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

На правах рукописи

# Больбасов Евгений Николаевич

# ЭЛАСТИЧНЫЕ ИНТРАМЕДУЛЛЯРНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ С ОСТЕОИНДУКТИВНЫМИ КОМПОЗИЦИОННЫМИ ПОКРЫТИЯМИ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА ВИНИЛИДЕНФТОРИДА С ТЕТРАФТОРЭТИЛЕНОМ И ГИДРОКСИАПАТИТА

05.11.17 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата технических наук

> Научный руководитель: доктор химических наук, профессор, академик РАН Бузник В. М.

Оглавление

Введение	7
Глава 1. Эластичные интрамедуллярные имплантаты для удлинения и	
исправления деформаций длинных трубчатых костей	16
1.1. Детская ортопедическая патология: проблемы и методы решения	16
1.2. Костная ткань, её структура и функции	21
1.3. Пьезоэлектрические материалы для регенерации костной ткани	26
1.4. Фосфаты кальция для регенерации костной ткани	30
1.5. Постановка задачи исследований	36
Глава 2. Методология работы, материалы и методы исследования	38
2.1. Методология работы	38
2.2. Материалы и методы исследования	39
2.2.1. Характеристика исходных основных материалов	40
2.2.2 Характеристика основных вспомогательных материалов	42
2.3. Методы исследований физико-химических свойств	48
2.3.1. Сканирующая электронная микроскопия	48
2.3.2. Энергорассеивающая рентгеновская спектроскопия	49
2.3.3. Шероховатость поверхности	50
2.3.4 Смачивание поверхности	51
2.3.5. Пористость	52
2.3.6. Прочность и относительное удлинение	53
2.3.7. Адгезия покрытий	53
2.3.8. Эластичность покрытий	54
2.4. Идентификация электроактивных кристаллических фаз в полимерных	
каркасах и композиционных материалах на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ	54

2.4.1. Инфракрасная спектроскопия 55
2.4.2 Рентгенофазовый анализ 56
2.4.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия 57
2.5. Исследования биологических свойств 59
2.5.1. Растворимость в модельной телесной жидкости 59
2.5.2. Исследование жизнеспособности и эффективности адгезии клеток 59
2.5.3. Исследование местного токсического действия и способности
интеграции с нативными тканями61
2.5.4. Исследование способности продуцировать костную ткань в тесте
эктопического костеобразования 62
2.5.5. Исследования процесса интеграции имплантанта с костной тканью при
интрамедуллярном армировании64
2.5.6. Исследования удлиннения длинной трубчатой кости методом
комбинированного остеосинтеза с использованием эластичных
интраммедуллярных импланнтантов65
2.6. Статистическая обработка результатов 66
Глава 3. Исследование структуры и свойств полимерных каркасов на основе
сополимера ВДФ-ТеФЭ67
3.1. Формование полимерных каркасов методами электроформования и
аэродинамического формования67
3.2. Исследование физико-химических свойств полимерных каркасов
3.2.1. Морфология полимерных каркасов
3.2.2. Химический состав и конформационная структура сополимера ВДФ-
ТеФЭ в полимерных каркасах77
3.2.3. Кристаллическая структура полимерных каркасов

3.2.5. Прочность и относительное удлинение полимерных каркасов
3.2.6. Смачивание поверхности каркасов
3.3. Исследование биологических свойств полимерных каркасов
3.3.1. Исследования жизнеспособности и эффективности адгезии клеток к
полимерным каркасам
3.3.2. Исследование местного токсического действия и способности
интеграции каркасов с нативными тканями
3.4. Практическое применение полимерных каркасов
3.5. Выводы по Главе 3
Глава 4. Исследование структуры и свойств композиционных покрытий на основе
сополимера ВДФ-ТеФЭ и гидроксиапатита94
4.1. Формирование композиционных покрытий на основе сополимера ВДФ-
ТеФЭ и гидроксиапатита94
4.2.1. Морфология и пористость покрытий96
4.2.2. Смачивание поверхности композиционных покрытий 98
4.2.3 Адгезионная прочность и эластичность композиционных покрытий 99
4.2.4. Химический состав и конформационная структура сополимера ВДФ-
ТеФЭ в композиционных покрытиях100
4.2.5. Кристаллическая структура композиционных покрытий 102
4.2.6. Темплофизические свойства композиционных покрытий 104
4.3.1 Исследования жизнеспособности и эффективности адгезии клеток к
композиционным покрытиям107
4.3.2. Исследования способности покрытий продуцировать костную ткань в
тесте эктопического костеобразования 109
4.4. Практическое применение композиционных покрытий 114

Глава 5. Сравнительные экспериментальные исследования эластичных
интрамедуллярных имплантатов 116
5.1. Формирование покрытий на поверхности эластичных интрамедуллярных
имплантатов116
5.2. Сравнительные исследования физико-химических свойств 117
5.2.1. Морфология поверхности эластичных интрамедуллярных имплантатов
5.2.2. Механические свойства покрытий эластичных эластичных
интрамедуллярных имплантатов120
5.2.3. Химический состав поверхности эластичных интрамедуллярных
имплантатов
5.2.4. Кристалическая структура покрытий эластичных интрамедуллярных
имплантатов
5.2.5 Смачивание поверхности водой и растворение покрытий эластичных
интрамедуллярных имплантатов127
5.3. Сравнительные исследования биологических свойств эластичных
интрамедуллярных имплантантов129
5.3.1. Исследование адгезии мультипотентных стволовых клеток к
поверхности имплантантов130
5.3.2. Исследование остеоиндуктивных свойств имплантантов в тесте
эктопического костеобразования132
5.3.3. Исследование процессов интеграции имплантантов с костной тканью 134
5.3.4. Сравнительные исследования процесса удлинения трубчатой кости с
использованием различных типов имплантантов 137
5.4 Анализ полученных результатов142

5.5. Использование индивидуальных эластичных интрамедуллярных
имплантатов с биологически активным композиционным покрытием для
исправления деформаций длинных трубчатых костей 145
5.6. Выводы по Главе 5 146
Основные выводы 148
Заключение 151
Список сокращений и условных обозначений154
Список используемой литературы 155
Приложение 1 Проект требований к биологически активным композиционным
материалам на основе сополимеров тетрафторэтилена и фосфатов кальция 175
Приложение 2 Приказ о расширение перечня уникального оборудования ТПУ. 177
Приложение 3 Лабораторный технологический регламент формирования
полимерных каркасов методом аэродинамического формования 178
Приложение 4 Акт об использование результатов диссертационной работы 179
Приложение 5 Акт об использование результатов диссертационной работы 181
Приложение 6 Акт об использование результатов диссертационной работы 182
Приложение 7 Акт об использование результатов диссертационной работы 183
Приложение 8 Лабораторный технологический регламент формирования
композиционных покрытий184
Приложение 9 Патент на изобретение
Приложение 10 Акт об использовании результатов диссертационной работы 186
Приложение 11 Патент на полезную модель 187
Приложение 12 Акт об использовании результатов диссертационной работы 188
Приложение 13 Акт об использование результатов диссертационной работы 189
Приложение 14 Акт об использование результатов диссертационной работы 190

#### Введение

Актуальность работы. В настоящие время в России и мире фиксируется рост количества детских ортопедических патологий связанных с укорочением и деформациями конечностей. Методики и способы восстановления функции опорно-двигательного аппарата для лечения пациентов с укорочением и деформациями конечностей вызванных генетическими заболеваниями (несовершенный остеогенез, фосфат диабет, болезнь Лери), основанные на применении метода компрессионно-дистракционного остеосинтеза достигли предела своих биомеханических возможностей. Объединение усилий отечественных специалистов из ФГУ РНЦ ВТО им. акад. Г.А. Илизарова (г. Курган) и французских ортопедов из университета Нанси позволило разработать методику остеосинтеза, основанную на концепции активного воздействия на костную ткань, в том числе, биологически активными имплантатами для управления процессами ее регенерации и минерализации. Методика сочетает в себе достоинства метода компрессионно-дистракционного остеосинтеза по Г.А. Илизарову остеосинтеза И метода тонкими эластичными спицами, имплантируемыми в интрамедуллярный канал трубчатой кости – эластичными интрамедуллярными имплантатами (flexible intramedullary nail), что позволяет использовать ее, в том числе для коррекции укорочений и деформаций конечности, вызванных генетическими нарушениями.

Улучшение клинических результатов применения комбинированной методики остеосинтеза и расширение спектра показаний к её применению связано с дальнейшим совершенствованием эластичного интрамедуллярного имплантата. Исследования, направленные на разработку эластичных интрамедуллярных имплантатов с улучшенными свойствами, являются актуальными.

Работа выполнена в лаборатории "Плазменных гибридных систем" Научнообразовательного центра Б. П. Вейнберга Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» в тесном сотрудничестве с коллегами кафедры "Неорганической химии" НИ ТГУ г. Томск, ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России г. Курган, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечнососудистых заболеваний» г. Кемерово. Работа выполнена в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научнотехнологического комплекса России", соглашение № 14.575.21.0140 "Разработка остеостимулирующих основе гибридных имплантатов на технологий модифицирования их поверхности и компьютерного моделирования выхода лекарственных препаратов для персонализированной медицины при политравме и онкологии" (уникальный идентификатор работ (проекта) RFMEF157517X0140).

Степень разработанности темы. В настоящее время в клинической практике для исправления укорочений и деформаций длинных трубчатых костей используют два вида эластичных интрамедуллярных имплантатов: имплантаты диаметром до 2 мм, изготовленные из нержавеющей стали и титановые имплантаты диаметром до 2,5 мм с кальций-фосфатным покрытием (КФ), сформированным методом микродугового оксидирования (МДО).

Достоинством стальных интрамедуллярных имплантатов являются отличные механические свойства и низкая стоимость, при этом главным недостатком является низкая способность продуцировать костную ткань. В настоящие время стальные интрамедуллярные имплантаты производит ФГУП **«BTO»** Г.А. «Опытный завод РНЦ академика Илизарова» имени Минздравсоцразвития России.

Недостатки стальных интрамедуллярных имплантатов в значительной степени устранены в титановых интрамедуллярных имплантатах с КФ МДО покрытием. Существенный вклад в разработку технологии КФ МДО покрытий для титановых имплантатов, внесли коллективы отечественных ученых из ИХ ДВО РАН под руководством чл.-корр. РАН Гнеденкова С. В., НИУ БелГУ под руководством д.ф.-м.н. Колобова Ю. Р., ИФПМ СО РАН под руководством д.ф.-м.н. Шаркеева Ю.П. Обладая высокой способностью продуцировать костную

ткань, КФ МДО покрытия характеризуются низкой эластичностью, что вызывает отслоения и разрушения покрытия в процессе имплантации, кроме этого ограничен ассортимент металлов (Ti, Zr, Nb), на которых можно формировать покрытие методом МДО. Эти ограничения сокращают клинические возможности метода комбинированного остеосинтеза с использованием эластичных интрамедуллярных имплантатов, так как имеется клиническая потребность в стальных эластичных интрамедуллярных имплантатах, обладающих высокой способностью продуцировать костную ткань. В настоящие время, в отечественной и зарубежной литературе, не освещены вопросы получения биологически активных композиционных покрытий, на поверхности стальных эластичных интрамедуллярных имплантатов. Имплантаты, удовлетворяющие современным клиническим потребностям, отсутствуют.

Объекты исследования: Композиционные покрытия на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом (ВДФ-ТеФЭ) и гидроксиапатита (ГА), кальций-фосфатные покрытия сформированные методом МДО, эластичные интрамедуллярные имплантаты с КФ МДО покрытием и композиционным покрытием на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ и ГА, полимерные каркасы на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ.

**Предмет исследования:** физико-химические и медико-биологические свойства: полимерных каркасов на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ, эластичных интрамедуллярных имплантатов с композиционных покрытий на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ и ГА, кальций-фосфатным покрытием сформированным методом МДО.

**Цель работы:** разработка эластичных интрамедуллярных имплантатов из нержавеющей стали с покрытием, обладающим высокой способностью продуцировать костную ткань для коррекции ортопедических патологий.

Для достижения поставленной цели решались следующе задачи:

1. Выбор материалов для изготовления композиционного покрытия для стальных эластичных интрамедуллярных имплантатов.

2. Выбор способа формирования композиционного покрытия на поверхности эластичных интрамедуллярных имплантатов.

3. Разработка и изготовление технологического оборудования для формирования композиционных покрытий и полимерных каркасов.

4. Исследование физико-химических и медико – биологических свойств полимерных каркасов.

5. Исследование физико-химических и медико-биологических свойств композиционных покрытий для эластичных интрамедуллярных имплантатов.

6. Разработка дизайна эластичного интрамедуллярного имплантанта.

7. Проведение сравнительных исследований разработанных эластичных интрамедуллярных имплантатов с биологически активным композиционным покрытием с существующими аналогами.

#### Научная новизна работы.

1. Установлено, что полимерные каркасы на основе сополимера винилиденфторида тетрафторэтиленом, с сформированные методом электроформования и аэродинамического формования, содержат электрически активные кристаллические фазы, при этом прочность более чем 7,5 раз и содержание электрически активных кристаллических фаз более чем на 40 % выше в каркасах сформированных методом электроформования что обусловлено воздействием электрического поля на прядильный раствор В процессе формования каркаса.

2. Установлено, что при одинаковых значениях показателя краевого угла смачивания поверхности водой ~120°, полимерные каркасы сформированные методом аэродинамического формования обеспечивают более чем в 2 и 1,2 раза высокие значения показателя адгезии стволовых клеток и эндотелиальных клеток к поверхности каркаса по сравнению с каркасами сформированными методом электроформования, что обусловлено структурой и морфологией волокон формирующих полимерный каркас.

3. Установлено, что уменьшение массового содержания сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом в композиционном покрытие с 50 до 25 % увеличивает пористость покрытия в 8,4 раза, количество адгезированных клеток на поверхности в 5,4 раза, вероятность формирования костной ткани в тесте эктопического костеобразования до 85 %, уменьшает адгезионную прочность к стальной подложке в 1,6 раза, эластичность в 3 раза. Оптимальным составом обладают композиционные покрытия с содержанием сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом ~35 масс %.

4. Установлено, что эластичные интрамедуллярные имплантаты в виде стальной спицы, имеющей специальную конфигурацию, с композиционным покрытием на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом 35 масс % и гидроксиапатита 65 масс %, толщиной  $180 \pm 20$  мкм, пористостью  $26 \pm 6$ %, адгезионной прочностью к стальной подложке 17 ± 2 МПа, при имплантации в интрамедуллярный канал длинной трубчатой кости имеют прочность сцепления с костной тканью ~ 500 МПа, стимулируют образование зрелой костной ткани способствуют ускорению вокруг имплантата, процесса формирования дистракционного регенерата при удлинении длинной трубчатой кости за счет сохранения целостности покрытия при имплантации и наличия кристаллических структур, обладающих пьезоэлектрическими свойствами.

Теоретическая значимость работы заключается в развитие представлений о формирование электрически активных кристаллических фаз в сополимере ВДФ-ТеФЭ при формирование изделий методами ИЗ него электро-И аэродинамического формования; при кристаллизации из расплава в присутствие значительных количеств мелкодисперсных порошков ГА; развитие представлений об особенностях взаимодействия электрически активных полимерных И композиционных материалов с клетками и тканями в системах in vitro, in vivo.

Практическая значимость работы. Разработано и изготовлено новое медицинское изделие для травматологии и ортопедии – эластичные

интрамедуллярные имплантаты с биоактивным композиционным покрытием. Для использования реконструктивной хирургии мягких тканей методами В (АЭРДФ) электроформования **(**ЭΦ**)** И аэродинамического формования изготовлены полимерные электрически активные каркасы пористостью от 9 до 87 %, прочностью от 1,9  $\pm$  0,1 МПа до 15,3  $\pm$  2,6 МПа. Разработана технология формирования электрически активных полимерных каркасов. Разработана технология формирования композиционных покрытий для эластичных имплантатов. Разработана интрамедуллярных И изготовлена установка, формования позволяющая методом аэродинамического изготавливать ИЗ растворов различных полимеров полимерные и композиционные материалы для приложений регенеративной медицины. Новизна и актуальность практических разработок подтверждена патентами, а так же дипломами и медалями международных выставок.

Методы исследования и методология работы. В основу исследования, положено предположение о том, что высокая способность интрамедуллярного имплантата, функционирующего в условиях циклических нагрузок, продуцировать костную ткань, может быть обеспечена композиционным покрытием, на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ обладающего способностью формировать электрически активные (сегнетоэлектрические) кристаллические фазы при кристаллизации из расплава. В качестве биологически активного наполнителя может быть использован порошок ГА.

Для исследования физико-химических свойств композиционных покрытий, полимерных каркасов И имплантатов применяли следующие методы: профилометрия, сканирующая электронная микроскопия, оптическая гониометрия, порометрия, дифференциальная сканирующая калориметрия, рентгенофазовый анализ, инфракрасная И рентгеновская спектроскопия, испытания механических свойств. Медико-биологическое тестирование было проведено с использованием методик оценки адгезии и жизнеспособности МСК, эндотелиальных клеток in vitro и двух типов биологических моделей в

экспериментах *in vivo*. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft, Dell).

