для получения результатов ИК-спектроскопии были подготовлены композитные скэффолды с беспорядочно ориентированной структурой волокон ввиду идентичности состава смеси, используемой в процессе ЭФ.

Элемент	Количественное содержание, [ат. %]					
	ПКЛ10SrГА	ПКЛ15SrГА	ПКЛ10SiГА	ПКЛ15SiГА		
Ca	56,11±0,12	61,13±0,51	60,42±0,48	61,37±0,24		
Р	39,43±0,21	33,17±0,24	33,78±0,86	31,02±0,64		
Si	_	_	5,79±0,43	7,61±0,35		
Sr	4,46±0,18	5,69±0,13	_	_		
Отношение	Ca+Sr/P	Ca+Sr/P	Ca/P+Si	Ca/P+Si		
	1,53±0,04	2,01±0,05	1,52±0,03	1,58±0,04		

Таблица 4.2 – Элементный состав полимерных скэффолдов обогащенных SrГA и SiГA материалами

ИК-спектры композитных ПКЛ скэффолдов демонстрируют следующие полосы, характерные для ПКЛ при 2943 и 2864 см⁻¹ (ассиметричные и симметричные вибрационные колебания CH₂), 1722 см⁻¹ (колебание C=O), 1294 см⁻¹ (колебания C–O и C–C в кристаллической фазе) 1240 см⁻¹ (ассиметричные колебания COC), 1186 см⁻¹ (колебания OC–O), 1163 см⁻¹ (симметричные колебания COC) и 1157 см⁻¹ (колебания C–O и C–C в аморфной фазе) [104].

Полосы поглощения, характерные для SrГA и SiГA были выявлены при 631 см⁻¹ (колебания OH⁻), при 600 и 573 см⁻¹ (деформационные колебания PO4^{3–}). Также на спектрах композитных скэффолдов присутствует слабый пик при 887 см⁻¹, характерный для PO–H колебаний в ионе HPO4^{2–} [173] и 890 см⁻¹, характерный для Si–O на спектрах ПКЛ-SiГA скэффолдов [68].



Рисунок 4.20 – ИК-спектры композитных скэффолдов содержащих микрочастицы SrГA (*a*) и SiГA (б)

4.3 Краткие выводы по главе 4

Полученные методом ЭФ скэффолды обладают заявленной микроархитектурой с беспорядочно ориентированными волокнами. Обнаружено И упорядоченно влияние микрочастиц модифицированных порошков ГА на морфологию полимерного волокна в результате которого происходит образованием би- и мультимодальной микроархитектуры скэффолдов. Согласно полученным СЭМ-изображениям диаметр волокон варьируется от ~ 200 нм до 30 мкм, а РКТ показал разброс диаметров от ~ 1 мкм до 60 мкм. Различие диаметров волокон при увеличении концентрации частиц объясняется наличием порошковых агломератов, содержащихся на начальной стадии подготовки суспензии для процесса ЭФ. Проведенное исследование показало, что с повышением концентрации микрочастиц SrГA и SiГA происходит увеличение диаметра волокон за счет встраивания микрочастиц во внутреннюю структуру волокон. В структуре волокон обнаружены микрочастицы и их агломераты диаметром в диапазоне от 1 до 10000 мкм³. При увеличении массовой доли SrГA и SiГA модификаторов от 10 до 15 мас.% происходит снижение количества частиц в диапазоне от 1 до 25 мкм³ и увеличение от 25 до 10000 мкм³. Таким образом, была выявлена зависимость агломерации микрочастиц от концентрации в процессе ЭФ, а также то, что SrГA микрочастицы порошка характеризуются бо́льшей степенью агломерации, в сравнении с SiГA. Однако установлено, что наибольшее количество микрочастиц находится в диапазоне от 1 до 25 мкм³ для всех типов образцов.

Было выявлено, что на пористость скэффолдов основное влияние оказывают удельная поверхность дисперсной системы, наличие нановолокон, образованных при добавлении микрочастиц порошка и ориентация микроволокнистых структур. При этом, чем выше концентрация микрочастиц порошка, тем больше нановолокон образуется в процессе ЭФ. В случае скэффолдов, содержащих микрочастицы SrГA, пористость понижается при увеличении концентрации, а в случае скэффолдов с SiГA – увеличивается. Количественный РКТ-анализ микрочастиц и их агломератов в полимерной матрице показал, что использование процесса ЭФ позволяет создавать скэффолды без существенных потерь модификаторов в формующей системе с заданной концентрацией, что является перспективным для создания композитов, используемых в инженерии костной ткани с требуемыми свойствами.

Качественная и количественная оценка фазового, молекулярного и элементного составов подтвердила наличие замещенных SrГA и SiГA в структуре полимерных матриц. Также было показано, что при увеличении концентрации микрочастиц порошков с 10 до 15 мас.% происходит увеличение фазы замещенных ГА относительно полимерной и увеличению количества элементов замещения, для Sr до 7,61±0,35 ат.% и для Si до 5,69±0,13 ат.%, что согласовано с данными СЭМ и РКТ.

5. Механические характеристики и биологическая апробация композитных скэффолдов

5.1 Влияние модифицированного гидроксиапатита на механические свойства композитных скэффолдов

Для оценки влияния модифицированных ГА в полимерной матрице на механические свойства скэффолдов были выбраны микрочастицы порошка SiГA. На рисунке 5.1 показана зависимость данных механических испытаний от направления волокна и массовой доли микрочастиц SiГA.

Удлинение при растяжении скэффолдов с упорядоченной структурой, в сравнении с чистыми полимерными скэффолдами, имеющими беспорядочно ориентированную структуру волокон (рисунок 5.1), увеличилось на ~ 28 % от 183,9 до 235,6 мм. Предел прочности и деформация при растяжении, в свою очередь, также увеличились на ~ 18 % от 4,9 до 5,8 МПа и от 995,2 до 1178,2 %, соответственно.

Удлинение при растяжении композита бПКЛ10SiГA, по сравнению с чистым полимерным скэффолдом с беспорядочно ориентированной волокнистой структурой, уменьшилось на ~ 82 % от 183,9 до 32,9 мм. Предел прочности при растяжении уменьшился на ~ 74% от 4,9 до 1,3 МПа, а деформация при растяжении уменьшилась на ~ 83 % от 995,2 до 164,4 %. При увеличении массовой доли модифицированного SiГA от 10 до 15 мас.% удлинение при растяжении уменьшилось на ~ 16 % от 1,29 до 1,09 МПа и деформация при растяжении уменьшилась на ~ 6 % от 164,4 до 153,8 %.

Аналогично можно отследить изменения механических характеристик композитных скэффолдов с упорядоченной волокнистой структурой, содержащих SiГA по сравнению с чистыми полимерными скэффолдами. Так, удлинение и деформация при растяжении композита уПКЛ10SiГA уменьшились на ~ 94 % от 235,6 до 14,6 мм и от 1178,2 до 73,1 % соответственно, а предел прочности при растяжении уменьшился на ~ 88 % от 5,83 до 0,67 МПа. При увеличении массовой доли SiГA в композите с 10 до 15 мас.% удлинение при растяжении уменьшилось на ~ 30 % от 14,6 до 10,3 мм, предел прочности при растяжении уменьшилась на ~ 7 % по сравнению с 73,1 до 67,8 %.

Исходя из результатов, механические характеристики для скэффолдов из чистого ПКЛ значительно выше в сравнении с композитами. Скэффолд с упорядоченной структурой волокон из чистого ПКЛ обладает максимальными механическими характеристиками среди всей выборки образцов. Это можно объяснить наличием большого количества продольно-ориентированных волокон, обеспечивающих его прочность. Изменения механических свойств композитных скэффолдов можно обосновать теорией перераспределения нагрузки, предполагающей переход напряжения от полимерной матрицы на наполнитель через межфазную границу [174]. Так, SiГA компонент имеет более высокие механические свойства, в сравнении с полимерной матрицей, благодаря чему происходит перераспределение нагрузки между SiГA и ПКЛ, изменяя тем самым прочностные характеристики композита.



Рисунок 5.1 – Механические характеристики композитных скэффолдов, содержащих микрочастицы порошка SiГA: удлинение при растяжении (*a*); предел прочности при растяжении (*б*); деформация при растяжении (*b*) (*p<0,01)

Существует три механизма переноса нагрузки от полимерной матрицы к наполнителю. Первый механизм заключается в микромеханическом взаимодействии, второй основан на формировании химических связей между полимером и наполнителем, и третий заключается в дисперсионном неспецифическом взаимодействии (силы Ван-дер-Ваальса) между матрицей и наполнителем [175]. Равномерность распределения микрочастиц в полимерной матрице также
является важным фактором, влияющим на механические свойства композитов. Агломерация и значение удельной поверхности микрочастиц порошка, прямо пропорциональное дисперсности, может влиять на снижение механические характеристики композитов [176]. Из результатов исследования морфологии и внутренней структуры скэффолдов, представленных в п. 4.1 показано, что диаметр и структура волокон в композитных скэффолдах носит неравномерный характер, зафиксировано большое количество микро- и нановолокон, а также микрочастиц, распределенных внутри и снаружи волокна, размер которых варьируется в широком диапазоне, вследствие чего конечные прочностные характеристики снижаются. При этом, чем выше массовая доля наполнителя, тем ниже механические свойства композитных скэффолдов. Данная тенденция возникает с одной стороны, предположительно, ввиду образования нановолокон ПКЛ, и, с другой стороны, из-за содержания большего количества агломератов, влияющих на снижение механических свойств.

В литературе представлены исследования, в которых приведены механические свойства на растяжение костных тканей человека. Goldstein и др. показали, что механические свойства трабекулярной кости изменяются в два раза (1–13 МПа) в зависимости от областей, несущих нагрузку в костной ткани [177]. Lindahl в своей работе также показал диапазон механической прочности для большеберцовой кости, который находился в пределах 0,2–6,7 МПа [178]. Behrens et al. при изучении губчатой кости показали, что прочность костей варьировалась от 1,8 до 63,6 МПа [179]. Основываясь на полученных данных механических испытаний, а также сравнении их с литературными данными позволяет сделать вывод о том, что разработка композитных скэффолдов с беспорядочно и упорядоченно ориентированными волокнистыми структурами является перспективным направлением в области лечении костных тканей.

5.2 Смачиваемость поверхности и поверхностная энергия композитных скэффолдов

Одним из ключевых параметров, влияющих на эффективность взаимодействия скэффолда с жидкостями, протеинами и клетками является смачиваемость. Наиболее важными факторами, определяющими смачиваемость является химический состав поверхности, микроструктурная топография и заряд поверхности. Считается, что для достижения наилучшего биологического эффекта при взаимодействии клеточных культур со скэффолдом, поверхность должна быть гидрофильной (<90°) [180]. Данный факт не исключает того, что на гидрофобных поверхностях клеточные культуры не могут выжить. Известно, что гидрофобная поверхность способствует более активной адсорбции белков, чаще всего из плазмы крови. Белки за счет поверхностно-связанных фрагментов протеолитической деградации способствуют взаимодействию клеток с поверхностью, необходимой для экспрессии клеточной морфологии, пролиферации,

109

дифференциации и жизнедеятельности [181]. С другой стороны, в большинстве работ показано, что лучший эффект все таки наблюдается на гидрофильных поверхностях, которые через адсорбцию белков, таких как фибронектин, положительно влияют на адгезию и пролиферацию клеток [182]. Условия прикрепления клеток на поверхность материала зависят от субъединиц интегрина (клеточный рецептор, который передает межклеточные сигналы и от которого зависит регулировка цикла, а также форма и подвижность клетки), которые в свою очередь зависят от цитотипа клетки [183]. Для исследования смачиваемости поверхности и расчетов СПЭ композитных скэффолдов были определены краевые углы смачивания тестовыми жидкостями.