## Положения выносимые на защиту:

1. Полимерные каркасы, сформированные методом аэродинамического формования из раствора сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом в смеси метилэтилкетона и диметилформамида при объёмном отношении компонентов смеси 1:2 и содержание сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом 5 масс % характеризуются средним диметром волокон 0,8  $\pm$  0,3 мкм, прочностью при растяжении 1,90  $\pm$ 0,14 МПа, краевым углом смачивания поверхности водой ~120° наличием электрически активных кристаллическими фаз, обеспечивают значения показателя жизнеспособности клеток ~96 %, адгезии стволовых клеток 400  $\pm$  50 шт./мм<sup>2</sup>, эндотелиальных клеток 3600  $\pm$  400 шт./мм<sup>2</sup>, не вызывают местных отрицательных тканевых реакций при имплантации.

2. Изменение массовой доли сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом от 50 до 25 % в композиционном материале на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом и гидроксиапатита увеличивает пористость композитного материала от 8 до 67 %, вероятность продуцировать костную ткань из клеток костного мозга в тесте эктопического костеобразования от 70 до 90 %, уменьшает эластичность композиционного материала от 2 до 5 мм и адгезионную прочность к металлической подложке с 22 до 10 МПа.

3. При удлинение конечности методом комбинированного остеосинтеза стальные эластичные интрамедуллярные имплантаты с биологически активным композиционным покрытием с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 масс % и ГА 65 масс %, толщиной 180  $\pm$  20 мкм, пористостью 26  $\pm$  6 %, адгезионной прочностью 17  $\pm$  2 МПа, по сравнению со стальными интрамедуллярными имплантатами без покрытия, обеспечивают: увеличение прочности сцепления имплантата с костной тканью более чем на 40 %, увеличение скорости

дистракции более чем на 50 %, обладают выраженной способностью продуцировать костную ткань. Разработанный эластичный интрамедуллярный имплантат с биологически активным композиционным покрытием используется для исправления укорочений и деформаций длинных трубчатых костей.

Реализация результатов работы. Результаты работы используются в экспериментальных исследованиях в следующих учреждениях: ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Филиале ТНИИКиФ ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России, ФГБНУ "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний", ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л.Цивьяна» Минздрава России, ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, ФГБУ им. И.Канта».

Достоверность и обоснованность полученных результатов подтверждается использованием современных высокоточных методов исследования, поверенного измерительного оборудования, достаточным объемом экспериментальных данных, сопоставлением с опубликованными результатами.

Личный вклад автора заключается в выборе методов решения основных диссертационного исследования, планирование задач проведение И экспериментальных исследований, анализе интерпретации полученных И разработке образцов результатов, изготовление экспериментальных И каркасов и композиционных покрытий, разработке полимерных дизайна эластичного интрамедуллярного имплантата с композиционным покрытием, эскизном проектирование установки аэродинамического формования, подготовке научных публикаций и патентов. Совместно с научным руководителем автор принимал участие в постановке основных задач диссертационного исследования и формулировке основных выводов диссертационного исследования.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались и обсуждались на конференциях: 11th Essen Symposium on Biomaterials and

Віотесhanics: Fundamentals and Clinical Applications (Дуйсбург-Эссен, Германия 2009), The 13th Seminar and Meeting on Regenerative nanomedeicine, tissue and genetic engineering and the role of ceramics CCT 13 (Фаэнса, Италия, 2011), The 3rd International Conference of Bionic Engineering (ISBI) (Жухай, Китай, 2010), Annual Conference and Expo on Biomaterials (Лондон, 2016), Electron Microscopy Characterization of Organic-Inorganic Interfaces (Лондон, 2016), International Conference "Physics of Cancer: Interdisciplinary Problems and Clinical Applications" (Томск, 2016), Fifth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (Лиссабон, 2017). Результаты работы были отмечены золотыми медалями на 5-й Международной Варшавской выставки изобретений IWIS-2011, Национальной научной и технологической выставке в Бангкоке (Таиланд, 2013), Дипломом международного конкурса "Наука и образование" (Оксфорд, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 32 печатных работы. Из них: 19 статьи в научных журналах входящих в перечень ВАК, 10 статей в зарубежных изданиях индексируемых Web of Science и Scopus, учебное пособие, получено 2 патента РФ.

Структура и объем диссертации: Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка использованной литературы и приложений. Объем диссертации составляет 190 страниц, включая 30 рисунков, 16 таблиц, 14 приложений и списка литературы из 215 наименований.

# Глава 1. Эластичные интрамедуллярные имплантаты для удлинения и исправления деформаций длинных трубчатых костей

#### 1.1. Детская ортопедическая патология: проблемы и методы решения

Развитие человеческого общества, наряду с огромными достижениями в науке, технике и медицине, благотворно сказывается на уровне жизни значительной части населения. К сожалению, этот процесс сопровождается и негативными проявлениями, к которым, относятся, в частности, проблемы врожденных аномалий в развитии ребенка. Современные методы наблюдения за внутриутробным развитием плода позволяют диагностировать врожденные аномалии, однако вопрос о прерывании беременности или рождения ребенка решают родители, руководствуясь собственными представлениями о морали, этике и праве на жизнь ещё не родившегося человека. В настоящее время одной из наиболее часто встречающихся аномалий, являются аномалии развития костномышечной системы [1–3]. Сложность ранней диагностики врожденных пороков скелета обусловлена эмбриопатиям – изменениями эмбриона, возникающими в период с 16 дня до конца 8 недели после оплодотворения. В России проблема усугубляется недостаточным количеством современных медицинских центров, а так же недостаточным уровнем их оснащения. При этом наблюдаемое увеличение частоты и тяжести врожденных ортопедических патологий связывают с ухудшением экологической ситуации, в первую очередь, в индустриально развитых странах.

Согласно статистическим данным в России число новорожденных с нарушениями развития скелета достигает 2,5 – 3 %. При этом по данным Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» доля пациентов, которым требуется удлинение конечности, составляет ~50% от числа обратившихся [4]. Укорочения конечности, которые прогрессируют по мере развития ребенка, приводят к паталогическим изменениям

не только в пораженной конечности. Например, перегрузка здоровой конечности и перекос таза становятся причиной развития патологий, связанных с деформациями тазобедренного сустава, подвывихами здорового бедра, что приводит к снижению показателей качества жизни по многим параметрам. Таким образом, восстановление длинны конечности позволяет комплексно решить не только проблему ортопедической и биомеханической реабилитации всего организма, но и проблему социальной реабилитации пациента в обществе.

При врожденных пороках развития скелета ортопедическая профилактика не возможна. В настоящее время задачи предупреждения развития паталогических состояний в пораженном сегменте и функционально связанных элементах всей биомеханической системы, анатомической, функциональной и социальной реабилитации ребенка до начала школьного периода уже видятся выполнимыми. Прочным фундаментом для решения этих проблем являются методики оперативного лечения, заложенные в работах выдающегося ортопеда Г.А. Илизарова, развитые его коллегами и последователями. Ими, разработана концепция функционального восстановления тканей во всей биомеханической цепи конечности, основанная на патогенетическом влиянии и индуцировании процессов остеогенеза [5–7].

Методика остеосинтеза по Г.А Илизарову позволяет закрытым путем с минимальной травматичностью мягких и твердых тканей добиваться точной репозиции костных отломков, стабильно их фиксировать и проводить раннее и полноценное функциональное лечение [8]. Аппарат, предложенный Г.А Илизаровым, считается одним из лучших аппаратов наружной (внешней) фиксации в силу своих конструктивных особенностей и уникальных клинических возможностей, позволяющих использовать его не только для остеосинтеза при переломах, но и для удлинения конечностей, а также исправления деформаций кости и восстановления функций в смежных с ней суставах [9,10].

Работа французских докторов Prevot, Lascombes и Metaizeau по поиску оптимальных способов фиксации костных отломков при переломах диафизов

бедренной кости позволила разработать методику, объединившую в себе преимущества внешней и внутренней фиксации перелома. В последствии эта методика получила название эластичное интрамедуллярное армирование (Elastic Stable Intramedullary Fixation (ESIF)) [11,12]. Суть разработанной методики заключается в использовании для фиксации перелома предварительно изогнутых спиц – эластичных интрамедуллярных стержней (ЭИ) (flexible intramedullary nails, FIN), имплантируемых в интрамедуллярный канал травмированной кости (рисунок 1.1.а.). При таком способе фиксации эластичный интрамедуллярный имплантат, находясь в механически напряженном состоянии, фиксирует перелом в трех местах, обеспечивая одновременно четыре вида фиксации: изгибающую, аксиальную, трансляционную и вращательную. Таким образом, эластичное интрамедуллярное армирование позволяет сохранить «линию силы перелома», в то же время, - создавать вертикальное микродвижение в месте перелома, что способствует образованию костной мозоли, тем самым гарантируя стабильность отломков [13]. Благодаря таким достоинствам, как отсутствие костных повреждений эпифизарной пластины, сохранение контакта между мускулатурой и костью, отсутствие значительной кровопотери метод позволяет обеспечить быструю консолидацию перелома при низкой норме осложнений [14].

Объединение усилий французских и отечественных специалистов из ФГУ РНЦ ВТО им. акад. Г.А. Илизарова (рук. проф. А.В. Попков) позволили разработать комбинированную методику остеосинтеза, сочетающую в себе достоинства методики эластичного интрамедуллярного армирования c компрессионно-дистракционного достоинствами методики остеосинтеза с применением аппаратов наружной (внешней) фиксации по Г.А Илизарову (рисунок 1.1.б.) [5,15–17].

Применение комбинированной методики остеосинтеза позволило снизить: вероятность осложнений при удлинении предплечья [18], исправлении деформаций длинных трубчатых костей у пациентов с болезнью Лери [19],

сократить сроки удлинения голени у пациентов с диагнозом болезнь Олье с 25 дней/см до 12 дней/см [20].



Рисунок 1.1. Схема имплантации эластичных интрамедуллярных имплантатов: а – классическая, б – комбинированная.

Известно, что фосфаты кальция являются триггерами, запускающими, механизмы дифференцировки мультипотентных клеток в остеобласты [21–24].

Анатомическое расположение имплантатов в интрамедуллярном канале трубчатой кости – зоне, обладающей хорошим кровоснабжением, и при этом, являющейся естественным "хранилищем" мультипотентных клеток, позволяет использовать эти факторы для управления процессом гистогенеза с целью продуцирования костной ткани [25,26].

Стимулирование продуцирования костной ткани на поверхности имплантата способствует: увеличению жесткости фиксации костных отломков, увеличению минерализации и прочности кости [27], увеличению скорости дистракции при удлинение длинных трубчатых костей [28], а также используется для коррекции деформаций, вызванных наследственными генетическими изменениями (несовершенный остеогнез) [29].

В настоящее время, для управления гистогенезом ткани, используют интрамедуллярные имплантаты с кальций-фосфатными покрытиями, полученными методом микродугового оксидирования (МДО) (micro-arc oxidation, MAO) [28,30]. Покрытия, сформированные этим методом, обладают развитым рельефом, хорошо растворяются в физиологических жидкостях, насыщая место имплантации кальцием и фосфором, обладают высокими остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами [21,31].

Одним из недостатков КФ МДО покрытий, является низкая эластичность, кроме этого, с увеличением толщины покрытий, существенно снижается адгезионная прочность [32], что вызывает разрушение и отслоение покрытия в результате значительных изгибных деформаций, которым подвергается эластичный имплантат, как в процессе имплантации, так и в процессе функционирования. Другим недостатком является то, что их можно наносить только на металлы вентильной группы (Ti, Zr, Nb) [33]. Это обстоятельство существенно снижает клинические возможности метода комбинированного остеосинтеза, так как часто возникает потребность в имплантатах, изготовленных из нержавеющей стали, обладающих более высоким модулем упругости [34–36].

Таким образом, улучшение клинических результатов и расширение показаний к применению метода комбинированного остеосинтеза, связано, с решением задачи создания эластичных интрамедуллярных имплантатов, из нержавеющей стали, способных эффективно продуцировать костную ткань в интрамедуллярном канале, что определяет актуальность настоящего исследования.

## 1.2. Костная ткань, её структура и функции

Трубчатые кости в процессе своей эволюции приобрели уникальное сочетание высокой прочности и низкой массы, что обеспечивается их структурой (рисунок 1.2). Различают три основных зоны длинной трубчатой кости. Эпифиз – концевой закруглённый, чаще расширенный, отдел трубчатой кости, формирующий сустав со смежной костью посредством сочленения их суставных поверхностей. Одна из суставных поверхностей выпуклая (располагается на суставной головке), а другая вогнутая (формируется суставной ямкой). Метафиз – отдел трубчатой кости, прилегающий к эпифизарной пластинке. За счёт эпифизарной пластинки осуществляется рост кости в длину в детстве и юношеском возрасте; в процессе роста отмечается окостенение метафиза со стороны эпифиза. В 18-25 лет метафиз перестаёт расти и окостенение завершается с формированием целостной кости. Диафиз – центральный отдел (тело) трубчатой кости, расположенный между эпифизами. Диафиз имеет цилиндрическую или трёхгранную форму. Рост диафиза осуществляется за счёт метаэпифизарной зоны – метафиза и хрящевой эпифизарной пластинки. В диафизе расположен костномозговой канал, заполненный костным мозгом. Диафизы трубчатых костей покрыты надкостницей.

Различают два типа костной ткани – губчатую и компактную.

Губчатая кость состоит ИЗ сети трабекул, образующих обширные костномозговые пространства, содержащие гемопоэтические клетки и жир. Костные трабекулы содержат остеоциты, окруженные слоем остеобластов. Губчатая кость характеризуется низкими показателями прочности, твердости и плотности. Из губчатой костной ткани сформированы эпифизы длинных трубчатых костей, она входит в состав большинства плоских костей, эктопических очагов костеобразования и костной мозоли на ранних стадиях Компактная костная ткань отличается высокими развития. значениями показателей прочности, твердости, плотности, уровня минерализации, образует метафиз длинных трубчатых костей, состоит из пластинчатой костной ткани, имеет круговое расположение гаверсовых каналов, не содержит трабекул.



Рисунок 1.2 Организация длинной трубчатой кости: а) анатомическое строение кости, б) микроскопическое строение кости. (1 – метафиз; 2 – суставной хрящ; 3 – губчатое вещество эпифиза; 4 – компактное вещество диафиза; 5 – костномозговая полость в диафизе, 6 – костный мозг; 7 – надкостница.

Костная ткань является природным живым композитом, который на 60 % состоит из минеральных веществ (доминирует гидроксиапатит), на 30 % – из органических субстанций (коллагеновые волокна, протеогликаны и т.д.) и на 10 % – из воды в свободном и связанном состоянии. Различают неорганическую (минеральную) и органическую составляющие внеклеточного вещества костной ткани – костного матрикса.

Неорганическая часть костного матрикса представлена преимущественно кальцием и фосфором, составляющими примерно 35 и 50 %, соответственно. Основную массу костной ткани составляет главный неорганический компонент костной ткани – кристаллический гидроксиапатит. Аморфные фосфаты кальция сосредоточены в основном на поверхности гидроксиапатита. Фосфаты кальция обеспечивают минерализацию костной ткани, обеспечивая механические характеристики кости. По одной из гипотез минерализация костной ткани происходит за счет образования аморфных кальций фосфатных соединений с последующей кристаллизацией их в гидроксиапатит внутри волокон коллагена. Важную часть минерального компонента костного матрикса составляют микроэлементы Sr, Mg, Cu, Zn и т.д. Характерной особенностью микроэлементов является уникальная способность при низкой концентрации выступать в роли эффективных катализаторов и активаторов биоактивных молекул: ферментов, гормонов, витаминов.

Органическая составляющая костного матрикса в основном представлена коллагеном (98 %) и неколлагеновыми белками (~2%) такими как: остеонектин, остеокальцин, силопротеины, протеогликаны, морфогенетические белки и фосфолипиды.

Коллаген сложный белок, молекула которого представляет собой правозакрученную спираль из трёх α-цепей. Один виток спирали α-цепи содержит три аминокислотных остатка. Молекулярная масса коллагена около 300 кДа, длина 300 нм, толщина 1,5 нм. Коллаген, являясь основным белком костного матрикса, во многом определяет его конструкцию, а так же физико-механические характеристики: прочность, упругость, жесткость, устойчивость к деформациям. Коллагеновые волокна в компактной кости входят в состав костных пластинок остеона и костных трабекул в губчатой кости. На сегодня известно 17 видов коллагенов [37]. В костной ткани преобладает коллаген первого типа, доля которого составляет 90 – 95 %, остальная часть приходится на коллаген пятого типа.