В таблице 5.1 приведены краевые углы смачивания для скэффолдов, содержащих SrГA или SiГA модификаторы. Все поверхности исследуемых скэффолдов являются гидрофобными, поскольку водный краевой угол смачивания > 90°. Видно, что с добавлением и увеличением концентрации микрочастиц SrГA до 15 мас.% с беспорядочно ориентированной структурой волокон происходит уменьшение водного угла смачивания от ~ 132° до ~ 112° . Схожая тенденция наблюдается и для SiГA, где краевой угол уменьшается от ~ 132° до ~ 108° . Краевые углы смачивания глицерином уменьшаются от ~ 125° до ~ 105° и от ~ 125° до ~ 109° для SrГA и SiГA композитных скэффолдов, соответственно. Для упорядоченных структур при добавлении и росте массовой доли SrГA и SiГA также наблюдается понижение водных краевых углов от ~ 134° до ~ 106° и ~ 110° , соответственно. Значения краевых углов глицерина также понизились в интервалах от ~ 128° до ~ 105° и от ~ 128° до ~ 109° .

Скэффолд	$\theta_{\rm B}$	θ_{r}
бПКЛ	132,1±4,9	125,2±3,2
уПКЛ	134,5±5,9	128,1±2,6
бПКЛ10SrГА	119,2±2,1	115,5±2,1
уПКЛ10SrГА	113,1±3,2	108,7±2,6
бПКЛ15SrГА	112,6±4,2	110,2±3,4
уПКЛ15SrГА	106,5±4,7	$105,4{\pm}1,9$
бПКЛ10SiГА	113,4±4,6	109,4±4,6
уПКЛ10SiГА	115,7±5,4	113,1±6,1
бПКЛ15SiГА	108,1±3,1	107,2±3,6
уПКЛ15ЅіГА	110,1±4,9	109,3±4,8

Таблица 5.1 – Краевые углы смачивания водой (θ_в) и глицерином (θ_г) ПКЛSrГA и ПКЛSiГA скэффолдов с беспорядочно и упорядоченно ориентированными структурами

Как упоминалось ранее, на изменение краевого угла смачивания могут влиять несколько факторов. Одним из них может служить шероховатость поверхности. В данном конкретном случае, при исследовании поверхности волокон методом СЭМ композитных скэффолдов (рисунок 4.2–4.5) отчетливо наблюдается изменение шероховатости поверхности за счет выступающих за пределы волокон микрочастиц SrГA и SiГA. Другим вероятным фактором

может служить изменение пористости композитных скэффолдов за счет внедрения модификаторов во внутреннюю структуру волокон (рисунок 4.18).

Согласно полученным данным (таблица 5.2), СПЭ образцов имеет полярную и дисперсионную компоненты. Полярная компонента включает кулоновские взаимодействия между постоянными диполями и между постоянными и индуцированными диполями (например, между водородными связями). В то время как дисперсионная компонента включает в себя взаимодействия вызванные флуктуациями распределения заряда в молекулах или атомах (взаимодействия Ван-дер-Ваальса) [184].

Таблица 5.2 – СПЭ (σ) композитных скэффолдов, включая полярную (σ^{P}) и дисперсионную

Скэффолд	σ , [мДж/м 2]	$\sigma^{\scriptscriptstyle P}$, [мДж/м 2]	$\sigma^{\scriptscriptstyle D}$, [мДж/м 2]
бПКЛ	4,9±0,6	3,8±0,4	$1,1\pm0,2$
уПКЛ	3,2±0,5	$1,7{\pm}0,4$	1,5±0,3
бПКЛ10SrГА	21,6±0,8	17,4±0,6	7,2±0,3
уПКЛ10SrГА	39,4±0,6	30,1±0,3	9,3±0,4
бПКЛ15SrГА	29,3±0,4	24,2±0,3	$4,1{\pm}0,1$
уПКЛ15SrГА	43,2±0,5	35,1±0,3	8,1±0,2
бПКЛ10SiГА	24,1±1,1	18,9±0,7	5,2±0,5
уПКЛ10SiГА	38,9±0,7	28,3±0,5	10,6±0,3
бПКЛ15SiГА	31,6±0,6	25,3±0,2	6,3±0,4
уПКЛ15SiГА	47,3±0,8	34,2±0,3	13,1±0,6

 (σ^{D}) компоненты

В работе [185], направленной на исследование влияния компонентов свободной поверхностной энергии на скорость деления и пролиферацию клеточных культур показано, что распластывание клеток на культуральной поверхности зависело в большей степени от полярной компоненты и прямо пропорционально усиливаются с ее увеличением.

Согласно результатам данного исследования можно отметить, что по мере увеличения массовой доли микрочастиц модифицированного ГА в полимерной матрице наблюдается закономерное увеличение полярной составляющей СПЭ. Это свидетельствует о наличии на поверхности полярных химических связей, которые присутствуют в соединениях, содержащих РО4³⁻- и ОН⁻-группы. Полученные данные подтверждены результатами ИК-спектроскопии (рисунок 4.20), где указано наличие интенсивных фосфатных связей и ОН-групп, и результатами РФА (рисунок 4.19), свидетельствующими о присутствии в покрытиях кристаллической фазы ГА. При этом общая СПЭ модифицированных композитов возрастает, что позволяет прогнозировать увеличение адгезионной способности клеток при контакте с скэффолдами [186]. Полученные данные коррелируют с исследованием, где продемонстрирована усиленная дифференциация клеток остеобластов на поверхности с более высокой СПЭ (~ 56 мДж/м²) [187].

5.3 Определение скорости биодеградация скэффолдов

В качестве предварительной оценки перспективности использования полученных скэффолдов при длительном использовании в организме человека согласно рекомендациям международной организации по стандартизации ИСО 10993 [188] были проведены *in vitro* тесты на исследование динамики биодеградации полученных скэффолдов при воздействии биологической среды. Как правило, скорость деградации полимера зависит от химической структуры, молекулярной массы, ориентации макромолекул, морфологии скэффолда, пористости, взаимосвязанности пор и т.д. [189].

Для лучшего понимания влияния модификаторов в виде микрочастиц SrГA и SiГA на деградацию скэффолдов, необходимо проанализировать механизмы и факторы, которые могут оказать влияние на деградацию полимера.

Процесс деградации алифатических полиэфиров, к группе которых относится ПКЛ, происходит через гидролитическое разложение, за счет чего происходит расщепление сложноэфирных связей. Schliecker и др. [190] предположил, что на процесс гидролитической деградации могут влиять, в частности, четыре параметра: константа скорости проникновения воды, ее количество, коэффициент диффузии фрагментов эфирной цепи и растворимость побочных продуктов разложения в водной среде. Деградация полимерной матрицы может протекать через следующие механизмы: поверхностную или гетерогенную и объемную или однородную эрозии [191]. В первом случае вода абсорбируется полимером, а расщепление гидролитических эфирных связей происходит на поверхности полимерной матрицы. Это генерирует фрагменты цепей, которые имеют кислотные концевые группы. На начальной стадии деградация полимера происходит быстрее, чем проникновение воды в полимерный объем, что приводит к деградации главным образом внешней, а не внутренней части матрицы. Благодаря этому процессу происходят снижение молекулярного веса, увеличение полидисперсности и, в конечном итоге, потеря массы. Реакционные или диффузионные явления, которые включают водорастворимые продукты с низкой молекулярной массой на поверхности и во внутренней части определяют деградацию полимера [190]. Во втором случае гомогенной эрозии полимеры деградируют медленней, а диффузия воды в систему происходит быстрее, чем разложение полимера.

Деградация поликристаллического полимера, такого как ПКЛ, протекает в два этапа. На первом этапе происходит деградация аморфной области, поскольку данная фаза имеет более высокое поглощение воды, чем кристаллическая. После того, как основная часть аморфной фазы растворится, процесс гидролиза продолжится от края к центру кристаллических доменов [192]. Предполагается, что гидрофобность ПКЛ (п. 5.2) может привести к поверхностной эрозии, как показано в работе Хи и др., где исследовалась деградация гидрофобных полиэфиров [193].

Скорость деградации ПКЛ полимера происходит в течение 2–3 лет, в зависимости от степени кристалличности и размера образца [194]. В данной работе скэффолды обладают гидрофобной поверхностью (таблица 5.1), за счет чего на первом этапе исследования скорости деградации на 24 день не было зафиксировано изменений, свидетельствующих о деградации всего набора исследуемых скэффолдов (результаты не приведены). Ввиду этого для дальнейшего эксперимента с целью первичной оценки влияния модификаторов на скорость деградации, поверхность скэффолдов была предварительно смочена этанолом (70%), с целью обеспечения проникновения PBS-раствора внутрь порового пространства и увеличения скорости деградации, как представлено в работе [195].

На рисунке 5.2 а, с представлена зависимость процентного соотношения потери массы от времени деградации для беспорядочных и упорядоченных волокнистых структур. Видно, что микрочастицы SrГA и SiГA влияют на характер деградации скэффолдов. В конце 24 дня потеря массы выше для композитных скэффолдов в сравнении с чистыми, и с увеличением массовой доли микрочастиц порошка, процент потери массы линейно возрастает. При анализе зависимости поглощения жидкости от времени деградации (рисунок 5.2 δ , d) также прослеживается линейная зависимость, увеличения поглощения с увеличением концентрации частиц от 10 до 15 мас.%. Данный процесс может быть обусловлен несколькими факторами. Одним из основных вкладов в увеличение скорости деградации композитов с одной стороны может вносить гидрофильная природа микрочастиц SrГA и SiГA порошков, а с другой стороны несовершенство кристаллической структуры ГА с изоморфными замещениями на ионы Sr²⁺ и SiO₄⁴⁻. Также к потере массы может приводить наличие дефектов на границе полимер-частица. В литературе представлены результаты [145], [196], [197], где наблюдалась повышенная деградация композитов, полученных с использованием различных полиэфиров (ПКЛ, ПЛА, ПЛГА и т.д.) и модификаторов в виде минералов, биостекла и чистого ГА, обусловленная, в первую очередь, гидрофильной природой допирующих элементов, за счет чего происходит увеличение поглощения жидкости, и, как следствие, ускоренная деградация. В случае композитов с 15 мас.% SiГA процент потери массы имеет максимальные значения (2,50 % – для беспорядочно и 3,35 % – для упорядоченно ориентированных структур), что объясняется более низким значением S_{уд} SiГА (п. 3.2) и объемом SiГА микрочастиц (рисунок 4.16).

Одним из ограничений, которые были представлены в литературных данных для применения алифатических полиэфиров в тканевой инженерии, является уменьшение параметра рН в окружении имплантата, которое было вызвано выходом кислотных продуктов деградации полимера. В одном из исследований [198] сообщается о появлении воспалительной реакции,

вызванной этим процессом. Щелочные вещества, такие как ГА, и в частности модифицированный ГА ионами Sr²⁺ и SiO₄^{4–} могут служить нейтрализаторами кислотности продуктов распада этих видов полимеров [197].

На рисунке 5.2 *в*, *е* представлены данные изменения рН в зависимости от времени деградации. В случае чистых ПКЛ скэффолдов наблюдается уменьшение значения рН на 24 день до максимальных значений в этом эксперименте с 7,40 до 7,36 для беспорядочной и до 7,37 для упорядоченной структуры. Это объясняется выходом олигомеров из полимера в PBS раствор, которые повышают кислотность среды. Для композитных скэффолдов наблюдается проявление нейтрализации среды. Наиболее высокие значения наблюдаются для SiГA частиц, которые предположительно за счет своего меньшего размера быстрее растворяются и выходят из полимерной матрицы, в сравнении с SrГA микрочастицами. При концентрации 15 мас.% на 24 день значения рН сохраняются ~ 7,40, в то время, как при 10 мас.% значение падает до 7,39.