Несмотря на то, что на все остальные протеины количественно приходится примерно 2 %, тем не менее, они играют исключительную роль в обмене органических веществ, минералов, витаминов и микроэлементов, принимая активное участие в ремоделирование костной ткани в норме и патологии. Условно не коллагеновые белки по функциональной активности можно разделить на две большие группы. Первые участвуют активно В формировании микро архитектоники костной ткани, определяя расположение костных клеток, а так же связь с коллагеном и гидроксиапатитом. К этой группе относятся ИХ протеогликаны, фиброкенетин, гиалоурановая кислота и т.д. Другая подгруппа воздействует на функциональную активность клеток: адгезию, миграцию, пролиферацию. Она включает специфические остеотропные гормоны, ростовые и дифференцирующие факторы, морфогенетические белки. Вместе с коллагеном они участвуют в формировании специфического костного микроокружения [38].

Таким образом, костная ткань представляет собой уникальный, живой, сложно организованный композит, выполняющий биомеханическую, зашитую, кроветворную, сенсорную, морфо-образующую и регенераторную функции. Композитное строение кости обеспечивает уникальное сочетание прочности, упругости, пористости, эластичности [39].

Костная ткань, является электрически активным композитом, в котором под воздействием внешних механических напряжений и электромагнитных полей, возникают электрические потенциалы [40]. Выделяют пьезоэлектрические (прямой и обратный эффект) [41–43] и электрокинетические свойства костной ткани [44].

Считается, что в условиях целостного организма доминирующим механизмом электрогенерации в кости являются электрокинетические процессы, а электрические потенциалы, генерируемые костью, являются по своей природе потенциалами течения (streaming potential) [45]. Стимулирующее воздействие электрического поля на продуцирование костной ткани носит прямой характер путем воздействия на внутриклеточные компоненты (ионы, факторы роста и рецепторы) и опосредованный характер посредством изменения конформации

белков [46]. Известно, что воздействие электрического поля вызывает перераспределение катионов кальция (Ca<sub>2</sub><sup>+</sup>) во внеклеточном матриксе костной ткани и стимулирует гальванотаксис клеток [47].

В работе [48] показано, что постоянный электрический ток стимулирует движение катионов кальция  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$  в направление катода и способствует образованию апатита остеобластами. Внешнее электрическое поле изменяет конформацию фиброкенетина, что способствует абсорбции протеинов на поверхности имплантата [49], способствует захвату ионов и макромолекул из межкостной биологической жидкости, что стимулирует активность остеобластов [50,51].

В настоящие время большинство исследователей сходятся во мнении, что для наиболее эффективного продуцирования костной ткани свойства имплантируемых материалов должны быть максимально приближены к свойствам нативной кости [52,53].

Основные требования перспективным биологически К активному композитному материалу для травматологии и ортопедии были разработаны и утверждены специалистами ФГУ «РНЦ ВТО им. акад. Г.А. Илизарова» 1). В частности, покрытия на основе композиционных (ПРИЛОЖЕНИЕ материалов должны обладать высокой эластичностью, достаточной механической прочностью, толщиной более 90 мкм, высокой многоуровневой пористостью, что способствует протеканию процессов интеграции костной ткани с биологически активным покрытием с образованием системы "покрытие – костная ткань". С биологических позиций такие покрытия и продукты их деградации должны быть не токсичными, не вызывать отрицательных тканевых реакций, не вызывать аллергии, способствовать пролиферации клеток в остеогенном направление.

Создать полимерные композиты, обладающие необходимым набором функций и при этом оказывающие электростимулирующее воздействие на продуцирование кости в результате механического воздействия на композит, возможно на основе пьезоэлектрических материалов [54]. Пьезоэлектрические композиты не требует имплантации электродов или источников тока, что исключает возможность

накопления продуктов электролиза в тканях, а так же внешних источников электрического поля для стимуляции образования кости [54].

#### 1.3. Пьезоэлектрические материалы для регенерации костной ткани

Прямой пьезоэлектрический эффект – эффект возникновения на гранях кристалла электрического заряда, величина которого пропорциональна величине деформации кристалла. Эффект был открыт в 1880 г. Жаком и Пьером Кюри. Известен обратный пьезоэлектрический эффект – явление возникновения внутренних механических напряжений в кристаллах, помещенных во внешнее электрическое поле, при этом механические напряжения пропорциональны напряженности электрического поля. Обратный пьезоэлектрический эффект был предсказан в 1881 г. Липпманом, исходя из термодинамических соображений. В том же году эффект экспериментально подтвержден братьями Кюри. Разработка пьезоэлектрических композитов для регенерации костной ткани является предметом исследования многих научных групп во всем мире. В качестве электрически активной фазы для создания пьезоэлектрического эффекта используются различные виды сегнетоэлектрических материалов.

Сегнетоэлектричество – явление возникновения спонтанной поляризации в кристалле в определенном температурном интервале в отсутствии внешнего электрического поля. Спонтанная поляризация может быть переориентирована внешним электрическим полем. Кристаллы, которым присуще явление При сегнетоэлектричества, называются сегнетоэлектриками. определённой температуре (температура (точка) Кюри) кристаллическая модификация сегнетоэлектриков изменяется спонтанная поляризация И исчезает. Кристаллическая модификация, в которой наблюдается явление спонтанной поляризации, называется полярной фазой, кристаллическая модификация в которой отсутствует спонтанная поляризация – неполярной фазой.

Можно выделить два основных направления в развитии исследований, направленных на создание композиционных сегнетоэлектрических материалов для регенерации костной ткани.

Первое – применение в качестве неорганической фазы сегнетоэлектриков с высокими значениями пьезоэлектрических коэффициентов. В настоящие время наиболее исследованы материалы на основе титаната бария ( $BaTiO_3$ ) [55–58], композиты титаната бария с гидроксиапатитом [59–62], а так же композиционные материалы на основе титаната бария с биодеградируемыми полимерами [63,64] и [65–67]. Изучается полимерными сегнетоэлектриками возможность использования таких сегнетоэлектриков, как ниобат лития  $(LiNbO_3)$  [68,69], ниобат калия натрия ( $(K_x Na_x) NbO_3$ ) [70] и композитов на их основе [71]. Одним из ограничивающих факторов использования неорганических сегнетоэлектриков для регенерации костной ткани является риск выделения токсичных ионов и комплексов [72,73], что потенциально способно провоцировать отрицательные тканевые реакции в процессе длительного функционирования имплантата in vivo.

Вторым направлением является использование в качестве органической фазы композитного материала сегнетоэлектрических полимерных материалов [74–76].

Среди полимерных сегнетоэлектриков одними из наиболее электроактивных полимеров являются поливинилиденфторид (ПВДФ) и его сополимеры с трифторэтиленом (ВДФ-ТрФЭ) и тетрафторэтиленом (ВДФ-ТеФЭ) [77].

Сегнетоэлектрические свойства ПВДФ обусловлены дипольным моментом, направленным перпендикулярно оси полимерной цепи и возникающим вследствие значительно большей электроотрицательности атомов фтора по сравнению с атомами водорода и углерода (рисунок 1.3а) [78,79].

Выделяют три основных полиморфных модификаций ПВДФ ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (рисунок 1.36).  $\alpha$  – модификация характеризуется моноклинной решеткой, в которой цепи с конформацией (*TGTG*<sup>-</sup>) имеют противоположные дипольные моменты, поэтому в целом она является неполярной.  $\gamma$  – модификация содержит слабо полярную ячейку с конформацией цепи (*T*<sub>3</sub>*GT*<sub>3</sub>*G*<sup>-</sup>). Наиболее электрически

активной является β – модификация с орторомбической решеткой с полярной ячейкой, в которой цепи имеют конформацию плоского зигзага (*TTT*) [80,81].

Наиболее стабильной полиморфной модификацией ПВДФ является α – модификация, которая образуется при кристаллизации из расплава [82]. Поэтому для получения электрически активной β – модификации применяют такие методы как растяжение [83], кристаллизация из расплава под высоким давлением [84], поляризацией высоким напряжением [85], электроформование [86] и т.д.





Рисунок 1.3. Молекула поливинилиденфторида: а – образование дипольного момента, б – конформационная структура макромолекулы, в – кристаллическая структура ПВДФ [79,87,88].

Ранее было показано, что пленки и нетканые материалы из ПВДФ в β – полиморфной модификации могут быть применены в приложениях активной тканевой инженерий [89], поскольку способствует дифференцировки

мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты [90–92] и стимулируют регенерацию костной ткани [93,94].

Однако применение ПВДФ в качестве связующего материала для изготовления электрически активных композиционных покрытий эластичных интрамедуллярных имплантатов ограниченно низкой адгезией покрытий, для увеличения которой, как правило, требуется формировать покрытие выше температуры плавления ПВДФ, что приводит к образованию *α* – полиморфной модификации [95].

Известно что, введение в молекулярную структуру ПВДФ тетрафторэтилена ТеФЭ в количестве более 7 мол % способно структурировать ее таким образом, что даже при кристаллизации из расплава образуются сегменты с длинными транс последовательностями [96–99]. Таким образом, непосредственная кристаллизация из расплава в  $\beta$  – полиморфной модификации позволяет использовать сополимеры ВДФ - ТеФЭ для разработки электрически активных композиционных покрытий для эластичных интрамедуллярных имплантатов.

Сополимер ВДФ-ТеФЭ является химически стойким синтетическим полимером [100], способным при комнатной температуре растворятся в низкотоксичных органических растворителях, таких как ацетон, метилэтилкетон, бутилацетат, этилацетат [101], что снижает риск отторжения имплантата и упрощает технологический процесс формирования композитного материала. Являясь кристаллическим полимером, сополимер ВДФ-ТеФЭ испытывает существенное влияние на кристаллическую структуру, а, следовательно, и на комплекс физикохимических свойств, технологических параметров его переработки в изделие. При этом в настоящее время в доступной литературе отсутствует информация о влиянии методов переработки и минеральных наполнителей на кристаллическую структуру и физико-химические свойства, как чистого полимера, так и композитов на его основе. Отсутствуют исследования, направленные на изучение биологической совместимости этого сополимера в системах in vitro, in vivo, что не позволяет использовать этот перспективный материал для приложений тканевой инженерии.

## 1.4. Фосфаты кальция для регенерации костной ткани

Кальций - фосфатные материалы представляют собой обширный класс химических соединений, в состав которых ионы кальция ( $Ca^{2+}$ ), фосфат ионы ( $PO_4^{3-}$ ), пирофосфат ионы ( $P_2O_7^{4-}$ ), кроме этого в состав так же могут входить ионы водорода и гидроксид ионы (OH<sup>-</sup>). Основные фосфаты кальция представлены в таблице 1.1.

Название	Химическая формула	Отношен ие Са/Р	Элементарная ячейка
Монокальций- фосфат моногидрат	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,5	Триклинная <i>Р</i> 1
Монокальций- фосфат ангидрат	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,5	Триклинная <i>Р</i> 1
Дикальций-фосфат дигидрат	CaHPO <sub>4</sub> · <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	1	Моноклинная Іа
Дикальций-фосфат ангидрат	CaHPO <sub>4</sub>	1	Триклинная <i>Р</i> 1
Октакальций- фосфат	$Ca_8H_2(PO_4)_6$ ·5H <sub>2</sub> O	1,33	Триклинная <i>Р</i> 1
β-трикальций- фосфат	$\beta$ - Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1,5	Ромбоэдрическая <i>R3cH</i>
α-трикальций- фосфат	$\alpha$ - Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1,5	Моноклинная <i>Р</i> 2 <sub>1</sub> /а
Тетракальций- фосфат	$Ca_4(PO_4)_2O$	2	Моноклинная Р21
Аморфный кальций-фосфат	$Ca_x(PO_4)_y \cdot n H_2O$	1,2÷2,2	-
Гидроксиапатит	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	1,67	моноклинная P2 <sub>1</sub> /b или гексагональная P6 <sub>3</sub> /m
Нестехиометричн ый гидроксиапатит	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-}$ x(OH) <sub>2-x</sub> (0 <x<1)< td=""><td>1,5÷1,67</td><td>-</td></x<1)<>	1,5÷1,67	-

Таблица 1.1. Названия и основные свойста фосфатов кальция [102].

В травматологии и ортопедии наибольший практический интерес представляют гидроксиапатит и трикальцийфосфат – минералы, являющиеся естественными метаболитами костной ткани [103,104]. Эти кальций-фосфатные минералы

обладают высокой биосовместимостью, не вызывают отрицательных аллергических и иммунологических реакций, не обладают канцерогенными и мутагенными свойствами, что делает их хорошим инструментом для создания покрытий на имплантатах для применения в области травматологии и ортопедии [105,106].

Благодаря прогрессу области развития В химических И рентгенодифракционных методов анализа в 1926 г W. F. de Jong удалось показать что неорганическая часть костного матрикса представлена различными формами гидратированных фосфатов кальция с преобладанием гидроксиапатита [107]. Гидроксиапатит являясь доминирующим метаболитом костной ткани, имеет сходную с костью кристаллическую структуру, относится к классу биологически активных материалов, обладающих поверхностно-активными высокой биосовместимостью. В свойствами И элементарной ячейке стехиометрического гидроксиапатита выделяют два независимых кристаллографических положения, занимаемых атомами кальция (Са) (рисунок 1.4). Атом Са, расположенный в положении 1, окружен атомами кислорода (О), имеющими расположение близкое к октаэдру. Атом Са, расположенный в положении 2 (рисунок 1.4), окружен шестью атомами О, входящими в группы РО<sub>4</sub> и ОН. Атомы Са в положении 2 образуют треугольник в плоскости, перпендикулярной оси с. Подобные треугольники повернуты друг относительно друга на 60° вдоль этой оси. Атомы фосфора (Р) окружены четырьмя атомами О и образуют тетраэдр, длина связей Р-О которого ~ 0,152 нм [108].



Рисунок 1.4. Структура элементарной ячейки апатита [109].

Кристаллическая решетка гидроксиапатита биологического происхождения характеризуется существенно более сложной симметрией, поскольку синтез гидроксиапатита в костной ткани обусловлен анионными и катионными замещениями в его структуре. Замещения в кристаллической решетке гидроксиапатита приводят к изменению, физико – химических и биологических свойств материала. Разнообразие катионных И анионных замещений обусловлено гибкостью структуры гидроксиапатита. При анионном замещении компенсация заряда в структуре гидроксиапатита во многом определяется зарядом замещающего аниона. Такие одновалентные анионы как фтор (F) и хлор (Cl<sup>-</sup>) замещают OH<sup>-</sup> группы в анионном канале без дисбаланса заряда. Двухвалентные анионы ( $HPO_4^{2^-}$ ,  $CO_3^{2^-}$ ,  $SO_4^{2^-}$ ,  $SeO_3^{2^-}$ ) при замене трехзарядных фосфатных групп уравновешиваются образованием вакансий по ОН группе и катиону Ca<sup>2+</sup>. В случае замещение ОН<sup>-</sup> группы четырехзарядным анионом (SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>), отрицательный заряд компенсирует формирование вакансии по гидроксид иону [110]. Катионные замещения (Sr<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>) в структуре гидроксиаппатита возможны широком диапазоне состава, или случае небольших ионов  $(Zn^{2+}, Mg^{2+})$  которые ингибируют кристаллизацию только в ограниченной степени [111] [112]. Ниже будут рассмотрены свойства основных замещенных гидроксиапатитов.

#### Фтор замещенный гидроксиапатит

Замещение ОН<sup>-</sup> групп ионами F<sup>-</sup> может происходить во всем диапазоне состава, при этом для замещения F<sup>-</sup> характерна способностью формировать водородные связи, что увеличивает стабильность И кристалличность фторзамещенного гидроксиапатита [113]. Использование фторзамещенного гидроксиапатита в качестве материала для изготовления биологически активных покрытий имплантатов способствует улучшению стабильности покрытий, в среде человеческого организма отличающейся высокой химической активностью. Следует отметить, что фторзамещенным гидроксиапатитам характерна повышенная степень кристалличности и меньшая растворимость в физиологических жидкостях что потенциально снижает их остеоиндуктивные свойства. Повышенное содержание фтора может привести к остеомаляции – заболеванию характеризующимся недостаточной минерализацией костной ткани, сопровождающимся увеличением общего объёма костного вещества и уменьшением его общей минерализации [114].

## Карбонат замещенный гидроксиапатит

Важное место в анионных замещениях в структуре гидроксиапатита занимает замещении карбонат-ионами (СО3<sup>2-</sup>). Это связано с тем, что биологический апатит костной ткани, является кальций дефицитным и содержит значительное количество карбонатных групп [115]. В зависимости от возраста человека содержание CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>- групп в гидроксиапатите биологического происхождения составляет от 2,3 до 8,0 масс. % [26].  $CO_3^{2^-}$  группы способны занимать в решётке гидроксиапатита, первое замещая группы ОН<sup>-</sup> (А-тип замещения) либо PO<sub>4</sub><sup>3<sup>-</sup></sup> группы (Б-тип замещения). Тип замещения зависит от содержания CO<sub>3</sub><sup>2<sup>-</sup></sup> - групп в гидроксиапатите: при содержаниях CO<sub>3</sub><sup>27</sup>- групп менее 4 масс % основным является А-тип замещения, при содержаниях CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> групп более 4 масс % основным является Б-тип замещения. Карбонат замещенный гидроксиапатит по сравнению с стехиометрическим синтетическим гидроксиапатитом характеризуется меньшим размеров кристаллов и степенью кристалличности а так же повышенной скоростью биорезорбции [116]. Карбонат замещенный гидроксиапатит является термически нестабильным, разложение карбонат замещенного гидроксиапатит начинается уже при температурах 300-400 °C с выделением СО и СО<sub>2</sub> что ограничивает область его применения [117,118].

# Кремний замещенный гидроксиапатит

Анионное замещения групп  $PO_4^{3^-}$ анионами SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup> на поверхности или в объеме гидроксиапатита существенно изменяет его биохимические свойства, в частности: ускоряет процесс интеграции имплантата с костью, увеличивает способность гидроксиапатита продуцировать костную ткань (остеоиндукцию),

увеличивает минерализацию костной ткани [119,120]. Исходя из положений теории изоморфной смесимости, разница в размерах тетраэдрических анионов (расстояния Si–O = 1,66 Å, P–O = 1,55 Å) приводит к дестабилизации структуры гидроксиаппатита. Наиболее благоприятные возможности для релаксации микронапряжений возникающих в структуре гидроксиаппатита связаны с поверхностной сегрегацией силикат-иона. Таким образом, основная масса кремния в образцах теоретически сосредоточена в поверхностном слое кремний замещенного гидроксиапатита. Несмотря на значительный интерес исследователей к проблеме получения кремний замещенных гидроксиапатитов в настоящие время остаются не решенными следующие основные вопросы: предел растворимости Si в объеме кристаллической решетки гидроксиапатита; проблема компенсация заряда при гетеровалентном замещении Si и ее влияние на термическую стабильность гидроксиапатита [121,122].

#### Стронций замещенный гидроксиапатит

Стронций (Sr) достаточно легко включается в структуру гидроксиапатита замещая кальции как по типу А (из безводных систем) замещения так и по типу В (из водных систем). Включение Sr<sup>2+.</sup> в вследствие его большего ионного радиуса приводит к увеличению размеров кристаллической решётки гидроксиапатита по осям а и с, при этом включение стронция не существенному увеличению приводит к степени кристалличности гидроксиапатита [123] при этом увеличивается его растворимость в В физиологических естественных стронций жидкостях. условиях предотвращает растворение костной ткани и стимулирует формирование кости и ее регенерацию, так как он стимулирует синтез коллагеновых и неколлагеновых протеинов. В частности, происходит уменьшение пролиферации остеокластов при увеличении концентрации стронция [124].

## Магний замещенный гидроксиапатит

В концентрации 0,4-1,2 масс.% магний (Mg) содержится в зубной эмали, дентине икостной ткани. Концентрация Mg увеличивается во время начальной стадии остеогенеза, но постепенно снижается при дальнейшей кальцификации. Магний влияет на метаболическую активность кости и на ее рост путем воздействия на остеобластные/остеокластные клетки [125]. Магний оказывает дестабилизирующее действие на структуру гидроксиапатита что связано с меньшим ионный радиусом магния (0,78 Å) по сравнению с ионный радиусом кальция (1,06 Å).

На примере покрытий из гидроксиаппатита было доказано, что магний способен влиять на размер кристаллов и степень кристалличности кальцийфосфатных покрытий [126]. Следует также отметить, что магний легко встраивается в кристаллическую решетку даже при высокой концентрации, однако его распределение не является равномерным. При культивировании остеобластов на кальций-фосфатном магний содержащем покрытии было отмечено, что остеобласты концентрируются в области с высоким содержанием магния, а не распределяются по поверхности равномерно. Биологические исследования, проведенные на кроликах, показали, что внедрение магния в кальций-фосфатных покрытий биологическую повышает структуру совместимость имплантатов. Нелостатоком магний замешенных гидроксиапатитов является охрупчивание кости и нарушение остеогенеза.

#### Марганец замещенный гидроксиапатит

Марганец (Mn) важный компонент, принимающий участие в процессе ремоделирования костной ткани. Дефицит марганца приводить к задержке процессов остеогенеза из-за низкой активности остеобластов, что вызывает деформации длинных трубчатых костей или резорбцию костной ткани. В структуру гидроксиапатита ионы марганца вводят с помощью различных перекурсоров, таких как (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mn·4H<sub>2</sub>O, Mn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> и т.д.

Установлено что введение ионов марганца в структуру гидроксиапатита оказывает влияние на размер его частиц и морфологию, скорость роста кальцийфосфатного слоя в модельном SBF-растворе [127].

Проведенные литературные исследования позволяют утверждать, что для биогенного гидроксиапатита характерна строгая специфическая пространственная организация и анизотропию трудно воспроизводимые в искусственных условиях. Нарушение структуры гидроксиапатита вызванное микроэлементами анионами или катионами приводит к изменению его физикобиологических свойств, что является, одной химических и из причин, вызывающих осложнения при их использовании в травматологии и ортопедии. К сожалению, пока ни одна из известных схем синтеза гидроксиапатита не позволяет точно повторить особенности кристаллической структуры биогенного гидроксиапатита. Исходя из вышесказанного для разработки композиционных материалов в настоящей работы был использован натуральный гидроксиапатит, выделенные из костей крупного рогатого скота по щадящей технологии с максимально возможным сохранением исходной структуры и химического состава.

#### 1.5. Постановка задачи исследований

На основе проведенного анализа литературы можно сделать заключение, что метод микродугового оксидирования, используемый для нанесения биологически активных кальций-фосфатных покрытий на интрамедуллярные имплантаты, не является оптимальным, поскольку покрытия сформированные этим методом не обладают требуемым комплексом свойств:

- инвариантности по отношению к металлу основы имплантата,

- толщины покрытия (более 90 мкм),

- высокой эластичности,

- многоуровневая взаимосвязанная пористость с размером макропор порядка 100-150 мкм,
- электрической активности.

Дизайн имплантата в виде металлической спицы с покрытием толщиной ~ 90 мкм, полностью укрывающим всю его поверхность, не позволяет сохранить целостность покрытия в ходе проведения хирургического вмешательства, поскольку происходит разрушения покрытия в результате его скалывания кортикальным слоем кости с режущей кромки спицы и последующего разрушения в процессе имплантации.

Литературные данные о структуре и свойствах сополимера ВДФ-ТеФЭ позволяют предположить, что на его основе и можно создать композиционные материалы, удовлетворяющие требованиям, предъявляемым К покрытиям В биоактивного эластичных интрамедуллярных имплантатов. качестве наполнителя композитного материала целесообразно использовать гидроксиапатит.

Поэтому целью настоящей диссертационной работы являлась разработка стального эластичного интрамедуллярного имплантата с композиционным покрытием на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ и гидроксиаппатита, обладающего высокой способностью к продуцированию костной ткани.

Для достижения поставленной цели решались следующе задачи:

1. Разработка способа формирования биологически активного композитного покрытия для эластичных интрамедуллярных имплантатов, включающая выбор материалов и метода формирования, разработка и изготовление технологического оборудования.

2. Исследование физико-химических и медико-биологических свойств биологически активных композиционных покрытий для эластичных интрамедуллярных имплантатов.

3. Разработка и изготовление эластичных интрамедуллярных имплантатов с биологически активным композиционным покрытием.

4. Проведение сравнительных исследований разработанных эластичных интрамедуллярных имплантатов с биологически активным композиционным покрытием с существующими аналогами.

#### Глава 2. Методология работы, материалы и методы исследования

#### 2.1. Методология работы

Методологической основой настоящей работы, являлось предположение о наличие у сополимера ВДФ-ТеФЭ комплекса физико-химических свойств необходимого для разработки композиционного покрытия удовлетворяющего требований проекту медико-технических предъявляемых к покрытиям эластичных интрамедуллярных имплантатов. Сополимер ВДФ-ТеФЭ в отличие от таких растворимых фторполимеров как винилиденфторид (ВДФ), сополимер винилиденфторида трифторхлорэтиленом (ВДФ-ТрФХЭ), с сополимер винилиденфторида с гексафторпропиленом (ВДФ-ГФП) обладает высокой стойкостью к термической деструкции в окислительной атмосфере при температурах на 100-120 °С превышающих температуру плавления. Это качество позволяет формировать на его основе композиционные покрытия на имплантате обладающие достаточной адгезией к поверхности за счет снижения вязкости расплава полимера при повышенных температурах. Кроме этого сополимер ВДФ-ТеФЭ единственный из растворимых фторуглеродных пластиков способных формировать кристаллические фазы обладающие сегнетоэлектрическими свойствами при кристаллизации из расплава. Эта особенность позволяет формировать композиционные покрытия на поверхности имплантата обладающие пьезоэлектрическими свойствами, таким образом оказывать электрическую стимуляцию репаративной регенерации костной ткани. Способность сополимера ВДФ-ТеФЭ расворятся в низкотоксичных органических растворителях позволяет использовать для его переработки широкий спектр доступного технологического оборудования.

Ограничением к использованию сополимера ВДФ-ТеФЭ для разработки имплантатов являлось отсутствие в научно-технической литературе данных по медико-биологическим свойствам этого полимерного материала, в частности по острой и системной токсичности, особенностями взаимодействия с клетками и тканями организма при имплантации. Для оценки возможности использования сополимера ВДФ-ТеФЭ для изготовления имплантируемых изделий, а также для выбора технологии формирования композиционных покрытий с использованием двух методов (электроформования и аэродинамического формования) были сформированы полимерные каркасы и исследованы их физико – механические и медико – биологические свойства.

Для оптимизации состава композиционного материала используемого для биологически формирования активного покрытия эластичного интрамедуллярного имплантата на втором этапе работ были проведены исследования влияния содержания биологически активного наполнителя с подтвержденными свойствами (гидроксиапатита) на комплекс физикохимических и медико – биологические свойств композиционного материала, осуществлен выбор оптимального состава композиционного материала.

Для эффективности разработанных оценки имплантатов изучения И формирования костной ткани, механизмов стимуляции были проведены системные сравнительные исследования, разработанных эластичных интрамедуллярных имплантатов с композиционным покрытием на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ и гидроксиапатита с эластичными интрамедуллярными имплантатами, применяющимися в настоящие время в клинической практике.

#### 2.2. Материалы и методы исследования

В настоящей работе для изготовления полимерных и композиционных покрытий использовались следующие основные материалы: статистический сополимер винилиденфторида с тетрафторэтиленом (ВДФ-ТеФЭ) марки "В" по ГОСТ 25428-82, гидроксиапатит из биогенного сырья (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) (Caнкт-Петербургский филиал ФГУП «ЭПМ» ФМБА России – СКТБ Биофизприбор, Россия),

В качестве вспомогательных использовались следующие материалы: органические растворители (ацетон (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) (Экос-1, Россия), бутилацетат

(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>) (Экос-1, Россия), метилэтилкетон (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O) (Экос-1, Россия), этилацетат (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) (Экос-1, Россия), N,N- диметилформамид (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO) (Экос-1, Россия), уайт-спирит (Новбытхим, Россия), спирт этиловый (Мариинский ЛВЗ, Россия), трихлорметан (CHCl<sub>3</sub>) (Экос-1, Россия), электрокорунд нормальный (OAO "Юргинский абразивный завод", Россия), спицы для скелетного вытяжения из нержавеющей стали или титанового сплава (ФГУП «Опытный завод РНЦ «ВТО» имени академика Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития России).

В качестве основного технологического оборудования в настоящей работе использовали установку электроформования "NANON-NF 101" (МЕСС, Япония) и установку аэродинамического формования собственной конструкция.

В качестве вспомогательного технологического оборудования в настоящей работе использовали: мельницу шаровую лабораторную МШЛ-1 (Механобртехника, Россия), печь камерную ИТМ 50.1100 (ИТМ, Россия), ванну ультразвуковую Сапфир 5 (НТК Солтек, Россия), установку пескоструйной очистки ТСС-ПК-100 (СТМ, Россия), водяную баню WB-11 (Daihan SNT, Китай).

#### 2.2.1. Характеристика исходных основных материалов

Сополимер ВДФ-ТеФЭ содержащий от 5 до 42 мол % тетрафторэтилена (ТеФЭ) и от 95 до 58 мол % винилиденфторида (ВДФ) в настоящие время производятся на ООО "Галополимер Кирово-Чепецк" методом сополимеризации мономеров в газовой фазе в водной среде, содержащей окислительновосстановительную систему. Химическая формула сополимера ВДФ-ТеФЭ представлена на рисунке 2.1.

#### $[(-CF_2CF_2-)_m(-CF_2CH_2-)_p]_n$

#### Рисунок 2.1 Химическая формула сополимера ВДФ-ТеФЭ

Сополимер ВДФ-ТеФЭ один из немногих термопластичных фторопластов способных растворятся в низкотоксичных органических растворителях: ацетоне, метилэтилкетоне, этилацетате, бутилацетате и т.д. Эта способность позволяет использовать для переработки и получения покрытий на основе ВДФ-ТеФЭ

хорошо разработанные технологические способы например получение дисперсий в растворе, окунание, пневматическое распыление и т.д. [128].

Сополимер ВДФ-ТеФЭ обладает хорошими физико-механическими свойствами (таблица 2.1) сохраняющимися в широком температурном интервале.

Таблица 2.1 Физико-механические свойства сополимера ВДФ-ТеФЭ

Плотность, г/см <sup>3</sup>	1,91-1,93
Температура, °С	
плавления	155-160
разложения	Выше 360
Разрушающее напряжение, МПа	
при растяжении	30-50
при изгибе	25-33
Относительное удлинение при разрыве, %	300-500
Модуль упругости, МПа (кгс/см <sup>2</sup> )	
при изгибе	400
Ударная вязкость, кДж/м <sup>2</sup>	140-200
Твердость по Бринеллю, кгс/мм2	4,5
Водопоглощение за 24 ч, %	Ниже 0,1

Сополимер ВДФ-ТеФЭ устойчив к воздействию высоких температур, при этом температура плавления сополимера ВДФ-ТеФЭ намного превышает температуру его разложения. При повышенных температурах сополимер ВДФ-ТеФЭ способен сшиваться, при этом наиболее склонны к термическому сшиванию сополимеры с высоким содержанием ВДФ. В вакууме процессы сшивания более интенсивны, чем при прогреве на воздухе.

Сополимер ВДФ-ТеФЭ обладает очень высокой химической стойкостью о чем свидетельствует отсутсвие изменений химических свойств после прибывания образцов сополимера течение двух месяцев в «царской водке», 98%-ной HNO<sub>3</sub>, 45%-ной NaOH, этаноле, диэтиловом эфире и т.д.[80].

Ведение в молекулярную структуру ПВДФ звеньев ТеФЭ в количестве более 7 мол % способно структурировать молекулярную цепь ПВДФ таким образом, что даже при кристаллизации из расплава образуются сегменты с длинными транс последовательностями [96–99]. Возможность образовывать длинные транс последовательности непосредственно из расплава в наиболее электрически активной в  $\beta$  – полиморфной модификации а так же уникальное сочетание физико-химических свойств делает сополимер ВДФ - ТеФЭ перспективным материалом для разработки электрически активных композиционных покрытий для эластичных интрамедуллярных имплантатов. В работе сополимер ВДФ – ТеФЭ использовался в качестве полимерного материала для разработки трехмерных каркасов методами электроформования и аэродинамического формования, а так же в качестве связующего для композиционного покрытия.

B качестве биологически активного наполнителя для изготовления композиционных покрытий для имплантатов использовался гидроксиапатит полученный из биогенного сырья Санкт-Петербургским филиалом ФГУП «ЭПМ» ФМБА России – СКТБ Биофизприбор. Используемый гидроксиапатит отвечает требованиям нормативной документации является нетоксичным, апирогенным, с содержанием тяжелых металлов ниже допустимых значений (Приложения 2-3). Токсикологические эксперименты, проведенные в ФГБУ «Всероссийский научноисследовательский И испытательный институт медицинской техники» Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения не выявили отрицательных тканевых реакций, а так же изменений гематологических и биохимических показателей при подкожной биогенного имплантации гидроксиапатита.

#### 2.2.2 Характеристика основных вспомогательных материалов

Метилэтилкетон – химическое соединение класса кетонов, второй член гомологического ряда алифатических кетонов. Метилэтилкетон является подвижной бесцветной легколетучей жидкостью с запахом, напоминающий запах ацетона. Обладает химическими свойствами, характерными для алифатических кетонов, используется как растворитель и сырьё в органическом синтезе. Ограниченно смешивается с водой образуя азеотропную смесь с водой (T<sub>кип</sub>. – 73,41 °C; 88,7 % по массе метилэтилкетона), в любых пропорциях смешивается с большинством органических растворителей. При воздействии на человека в концентрации 0,1 мг/л в течение 3 – 5 минут вызывает раздражение слизистых

оболочек глаз, носа и горла, при 0,2 мг/л – раздражение становится невыносимым. Предельно допустимая концентрация (ПДК) метилэтилкетона в воздухе рабочей зоне по ГОСТ 12.1.005-88 составляет 200 мг/м<sup>3</sup>.