Рисунок 5.2 – Потеря массы, поглощение жидкости и изменение pH в зависимости от времени деградации для скэффолдов с беспорядочно (*a*–*e*) и с упорядоченно (*c*–*e*) ориентированными структурами

Повышение концентрации ОН⁻-ионов за счет выхода частиц SrГA и SiГA вызывает смещение значения pH в щелочную сторону. Также, можно отметить, что в случае упорядоченных структур значения pH незначительно, но меньше, в сравнении с

беспорядочными. Это предположительно происходит за счет меньшей пористости (рисунок 4.18 б), которая замедляет прохождение PBS во внутрипоровое пространство скэффолдов. Как отмечается в литературных данных [189], способность сохранения нейтрального pH существенна для биоматериалов, используемых в *in vivo* условиях за счет чего будет минимизироваться возникновение воспалительных реакций от кислотных продуктов распада ПКЛ-полимера.

5.4 Исследование биосовместимости полимерных композитов на основе модифицированных гидроксиапатитов в условиях *in vitro*

Сравнение токсичности тестируемых материалов (*MTT-mecm*). Для выявления биосовместимости композитных скэффолдов предназначенных для инженерии костных тканей был выполнен MTT-тест на цитотоксичность, который широко используется в научных кругах для измерения жизнеспособности клеток.

Результаты МТТ-теста при инкубации в течение 24 часов показаны на рисунке 5.3 *а*. Рост клеток в присутствии чистых ПКЛ-скэффолдов с беспорядочно и упорядоченно ориентированными структурами, в сравнении с контролем, был ниже на ~ 70 %. Однако, для композитных скэффолдов эта разница сократилась до ~ 15–45 %, что говорит о повышении биосовместимости скэффолдов за счет SrГA и SiГA модификаторов. Интересно, что в случае скэффолдов с SrГA наблюдаются более стабильные показатели жизнеспособности клеток вне зависимости от ориентации волокон, в то время как для ПКЛ-SiГA скэффолдов с упорядоченной структурой наблюдается снижение количества клеток в сравнении с беспорядочной. В результате эксперимента явно выраженной цитотоксичности всей выборки исследуемых образцов обнаружено не было.

Гистологическое исследование пролиферации и жизнеспособности клеток. На рисунке 5.3 б представлены данные адгезии МСК на 7, 14 и 21 день. Покровные стекла в качестве контрольного образца в ходе эксперимента позволили оценить жизнеспособность клеток. Наиболее низкий результат количества живых клеток на поверхности скэффолдов был зафиксирован для чистых полимерных скэффолдов вне зависимости от ориентации волокон. При добавлении модифицированных ГА в полимерную матрицу отчетлива видна положительная тенденция увеличения адгезии клеток на поверхности скэффолдов.

Так, при добавлении 10 мас.% SrГA и SiГA в матрицу ПКЛ с беспорядочным ориентированием волокон, количество МСК на 7 день, в сравнении с чистыми ПКЛ скэффолдами, возросло на ~ 89 и 92 %, соответственно. При увеличении концентрации до 15 мас.% количество клеток увеличилось до ~ 107% для бПКЛSrГA и до ~ 97 % для бПКЛSiГA. Согласно результатам, на первом этапе культивирования, в сравнении с беспорядочно

ориентированной структурой, упорядоченное ориентирование волокон для клеток является более предпочтительным. Так, для уПКЛ10SrГА и уПКЛ10SiГА образцов количество клеток увеличилось до ~ 202 и 176 %, а для бПКЛ15SrГА и бПКЛ15SiГА скэффолдов до ~ 226 и 251 %, соответственно.

На 14 день для скэффолдов, содержащих в композите с беспорядочно ориентированной структурой 10 мас.% SrГA и SiГA, жизнеспособность MCK увеличилась до ~ 125 и 59 %, в то время как для 15 мас.% увеличение произошло до ~ 155 и 102 %. Для скэффолдов с упорядоченно ориентированной структурой волокон и концентрацией 10 мас.% SrГA и SiГA, количество живых клеток увеличилось до ~ 305 и 187 %. В случае 15 мас.% SrГA и SiГA количество клеток возросло до ~ 404 и 312 %

На 21 день количество живых клеток на скэффолдах с беспорядочно ориентированной структурой, содержащих 10 мас.% SrГA и SiГA в сравнении с чистыми ПКЛ скэффолдами увеличилось до ~ 108 и 124 %, а для 15 мас.% до ~ 272 и 259 %, соответственно. Для скэффолдов с упорядоченно ориентированной структурой, содержащих 10 мас.% SrГA и SiГA количество клеток увеличилось до ~ 284 и 313 %, а для 15 мас.% до ~ 792 и 716 %.

Таким образом, композитные скэффолды являются биосовместимыми и увеличение концентрации модификаторов в структуре полимерной матрицы благотворно влияет на жизнеспособность клеточных культур на их поверхности. Скэффолды, содержащие 15 мас.% модификаторов продемонстрировали наиболее высокие показатели жизнеспособности клеточных культур на поверхности образцов. Причем наибольшая жизнеспособность МСК наблюдалась на скэффолдах с упорядоченным ориентированием волокон.

Увеличение жизнеспособности клеточных культур на композитных скэффолдах может быт связано с несколькими факторами. Одним из них является химический состав поверхности, поскольку он определяет, какие функциональные группы доступны для взаимодействия с молекулами (п. 4.2). Как основной компонент кости, ГА имеет определенные биохимические фрагменты, способные взаимодействовать с белками клеточной поверхности [199]. Различия в текстуре или микротопографии поверхности также могут влиять на реакцию клеток при контакте со скэффолдов [200]. При исследовании способности остеобластов прикрепляться к керамическим поверхностям было обнаружено, что наиболее положительный клеточный ответ наблюдался на более шероховатых поверхностях [201]. Добавление SrГA и SiГA микрочастиц косвенно увеличивает шероховатость волокон [202], что может оказывать стимулирующий эффект на клеточную адгезию и пролиферацию. Понижение краевого угла смачивания в сторону гидрофильности поверхности и повышение СПЭ за счет полярной составляющей, результаты которых представлены в п. 5.2, также могут влиять на повышение жизнеспособности клеточных культур.





На рисунках 5.4 и 5.5 представлена сравнительная характеристика морфологии МСК на 14 день на исследуемых поверхностях чистых и композитных скэффолдов. На скэффолдах из чистого ПКЛ (рисунок 5.4 *a* и 5.5 *a*), вне зависимости от ориентации волокон, активного прикрепления и роста клеток не наблюдается. Были выявлены округлые, не распластанные или одиночно распластанные клетки, при этом площадь соприкосновения клетки с поверхностью скэффолда минимальна. Добавление модификаторов в структуру ПКЛ оказывает значительное влияние на эффективность жизнедеятельности клеточных культур. Клетки на поверхности композитных скэффолдов имеют вытянутую, распластанную форму с множественными филоподиями, которые образуют редкие, хаотично разбросанные плотные пучки, что является следствием активной клеточной миграции [203].

В случае скэффолдов с беспорядочно ориентированной структурой волокон, большинство клеток локализовано на пересечении микро- и нановолокон образующих «ложбинки» в структуре скэффолда. В случае упорядоченно ориентированных структур МСК также локализуются в ложбинках, образованными микро- и нановолокнами, однако при этом цитоскелет клеток приобретает более вытянутую и распластанную форму вдоль поверхности волокон. Клетки, на соседних с волокнами участках соединяются между собой клеточными филоподиями, и за те же сроки культивирования, что и в случае с беспорядочно ориентированными структурами образуют клеточные тяжи. Предположительно, благодаря этому феномену клеточная активность и жизнеспособность на композитных скэффолдах с упорядоченно ориентированной структурой

выше (рисунок 5.3 *б*).

Полученные результаты свидетельствуют о прочном взаимодействии МСК с композитными скэффолдами. Исходя из представленных данных установлено, что уПКЛ15SrГА и уПКЛ15SiГA образцы оказывают наилучший эффект на адгезию, пролиферацию и миграцию клеток на поверхности скэффолдов. На скэффолдах с беспорядочным и упорядоченным ориентированием волокон клетки взаимодействуют по разному. Благодаря тому, что волокна в упорядоченно ориентированных структурах соединены между собой более плотно, чем в беспорядочно ориентированных, за идентичный срок культивирования образование клеточных тяжей между соседними волокнами происходит более интенсивно.

Изучение динамики экспрессии генов при культивировании МСК на поверхности композитных скэффолдов. Для исследования влияния Sr и Si в кристаллической структуре ГА, содержащихся в полимерной матрице на минерализацию и дифференцировочную активность МСК, был проанализирован уровень экспрессии ALPL, BMPR1A, RUNX2, TGFBR1, IGF1, IGF1, IGFR1, COL1A1, BGLAP и CD34 генов методом ПЦР в реальном времени на вторую неделю культивирования. Для исследования были взяты образцы ПКЛ15SrГА и ПКЛ15SiГA с беспорядочно ориентированной структурой волокон. В качестве контроля был взят образец чистого бПКЛ скэффолда. На 14 день культивирования клеток уже отчетливо видно, что введение SrГA и SiГA микрочастиц в структуру полимерной матрицы приводит к повышению экспрессии ALPL, BMPR1A, RUNX2, TGFBR1, IGF1 и IGFR1 генов относительно чистого ПКЛ образца (рисунок 5.6).

ALPL является одним из важных факторов, инициирующих процесс минерализации (фаза развития кости) путем дифференцировки клеток. В основе минерализации лежит образование кристаллов с участием фосфатов кальция. Нуклеация или начало образования кристаллов инициируется накоплением неорганических фосфатов и ионов Ca²⁺, что приводит к кальцификации [204]. *ALPL* увеличивает концентрацию фосфата в локальной среде посредством гидролиза фосфатных эфиров, и, таким образом, повышает минерализацию ВКМ [205]. Поскольку фермент, продуцируемый *ALPL* геномом принимает участие в минерализации, то он считается ранним промежуточным индикатором дифференцировки МСК в остеобласты. *BMPR1A* играет ключевую роль в селективной дифференцировке МСК по остеобластной (в клетки костной ткани) или адипогенной (в клетки жировой ткани) дифференцировке [206].



Рисунок 5.4 – Морфология МСК на поверхности бПКЛ (*a*), бПКЛ10SrГА (*б*), бПКЛ15SrГА (*в*), бПКЛ10SiГА (*г*), бПКЛ15SiГА (*д*) на 14 день



Рисунок 5.5 – Морфология МСК на поверхности уПКЛ (*a*), уПКЛ10SrГА (*б*), уПКЛ15SrГА (*в*), уПКЛ10SiГА (*г*), уПКЛ15SiГА (*д*) на 14 день

Из литературных данных известно, что повышенная экспрессия этого гена стимулирует MCK-предшественники дифференцировать в остеобласты [207]. *TGFBR1* ген отвечает за производство белка, известного под названием «Трансформирующий ростовой фактор бета (TGF-beta)». Данный фактор передает сигналы от поверхности клетки во внутреннюю часть посредством трансдукции сигнала. Через данный тип передачи сигнала окружающая среда вне клетки влияет на процессы внутри клетки, такие как рост и деление [208]. *BGLAP* или остеокальцин высвобождается остеобластами в процессе остеосинтеза и является наиболее информативным маркером формирования костной ткани. На данном этапе культивирования на скэффолдах ПКЛ15SiГA уровень экспрессии *ALPL*, *BMPR1A*, *TGFBR1 BGLAP* генов выше, чем на ПКЛ15SrГA, что говорит о непосредственном влиянии Si в кристаллической структуре ГА на процесс минерализации и дифференцировки клеток по остеогенному пути, что в свою очередь, ускоряет процесс костеобразования в сравнении с чистой полимерной матрицей. Полученные данные коррелируют с литературными, где SiГA материалы демонстрируют повышенный остеогенез клеточных культур в условиях *in vitro* [209].

RUNX2 отвечает за создание белка, который вовлечен в развитие и сохранение здоровья костных тканей. Считается, что белок действует как регулятор ряда других генов, вовлеченных в развитие клеток костных тканей. В исследовании [210] показано достоверно повышенные уровня *RUNX2* при культивировании MCK, что указывает на потенциально важную роль продуцируемого геном белка в формировании кости. *IGF1* и *IGFR1* гены индуцируют белки, по структуре и свойствам схожие на инсулин, отвечают за процесс старения, при этом регулируя рост, развитие и дифференцировку клеток. В работе увеличение уровня экспрессии *RUNX2* и *IGF1* генов, на увеличение активности остеобластов и снижение генеза остеокластов, за счет чего происходило индуцирование формирования костной ткани. В данной работе в случае ПКЛ15SrГA скэффолда значения *RUNX2*, *IGF1* и *IGFR1* генов выше, в сравнении с ПКЛ15SiГA, что косвенно может говорить о том, что ионы Sr^{2+} в структуре ГА увеличивают образование костных клеток, а также подавляют костную резорбцию, опосредованную остеокластами [211]. По этой причине использование SrГA в полимерной матрице целесообразно при остеопрозе благодаря его антирезорбтивному и остеоанаболическому потенциалу [212].

Также следует отметить, что в случае скэффолда, содержащего SrГA наблюдается увеличение экспрессии генов *COLIA1* и *CD34*, которые являются маркерами основных компонентов BKM [213], [204], при этом *COLIA1* отвечает за укрепление и подержание эластичности костных тканей, а *CD34* – за межклеточную адгезию.

121



Рисунок 5.6 – Уровень экспрессии генов в МСК на 14 день культивирования на поверхности композитных скэффолдов с беспорядочно ориентированной структурой относительно чистого бПКЛ скэффолда, взятого за 1 как контроль (*p<0,01, **p<0,25)

5.5 Краткие выводы по главе 5

Существует зависимость между механическими характеристиками скэффолдов и концентрацией модифицированного ГА в структуре полимерной матрицы. Модуль Юнга и значения напряжения при растяжении уменьшаются с увеличением массовой доли микрочастиц SiГА. Равномерность распределения модификаторов в матрице является важным параметром, влияющим на механические свойства композита. Скэффолд с упорядоченно ориентированной ПКЛ обладает структурой волокон чистого максимальными ИЗ механическими характеристиками среди всей выборки образцов. Объяснением данного явления служит наличие большинства волокон, ориентированных в продольном направлении, что и обеспечивает прочность скэффолда.

Краевой угол смачивания характеризует поверхность полученных скэффолдов как

122

гидрофобную. При повышении концентрации модифицированных SrГA и SiГA в полимерной матрице, краевые углы смачивания линейно уменьшаются. Свободная поверхностная энергия чистых ПКЛ-скэффолдов имеет низкие значения (~ 5 и 3 мДж/м² для беспорядочно и упорядоченно ориентированных волокон), однако возрастает до ~ 22–47 мДж/м² с добавлением 10 и 15 мас.% SrГA и SiГA. Установлено, что в результате модификации скэффолдов наблюдается рост полярной компоненты СПЭ, которая во всех случаях преобладает над дисперсионной. Данный факт свидетельствует о превалировании на поверхности скэффолдов сильных полярных химических связей, находящихся в соединениях с фосфатными и гидроксильными группами.

Установлено, что SrГA и SiГA модификаторы увеличивают скорость деградации композитных скэффолдов и служат в качестве нейтрализаторов вредных для организма кислотных продуктов распада ПКЛ-полимера в процессе резорбции. В связи с этим можно считать, что композитные скэффолды с концентрацией 15 мас.% являются наиболее подходящими материалами для биоинженерных решений.

Согласно биологическим in vitro тестам композитные скэффолды являются биосовместимыми и добавление модификаторов в структуру полимерной матрицы благотворно влияет на жизнеспособность клеточных культур на поверхности композитных скэффолдов. Скэффолды, содержащие 15 мас.% модификаторов продемонстрировали наиболее высокие показатели жизнеспособности клеточных культур на поверхности образцов. Наибольшая жизнеспособность МСК наблюдалась на скэффолдах с упорядоченным ориентированием волокон. Полученные результаты свидетельствуют о прочном взаимодействии МСК с композитными скэффолдами. На скэффолдах с беспорядочным и упорядоченным ориентированием волокон клетки взаимодействуют по разному. Благодаря тому, что волокна в упорядоченно ориентированных структурах соединены между собой более плотно, чем в беспорядочно ориентированных, за идентичный срок культивирования образование клеточных тяжей между соседними волокнами происходит более интенсивно.

Анализ экспрессии генов показал существенное преимущество композитов перед чистой ПКЛ-матрицей. При этом, важно отметить, что характер и степень активации экспрессии генов дифференцировки в остеогенном направлении на ПКЛ15SrГА и ПКЛ15SiГА композитах отличается. На основании полученных данных можно предположить, что ПКЛ15SiГA скэффолды с более высоким уровнем экспрессии *ALPL* и *BGLAP* генов при имплантации будут способствовать метаболической активности костных клеток и ускоренной регенерации костной ткани, в то время как композитный ПКЛ15SrГA скэффолд благодаря более высокому уровню *RUNX2*, *IGF1*, *IGFR1*, *COL1A1*, *CD34* генов будет способствовать заживлению поврежденных костных тканей у людей, страдающих остеопорозом.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Механохимически синтезированные порошки стронций- и кремнийзамещенного гидроксиапатита характеризуются:

- однофазной структурой, изовалентное Sr²⁺ и гетеровалентное SiO₄^{4–} замещения приводят к увеличению объема кристаллической решетки гидроксиапатита и изменению размера кристаллитов;

 одномодальным распределением размеров зерен, при этом удельная поверхность дисперсных систем уменьшается в следующем ряду: кремнийзамещенный гидроксиапатит > гидроксиапатит > стронцийзамещенный гидроксиапатит.

2. Экспериментально показано, что стабильность технологического процесса электроформования при создании композитных дисперсно-наполненных скэффолдов с беспорядочно и упорядоченно ориентированными относительно оси *z*, проходящей через центр полярной системы координат микроволокнами, достигается путем использования концентрации порошка прекурсора 5÷15 мас.%, при вязкости технологической смеси 1,61÷2,30 Па×сек, и следующих параметрах технологического процесса: электрическое напряжение – 8 кВ, расход композитного раствора – 1 мл/час, межэлектродное расстояние – 7 см, скорость вращения коллектора – 600 или 1000 об/мин.

3. Полученные композитные скэффолды характеризуются би- и мультимодальной пористой микроархитектурой. Повышение концентрации дисперсных наполнителей в виде Sr- или Siзамещенного гидроксиапатита в структуре полимерной матрицы от 10 до 15 мас.% приводит к увеличению фазы гидроксиапатита и количества Sr и Si элементов в скэффолдах от 5,8 до 7,6 ат. % и от 4,5 до 5,7 ат.%, соответственно, а также увеличению диапазона распределения диаметра волокон за счет встраивания микрочастиц диаметром 1,0–21,5 мкм во внутреннюю структуру полимерных волокон. Показано, влияние концентрации микрочастиц Sr- или Si-замещенного гидроксиапатита и ориентации микроволокнистых структур на пористость композитных скэффолдов.

4. Экспериментально установлено, что увеличение скорости биодеградации композитных скэффолдов, содержащих 15 мас.% дисперсных наполнителей в виде Sr- или Si-замещенного гидроксиапатита в среднем на 1,8±0,6% в сравнении с немодифицированными и модифицированными с помощью 10 мас.% микрочастиц скэффолдами обусловлено улучшенной смачиваемостью благодаря повышению значения поверхностной энергии (в среднем от 4,1±1,2 до 37,9±8,8 мДж/м²), определяющий вклад в значение которой вносят полярные химические P– О и O–H связи замещенного ГА.

5. Биологическая апробация в условиях in vitro показала, что скэффолды, содержащие 15

мас.% Sr- или Si-замещенного гидроксиапатита с упорядоченно ориентированными микроструктурами не оказывают токсического воздействия. Они показали наиболее высокую жизнеспособность клеточных культур на поверхности образцов среди всей выборки. При анализе экспрессии генов установлено, что SiГA-содержащие скэффолды более интенсивно активируют ALPL и BGLAP гены, отвечающие за метаболическую активность костных клеток, в то время как SrГA-содержащие скэффолды способствуют более эффективной выработке RUNX2, IGF1, IGFR1, COL1A1, CD34 генов, что способно благотворно влиять на заживление поврежденных костных тканей с остеопоротическими изменениями.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- PBS натрий-фосфатный буфер;
- SiГА кремнийзамещенный гидроксиапатит;
- SrГА стронцийзамещенный гидроксиапатит;
- *W*₀ начальная масса образца;
- *W*₆ вес высушенного образца;
- *W*_{ПЖ} Количество поглощенной жидкости;
- *W_c* вес смоченного образца после удаления остаточной жидкости;
- ZnГА цинкзамещенный гидроксиапатит;
- бПКЛ скэффолд, состоящий из ПКЛ с беспорядочно ориентированными волокнами;
- бПКЛ(10,15)Sr(Si)ГА композитный скэффолд, состоящий из ПКЛ и (5, 10, 15 мас.%)Sr(Si)ГА с
- беспорядочно ориентированными волокнами;
- ВКМ трехмерный внеклеточный матрикс;
- ГА гидроксиапатит;
- ГМДС гексаметилдисилазан;
- ДМЕМ Dulbecco's Modified Eagle Medium;
- ДМСО диметилсульфоксид;
- ИК-спектроскопия инфракрасная спектроскопия;
- МСК мезенхимальные стволовые клетки;
- ОВРК метод Оуэнса-Вендта-Рабеля-Каелбле;
- ОИ область интереса;
- ОМ оптическая микроскопия/оптический микроскоп;
- П4ГБ поли(4-гидроксибутират);
- ПГА полигидроксиалканат;
- ПГА полигликолид;
- ПГБ поли(3-гидроксибутират);
- ПГБВ поли(3-гидроксибутират-3-гидроксивалерат);
- ПГБГГ поли(3-гидроксибутират-3-гидроксигексаноат);
- ПГО поли(3-гидроксиоктаноат);
- ПК персональный компьютер;
- ПКЛ поликапролактон;
- ПКЛ поликапролактон;
- ПЛА полилактид;
- ПЛГА полилактид/гликолид;

- ПЦР полимеразная цепная реакция;
- ПЭГ полиэтиленгликоль;
- РИ рентгеновское излучение;
- РКТ рентгеновская компьютерная томография;
- РФА рентгенофазовый анализ;
- С* концентрация перекрытия полимерных клубков;
- СПЭ свободная поверхностная энергия;
- СЭМ сканирующая электронная микроскопия/сканирующий электронный микроскоп;
- ТКФ трикальций-фосфат;
- уПКЛ скэффолд, состоящий из ПКЛ с упорядоченно ориентированными волокнами;
- уПКЛ(10,15)SrГА композитный скэффолд, состоящий из ПКЛ и (5, 10, 15 мас.%)Sr(Si)ГА с
- упорядоченно ориентированными волокнами;
- ЭДРА энергодисперсионный рентгеновский анализ;
- ЭФ электроформование.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Electrospun bioactive nanocomposite scaffolds of polycaprolactone and nanohydroxyapatite for bone tissue engineering / V. Thomas, S. Jagani, K. Johnson [et al.] // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2006. – Vol. 6, N_{2} 2. – P. 487-493.