Ацетон – простейший представитель насыщенных кетонов. Является подвижной бесцветной легколетучей жидкостью с характерным запахом. Смешивается с водой и органическими растворителями. Ацетон, широко применяемый органический растворитель для нитратов и ацетатов целлюлозы. По фармакологическим свойствам ацетон относится к числу веществ, проявляющих наркотическое действие, обладает кумулятивными свойствами. ПДК ацетона в воздухе рабочей зоне по ГОСТ 12.1.005-88 составляет 200 мг/м<sup>3</sup>.

Бутилацетат – органическое вещество класса сложных эфиров, бесцветная или слегка желтоватая жидкость с приятным фруктовым запахом. Бутилацетат – является хорошим растворителем нитроцеллюлозы, хлоркаучука, глифталевых смол и др. плёнкообразующих веществ, применяемых в лакокрасочной промышленности, входит в состав многих многокомпонентных растворителей, например: 646 и 648. Бутилацетат мало растворим в воде; смешивается с органическими растворителями и растительными маслами; обладает всеми свойствами сложных эфиров. Пары бутилацетата раздражают слизистые оболочки глаз и дыхательных. путей, вызывают сухость кожи. ПДК бутилацетата в воздухе рабочей зоне по ГОСТ 12.1.005-88 составляет 200 мг/м<sup>3</sup>.

Этилацетат – бесцветная, прозрачная, горючая жидкость с приятным запахом. Этилацетат в любых соотношениях смешивается с диэтиловым эфиром, бензолом, толуолом, хлороформом, этанолом. Ограниченно растворим в воде (до 12% по массе), образует азеотропные смеси с водой (Т<sub>кип</sub> 70.4°С, 8.2% воды по массе). Является умеренно полярным растворителем. Хорошо растворяет эфиры целлюлозы, смоляные масляные лаки, жиры, воски. Пары этилацетата раздражают слизистые оболочки глаз и дыхательных путей, при действии на кожу вызывают дерматиты и экземы. ПДК этилацетата в воздухе рабочей зоны по ГОСТ 12.1.005-88 составляет 200 мг/м<sup>3</sup>.

43

N,N - диметилформамид – бесцветная довольно вязкая жидкость со слабым специфическим запахом, является полярным апротонным растворителем, смешивается с большинством органических растворителей за исключением углеводородов. Обладая высокой растворяющей способности для органических соединений и неорганических солей часто используется как растворитель для проведения химических реакций и очистки веществ перекристаллизацией. Обладает довольно сильным раздражающим действием на слизистые оболочки и кожные покровы, проявляет общетоксическое и эмбриотоксическое воздействие, вызывает поражение печени и почек, слабо угнетает центральную нервную систему. ПДК N,N-диметилформамида в воздухе рабочей зоны по ГОСТ 12.1.005-88 составляет 10 мг/м<sup>3</sup>.

Уайт-спирит – прозрачная маслянистая жидкость с характерным запахом керосина, представляет собой смесь жидких алифатических и ароматических углеводородов, полученных методом прямой дистилляцией нефти. Используется для производства олиф, лакокрасочных материалов и сиккативов. Широко применяется для обезжиривания поверхностей. Отличается низкой токсичностью, безопасностью для кожи. ПДК в воздухе рабочей зоны по ГОСТ 12.1.005-88 составляет 300 мг/м<sup>3</sup>. В настоящей работе трихлорметан использовался для обезжиривания поверхности измельчительного барабана шаровой мельницы и поверхности интрамедуллярного имплантата перед нанесением композиционного покрытия.

Этанол – второй представитель гомологического ряда одноатомных спиртов, летучая, горючая, бесцветная прозрачная жидкость. Является хорошим органических веществ. В растворителем других зависимости ОТ дозы, концентрации, пути попадания в организм и длительности воздействия этанол также может обладать наркотическим и токсическим действием. В настоящей работе трихлорметан использовался финишного для обезжиривания поверхности измельчительного барабана шаровой мельницы И поверхности интрамедуллярного имплантата перед нанесением композиционного покрытия.

44

Свойства используемых растворителей представлены в таблице 2.2.

Тип органического растворителя	Молярна я масса, г/моль	Плотност ь, г/см <sup>3</sup>	Т плав. °С	Т. <sub>кип</sub> . °С	Давление пара, мм.рт.ст	Предельное содержание по ОФС 42- 0057-07
Ацетон	58,08	0,7899	-95,0	56,1	$180 \pm 1$	до 0,5%
Бутилацетат	116,16	0,8813	-76,8	126,3	$10 \pm 1$	до 0,5%
Метилэтилкетон	72,12	0,8050	-86,3	79,6	$78 \pm 1$	до 0,5%
Этилацетат	88,11	0,9021	-84,0	77,0	$73 \pm 1$	до 0,5 %
Диметилформамид	73,09	0,9445	-61,0	153,0	$3 \pm 1$	880 ppm
Уайт-спирит	-	0,795	-	-	-	-
Этанол	46,07	0,7893	-114,3	78,4	$44 \pm 1$	до 0,5 %
Трихлорметан	119,38	1,483	-63,5	61,2	$160 \pm 1$	1870 ppm

Таблица 2.2. Свойства используемых растворителей.

Трихлорметан (CHCl<sub>3</sub>) – При нормальных условиях бесцветная летучая жидкость с эфирным запахом и сладким вкусом. Практически нерастворим в воде смешивается с большинством органических растворителей. Является сильным наркотическим средством. Благодаря высокой растворяющей способности используется для очистки поверхности от маслянно-жировых загрязнений.

Соляная кислота (HCl) – раствор хлороводорода в воде, сильная одноосновная кислота. Бесцветная, прозрачная, едкая жидкость, «дымящая» на воздухе. рименяется в гидрометаллургии и гальванопластике (травление, декапирование), для очистки поверхности металлов при пайке и лужении, для получения хлоридов цинка, марганца, железа и др. металлов. В смеси с поверхностно-активными веществами используется для очистки керамических и металлических изделий (тут необходима ингибированная кислота) от загрязнений и дезинфекции.

Едкий натр (NaOH) – белое твёрдое гигроскопичное вещество, на воздухе активно поглощает пары воды. Хорошо растворяется в воде, выделяя значительное количество тепла, водный раствор мылок на ощупь. Водный расттвор используется для подготовки поверхности имплантанта с целью нейтрализации соляной кислоты.

Электрокорунд – химически стойкий, огнеупорный, сверхтвёрдый материал на основе оксида алюминия. Представляет собой искусственно синтезированный синтетический корунд с содержанием оксида алюминия Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> от 88 до 99 %. Используется как как абразивный материал для пескоструйной обработки поверхности интрамедуллярного имплантата с целью увеличения адгезии композитного покрытия к поверхности имплантата. В настоящей работе использовался электрокорунд нормальный марки 16A с зернистостью 50 выпускаемый по ГОСТ 28818-90 "Материалы шлифовальные из электрокорунда. Технические условия" на ОАО "Юргинский абразивный завод".

Спицы для скелетного вытяжения – в настоящей работе использовались два типа спиц. Первый тип – спицы из титанового сплава ВТ-6 изготовленные в соответствие с требованиями ГОСТ Р ИСО 5838-1-2011. "Имплантаты для хирургии. Стержни, спицы и проволока для скелетного вытяжения. Часть 1. Материалы и механические свойства" ГОСТ Р ИСО 5832-3-2014 "Имплантаты для хирургии. Металлические материалы. Часть 3. Деформируемый сплав на основе титана, 6-алюминия и 4-ванадия (с Поправкой)". Титановые спицы с кальций фосфатным покрытием сформированным ΜДΟ методом использовались в качестве контрольного образца для проведения сравнительных исследований способности имплантатов продуцировать костную ткань. Второй тип – спицы из нержавеющей стали по ГОСТ Р ИСО 5832-1-2010 "Имплантаты для хирургии. Металлические материалы. Часть 1. Сталь коррозионно-стойкая (нержавеющая) деформируемая" изготовленные в соответствие с требованиями ГОСТ Р ИСО 5838-1-2011. "Имплантаты для хирургии. Стержни, спицы и проволока для скелетного вытяжения. Часть 1. Материалы и механические

свойства". В настоящей работе спицы из нержавеющей стали использовали в качестве контрольного образца при проведение сравнительных исследований способности имплантатов продуцировать костную ткань и в качестве заготовки для получения имплантатов специальной геометрии с композиционным покрытием.

#### 2.3. Методы исследований физико-химических свойств

#### 2.3.1. Сканирующая электронная микроскопия

Известно, что такие характеристики биоматериалов, предназначенных для приложений тканевой инженерии, физиологическими как смачивание жидкостями, прочность, сорбирующая способность и способность к интеграции с окружающими тканями BO многом определяются их морфологическими особенностями: формой и размером пор, их взаимосвязанностью, распределением биологически активного наполнителя на поверхности покрытия и в полимерной матрице и т.д. Таким образом, исследование морфологии биоматериалов является одним из важных этапов материаловедческих исследований, с помощью которых могут быть спрогнозированы биологические свойства сформированного биоматериала.

В настоящие время сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является наиболее распространённых способов одним ИЗ изучения морфологии получать изображения биоматериалов, так как позволяет высоким С пространственным разрешением и большой глубиной резкости в широком диапазоне увеличений. СЭМ изображение последовательно формируется по точкам и является результатом взаимодействия ускоренного пучка электронов, который сканирует исследуемый объект аналогично сканированию электронным лучом в телевизионных системах. Важным требованием для получения СЭМ изображений высокого качества является электропроводность, необходимая для стекания заряда с поверхности, что обеспечивает получение качественных изображений. Чаше всего для этих целей используют тонкие покрытия, полученные на основе углерода, золота или платины.

Исследование морфологии материалов проводили на электронном микроскопе ESEM Quanta 400 FEG (FEI, США). Для получения изображений были использованы следующие режимы: ускоряющее напряжение 20 кВ, ток пучка 3,5 мкА. Для улучшения качества изображения перед исследованием на

поверхности образцов с использованием магнетронной распылительной системы SC7640 (Quorum Technologies Ltd, Англия) течение 2 минут наносили тонкий слой золота. Количественное исследование морфологических характеристик сформированных материалов (средний диаметр волокон, средний диаметр пор и т.д.) проводили с использованием программного комплекса Image J 1.38 (National Institutes of Health, США). Для расчетов использовали не менее 5 цифровых изображений, полученных с различных участков поверхности материала.

#### 2.3.2. Энергорассеивающая рентгеновская спектроскопия

Метод энергорассеивающей рентгеновской спектроскопии (Energy Dispersive X-ray analysis или EDX-метод) является одним из наиболее надежных и успешно применяемых методов определения химического состава анализируемой пробы. Метод позволяет определять элементный состав различных веществ (металлов, керамик, полимеров). При анализе химического состава метод за сравнительно короткое время позволяет достаточно точно определить химический состав области объекта, представляющей интерес, а также и некоторые другие характеристики, например, наличие в полимерной матрице остаточных количеств органических растворителей.

Метод основан на регистрации характеристического рентгеновского излучения, возникающего при возбуждении внутренних оболочек атомов исследуемого образца пучком электронов. При возбуждении электрона внутренней оболочки и его переходе на более высокий энергетический уровень происходит переход другого электрона с более высокого энергетического уровня на освободившуюся позицию, сопровождающийся эмиссией характеристического рентгеновского излучения. Энергия излучаемого рентгеновского фотона соответствует разности энергий энергетических уровней. При этом согласно правилам отбора могут иметь место только определенные электронные переходы. Рентгеновские фотоны, излучающиеся при переходе на K, L, M и так далее оболочки атома, обозначаются символами K, L, M и так далее, соответственно.

Широкое распространение метод получил благодаря таким своим достоинствам, многоэлементность анализа (возможность как определять несколько десятков химических элементов одновременно), широкий диапазон регистрируемых концентраций (от 10<sup>-5</sup> до 100 %), экспрессность метода (как правило, время проведения одного анализа не более 2-10 минут). Существенными достоинствами этого метода являются то, что он не разрушает исследуемый материал, малочувствителен к агрегатному состоянию исследуемого материала (монолит, порошок, волокнистый материал) и нуждается в сравнительно простой процедуре подготовки проб. Также важно то, что такими анализаторами оснащены многие центры коллективного пользования, лаборатории И облегчает материаловедческие организацию проведения центры, что исследований.

Изучение химического состава поверхности имплантатов проводилось методом энергодисперсионного анализа с помощью сканирующего электронного микроскопа ESEM Quanta 400 FEG (FEI, CША), оснащенного встроенным анализатором (EDS analysis system Genesis 4000 (EDAX, CША). Расчет полуколичественного химического состава покрытия проводили методом трех поправок: на средний атомный номер, поглощение и флуоресценцию.

#### 2.3.3. Шероховатость поверхности

Известно, что шероховатость поверхности играет важную роль в процессе прикрепления мезенхимальных стволовых клеток к поверхности имплантата [129]. Считается, что имплантаты с поверхностью обладающей шероховатостью микронного размера (значение параметра Ra находится в диапазоне ~ 2,1 – 4,7 мкм) способствуют эффективной адгезии и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток к поверхности [130]. Исследования шероховатости поверхности имплантатов проводили с применением контактного профилометра Talysurf 5-120 (Tailor-Hobson, Англия) В двух перпендикулярных направлениях. По профилограмам рассчитывали значение среднего арифметического ИЗ абсолютных значений отклонений профиля в пределах базовой длины (Ra).

Расчёт параметра *Ra* проводили в соответствие с рекомендациями ГОСТ 2789-73 «Шероховатость поверхности. Параметры и характеристики». За значение параметра *Ra* каждой из исследуемых групп принимали среднее арифметическое значение, полученное по результатам шести измерений.

#### 2.3.4 Смачивание поверхности

Важной характеристикой имплантатов является способность их поверхности водой И смачиваться телесными жидкостями, то есть гидрофильность/гидрофобность. Это свойство определяет форму биологических клеток и их частей, находящихся на поверхности имплантата, способность имплантата интегрироваться с окружающими тканями. Изменение сил поверхностного натяжения влияет на фагоцитоз (захват клетками соседних частиц), пиноцитоз (захват клеточной поверхностью жидкости с содержащимися в ней веществами) и на процессы альвеолярного дыхания [131]. Обычно гидрофильность/гидрофобность определяется путем измерения статического контактного угла, образованного каплей жидкости на исследуемой поверхности. Для исследования этого свойства используется метод оптической гониометрии, который позволяет прямо измерить контактные углы смачивания. К числу лостоинств метода можно отнести высокую достоверность, высокую оборудование, повторяемость, сравнительно простое необходимое для проведения измерений, а также возможность автоматизации процесса.

Измерение краевого угла смачивания жидкости, помешенной на поверхность исследуемого материала, было выполнено с использованием оптического гониометра Easy Drop – 100 (Krüss, Германия). Для исследования деионизованной воды объемом 3 мл помещали на поверхность каплю исследуемого материала. Измерения краевого угла смачивания проводили спустя одну минуту после помещения жидкости на исследуемую поверхность. За значение краевого угла смачивания поверхности каждой из исследуемых групп принимали среднее арифметическое значение, полученное по результатам семи измерений.

#### 2.3.5. Пористость

Известно, что механические и поверхностные свойства материалов зависят от пористости. С другой стороны, развитая структура трехмерного каркаса с сообщающимися порами обеспечивает транспорт биологических жидкостей внутри имплантата, обеспечивая питание и отвод продуктов жизнедеятельности формирующейся ткани, увеличивает свободную поверхность имплантата, что приводит к увеличению количества химических связей между имплантатом и формирующееся тканью, способствует формированию в порах повышенной концентрации биологически активных веществ. Эти обстоятельства могут быть использованы для воздействия на процесс дифференцировки клеток. В частности известно, что увеличение пористости способно стимулировать процессы интеграции имплантата с костной тканью [132].

Таким образом, пористость является одной из важнейших характеристик каркаса, во многом определяющей спектр его физических и биологических свойств.

Исследование открытой пористости сформированных композиционных покрытий проводили методом гидростатического взвешивания, описанным в работе [133]. Для проведения исследований на поверхности титановых дисков диаметром  $10 \pm 0,1$  мм и высотой  $1,5 \pm 0,1$  мм формировали композитное покрытие.

Открытую пористость композитного покрытия рассчитывали, используя уравнение 2.1

$$P = \frac{(m_{dc}^{la} - m_{d}^{la}) - (m_{dc}^{a} - m_{d}^{a})}{(m_{dc}^{la} - m_{d}^{la}) - (m_{dc}^{l} - m_{d}^{l})} \times 100\%,$$
(2.1)

где  $m_{dc}^{la}$  — масса диска с композиционным покрытием, насыщенным жидкостью, при взвешивании на воздухе;  $m_d^{la}$  — масса диска без композитного покрытия, насыщенного жидкостью, при взвешивании на воздухе;  $m_{dc}^a$  — масса сухого диска с композиционным покрытием при взвешивании на воздухе;  $m_d^a$  — масса сухого диска без композитного покрытия при взвешивании на воздухе;  $m_{dc}^a$  — масса сухого диска без композитного покрытия при взвешивании на воздухе;  $m_{dc}^a$  — масса сухого диска без композитного покрытия при взвешивании на воздухе;  $m_{dc}^a$  — масса гирь,

уравновешивающих массу диска с композиционным покрытием, погруженным в жидкость;  $m_d^l$  – масса гирь, уравновешивающих массу диска без композитного покрытия, погруженного в жидкость.