2. Wutticharoenmongkol, P. Osteoblastic phenotype expression of MC3T3-E1 cultured on electrospun polycaprolactone fiber mats filled with hydroxyapatite nanoparticles / P. Wutticharoenmongkol, P. Pavasant, P. Supaphol // Biomacromolecules. – 2007. – Vol. 8, N_{2} 8. – P. 2602-2610.

3. Erisken, C. Functionally graded electrospun polycaprolactone and β -tricalcium phosphate nanocomposites for tissue engineering applications / C. Erisken, D.M. Kalyon, H. Wang // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, No 30. – P. 4065-4073.

4. Метвалли, Х.А. Физико-химические закономерности синтеза субмикронных частиц ватерита и их применение в композитах : дис. ...канд. хим. наук : 02.00.04 / Метвалли Хассан Абдельфаттах. – Саратов, 2015. – 129 с.

PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation / F.M. Ghorbani, B. Kaffashi, P. Shokrollahi [et al.] // Carbohydr. Polym. – 2015. – Vol. 118. – P. 133-142.

6. Рассказова, Л.А. Технология получения магний- и кремний-модифицированных гидроксиапатитов и биорезарбируемых композиционных материалов с использованием полимеров молочной кислоты : дис. ... канд. тех. наук : 05.17.11 / Рассказова Людмила Алексеевна. – Томск, 2015. – 137 с.

7. Chan, B.P. Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations /
B.P. Chan, K.W. Leong // European Spine Journal. – 2008. – Vol. 17, № 4. – P. 467-479.

8. Hutmacher, D.W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues - State of the art and future perspectives / Hutmacher D.W. // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2001. – Vol. 12, № 1. – P. 107-124.

9. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells / R. Florencio-Silva, G.R.D.S. Sasso, E. Sasso-Cerri [et al.] // BioMed Research International. – 2015. – Vol. 2015.

10. Akay, G. Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation *in vitro* / G. Akay, M.A. Birch, M.A. Bokhari // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25, № 18. – P. 3991-4000.

11. Preparation and analysis of macroporous TiO2 films on Ti surfaces for bone-tissue implants. / F.A.

Akin, H. Zreiqat, S. Jordan [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 2001. – Vol. 57, № 4. – P. 588-596.

12. Takahashi, Y. Effect of the fiber diameter and porosity of non-woven PET fabrics on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. / Y. Takahashi, Y. Tabata // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2004. – Vol. 15, № 1. – P. 41-57.

13. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques / T.D. Roy, J.L. Simon, J.L. Ricci [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 2003. – Vol. 66A, № 2. – P. 283-291.

14. Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats / M.C. Kruyt, J.D. de Bruijn, C.E. Wilson [et al.] // Tissue Eng. – 2003. – Vol. 9, № 2. – P. 327-336.

15. Williams, D.F. On the nature of biomaterials / D.F. Williams // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30, № 30. – P. 5897-5909.

16. Problem of stress shielding and improvement to the hip implant designs: A review / M.I.Z. Ridzwan,
S. Shuib, A.Y. Hassan [et al.] // Journal of Medical Sciences. – 2007. – Vol. 7, № 3. – P. 460-467.

17. Kamachimudali, U. Corrosion of bio implants / U. Kamachimudali, T.M. Sridhar, B. Raj // Sadhana. Springer India. – 2003. – Vol. 28, № 3-4. – P. 601-637.

18. Additive manufactured Ti6Al4V scaffolds with the RF-magnetron sputter deposited hydroxyapatite coating / E. Chudinova, M. Surmeneva, A. Koptioug [et al.] // J. Phys. Conf. Ser. – 2016. – Vol. 669. – 12004 p.

19. Исследование способов управления структурой ВЧ-магнетронных кальцийфосфатных покрытий / М.А. Сурменева, Р.А. Сурменев, А.А. Шаронова [и др.] // Известия высших учебных заведений. Физика. 2013. – Т. 56, № 12–3. – С. 21-26.

20. Zhao, K. Polymer template fabrication of porous hydroxyapatite scaffolds with interconnected spherical pores / K. Zhao, Y.F. Tang, Y.S. Qin, D.F. Luo // J. Eur. Ceram. Soc. – 2011. – Vol. 31, № 1-2. – P. 225-229.

21. Silicon-substituted hydroxyapatite: The next generation of bioactive coatings / E. S. Thian, J. Huang, S.M. Best [et al.] // Mater. Sci. Eng. C. – 2007. – Vol. 27, № 2. – P. 251-256.

22. Bioactive, nanostructured Si-substituted hydroxyapatite coatings on titanium prepared by pulsed laser deposition / J.V. Rau, I. Cacciotti, S. Laureti [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. – 2015. – Vol. 103, № 8. – P. 1621-1631.

23. Osteogenesis effects of strontium-substituted hydroxyapatite coatings on true bone ceramics surface *in vitro* and *in vivo* / J. Li, L. Yang, X. Guo [et al.] // Biomedical Materials. – 2017. – Vol. 13, № 1. – 015018 p.

24. Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties / E.S. Thian, T. Konishi, Y. Kawanobe [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2013. – Vol. 24, № 2. – P. 437-445.

25. Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to *in vivo* behaviour / E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2008. – Vol. 19, № 1. – P. 239-247.

26. Spence, G. Carbonate substituted hydroxyapatite: Resorption by osteoclasts modifies the osteoblastic response / G. Spence, N. Patel, R. Brooks, N. Rushton // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2009. – Vol. 90A, № 1. – P. 217-224.

27. Chavassieux, P. Fluoride increases rat osteoblast function and population after *in vivo* administration but not after *in vitro* exposure / P. Chavassieux, G. Boivin, C.M. Serre, P.J. Meunier // Bone. – 1993. – Vol. 14, N_{2} 5. – P. 721-725.

28. Navarro, M. Biomaterials in orthopaedics / M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, J.A. Planell // J.R. Soc. Interface. The Royal Society. – 2008. – Vol. 5, № 27. – P. 1137-1158.

29. Velasco, M.A. Design, materials, and mechanobiology of biodegradable scaffolds for bone tissue engineering / M.A. Velasco, C.A. Narváez-Tovar, D.A. Garzón-Alvarado // Biomed Res. Int. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-21.

30. The repair of large segmental bone defects in the rabbit with vascularized tissue engineered bone / J. Zhou, H. Lin, T. Fang [et al.] // Biomaterials. -2010. - Vol. 31, No 6. -P. 1171-1179.

31. Nair, L.S. Biodegradable polymers as biomaterials / L.S. Nair, C.T. Laurencin // Prog. Polym. Sci. – 2007. – Vol. 32, № 8-9. – P. 762-798.

32. Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds / Y. Ji, K. Ghosh, X.Z. Shu [et al.] // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27, № 20. – P. 3782-3792.

33. Katti, D.S. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides / D.S. Katti, S. Lakshmi, R. Langer, C.T. Laurencin // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2002. – Vol. 54, № 7. – P. 933-961.

34. *In vitro* degradation of poly(caprolactone), poly(lactide) and their block copolymers: influence of composition, temperature and morphology / W.P. Ye, F.S. Du, W.H. Jin [et al.] // React. Funct. Polym. -1997. - Vol. 32, No 2. -P. 161-168.

35. Dang, J. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering / J. Dang, K. Leong // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2006. – Vol. 58, № 4. – P. 487-499.

36. Gunatillake, P. Recent developments in biodegradable synthetic polymers / P. Gunatillake, R. Mayadunne, R. Adhikari // Biotechnology annual review. – 2006. – Vol. 12. – P. 301-347.

37. Doyle, C. *In vitro* and *in vivo* evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite / C. Doyle, E.T. Tanner, W. Bonfield // Biomaterials. – 1991. – Vol. 12, $N \ge 9$. – P. 841-847.

38. Chen, G.-Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials / G.-Q. Chen,
Q. Wu // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26, № 33. – P. 6565-6578.

39. Verma, S. A possible role of poly-3-hydroxybuiyric acid in antibiotic production in Streptomyces /
S. Verma, Y. Bhatia, S.P. Valappil, I. Roy // Arch. Microbiol. Springer-Verlag. – 2002. – Vol. 179, № 1. – P. 66-69.

40. Nishi, M. Effects of implantation of three-dimensional engineered bone tissue with a vascular-like structure on repair of bone defects / M. Nishi, R. Matsumoto, J. Dong, T. Uemura // Appl. Surf. Sci. – 2012. – Vol. 262. – P. 60-63.

41. Ma, P.X. Engineering new bone tissue *in vitro* on highly porous $poly(\alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds / P.X. Ma, R. Zhang, G. Xiao, R. Franceschi // J. Biomed. Mater. Res. – 2001. – Vol. 54, No 2. – P. 284-293.$

42. Mandibular bone repair by implantation of rhBMP-2 in a slow release carrier of polylactic acid – An experimental study in rats / H. Schliephake, H.A. Weich, C. Dullin [et al.] // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, N_{2} 1. – P. 103-110.

43. Bergsma, E.J. Foreign body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures / E.J. Bergsma, F.R. Rozema, R.R. Bos, W.C. De Bruijn // J. Oral Maxillofac. Surg. – 1993. – Vol. 51, № 6. – P. 666-670.

44. Böstman, O.M. Late foreign-body reaction to an intraosseous bioabsorbable polylactic acid screw.
A case report / O.M. Böstman, H.K. Pihlajamäki // J. Bone Joint Surg. Am. – 1998. – Vol. 80, № 12. –
P. 1791-1794.

45. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers *in vivo* / G.G. Pitt, M.M. Gratzl, G.L. Kimmel [et al.] // Biomaterials. – 1981. – Vol. 2, № 4. – P. 215-220.

46. *In vitro/in vivo* biocompatibility and mechanical properties of bioactive glass nanofiber and poly(εcaprolactone) composite materials / J.H. Jo, E.J. Lee, D.S. Shin [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. – 2009. – Vol. 91B, № 1. – P. 213-220.

47. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering / S.S. Kim, M.S. Park, O. Jeon [et al.] // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27, № 8. – P. 1399-1409.

48. *In vitro* analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering / K.G. Marra, J.W. Szem, P.N. Kumta [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 1999. – Vol. 47. – P. 324-335.

49. Polymer-hydroxyapatite composites for biodegradable bone fillers / S. Higashi, T. Yamamuro, T. Nakamura [et al.] // Biomaterials. – 1986. – Vol. 7, № 3. – P. 183-187.

50. Polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds: preparation, characterization, and *in vitro* and *in vivo* biological responses of human primary bone cells / B. Chuenjitkuntaworn, W. Inrung, D. Damrongsri [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. A. -2010. - Vol. 94, No 1. - P. 241-251.

51. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration / M.C. Phipps, W.C. Clem, J.M. Grunda [et al.] // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33, N_{2} 2. – P. 524-534.

52. Natta, F.J.V. Studies of polymerization and ring formation. XXIII. 1ε-caprolactone and its polymers / F.J.V. Natta, J.W. Hill, W.H. Carothers // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society. – 1934. – Vol. 56, № 2. – P. 455-457.

53. Bittiger, H. Crystal structure of poly-ε-caprolactone / H. Bittiger, R.H. Marchessault, W.D. Niegisch // Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem. International Union of Crystallography. – 1970. – Vol. 26, № 12. – P. 1923-1927.