В качестве жидкости для насыщения покрытий использовали изопропиловый спирт (Экос 1, Россия). Перед измерением имплантанты с покрытием высушивали в сушильном шкафу (ЛабТех, Россия) при температуре 100 ± 5 °C до достижения постоянной массы. Для заполнения пор образец помешали в емкость с изопропиловым спиртом и выдерживали в течение трех суток. Исследования приводили с использованием аналитических весов (Госметр, Россия), оснащенных приспособлением для гидростатического взвешивания.

#### 2.3.6. Прочность и относительное удлинение

Исследование прочности и относительного удлинения при одноосном растяжении полимерных каркасов на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом проводили согласно рекомендациям ГОСТ Р 53226 – 2008 «Полотна нетканые. Методы определения прочности» с использованием разрывной машины Instron 3344 (Instron, Англия) при предварительной нагрузке на образец равной 0,1± 0,01 Н. Для предотвращения проскальзывания образцов на зажимные кулачки испытательного механизма была приклеена наждачная бумага с зернистостью Р 180 согласно ГОСТ Р 52381-2005 "Материалы абразивные. Зернистость и зерновой состав шлифовальных порошков. Контроль зернового состава".

#### 2.3.7. Адгезия покрытий

Разработка имплантатов с биоактивным композиционным покрытием не возможна без хорошей адгезии композита к металлу. Изучение адгезионных свойств покрытий к металлической подложке проводили согласно рекомендациям ГОСТ Р 52641-2006 «Стандартный метод испытаний для проверки на сдвиг фосфатно-кальциевых и металлических покрытий». Для этого на подготовленную

пластину из  $40 \times 20 \times 2,5$  мм наносили покрытия, таким образом чтобы площадь пластины с покрытием составляла  $284 \pm 7$  мм<sup>2</sup>. С помощью клея Scotch-Weld 2214-NMF (3M, CША) на поверхность покрытия приклеивали образец стальной пластины  $40 \times 20 \times 2,5$  мм без покрытия. Затем пластины под давлением  $0,14 \pm 0,01$  МПа помешали в термостат с температурой 30 °C на 98 часов. Исследования проводили с помощью испытательной машины Instron 3369 (Instron, Англия) при скорости перемещения траверсы 2,5 мм/мин. За значение показателей прочности и относительного удлинения покрытия принимали значения, полученные по результатам 5 измерений для каждой из исследуемых групп.

#### 2.3.8. Эластичность покрытий

Эластичность покрытий исследовали с помощью прибора Изгиб (Градиент-Техно, Россия) согласно рекомендациям ГОСТ Р 52740-2007 "Материалы лакокрасочные. Метод определения прочности покрытия при изгибе вокруг цилиндрического стержня". Для этого покрытия формировали на подложке размером 120×35×0,3 мм. За значение показателя эластичности покрытия принимали наименьший диаметр стержня, изгибание вокруг которого не приводило к механическому разрушению или отслаиванию покрытия. За значение показателя эластичность принимали значения, полученные по результатам 5 измерений для каждой из исследуемых групп.

# 2.4. Идентификация электроактивных кристаллических фаз в полимерных каркасах и композиционных материалах на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ

Известно, что наблюдение сегнетоэлектрических свойств (наблюдение петли E-D гистерезиса) для ПВДФ и его сополимеров возможно в электрических полях напряженностью более 40 МВольт/метр [82], что требует получения однородных без дефектных образцов, исключающих электрический пробой [134,135]. Полимерные каркасы и композитные покрытий, сформированные на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ содержат значительное количество дефектов обусловленных высокой пористостью и наличием значительного количества частиц гидроксиапатита в его структуре, что снижает электрическую прочность.

Кристаллическая фаза сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом основных полиморфных модификаций, характеризуется наличием трех отличающихся конформацией макромолекулы И характером упаковки макромолекул элементарную ячейку [136]. Выделяют В три основных полиморфных модификации  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ .  $\alpha$  – модификация характеризуется моноклинной решеткой с *TGTG*<sup>-</sup> конформацией макромолекул, соседние звенья которых имеют антипараллельные дипольные моменты, поэтому в целом она неполярная [80]. Кристаллическая у-модификация содержит полярные ячейки с  $T_3GT_3G^{-1}$  конформацией макромолекул. Для наиболее электрически активной  $\beta$ модификации характерна орторомбическая решетка, сформированная макромолекулами в *TTT* конформации [79].

Наличие полиморфных конформаций и кристаллических структур характерных для параэлектрических и сегнетоэлектрических фаз, а так же наличие характерной точки Кюри позволяет детектировать их наличие, используя методы рентгеновской дифракции, инфракрасной спектроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии [79].

#### 2.4.1. Инфракрасная спектроскопия

Поглощение в инфракрасной области спектра вещества обусловлено колебаниями атомов, связанных с изменением межатомных расстояний (валентные колебания) и углов между связями (деформационные колебания). Таким образом, метод инфракрасной (ИК) спектроскопии может быть использован для определения конформации макромолекул в кристаллизующихся полимерах. Характерные полосы поглощения, для кристаллической и аморфной компонент, а так же всех трех полиморфные модификаций, известны [137] [82], что может быть использованы для их идентификации. Поскольку инфракрасный спектр является тонкой характеристикой вещества, то он несет информацию о химическом составе, наличию пластификаторов и остаточных органических растворителей в полимерных и композиционных материалах.

Для определения остаточных органических растворителей и исследования полиморфных модификаций в каркасах и покрытиях на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ применяли метод инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье в геометрии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Исследования выполнены с применением ИК-спектрометра Tensort 27 (Bruker, США), оснащённого приставкой НПВО РІКЕ MIRacle (Bruker, США) с кристаллом ZnSe. Исследования проводили в спектральном интервале от 500 до 2000 см<sup>-1</sup> с разрешением 4 см<sup>-1</sup>. Инфракрасный спектр получали усреднением спектров, полученных от каждого образца 50 раз. Обработку спектров проводили с использованием пакета программ OMNIC 7.3 (TA Instruments, CША).

#### 2.4.2 Рентгенофазовый анализ

Поскольку полиморфные модификации сополимера ВДФ-ТеФЭ отличаются кристаллографическими параметрами элементарной ячейки [138], поэтому для определения электрически активных кристаллических фаз можно использовать метод дифракции рентгеновских лучей [79]. Исследования кристаллической сополимера ВДФ-ТеФЭ структуры каркасов на основе проводили с использованием дифрактометра XRD 6000 (Shimadzu, Япония). Образцы облучали монохроматическим *СиКа* излучением с длинной волны (1,54056 Å) при следующих параметрах съемки: ускоряющие напряжение 40 кВ, ток пучка 30 мА, в диапазоне углов сканирования 5 ...  $50^{\circ}$ , шаг сканирования  $0,03^{\circ}$ , время набора сигнала 1,5 секунды, скорость сканирования 2<sup>0</sup> в минуту. Средние размеры полимерных кристаллитов в образцах рассчитывали, используя формулу Дебая – Шеррера:

$$l_c = \frac{kl}{\cos\theta\sqrt{\beta^2 - \beta_r^2}},\tag{2.2}$$

где  $\lambda$  – длинна волны падающего излучения,  $\beta$  – ширина рефлекса на половине высоты,  $\beta_r$  – аппаратурное уширение рефлекса,  $\theta$  – угол дифракции, k = 0.9.

Оценку параметра ширина рефлекса на половине высоты проводили путем интерполяции рентгеновского спектра с использованием функции Гаусса (Origin 9, Origin Lab, USA).

#### 2.4.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Известно, что пьезоэлектрический эффект в кристаллах существует в определенной области температур. При температуре Кюри в пьезоэлектрических фазовый перехода второго рода связан со кристаллах скачкообразным изменением свойств симметрии кристалла. Поскольку на переход Кюри затрачивается энергия, то регистрация перехода возможна методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Метод основан на регистрации тепловой мощности, выделяемой в образце и эталоне и необходимой для поддержания между ними нулевой разности температур. В полимерных и композиционных материалах метод позволяет исследовать процессы, связанные с изменением внутреннего теплосодержания системы, связанных с физическими переходами или химическими реакциями. К этим процессам относятся кристаллизация, перестройка кристаллической структуры, плавление, стеклование (расстеклование), реакции разложения, окисления и восстановления и т.д.

Для определения теплоты плавления ( $\Delta H_{fm}$ ), температуры Кюри ( $T_c$ ) и температуры плавления ( $T_m$ ) использовали дифференциальный сканирующий калориметр SDT Q 1000 (TA Instruments, США). Исследования проводили в атмосфере аргона 99,99 % при следующих режимах: скорость нагрева 10°С/мин, диапазон температур от 60 °С до 200°С, расход газа 50 мл/мин.

Изменение степени кристалличности  $\Delta X_c$  (%) полимерных каркасов по сравнению с исходным порошком сополимера ВДФ-ТеФЭ определяли с помощью уравнения 2.2:

$$\Delta X_c = (1 - H_{fs}/H_{fp}) \times 100\%, \tag{2.3}$$

Где *H<sub>fs</sub>* – измеренная теплота плавления каркаса, *H<sub>fp</sub>* – измеренная теплота плавления необработанного порошка сополимера ВДФ-ТеФЭ.

Исследование влияния массового содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композитном покрытии на степень его кристалличности, проводили путем сравнения расчетной теплоты плавления сополимера ВДФ-ТеФЭ с измеренной теплоты плавления композиционного покрытия по следующей методике:

Расчетная теплота плавления композитного покрытия  $\Delta H_{ft}$  была рассчитана с использованием уравнения 2.3, описанного в работе [139]:

$$\Delta H_{ft} = \Delta H_{fm}^{B \square \Phi - \text{Te} \Phi \Im} * \omega_m, \qquad (2.4)$$

где  $\Delta H_{ft}$  – расчетная теплота плавления композитногопокрытия ,  $\Delta H_{fm}^{B\Phi - Te\Phi \Im}$ – измеренная теплота плавления пленки сополимера ВДФ-ТеФЭ,  $\omega_m$  – массовое содержание сополимера ВДФ-ТеФЭ в композитном покрытии.

Изменение степени кристалличности полученного композитного покрытия по сравнению с расчетным значением ( $\Delta X_c$ ) было рассчитано по формуле 2.4:

$$\Delta X_c = \frac{\Delta H_{fm}}{\Delta H_{ft}}, \qquad (2.5)$$

Следует отметить, что величина  $H_f$  включает в себя теплоту плавления как параэлектрической, так и сегетоэлектрической фазы сополимера ВДФ-ТеФЭ выше температуры Кюри.

#### 2.5. Исследования биологических свойств

Согласно ГОСТ Р ИСО 10993-1-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий» оценку биосовместимости новых биоматериалов требуется начинать *in vitro*. В связи с этим, тестирование образцов на клеточных культурах рассматривается как первый этап доклинических исследований. Одним из основных методов исследований является определение проницаемости клеток для витальных красителей после прямого контакта с изделием и/или воздействия его вытяжек.

#### 2.5.1. Растворимость в модельной телесной жидкости

Изучение растворимости покрытий в модельной биологической жидкости исследования проводили путем выхода ионизированного кальция В изотонический стерильный раствор хлорида натрия (ЭСКОМ, Россия). Для этого исследуемые образцы модельных имплантатов диаметром 10 ± 0,5 мм с двусторонним покрытием помещали в стерильную пробирку (Axygen Scientific, США) объёмом 15 мл и добавляли 4 мл 0,9 % хлорида натрия. Затем образцы помешали в термостат (ТС 120, Россия), в которым выдерживались их при температуре 37°С в течение 7 суток. После этого экстракты полностью удаляли из пробирок с помощью автоматических дозаторов. Для определения концентрации ионизированного кальция и уровня рН раствора применяли стандартный калориметрический метод с использованием автоматического анализатора Konelab60i (Thermo Fisher Scientific Inc., США) по протоколу Konelab<sup>TM</sup>/T Series protocols (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Все работы с образцами проводили в асептических условиях.

#### 2.5.2. Исследование жизнеспособности и эффективности адгезии клеток

Оценку жизнеспособности клеток проводили путем комбинированного окрашивания красителем с использованием набора PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (BD Bioscience, США) в комбинации с 7-AAD (BD Biosciences, США). Перед культивированием методом проточной цитофлуориметрии на

приборе FACS Calibur (Becton Dickinson, CША) проводили фенотипический анализ полученных клеток с использованием моноклональных антител CD90, меченных FITC, и CD45, меченных PE.

Оценку эффективности адгезии клеток к полимерным каркасам проводили методом флуоресцентной микроскопии с помощью инвертированного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Эффективность клеточной адгезии оценивали по количеству прикрепившихся клеток, видимых в десяти полях зрения микроскопа, усредненных и пересчитанных на 1мм<sup>2</sup>.

Для тестов использовали МСК второго пассажа, полученные из бедренных костей крыс линии Wistar, и эндотелиальные клетки линии EA-hy 926.

Для культивирования клетки с концентрацией 2,5×10<sup>5</sup> клеток на лунку (24луночного планшета) высевали на диски площадью 1,8 см<sup>2</sup> и культивировали в течение 5 суток при температуре 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>. Культивирование клеток проводили в питательной среде DMEM (Gibco, CША), содержащей 1% HEPES буфера (Sigma Aldrich, США), 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% Lглутамина, 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина B (Sigma Aldrich, США).

Исследование было проведено в ФГБНУ "Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний" г. Кемерово в соответствии с соблюдением принципов гуманного обращения с лабораторными животными, изложенными в [140].

Оценку адгезии клеток к композиционным покрытиям проводили методом флуоресцентной микроскопии с помощью универсального стереоскопического комплекса M205 FA (Leica, CША). Эффективность клеточной адгезии оценивали по количеству прикрепившихся клеток, видимых в десяти полях зрения микроскопа, усредненных и пересчитанных на  $1 \text{мm}^2$ . Культивирование клеток проводили на дисках, диаметром  $10 \pm 0,1$  мм с покрытиями сформированным на их поверхности. Диски помещали на дно 24-луночного планшет и засевали клетками в количестве  $4 \times 10^5$  на лунку. Для культивирования клеток использовали среду альфа-МЕМ (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей эмбриональной

сыворотки (Hyclone, США), 50 единиц/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Клетки культивировали при 37 ° С и 5% СО<sub>2</sub> в течение 72 часов. Для визуализации клеток образцы после культивирования, обрабатывали холодным метанолом в течение 5 мин при комнатной температуре.

жизнеспособности Для изучения культивируемых клеток были использованы МСК, выделенные из жировой ткани здоровых людей. Клетки были имунотипированы с использованием метода проточной цитометрии Guava Easy Cyte 6 (Millipore, США) с использованием CD19, CD34, CD45, CD73, CD90 и CD105 моноклональных антител (BD, USA), как описано в работе [141]. Культивирование клеток проводили на стальных дисках с покрытием, диаметром 10 ± 0,1 мм. Диски помещали на дно 24-луночного планшет и засевали клетками в количестве 4×10<sup>5</sup> на лунку. Для культивирования клеток использовали среду альфа-МЕМ (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% телячьей эмбриональной (Hyclone, США), 50 единиц/мл пенициллина 50 сыворотки И мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Клетки культивировали при 37 ° С и 5% СО<sub>2</sub> в течение 72 часов. Для исследования жизнеспособности клетки обрабатывали трипсином, используя метод проточной цитометрии Guava Easy Cyte 6 (Millipore, США) анализировали жизнеспособность с помощью набора красителей Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Sigma Aldrich, CIIIA).

Исследования были проведены в ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России. От всех здоровых доноров было получено письменное информированное согласие на проведения процедуры биопсии жировой ткани для выделения МСК.

## 2.5.3. Исследование местного токсического действия и способности интеграции с нативными тканями

Исследования местного токсического действия и способности полимерных каркасов, изготовленных методом аэродинамического формирования, к интеграции с нативными тканями проводили на 13 крысах линии Wistar (получены из питомника НИИ фармакологии и регенеративной медицины им.

Е.Д. Гольдберга, г. Томск). Для этого животным под общим комбинированным наркозом (реланиум 0,5% - 0,5 - 0,7 мл, кетамин 5% - 0,3-0,4 мл внутрибрюшинно) имплантировали исследуемые материалы в подкожный жировой карман и мышечную ткань. Спустя 30 суток животные выводились из эксперимента. Образцы фиксировали в нейтральном формалине, обезвоживали и заливали парафином для изготовления гистологических срезов по стандартной методике. Полученные тонкие мкм) срезы депарафинизировали, (6 окрашивали гематоксилином и эозином. Для определения типа ткани, полученные срезы подвергались гистологическому исследованию на микроскопе «Carl Zeiss MicroImaging» (Германия). Исследования были проведены в ФГБУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии» Минздрава России, г. Томск с соблюдением принципов гуманного обращения с лабораторными животными.