54. Pachence, J.M. Biodegradable Polymers / J.M. Pachence, M.P. Bohrer, J. Kohn // Principles of Tissue Engineering. Elsevier. – 2007. – P. 323-339.

55. Middleton, J.C. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. / J.C. Middleton, A.J. Tipton // Biomaterials. – 2000. – Vol. 21, № 23. – P. 2335-2346.

56. Uskoković, V. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents / V. Uskoković, D.P. Uskoković // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. – 2011. – Vol. 96B, № 1. – P. 152-191.

57. Posner, A.S. Refinement of the hydroxyapatite structure / A.S. Posner, A. Perloff, A.F. Diorio // Acta Crystallogr. International Union of Crystallography. – 1958. – Vol. 11, № 4. – P. 308-309.

58. Caverzasio, J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms / J. Caverzasio // Bone. – 2008. – Vol. 42, № 6. – P. 1131-1136.

59. Preliminary work on the antibacterial effect of strontium in glass ionomer cements / A. Guida, M.R. Towler, J.G. Wall [et al.] // J. Mater. Sci. Lett. Kluwer Academic Publishers – 2003. – Vol. 22, № 20. – P. 1401-1403.

60. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis / P.J. Meunier, C. Roux, E. Seeman [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol. 350, № 5. – P. 459-468.

61. Curran, D.J. Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods / D.J. Curran, T.J. Fleming, M.R. Towler, S. Hampshire // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. – 2011. – Vol. 4, № 8. – P. 2063-2073.

62. Bigi, A. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals / A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, M. Gazzano // Inorganica Chim. Acta. – 2007. – Vol. 360, № 3. – P. 1009-1016.

63. Carlisle, E.M. Silicon: a possible factor in bone calcification / E.M. Carlisle // Science. – 1970. – Vol. 167, № 3916. – P. 279-280.

64. Schwarz, K. Growth-promoting effects of silicon in rats / K. Schwarz, D.B. Milne // Nature. Nature Publishing Group – 1972. – Vol. 239, № 5371. – P. 333-334.

65. Porter, A.E. Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite *in vitro* and *in vivo* / A.E. Porter, C.M. Botelho, M.A. Lopes, J.D. Santos, S.M. Best, W. Bonfield // J. Biomed. Mater. Res. – 2004. – Vol. 69A, № 4. – P. 670-679.
66. Tang, Q. Production and characterization of HA and SiHA coatings / Q. Tang, R. Brooks, N.

Rushton, S. Best // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2010. – Vol. 21, \mathbb{N} 1. – P. 173-181.

67. The role of electrosprayed apatite nanocrystals in guiding osteoblast behaviour / E. San Thian, Z. Ahmad, J. Huang [et al.] // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, № 12. – P. 1833-1843.

68. Hing, K.A. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicatesubstituted porous hydroxyapatite scaffolds / K.A. Hing, P.A. Revell, N. Smith, T. Buckland // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27, No 29. – P. 5014-5026.

69. Ma, P.X. Fabrication of biodegradable polymer foams for cell transplantation and tissue engineering / P.X. Ma, R. Langer // Tissue Engineering. New Jersey: Humana Press. – 1999. – Vol. 18. – P. 47-56.

70. Sikavitsas, V.I. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor / V.I. Sikavitsas, G.N. Bancroft, A.G. Mikos // J. Biomed. Mater. Res. – 2002. – Vol. 62, N_{2} 1. – P. 136-148.

71. Cooper, A.I. Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide / A.I. Cooper // J. Mater. Chem. The Royal Society of Chemistry. – 2000. – Vol. 10, № 2. – P. 207-234.

72. Harris, L.D. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming / L.D. Harris, B.S. Kim, D.J. Mooney // J. Biomed. Mater. Res. – 1998. – Vol. 42, № 3. – P. 396-402.

73. Lu, T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering / Y. Li, T. Chen // Int. J. Nanomedicine. Dove Press – 2013. – Vol. 8. – P. 337-350.

74. Lee, K.S. Advances in 3D nano/microfabrication using two-photon initiated polymerization / K.S. Lee, R.H. Kim, D.Y. Yang, S.H. Park // Prog. Polym. Sci. Elsevier. – 2008. – Vol. 33, № 6. – P. 631-681.

75. Dispensing of very low volumes of ultra high viscosity alginate gels: a new tool for encapsulation of adherent cells and rapid prototyping of scaffolds and implants / M.M. Gepp, F. Ehrhart, S.G. Shirley [et al.] // Biotechniques. – 2009. – Vol. 46, N_{2} 1. – 31 p.

76. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering / L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, R.J.
Biron [et al.] // Nature Biotechnology. – 1994. – Vol. 12, № 7. – P. 689.

77. Матвеев, А.Т. Получение нановолокон методом электроформования / А.Т. Матвеев, И.М. Афанасов // Москва. – 2010. – 83 с.

78. Hierarchically structured PMMA fibers fabricated by electrospinning / L. Li, Z. Jiang, M. Li [et al.] // RSC Adv. – 2014. – Vol. 4, № 95. – P. 52973-52985.

79. Reneker, D.H. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning / D.H. Reneker,
I. Chun // Nanotechnology. IOP Publishing – 1996. – Vol. 7, № 3. – P. 216-223.

80. Yuan, X. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning / X. Yuan, Y. Zhang, C. Dong, J. Sheng // Polym. Int. John Wiley & Sons, Ltd. – 2004. – Vol. 53, № 11. – P. 1704-1710.

81. Mit-uppatham, C. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter / C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, P. Supaphol // Macromol. Chem. Phys. WILEY-VCH Verlag. – 2004. – Vol. 205, № 17. – P. 2327-2338.

82. Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process / C.L. Casper, J.S. Stephens, N.G. Tassi [et al.] // Macromolecules. – 2004. – Vol. 37, № 2. – P. 573-578.

83. Чайкина, М.В. Механохимический синтез гидроксилапатита с замещениями для нанесения покрытий на медицинские имплантаты методом высокочастотного магнетронного распыления / М.В. Чайкина, В.Ф. Пичугин, М.А. Сурменева, Р.А. Сурменев // Химия в интересах устойчивого развития. – 2009. – Т. 17, № 5. – С. 513-520.

84. Салтыков, С.А. Стереометрическая металлография / С.А. Салтыков // М.: Металлургия. – 1976. – 271 с.

85. Willmott, P. An introduction to synchrotron radiation: techniques and applications / P. Willmott – UK: John Wiley & Sons, Ltd. – 2011. – 368 p.

86. Vogelgesang, M. UFO: A Scalable GPU-based image processing framework for on-line monitoring / M. Vogelgesang, S. Chilingaryan, T. dos Santos Rolo, A. Kopmann // 2012 IEEE 14th International Conference on High Performance Computing and Communication & 2012 IEEE 9th International Conference on Embedded Software and Systems. IEEE. – 2012. – P. 824-829.

87. Dougherty, G. Digital image processing for medical applications / G. Dougherty // – Cambridge: Cambridge University Press. – 2009. – 485 p.

88. Serra, J. Morphological filtering: an overview / J. Serra // Signal processing. – 1994. – Vol. 38, №
1. – P. 3-11.

89. Huang, T.S. A fast two-dimensional median filtering algorithm / T. Huang, G. Yang, G. Tang // IEEE Trans. Acoust. – 1979. – Vol. 27, № 1. – P. 13-18.

90. Gonzalez, R.C. Digital image processing / R.C. Gonzalez, R.E. Woods // Nueva Jersey. – 2008. – 976 p.

91. Kong, T.Y. Topological Algorithms for Digital Image Processing / T.Y. Kong, A. Rosenfeld // Machine intelligence and pattern recognition. – 1996. – Vol. 19. – P. 263-292.

92. Fiorio, C. Two linear time Union-Find strategies for image processing / C. Fiorio, J. Gustedt // Theor. Comput. Sci. – 1996. – Vol. 154, № 2. – P. 165-181.

93. Wu, K. Optimizing two-pass connected-component labeling algorithms / K. Wu, E. Otoo, K. Suzuki // Pattern Anal. Appl. – 2009. – Vol. 12, № 2. – P. 117-135.

94. Saha, P.K. A survey on skeletonization algorithms and their applications / P.K. Saha, G. Borgefors,
G. Sanniti di Baja // Pattern Recognit. Lett. – 2016. – Vol. 76. – P. 3-12.

95. Robb, K. Fiber orientation estimation from 3D image data: practical algorithms, visualization, and interpretation / K. Robb, O. Wirjadi, K. Schladitz // 7th Int. Conf. Hybrid Intell. Syst. (HIS 2007). – 2007. – P. 320-325.

96. Golub, G.H. Eigenvalue computation in the 20th century / G.H. Golub, H.A. van der Vorst // J. Comput. Appl. Math. – 2000. – Vol. 123, № 1-2. – P. 35-65.

97. Li, C.H. Minimum cross entropy thresholding / C.H. Li, C.K. Lee // Pattern Recognit. – 1993. – Vol. 26, № 4. – P. 617-625.

98. Zhu, N.A fast 2D otsu thresholding algorithm based on improved histogram / N. Zhu, G. Wang, G. Yang, W. Dai // Proceedings of the 2009 Chinese Conference on Pattern Recognition, CCPR 2009, and the 1st CJK Joint Workshop on Pattern Recognition, CJKPR. – 2009. P. 319-323.

99. Ozeki, K. Characterization of Sr-substituted hydroxyapatite thin film by sputtering technique from mixture targets of hydroxyapatite and strontium apatite / K. Ozeki, T. Goto, H. Aoki, T. Masuzawa // Biomed. Mater. Eng. – 2014. – Vol. 24, № 2. – P. 1447-1456.

100. Patterson, A.L. The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination / A.L. Patterson // Phys. Rev. – 1939. – Vol. 56, № 10. – P. 978-982.

101. Petříček, V. Crystallographic Computing System JANA2006: General features / V. Petříček, M. Dušek, L. Palatinus // Zeitschrift für Krist. – Cryst. Mater. De Gruyter Oldenbourg. – 2014. – Vol. 229, № 5. – P. 345-352.

102. Young, R.A. The Rietveld method / R.A. Young // International Union of Crystallograhy / – 1993. Vol. 5. – P. 1-38.

103. Terra, J. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study /

J. Terra, E.R. Dourado, J.G. Eon [et al.] // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2009. – Vol. 11, № 3. – P. 568-577.

104. FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces / T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite [et al.] // J. Colloid Interface Sci. – 2004. – Vol. 273, № 2. – P. 381-387.

105. Accurate characterization of pure silicon-substituted hydroxyapatite powders synthesized by a new precipitation route / D. Marchata, M. Zymelka, C. Coelho [et al.] // Acta Biomater. – 2013. – Vol. 9, № 6. – P. 6992-7004.

106. Dulbecco, R. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses / R. Dulbecco,
M. Vogt // J. Exp. Med. – 1954. – Vol. 99, № 2. – P. 167-182.

107. Tiwari, S.K. Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers / S.K. Tiwari, S.S. Venkatraman // Mater. Sci. Eng. C. Elsevier, – 2012. – Vol. 32, № 5. – P. 1037-1042.

108. Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning / D.H. Reneker, W. Kataphinan, A. Theron [et al.] // Polymer. – 2002. – Vol. 43, № 25. – P. 6785-6794.

109. Yoshimoto, H.A. biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering / H. Yoshimoto, Y.M. Shin, H. Terai, J.P. Vacanti // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24, № 12. – P. 2077-2082.

110. Shin, M. Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh / M. Shin, O. Ishii, T. Sueda,
J.P.Vacanti // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25, № 17. – P. 3717-3723.