# 2.5.4. Исследование способности продуцировать костную ткань в тесте эктопического костеобразования

Для исследования способности продуцировать костную ткань применяли тест эктопического костеобразования [142].

Так как ремоделирование костной ткани происходит через активацию остеобластов, находящихся в зоне повреждения, а так же привлечения и последующей дифференцировки в остеобласты мезенхимальных клеток, поэтому анатомическое расположение, особенность К фиксации, состояние ложа тканей, биологические свойства имплантата И окружающих имплантата оказывают основное влияние на процессы остеоидукции и остеокондукции [143]. Таким образом, хорошего кровоснабжения наличие зоны перелома, обеспечивающего приток мезенхимальных клеток, является предпосылками для формирования полноценной костной ткани [22]. Имплантируемые в жировой карман крысы имплантаты с композиционным покрытием и нанесенным столбиком костного мозга удовлетворяют требованиям наличия значительного количества мезенхимальных клеток и хорошего кровоснабжения, поэтому тест

эктопического костеобразования хорошо имитирует условия пребывания эластичного интрамедуллярного имплантата в костномозговом канале.

Для исследований были изготовлены модельные имплантаты в форме дисков диаметром  $10 \pm 1$  мм, на поверхности которых было сформированы покрытия. На наносили in vitro столбик сформированное покрытие костного мозга, предварительно выделенный из бедренной кости мышей линии CBA/CaLac, как это описано в работе [144]. Костный мозг служил источником МСК и ростовых факторов. МСК костного мозга способны генерировать эктопическую кость донорского происхождения и способствовать росту кроветворных клеток предшественников реципиента [23]. Рост тканевой пластинки из столбика костного мозга является результатом успешной адгезии, миграции, пролиферации, дифференцировки и созревания МСК.

Образец с нанесенным столбиком костного мозга инкубировали в течение 45 минут при температуре 37°С в культуральной среде, состоящей из 95 % DMEM (Sigma-Aldrich, США) и 5 % фетальной бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich, США). Для определения поверхности, занятой костным мозгом, образец фотографировали (PowerShot A 630, Canon), определяли площадь поверхности (мм<sup>2</sup>) по цифровым снимкам с помощью программы Image J 1.38 (National Institutes of Health, США).

Затем образецы имплантировали в подкожный жировой карман животного, Через 45 суток животных рану ушивали. выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза. Диски эксплантировали, определяли площадь поверхности, занятой сформированной тканью (тканевой пластинкой), как описано выше. Затем имплантаты помещали в нейтральный формалин на 24 часа фиксирования сформированной ткани. После фиксации образцы для декальцинировали, используя 10 % EDTA (Sigma-Aldrich, США). С имплантатов удаляли сформированную ткань, обезвоживали и заливали парафином для изготовления гистологических срезов по стандартной методике. Полученные тонкие (6 мкм) срезы депарафинизировали, окрашивали гематоксилином и эозином.

Для определения типа ткани, сформированной на поверхности дисков, срезы средней части тканевой пластинки подвергались гистологическому исследованию с применением микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия).

Исследования проведены на 22 мышах линии CBA/CaLac (виварий НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, Томск) с разрешения локального этического комитета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России с соблюдением принципов гуманного обращения с лабораторными животными, изложенными в [140]. При этом 16 животных использовали для подкожной имплантации, 6 животных в качестве доноров костного мозга.

# 2.5.5. Исследования процесса интеграции имплантанта с костной тканью при интрамедуллярном армировании

Сравнительные экспериментальные исследования морфологических особенностей процесса интеграции эластичного интрамедуллярного имплантата с костной тканью при интрамедуллярном армировании эластичными тонкими спицами проводили в системе *in vivo* на половозрелых собаках.

Имплантацию эластичных интрамедуллярных имплантатов осуществляли через проксимальный метафиз большеберцовой кости. Для этого с помощью шила диаметром 3 мм в кортикальном слое кости формировали наклонные отверстия, сообщающиеся с костно-мозговым каналом. Через отверстие спицу проводили костномозговой канал. Проксимальный конец спицы загибали в виде петли и располагали под фасцией. После имплантации мягкие ткани ушивали.

Спустя 4 недели после имплантации спицы удаляли за петлю, при этом проводили измерения прилагаемых усилий с помощью динамометра ДЭПЗ-1Д-1У-1(Россия). Расчет усилия отрыва спицы (*P*) проводили по формуле:

$$P = \frac{F}{L\pi d},\tag{2.5}$$

где *F* – усилие отрыва; *L* – длинна спицы; *d* – диаметр спицы.

После удаления спицы участки метадиафизов костей распиливали в продольном и поперечном направлении, фиксировали в 10% растворе

нейтрального формалина И заливали В целлоидин для проведения гистологических исследований. Гистотопографические срезы окрашивали по это описано в работе [145]. Исследование репаративной Массону, как регенерации костной ткани осуществляли методом световой микроскопии с использованием микроскопа «Никмед-5» («ЛОМО», Санкт-Петербург). Для получения микрофото гистологических препаратов использовали аппаратнопрограммный комплекс «ДиаМорф» (Москва), смонтированный на базе большого исследовательского фотомикроскопа «ОРТОМ» (Германия).

Исследования были проведены на 9 половозрелых собаках с разрешения этического комитета ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган с соблюдением принципов гуманного обращения с лабораторными животными, изложенными в [140].

# 2.5.6. Исследования удлиннения длинной трубчатой кости методом комбинированного остеосинтеза с использованием эластичных интраммедуллярных импланнтантов

Экспериментальные исследования по удлинению конечности методом комбинированного остеосинтеза проведены на 24 беспородных собаках в возрасте 1-3 года, со средним весом 18,2 ± 1,7 кг. Исследования проводились с разрешения этического комитета ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России, г. Курган с соблюдением принципов гуманного обращения с лабораторными животными, изложенными в [140]. Хирургическое вмешательство проводили под общей анестезией с помощью 5% -ного раствора тиопентата натрия. Затем в средней трети диафиза прводили чрескожную остеотомию малоберцовой кости и остеоклазию голени. После остеотомии в канал трубчатой кости вводили два интрамедуллярных имплантанта, изогнутых по всей длине. Их свободные концы были согнуты примерно на 60°, чтобы предотвратить внутрикостную миграцию имплантантов. Аппарат Илизарова состоял из двух дистальных кольцевых колец и двух проксимальных колец.

Для оценки течения дистракционного остеогенеза использовали рентгенографический метод исследования (VEP X Technology Premium VET, Испания). Ha рентгенограммах измеряли высоту диастаза, высоту проксимального и дистального костных регенератов, высоту срединной зоны просветления («зоны роста»), диаметр дистракционного регенерата в проекции «зоны роста».

#### 2.6. Статистическая обработка результатов

Исследования проведены с использованием современного поверенного оборудования Статистическую обработку В аккредитованных центрах. полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 Для оценки статистической значимости различий применяли (StatSoft, Dell). непараметрический критерий Манна-Уитни. Рассчитывали параметры распределений: для физических параметров – величину среднего значения (M), стандартного отклонения (SD) для медико-биологических параметров – медиану (Me), 25% квартиль (Q1) и 75% квартиль (Q3) При всех видах статистического анализа уровень значимости составлял 95% (р<0,05).

## Глава 3. Исследование структуры и свойств полимерных каркасов на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ

Не смотря на разнообразие технологий формирования полимерных каркасов для приложений тканевой инжененрии (газовое вспенивание, обработка сверхкритической жидкостью, выщелачивание частиц, сублимационная сушка, 3D печать и. т.д) одними из наиболее перспективных типов являются каркасы, созданные на основе волокон, поскольку способны наиболее точно имитировать архитектонику восстанавливаемых тканей [38].

Для исследования возможности использования сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом для приложений регенерации костной ткани на его основе были сформированы полимерные каркасы методом электроформования и аэродинамического формования.

## 3.1. Формование полимерных каркасов методами электроформования и аэродинамического формования

Наиболее распространенным способом создания каркасов для применения в области регенеративной медицины является электроформование ИЛИ электроспинниг (ЭС) [146]. Материалы, полученные методом электроспиннинга, характеризуются, высокими прочностными свойствами, хорошей биосовместимостю. Однако метод имеет определенные ограничения, связанные с избирательностью метода к относительной диэлектрической проницаемости растворителя, используемого для изготовления прядильного раствора, сложности с получением композиционных материалов, низкой производительностью метода, сложностью с получением материалов толщиной более 500 мкм, малым размером пор, препятствующим заселению объема материала клетками [147].

Альтернативным способом изготовления каркасов имеющих высокое отношение площади поверхности к общему объему, для приложений тканевой инженерии, является способ, предложенный группой Medeiros E.S., и не зависимо

от него Zhang, получивший название «аэродинамическое формование в турбулентном газовом потоке» (АЭРДФ) или solution blowing spinning, в котором для получения твердых полимерных матриксов из полимерного раствора используется сжатый газ [148,149]. Основными узлами системы, реализующей метод аэродинамического формования в турбулентном газовом потоке, являются дозирующий насос, необходимый для контроля количества доставляемого полимерного раствора, и распылительная система, представляющая собой систему концентрических форсунок, где по действием сжатого воздуха нагнетаемого компрессором формируется твердая сеть полимерных микро и нано волокон (рисунок 3.1).





По сравнению с электроформованием, реализация метода аэродинамического формования не требует применения высоковольтного оборудования, позволяет использовать одновременно несколько формующих форсунок, что обеспечивает высокую безопасность и производительность процесса формирования нетканого материала. Технологическая блок-схема изготовления экспериментальных образцов полимерных каркасов методом аэродинамического формования представлена на рисунке 3.2.



Рисунок 3.2 Технологическая блок-схема изготовления экспериментальных образцов полимерных каркасов методом аэродинамического формования.

Каркасы, полученные методом аэродинамического формования, могут быть сформированы из различных полимерных материалов, характеризуются высокой пористостью, волокнистой структурой, имитирующей естественную организацию внеклеточного матрикса. Метод позволяет формировать каркасы непосредственно на живом организме, что делает данную технологию перспективной для медицинских приложений [150].

Сравнительные исследования влияния метода формования на структуру и свойства полимерных каркасов на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ проводили с использованием коммерчески доступной установки электроспиннига "NANON-NF 101" (МЕСС, Япония) и установки аэродинамического формования в газовом потоке собственной конструкции, представленных на рисунке 3.3.





Рисунок 3.3. Изображения установок для проведения сравнительных исследований влияния метода формования на структуру и свойства полимерных каркасов: а – электроспиннига, б – аэродинамического формования в газовом потоке

Основными узлами установки электроспиннига являются сборочный коллектор (1), дозирующее устройство (2), привод инжекторов и высоковольтный источник (3).

Для формирования полимерных каркасов методом электроспиннига были использованы следующие технологические параметры: расход полимерного раствора 3,5 мл/час, расстояние от иглы до сборочного коллектора 16 см, напряжение 25 кВ.

Установка аэродинамического формования смонтирована в защищенном оборудованном системой приточно-вытяжной кожухе, вентиляции, обеспечивающей 100 кратное обновление атмосферы в объёме кожуха. В нижней части кожуха смонтирована рабочая стойка (1), на стойке расположена распылительная система (2), умеющая возможность перемещения оси для изменения рабочего расстояния между распылительной системой и сборочным коллектором (3). Сборочный коллектор установки смонтирован на подвижном основании, оснащённом двуканальной кинематической системой с независимым управлением каждым каналом. Дозирующая система (4) распылительной системы обеспечивает равномерную подачу необходимого количества прядильного раствора в процессе формования. Источник сжатого газа оснащен системой редукторов для поддержания необходимого расхода и давления сжатого газа, соединен с распылительной системой воздушной магистралью. Установка аэродинамического формования включена в перечень уникального научного оборудования ТПУ (приложение 4). Для приготовления прядильного раствора смесь метилэтилкетона (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O) (Экос-1, Россия) и N.Nиспользовали диметилформамида (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO) (Экос-1, Россия), взятых в объёмном отношении 1/2. Приготовление раствора сополимера ВДФ-ТеФЭ проводили в герметичном реакторе при постоянном перемешивании и температуре 50°C до получения однородного прозрачного раствора.

Для проведения сравнительных исследований влияния метода формования на структуру и свойства полимерных каркасов на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ были подготовлены пять типов прядильных растворов с концентрациями сополимера 3, 5, 7, 9, 11 масс %.

#### 3.2. Исследование физико-химических свойств полимерных каркасов

#### 3.2.1. Морфология полимерных каркасов

Результаты ранее проведенных исследований материалов, изготовленных методами электроспиннига (ЭС) и аэродинамического формования (АЭРДФ), показывают, что наибольшие влияние на средний диаметр формируемых волокон, а, следовательно, на свойства сформированных материалов оказывает концентрация полимера в прядильном растворе [146,149,151,152].

Изображения поверхности полимерных каркасов, изготовленных методами электроспиннига и аэродинамического формования из растворов с различной концентрацией, представлены на рисунке 3.4.






Рисунок 3.4. Электронно-микроскопические снимки (СЭМ) полимерных каркасов, изготовленных из растворов с различной концентрацией сополимера ВДФ-ТеФЭ: а – ЭС 3 масс %, в – ЭС 5 масс %, е – ЭС 7 масс %, ж – ЭС 9 масс %, и – ЭС 11 масс %, б –АЭРДФ 3 масс %, г – АЭРДФ 5 масс %, е – АЭРДФ 7 масс %, з – АЭРДФ 9 масс %.

Полимерный каркас, изготовленный методом ЭС из 3% прядильного раствора, сформирован отдельными волокнами правильной цилиндрической формы (рисунок. 3.4a) средним диаметром 0,38 ± 0,17 мкм (Таблица 3.1).

На поверхности присутствуют дефекты веретенообразной (овальной формы) со средним размером по наибольшей оси  $17 \pm 4$  мкм, плотность дефектов составляет  $653 \pm 78$  шт./мм<sup>2</sup>. Увеличение концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ в прядильном растворе до 5 % приводит к увеличению среднего диаметра формируемых волокон более, чем на 40 % по сравнению с 3 % прядильным раствором (Таблица 3.1). Отмечается существенное снижение плотности дефектов до 110 ± 24 шт./мм<sup>2</sup> при уменьшении среднего размера дефекта до 12 ± 3 мкм (рисунок. 3.4в). Увеличение концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ до 7 % приводит к увеличению среднего диаметра волокон до 0,83 ± 0,53 мкм. На поверхности каркаса наблюдаются единичные дефекты, происходит увеличение полидисперсности волокон (рисунок. 3.4д), о чем свидетельствует увеличение величины стандартного отклонения среднего диаметра волокон (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 Зависимость среднего диаметра волокон в полимерных каркасах от концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ в прядильном растворе.

Концентрация ВДФ-ТеФЭ в растворе, масс. %	3	5	7	9	11
Средний диаметр волокон в ЭС каркасах, мкм	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,3	$0,8 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,7$	$1,7 \pm 0,7$
Средний диаметр волокон в АЭРДФ каркасах, мкм	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,3	$1,2 \pm 0,6$	2,8 ± 1,44	_

При формировании каркаса из прядильного раствора с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 9 % на его поверхности отсутствуют дефекты, на поверхности волокон отмечается формирование собственного микрорельефа

(рисунок. 3.4ж), увеличивается полидесперсность волокон и средний диаметр (Таблица 3.1). При концентрации ВДФ-ТеФЭ 11 % полимерный каркас содержит значительное количество дефектов, волокна склеены между собой в местах контакта (рисунок. 3.4и).

В отличие от каркаса, сформированного методом ЭС, полимерный каркас, изготовленный методом АЭРДФ из прядильного раствора с концентрацией сополимера ВДФ-ТеФЭ 3 %, отличается сложной пространственной организацией (рисунок. 3.4б), в которой можно выделить как минимум два размерных уровня структурных элементов. Первый уровень – макроструктуры представлены жгутами средним диаметром  $8,3 \pm 3,4$  мкм и глобулами средним диаметром  $5,8 \pm$ 2,2 мкм, плотность глобул на поверхности полимерного каркаса составляет  $3631 \pm$ 435 шт./мм<sup>2</sup>. Второй уровень – микроструктуры представлены микроволокнами средним диаметром  $0.53 \pm 0.16$  мкм (Таблица 3.1), которые формируют жгуты, а так же заполняют пространство между ними. Увеличение концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ до 5 % не приводит к изменениям в организации структуры полимерного каркаса. В структуре каркаса наблюдаются жгуты, при этом их средний диаметр достоверно не изменяется, однако отмечается уменьшение плотности упаковки волокон в жгуте. Средний размер глобул увеличивается до 9,8 ± 4,1 мкм, при этом плотность глобул на поверхности уменьшается более чем в три раза до 931 ± 125 шт./мм<sup>2</sup>. Наблюдается увеличение среднего диаметра и полидесперсности микроволокон (Таблица 3.1), при этом на поверхности микроволокон имеется собственный развитый рельеф (рисунок. 3.4г). Увеличение концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ до 7 % приводит к появлению крупных дефектов на поверхности каркаса, значительно уменьшается плотность упаковки волокон (рисунок. 3.4e), более чем в два раза увеличивается средний диаметр и полидисперстноть волокон (Таблица 3.1). Полимерные каркасы. изготовленные методом АЭРДФ ИЗ прядильного раствора с концентрацией ВДФ-ТеФЭ 9 %, отличаются наибольшим количеством дефектов (рисунок. 3.43), низкой плотностью упаковки волокон, полимерные волокна часто

склеены между собой, на поверхности наблюдаются глобулы размером до 30 мкм. Каркасы из прядильного раствора с концентрацией ВДФ-ТеФЭ 11 % сформировать не получилось, так как инжекционное сопло распылителя засорялось.