111. Electrospinning of concentrated polymer solutions / D.G. Yu, C.J. Branford-White, N.P. Chatterton [et al.] // Macromolecules. – 2010. – Vol. 43, № 24. – P. 10743-10746.

112. Дой, М. Динамическая теория полимеров / М. Дой, С. Эдвардс // Москва: Мир – 1998. 440 с. 113. Buchko, C.J. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films / C.J. Buchko, L.C. Chen, Y. Shen, D.C. Martin // Polymer. – 1999. – Vol. 40, № 26. – P. 7397-7407.

114. Gorodzha, S.N. Fabrication and characterization of polycaprolactone cross- linked and highlyaligned 3-D artificial scaffolds for bone tissue regeneration via electrospinning technology / S.N. Gorodzha, M.A. Surmeneva, R.A. Surmenev // IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng. IOP Publishing. – 2015. – Vol. 98, $N_{\rm P}$ 1. – P. 012024.

115. Данильченко, С.М. Структура и свойства апатитов кальция с точки зрения биоминералогии и биоматериаловедения (Обзор) / С.М. Данильченко, С.Н. Данильченко // Издательство СумГУ. – 2007.

116. Ozeki, K. Characterization of Sr-substituted hydroxyapatite thin film by sputtering technique from mixture targets of hydroxyapatite and strontium apatite / K. Ozeki, T. Goto, H. Aoki, T. Masuzawa // Biomed. Mater. Eng. – 2014. – Vol. 24, № 2. – P. 1447-1456.

117. Gibson, I.R. Chemical characterization of silicon-substituted hydroxyapatite / I.R. Gibson, S.M.
Best, W. Bonfield // J. Biomed. Mater. Res. – 1999. – Vol. 44, № 4. – P. 422-428.

118. Tang, X.L. Structural characterization of silicon-substituted hydroxyapatite synthesized by a hydrothermal method / X.L. Tang, X.F. Xiao, R.F. Liu // Mater. Lett. – 2005. – Vol. 59, № 29-30. – P. 3841-3846.

119. Kim, S. Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors / S. Kim // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24, № 8. – P. 1389-1398.

120. Silicon location in silicate-substituted calcium phosphate ceramics determined by neutron diffraction / S. Gomes, J.M. Nedelec, E. Jallot [et al.] // Crystal Growth and Design. – 2011. – Vol. 11, N_{2} 9. – P. 4017-4026.

121. Palard, M. Synthesis of silicated hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}$ / M. Palard, E. Champion, S. Foucaud // J. Solid State Chem. – 2008. – Vol. 181, No 8. – P. 1950-1960.

122. Synthesis of silicon-substituted hydroxyapatite by a hydrothermal method with two different phosphorous sources / A. Aminian, M. Solati-Hashjin, A. Samadikuchaksaraei [et al.] // Ceramics International. – 2011. – Vol. 37, № 4. – P. 1219-1229.

123. Rehman, I. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy / I. Rehman, W. Bonfield // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 1997. – Vol. 8, № 1. – P. 1-4.

124. Surovell, T.A. Standardizing infra-red measures of bone mineral crystallinity: An experimental approach / T.A. Surovell, M.C. Stiner // J. Archaeol. Sci. – 2001. – Vol. 28, № 6. – P. 633-642.

125. Synthesis and characterization of strontium-substituted hydroxyapatite nanoparticles for bone regeneration / M. Frasnelli, F. Cristofaro, V.M. Sglavo [et al.] // Materials Science and Engineering: C. - 2017. - Vol. 71. - P. 653-662.

126. Mechanochemical synthesis of SiO_4^{4-} -substituted hydroxyapatite, part II – Reaction mechanism, structure, and substitution limit / N.V. Bulina, M.V. Chaikina, A.S. Andreev [et al.] // Eur. J. Inorg. Chem. – 2014. – Vol. 2014, No 28. – P. 4810-4825.

127. Vallet-Regi, M. Arcos navarrete biomimetic nanoceramics in clinical use / M. Vallet-Regi, D. Arcos
// Royal Society of Chemistry. – 2008. – № 5.

128. Suchanek, W. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants / W. Suchanek, M. Yoshimura // J. Mater. Res. Cambridge Univ. Press. – 2011. – Vol. 13, N_{2} 1. – P. 94-117.

129. The influence of Ca/P ratio on the properties of hydroxyapatite bioceramics / S. Ramesh, C.Y. Tan,
M. Hamdi [et al.] // International Conference on Smart Materials and Nanotechnology in Engineering.
– International Society for Optics and Photonics. – 2007. – Vol. 6423. – P. 64233A.

130. Wang, H. Ca/P ratio effects on the degradation of hydroxyapatite *in vitro* / H. Wang, J.K. Lee, A. Moursi, J.J. Lannutti // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2003. – T. 67. – № 2. – C. 599-608.

131. Прохончуков, А.А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экстремальном воздействии / А.А. Прохончуков, Н.А. Жижина, Р.А. Тигронян // Пробл. космической биологии. – 1984. – Т. 49. – С. 136-162.

132. Tzaphlidou, M. Calcium, phosphorus, calcium-phosphorus ratio in rib bone of healthy humans / M. Tzaphlidou, V. Zaichick // Biol. Trace Elem. Res. Springer. – 2003. – T. 93, – № 1-3. – C. 63-74.

133. A comparative study on the *in vivo* behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules / N. Patel, S.M. Best, W. Bonfield [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2002. – T. 13. – N_{0} 12. – C. 1199-1206.

134. Gibson, I.R. Effect of silicon substitution on the sintering and microstructure of hydroxyapatite /
I.R. Gibson, S.M. Best, W. Bonfield // J. Am. Ceram. Soc. – 2002. – T. 85. – № 11. – C. 2771-2777.

135. Strontium and fluorine co-doped biphasic calcium phosphate: Characterization and *in vitro* cytocompatibility analysis / E. Pourreza, A.Z. Alshemary, B. Yilmaz [et al.] // Biomed. Phys. Eng. Express. $-2017. - T. 3. - N_{2} 4. - C. 045004.$

136. Ravi, N.D. Strontium-substituted calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial properties / N.D. Ravi, R. Balu, T.S. Sampath Kumar // J. Am. Ceram. Soc. / ed. Bandyopadhyay A. $-2012. - T. 95. - N_{2} 9. - C. 2700-2708.$

137. The synthesis and characterization of nanophase hydroxyapatite using a novel dispersant-aided precipitation method / G.M. Cunniffe, F.J. O'Brien, S. Partap [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – Part A. – 2010. – T. 95. – N_{2} 4. – C. 1142-1149.

138. The wet precipitation process of hydroxyapatite / M.R. Saeri, A. Afshar, M. Ghorbani [et al.] // Mater. Lett. – 2003. – T. 57. – № 24-25. – C. 4064-4069.

139. *In vivo* assessment of hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite granules using an ovine defect model / N. Patel, R.A. Brooks, M.T. Clarke [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2005. – T. 16. – N_{0} 5. C. 429-440.

140. Silicon-substituted apatites and process for the preparation thereof / S.M. Best, W. Bonfield, I.R. Gibson [et al.] : пат. 6312468 США. – 2001.

141. Fu, Y. The influence of Sr^{2+} on the cytotoxicity of strontium substituted hydroxyapatite (Sr-HA) / Y. Fu, D. Chen // Journal Funct. Mater. – 2008. – T. 39. – No. 4. – C. 645.

142. Ding, M. Age-related variations in the microstructure of human tibial cancellous bone / M. Ding,
A. Odgaard, F. Linde, I. Hvid // J. Orthop. Res. Wiley Subscription Services, Inc. – 2002. – T. 20. – №
3. – C. 615-621.

143. Development of an electrospun nano-apatite/PCL composite membrane for GTR/GBR application / F. Yang, S.K. Both, X. Yang [et al.] // Acta Biomater. – 2009. – T. 5. – № 9. – C. 3295-3304.

144. Kedem, S. Composite polymer nanofibers with carbon nanotubes and titanium dioxide particles /
S. Kedem, J. Schmidt, Y. Paz, Y. Cohen // Langmuir. American Chemical Society. – 2005. – T. 21. – №
12. – C. 5600-5604.

145. Poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite hybrid nanofibrous scaffolds prepared by electrospinning / X.L. Deng, G. Sui, M.L. Zhao [et al.] // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2007. – T. 18. – № 1. – C. 117-130.

146. Prevascularization of porous biodegradable polymers / A.G. Mikos, G. Sarakinos, M.D. Lyman [et al.] // Biotechnol. Bioeng. – 1993. – T. 42. – № 6. – C. 716-723.

147. Miraoui, H. Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology / H. Miraoui, P.J. Marie // Gene. - 2010. - T. 468. - № 1. - C. 1-7.

148. Grogan, S.P. Repression of chondrogenesis through binding of notch signaling proteins HES-1 and HEY-1 to N-box domains in the COL2A1 enhancer site / S.P. Grogan, T. Olee, K. Hiraoka, M.K. Lotz // Arthritis Rheum. -2008. - T. 58. - N = 9. - C. 2754-2763.

149. Xu, J. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells / J. Xu, Z. Li, Y. Hou, W. Fang // Am. J. Transl. Res. – 2015. T. 7. – № 12. – C. 2527-2535.

150. Augello, A. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells / A. Augello, C. De Bari // Hum. Gene Ther. $-2010. - T. 21. - N_{0} 10. - C. 1226-1238.$

151. Bruderer, M. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis / M. Bruderer, R.G. Richards, M. Alini, M.J. Stoddart // Eur. Cell. Mater. – 2014. – Vol. 28. – P. 269-286.

152. Nanomechanical Properties of Electrospun Composite Scaffolds Based on Polycaprolactone and Hydroxyapatite / P. Tyagi, S.A. Catledge, A. Stanishevsky [et al.] // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2009. – Vol. 9, № 8. – P. 4839-4845.

153. Xu, C. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering / C.Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25, № 5. – P. 877-886.

154. Yang, F. Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering / F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26, № 15. – P. 2603-2610.

155. Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering / W.J. Li, R.L. Mauck, J.A. Cooper [et al.] // J. Biomech. – 2007. – Vol. 40, N_{2} 8. – P. 1686-1693.

156. Mechano-morphological studies of aligned nanofibrous scaffolds of polycaprolactone fabricated by electrospinning / V. Thomas, M.V. Jose, S. Chowdhury [et al.] // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2006. – T.17, № 9. – P. 969-984.

157. Aligned PLGA/HA nanofibrous nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering / M.V. Jose, V. Thomas, K.T. Johnson [et al.] // Acta Biomater. – 2009. – Vol. 5, № 1. – P. 305-315.

158. Nanostructured biocomposite scaffolds based on collagen coelectrospun with nanohydroxyapatite / V. Thomas, D.R. Dean, M.V. Jose [et al.] // Biomacromolecules. -2007. - Vol. 8, No 2. -P. 631-637. 159. Thermoplastic polyurethane/hydroxyapatite electrospun scaffolds for bone tissue engineering: effects of polymer properties and particle size / H.Y. Mi, S. Palumbo, X. Jing [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater. -2014. - Vol. 102, No 7. -P. 1434-1444.

160. Wutticharoenmongkol, P. Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles / P. Wutticharoenmongkol, N. Sanchavanakit, P. Pavasant, P. Supaphol // Macromol. Biosci. – 2006. – Vol. 6, N 1. – P. 70-77.

161. Developing porosity of poly(propylene glycol-co-fumaric acid) bone graft substitutes and the effect on osteointegration: A preliminary histology study in rats / K.U. Lewandrowski, J.D. Gresser, S.P. Bondre [et al.] // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2000. – Vol. 11, № 8. – P. 879-889.

162. Siddharthan, A. Synthesis and characterization of nanocrystalline apatites from eggshells at different Ca/P ratios / A. Siddharthan, T.S. Kumar, S.K. Seshadri // Biomed. Mater. – 2009. – Vol. 4, N_{\odot} 4. – P. 045010.

163. Gopi, D. Amino acid-assisted synthesis of strontium hydroxyapatite bone cement by a soft solution freezing method / D. Gopi, S. Nithiya, L. Kavitha, J.M.F. Ferreira // Bull. Mater. Sci. – 2012. – Vol. 35, N_{2} 7. – P. 1195-1199.

164. Fiber diameter and texture of electrospun PEOT/PBT scaffolds influence human mesenchymal stem cell proliferation and morphology, and the release of incorporated compounds / L. Moroni, R. Licht, J. de Boer [et al.] // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27, № 28. – P. 4911-4922.

165. Loh, Q.L. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size / Q.L. Loh, C. Choong // Tissue Eng. Part B. Rev. – 2013. – Vol. 19, № 6. – P. 485-502.

166. Controlling the porosity of fibrous scaffolds by modulating the fiber diameter and packing density
/ S. Soliman, S. Sant, J.W. Nichol [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – Part A. – 2011. – Vol. 96A, № 3.
– P. 566-574.

167. Mikos, A.G. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering / A.G. Mikos, J.S.Temenoff // Electron. J. Biotechnol. – 2000. – Vol. 3, № 2. – P. 23-24.

168. Griffith, L.G. Emerging Design Principles in Biomaterials and Scaffolds for Tissue Engineering /
L.G. Griffith // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2002. – Vol. 961, № 1. – P. 83-95.

169. Zhu, X. Electrospun fibrous mats with high porosity as potential scaffolds for skin tissue engineering / X. Zhu, W. Cui, X. Li, Y. Jin // Biomacromolecules. – 2008. – Vol. 9, № 7. – P. 1795-1801.

170. Mandal, B.B. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds / B.B. Mandal, S.C. Kundu // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30, № 15. – P. 2956-2965.

171. Structural characterization of sol-gel derived Sr-substituted calcium phosphates with antiosteoporotic and anti-inflammatory properties / G. Renaudin, P. Laquerriere, Y. Filinchuk [et al.] // J. Mater. Chem. – 2008. – Vol. 18, № 30. – P. 3593-3600.

172. Thorough analysis of silicon substitution in biphasic calcium phosphate bioceramics: A multitechnique study / S. Gomes, G. Renaudin, A. Mesbah [et al.] // Acta Biomater. – 2010. – Vol. 6, № 8. – P. 3264-3274.

173. Nanocrystalline apatite-based biomaterials : Synthesis, processing and characterization / D. Eichert,
C. Drouet, H. Sfihi [et al.] // Biomaterials. – 2007. – P. 93-143.

174. Thomason, J.L. The influence of fibre length, diameter and concentration on the strength and strain to failure of glass fibre-reinforced polyamide 6,6 / J.L. Thomason // Compos. Part A Appl. Sci. Manuf. -2009. - Vol. 40, No 2. - P. 114-124.

175. Mechanical properties of electrospun PVA/MWNTs composite nanofibers / J.S. Jeong, J.S. Moon, S.Y. Jeon [et al.] // Thin Solid Films. – 2007. – Vol. 515, № 12. – P. 5136-5141.

176. Zhou, J. Study on PP/calcium sulfate whisker composite / Z. Jian, T. Jiqin, M. Haibing, Y. Jinjian // Eng. Plast. Appl. – 2008. – Vol. 11. – P. 007.

177. Goldstein, S.A. The mechanical properties of human tibial trabecular bone as a function of metaphyseal location / S.A. Goldstein, D.L. Wilson, D.A. Sonstegard, L.S.Matthews // J. Biomech. – 1983. – Vol. 16, No 12. – P. 965-969.

178. Lindahl, O. Mechanical Properties of Dried Defatted Spongy Bone / O. Lindahl // Acta Orthop. Scand. – 1976. – Vol. 47, № 1. – P. 11-19.

179. Behrens, J.C. Variations in strength and structure of cancellous bone at the knee / J.C.Behrens, P.S. Walker, H. Shoji // J. Biomech. – 1974. – Vol. 7, № 3. – P. 201-207.

180. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast / B. Feng, J. Weng,
B.C. Yang [et al.] // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24, № 25. – P. 4663-4670.

181. Nouri, A. Introduction to surface coating and modification for metallic biomaterials / A. Nouri, C. Wen // Surface Coating and Modification of Metallic Biomaterials. Elsevier. – 2015. – P. 3-60.

182. Desai, T.R. A Self-setting, monetite (CaHPO₄) cement for skeletal repair / T.R. Desai, S.B. Bhaduri,

A.C. Tas // Adv. Biocer. and Biocomp. II, Cer. Eng. and Sci. Proc. – 2008. – Vol. 27, № 6. – P. 61-69.
183. Akiyama, S.K. Integrins in cell adhesion and signaling / S.K. Akiyama // Hum. Cell. – 1996. – Vol.

9, № 3. – P. 181-186.

184. Owens, D.K. Estimation of the surface free energy of polymers / D.K. Owens, R.C. Wendt // J. Appl. Polym. Sci. – 1969. – Vol. 13, № 8. – P. 1741-1747.

185. van der Valk, P. Interaction of fibroblasts and polymer surfaces: relationship between surface free energy and fibroblast spreading / P. Van der Valk, A.W.J. Van Pelt, H.J. Busscher [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 1983. – Vol. 17, № 5. – P. 807-817.

186. Чалых, А.Е. Влияние силанольной модификации сополимеров этилена с винилацетатом на поверхностные энергетические характеристики / А.Е. Чалых, В.К. Герасимов, С.Н. Русанова, О.В. Стоянов // Вестник Казанского технологического университета. – 2006. – № 2.

187. Effect of surface characteristics of metallic biomaterials on interaction with osteoblast cells / L. Bren, L. English, J. Fogarty [et al.] // 7th World Biomaterials Congress. – 2004. – P. 1121.

188. ГОСТ Р ИСО 10993-9-2009. Оценка биологического действия медицинских изделий. Ч. 9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деградации // М.: Стандартинформ. – 2010. – С. 11.

189. Chouzouri, G. Degradation of aliphatic polyesters in the presence of inorganic fillers / G. Chouzouri, M. Xanthos // J. Plast. Film Sheeting. – 2007. – Vol. 23, № 1. – P. 19-36.

190. Schliecker, G. Characterization of a homologous series of D, L-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics *in vitro* / G. Schliecker, C. Schmidt, S. Fuchs, T. Kissel // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24, № 21. – P. 3835-3844.

191. Proikakis, C.S. Swelling and hydrolytic degradation of poly(D, L-lactic acid) in aqueous solutions
/ C.S. Proikakis, N.J. Mamouzelos, P.A. Tarantili, A.G. Andreopoulos // Polym. Degrad. Stab. – 2006.
– Vol. 91, № 3. – P. 614-619.

192. Mano, J.F. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: State of the art and recent developments / J.F. Mano, R.A. Sousa, L.F. Boesel [et al.] // Compos. Sci. Technol. – 2004. – Vol. 64, $N_{\rm D}$ 6. – P. 789-817.

193. Xu, X.J. Towards developing surface eroding poly(α-hydroxy acids) / X.J. Xu, J.C. Sy, V. Prasad Shastri // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27, № 15. – P. 3021-3030.

194. Ulery, B.D. Biomedical applications of biodegradable polymers / B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin // Journal of polymer science Part B: polymer physics. – 2011. – Vol. 49, № 12. – P. 832-864.
195. *In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly(D, L-lactic-co-glycolic acid) foams / L. Lu, S.J. Peter, M.D. Lyman [et al.] // Biomaterials. – 2000. – Vol. 21. – № 18. – P. 1837-1845.

196. Diaz, E. *In vitro* degradation of poly(caprolactone)/nHA composites / E. Diaz, I. Sandonis, M.B. Valle // J. Nanomater. Hindawi. – 2014. – Vol. 2014. – P. 1-8.

197. Diaz, E. The effects of bioactive nanoparticles on the degradation of DLGA / E. Diaz, I. Puerto, I. Sandonis // Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater. – 2015. – Vol. 64, № 1. – P. 38-46.

198. Poly(l,l-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation *in vitro* / F. Yang, W. Cui, Z. Xiong [et al.] // Polym. Degrad. Stab. – 2006. – Vol. 91, № 12. – P. 3065-3073.

199. Feng, X. Chemical and biochemical basis of cell-bone matrix interaction in health and disease / X. Feng // Curr. Chem. Biol. – 2009. – Vol. 3, № 2. – P. 189-196.

200. Thomas, K.A. An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition /

K.A. Thomas, S.D. Cook // J. Biomed. Mater. Res. – 1985. – Vol. 19, № 8. – P. 875-901.

201. Keller, J.C. *In vitro* attachment of osteoblast-like cells to osteoceramic materials / J.C. Keller, J.G. Collins, G.G. Niederauer, T.D. McGee // Dent. Mater. – 1997. – Vol. 13, № 1. – P. 62-68.

202. Xu, C. *In vitro* study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughness / C. Xu, F. Yang, S. Wang, S. Ramakrishna // J. Biomed. Mater. Res. – 2004. – Vol. 71, № 1. – P. 154-161.

203. Albuschies, J. The role of filopodia in the recognition of nanotopographies / J. Albuschies, V. Vogel // Sci. Rep. – 2013. – Vol. 3. – P. 1658.

204. Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites / K. Ogata, S. Imazato, A. Ehara [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2005. – Vol. 72, N_{2} 2. – P. 127-135.

205. *In vitro* osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and *in vivo* bone formation in composite nanofiber meshes / E.K. Ko, S.I. Jeong, N.G. Rim [et al.] // Tissue Eng. Part A. – 2008. – Vol. 14, № 12. – P. 2105-2119.

206. Hanada, K. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells / K. Hanada, J.E. Dennis, A.I. Caplan // J. Bone Miner. Res. – 1997. – Vol. 12, №. 10. – P. 1606-1614.

207. Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages / D. Chen, X. Ji, M.A. Harris [et al.] // J. Cell Biol. – 1998. – Vol. 142, $N_{\rm P}$ 1. – P. 295-305.

208. Oshimori, N. The harmonies played by TGF- β in stem cell biology / N. Oshimori, E. Fuchs // Cell Stem Cell. – 2012. – Vol. 11, No 6. – P. 751-764.

209. Langstaff, S. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: Evaluation of biological response / S. Langstaff, M. Sayer, T.J.N. Smith, S.M. Pugh // Biomaterials. – 2001. – Vol. 22, № 2. – P. 135-150.

210. Zhang, J.Y. Genetic expression and functional characterization of the RUNX2 gene in human adult bone marrow mesenchymal stem cells / J.Y. Zhang, L.C. Li // Genet. Mol. Res. Mol. Res. – 2015. – Vol. 14, № 4. – P. 18210-18217.

211. Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and *in vivo* bone formation by activating Wnt/catenin signaling / F. Yang, D. Yang, J. Tu [et al.] // Stem Cells. -2011. - Vol. 29, No 6. - P. 981-991.

212. Blake, G.M. Long-term effect of strontium ranelate treatment on BMD / G.M. Blake, I. Fogelman // Journal of Bone and Mineral Research. – 2005. – Vol. 20, № 11. – P. 1901-1904.

213. Lian, J.B. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation / J.B. Lian, G.S. Stein // Iowa Orthop. J. University of Iowa. – 1995. – Vol. 15. – P. 118.