Анализ полученных результатов показывает, что при одинаковых концентрациях сополимера в прядильном растворе средний диаметр волокон в каркасах, формируемых методом ЭС, меньше, чем средний диаметр волокон в каркасах, формируемых методом АЭРДФ, что согласуется с результатами [153]. При этом метод ЭС менее "чувствителен" к концентрации полимера в прядильном растворе, что позволяет получать нетканые материалы в более широком диапазоне вязкостей прядильного раствора. При этом каркасы, изготовленные методом АЭРДФ, отличаются более сложной пространственной организацией.

Отличия в структуре каркасов обусловлены различными механизмами формирования волокон. Известно, что для процесса формирования материалов методом ЭС характерна высокая концентрация одноименных электрических зарядов в прядильном растворе. В результате воздействия электрических сил струя полимерного раствора становится поперечно неустойчивой, уплощается и после разворота поперек силовых линий внешнего электрического поля расщепляется вдоль своей оси на две дочерние струи, примерно равные по объему, каждая из которых способна вновь расщепиться. Этот процесс носит многократный характер и продолжается до тех пор, пока капиллярное давление на поверхности дочерних струй не скомпенсирует давление электрических сил, или струя при испарении растворителя не превратится в твердое волокно [146,154]. Таким образом, многократный процесс расщепления струи под действием электрических сил, с одной стороны, способствует уменьшению диаметра формируемых волокон, с другой стороны, обеспечивает однородную гладкую поверхность волокна.

При формировании материалов методом АЭРДФ, струя полимерного раствора ускоряется и растягивается неизотермическим высокоскоростным газовым потоком. В таких условиях эффективное растяжение струи раствора полимера происходит на незначительном расстоянии (~ 100÷150 мкм) от инжектирующего сопла. Растяжение полимерной струи вызывает уменьшение ее диаметра примерно в 100 раз по сравнению с диаметром на выходе из инжектирующего сопла. Уменьшение диаметра полимерной струи сопровождается интенсивным удалением растворителя, в результате вязкость полимерной струи увеличивается [155]. Затем струя раствора полимера попадает в зону газового потока, которая отличается высокой турбулентностью, где происходит ее изгиб и запутывание. В виду значительной вязкости прядильного раствора в турбулентной области эффективное растяжение струи и её распад на дочерние струи практически не происходит. Однако при этом увеличивается вероятность запутывания соседних струй, что приводит к формированию волокон сложной морфологии, преимущественно микронного размера [156].

Поскольку физико-химические свойства каркасов, изготовленных из одинаковых прядильных растворов, в первую очередь, определяются размером волокон, формирующих материал [157,158], то адекватная оценка влияния способа изготовления на свойства каркасов возможна при условии равенства среднего диаметра волокон. Каркасы, сформированные из прядильного раствора с концентрацией сополимера ВДФ-ТеФЭ 5 масс % незначительно отличаются по среднему диаметру волокон, обладают низкой полидесперстностью (таблица 3.1), поэтому для изучения влияния способа изготовления каркасов на их физико-химические свойства использовалась эта группа материалов.

## 3.2.2. Химический состав и конформационная структура сополимера ВДФ-ТеФЭ в полимерных каркасах

Инфракрасные спектры полимерных каркасов полученные методом электроформования и аэродинамического формования из прядильных растворов с

77

содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 5 масс % а так же спектр исходного порошка ВДФ-ТеФЭ представлены на рисунке 3.5.



Рисунок. 3.5 – ИК-спектры полимерных каркасов, изготовленных методом ЭС, АЭРДФ и порошка сополимера ВДФ-ТеФЭ.

Известно, что в области спектра от 400 до 1000 см<sup>-1</sup> располагаются полосы, характеризующие конформацию макромолекул сополимера ВДФ-ТеФЭ [159]. В спектре порошка сополимера ВДФ-ТеФЭ можно выделить несколько полос характерных для конформаций макромолекул, поглощения, обладающих сегнетоэлектрическими свойствами: 446 см<sup>-1</sup>, 510 см<sup>-1</sup> и 837 см<sup>-1</sup> (*TTT* конформация макромолекул), 822 см<sup>-1</sup> ( $T_3GT_3G^-$  конформация макромолекул). Кроме этого, в спектре присутствуют полосы в областях 535 и 618 см<sup>-1</sup>, TGTG конфрмации характерные для макромолекул, обладающих параэлектрическими свойствами [160,161]. Таким образом, во всех исследуемых материалах присутствуют полимерные цепи во всех трех конформационных формах. Наличие интенсивной полосы поглощения в области 837 см-1, характерной для фрагментов молекулы с длинными транс-последовательностями, преимущественной конформацией позволяет сделать вывод 0 том, что полимерных молекул является наиболее электрически активная ТТТ конформация

макромолекул. Также стоит отметить, что в спектрах каркасов материалов наблюдается увеличение значения отношения интегральной интенсивности полос, характерных для сегнетоэлектрической β фазы и γ фазы, к спектральной интенсивности полос, характерных для параэлектрической α фазы (Таблица 3.2).

Таблица 3.2. Отношения интегральной интенсивности полос, характерных для различных кристаллических фаз в полимерных каркасах, изготовленных методом ЭС, АЭРДФ и в порошке сополимера ВДФ-ТеФЭ

	Отношение интегральной интенсивности полос				
Образец	Сред.знач. ± стд.откл.				
	I <sub>446</sub> / I <sub>535</sub>	I <sub>510</sub> / I <sub>535</sub>	I <sub>837</sub> / I <sub>618</sub>	I <sub>822</sub> / I <sub>535</sub>	
Порошок	$0,1 \pm 0,1$	_	$4,1 \pm 0,2$	$0,\!4 \pm 0,\!1$	
АЭРДФ каркас	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	4,7 ± 0,3	$0,7 \pm 0,1$	
ЭС каркас	$0,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,2$	1,5 ± 0,3	

При ЭТОМ значение отношения интегральной интенсивности полос характерных для β и γ фазы в каркасах, сформированном методом ЭС, выше, чем в каркасах, сформированном методом АЭРДФ. Таким образом, результаты исследований, ИК-спектроскопии, проведенных методом подтверждают ВДФ-ТеФЭ перестройку кристаллической структуры сополимера под воздействием растягивающих усилий на формирующиеся волокна. При этом электрическое поле, действующее на волокна при формировании каркаса методом стимулирует ЭC, образование фаз, обладающих сегнетоэлектрическими свойствами.

### 3.2.3. Кристаллическая структура полимерных каркасов

Рентгенограммы каркасов (рисунок 3.6) подтверждают перестройку кристаллической структуры в сополимере ВДФ-ТеФЭ, происходящую под действием на прядильный раствор растягивающих сил потока сжатого газа или электрического поля в процессе формирования каркасов. Наблюдается

уменьшение интенсивность гало в области 16 – 18°, что свидетельствует об уменьшении доли параэлектрической α фазы в каркасах по сравнению с необработанным порошком.



Рисунок 3.6. Рентгенограммы полимерных каркасов, изготовленных методом ЭС, АЭРДФ и порошка сополимера ВДФ-ТеФЭ.

В спектре каркаса, сформированного методом АЭРДФ, значительно уменьшается интенсивность рефлексов в области 35° и 45° и одновременно увеличивается интенсивности рефлекса в области 19,2° (рисунок 3.6). Размер кристаллитов в полимерных каркасах, изготовленных методом ЭС и АЭРДФ, и исходном порошке сополимера ВДФ-ТеФЭ приведен в Таблице 3.3.

В спектре каркаса, сформированного методом ЭС, рефлексы в области 35° и 45° не определяются. Практически отсутствует гало в области 16 – 18° при этом в набольшей степени увеличивается интенсивность рефлекса упорядоченной β фазы в направление (110), что обусловлено растяжением и одновременной поляризацией волокон полимера под действием силы постоянного электрического поля, возникающего в пространстве между иглой и сборочным коллектором.

	Размер кристаллитов, нм			
Образец	Сред.знач. ± стд.откл.			
	β <sub>110</sub> нм	β <sub>001</sub> нм	β <sub>111</sub> нм	
Порошок ВДФ-ТеФЭ	5,4±0,6	$1,4{\pm}0,5$	3,8±0,6	
АЭРДФ каркас	$11,2\pm0,3^*$	$0,6{\pm}0,4^{*}$	2,2±0,6	
ЭС каркас	$14,4\pm0,2^{**}$	$\rightarrow 0$	$\rightarrow 0$	

Таблица 3.3. Размер кристаллитов в полимерных каркасах, изготовленных методом ЭС, АЭРДФ, и порошке сополимера ВДФ-ТеФЭ

\* p<0,05 отличия от порошка ВДФ-ТеФЭ; \*\* p<0,05 отличия от АЭРДФ каркаса

## 3.2.4. Теплофизические свойства полимерных каркасов

ДСК термограммы образцов полимерных каркасов полученные методом электроформования и аэродинамического формования из прядильных растворов с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 5 масс % а так же термограмма исходного порошка ВДФ-ТеФЭ представлены на рисунке 3.7.



Рисунок 3.7. – ДСК термограммы исследуемых полимерных каркасов, изготовленных методом ЭС, АЭРДФ и порошка сополимера ВДФ-ТеФЭ.

На термограмме порошка можно выделить два разнесенных эндотермических пика: первый в районе 102,6 °С и другой, более интенсивный, в

районе 142,7 °С. Эндотермический эффект равный  $1,2 \pm 0,3$  Дж/г в районе 102,6 °С на термограмме необработанного порошка сополимера ВДФ-ТеФЭ связан с затратой энергии на перестройку кристаллической структуры полимерного материала при переходе из сегнетоэлектрического в пароэлектрическое состояние (переход Кюри) [162]. Интенсивный эндотермический эффект равный 19,4 ± 0,9 Дж/г вблизи температуры 142,7 °С соответствует плавлению сополимера ВДФ-ТеФЭ [96].

На термограмме полимерного каркаса, изготовленного методом АЭРДФ, наблюдается переход Кюри в районе 116,3 °С и эндотермический эффект при температуре 143,8 °С, соответствующей плавлению. Количество тепла при переходе Кюри составляет  $1,8 \pm 0,2$  Дж/г, количество тепла, затраченное на плавление каркаса, изготовленного методом АЭРДФ, составляет  $21,2 \pm 0,7$  Дж/г. Таким образом, увеличение степени кристалличности полимерного каркаса, изготовленного методом ЭС, эндотермический эффект, соответствующий переходу Кюри (134,7 °С), перекрывается с эндотермическим эффектом плавления в районе 144,5 °С. Общая теплота плавления каркаса, изготовленного методом ЭС, составляет 27,1 ± 1,3 Дж/г. Таким образом, увеличение степени кристалличности полимерного каркаса, изготовленного методом ЭС, составляет 27,1 ± 1,3 Дж/г. Таким образом, увеличение степени кристалличности полимерного каркаса, изготовленного методом ЭС, по сравнению 30, каркаса, изготовленного методом ЭС, составляет 27,1 ± 1,3 Дж/г. Таким образом, увеличение степени кристалличности полимерного каркаса, изготовленного методом ЭС, составляет 27,1 ± 1,3 Дж/г. Таким образом, увеличение степени кристалличности полимерного каркаса, изготовленного методом ЭС, по сравнению 27,1 ± 1,3 Дж/г. Таким образом, увеличение степени кристалличности полимерного каркаса, изготовленного методом ЭС, по сравнению 27,1 ± 1,3 Дж/г. Таким образом, увеличение степени кристалличности полимерного каркаса, изготовленного методом ЭС, по сравнению с исходным порошком составляет более 30%.

Сдвиг и последующее слияние эндотермических эффектов, связанных с плавлением и переходом температуры Кюри в область более высоких температур при одновременном увеличении теплоты плавления сополимера ВДФ-ТеФЭ, впервые было показано Y. Murata и N. Koizumi для образцов сополимера ВДФ-ТеФЭ, которые обладали значительной остаточной поляризацией после действия на них электрических полей высокой напряженности [163]. Известно, что действие сильных электрических полей и растягивающих усилий на ПВДФ и его сополимеры способствует образованию фаз с сегнетоэлектрическими свойствами

[164]. Таким образом, результаты исследований, проведенных методом ДСК, позволяют предположить, что оба типа сформированных полимерных каркасов обладают повышенным количеством кристаллических фаз С сегнетоэлектрическими свойствами. При этом воздействие электрического поля при формировании полимерного каркаса методом ЭС в большей степени способствует формированию кристаллических фаз с сегнетоэлектрическими свойствами. Значительное увеличение степени кристалличности при формировании методом ЭС каркасов из ПВДФ и его сополимеров так же отмечено в работах [152,165].

#### 3.2.5. Прочность и относительное удлинение полимерных каркасов

Результаты исследований прочности и относительного удлинения при одноосном растяжении полимерных каркасов представлены в Таблице 3.4. Полученные результаты свидетельствуют о том, что прочность полимерных каркасов, сформированных методом ЭС, более чем в 7,5 раз, а относительное удлинение при разрыве более чем 1,3 раз выше, чем аналогичные показатели каркасов, сформированные методом АЭРДФ. Полученные результаты могут быть обусловлены как морфологическими, так и структурными особенностями сформированных каркасов.

Таблица 3.4. Прочность и относительное удлинение каркасов, изготовленных методом ЭС и АЭРДФ.

Kaprac	Прочность при	Относительное	
Каркас	растяжении, МПа	удлинение, %	
ЭС	15,3 ± 2,6	$122 \pm 10$	
АЭРДФ	$1,9 \pm 0,1$	$86 \pm 4$	

Высокая плотность упаковки волокон в полимерных каркасах, сформированных методом ЭС, обеспечивает меньшии значения удельной нагрузки, приходящиеся на каждое волокно, что увеличивает значения показателя

83

прочности. Кроме этого, как показывают исследования, проведённые методами ДСК и ИК-спектроскопии, воздействие электрического поля стимулирует кристаллизацию полимерного материала преимущественно в β фазе. Известно, что формирование нановолокнистых материалов методом ЭС стимулирует ориентацию оси сегнетоэлектрической β-фазы вдоль оси волокна, в то время как α-фаза имеет значительно более низкую степень ориентации [166]. Поскольку количество β-фазы в каркасах, сформированных методом ЭС, существенно выше, и она лучше ориентирована, чем в каркасах, сформированными методом АЭРДФ, то количество энергии, необходимое на разрушение волокна, с более высокой степенью кристалличности существенно выше. Поэтому показатели прочности полимерных каркасов, сформированных методом ЭС, существенно выше. Изображения, полученные методом сканирующей электронной микроскопии, показывают, что волокна каркасов, изготовленные методом ЭС, имеют правильную цилиндрическую форму. Каркасы, изготовленные методом АЭРДФ, напротив, отличаются собственным развитым микрорельефом, помимо этого, в их структуре наблюдаются макродефекты в виде капель. Известно, что дефекты, возникающие в твердом теле, снижают механическую прочность последнего. Таким образом, меньшие значения прочности и относительного удлинения, наблюдаемые для каркасов, изготовленных методом АЭРДФ, обусловлены и дефектами структуры.

## 3.2.6. Смачивание поверхности каркасов

Изображения капли воды на поверхности полимерных каркасов, сформированных методом ЭС и АЭРДФ, приведены на рисунке 3.8.





Рисунок 3.8. Изображения капли воды на поверхности полимерных каркасов,

изготовленных методом: ЭС (а) и АЭРДФ (б).

Значения краевого угла смачивания поверхности полимерных каркасов водой достоверно не отличаются и составляют более 120°, что свидетельствует о высокой гидрофобности сформированных каркасов. Высокая гидрофобность каркасов обусловлена, с одной стороны, низкой поверхностной энергией сополимера ВДФ-ТеФЭ, с другой стороны, гетерогенностью и высокой пористостью сформированных каркасов.

3.3. Исследование биологических свойств полимерных каркасов.

# **3.3.1. Исследования жизнеспособности и эффективности адгезии клеток** к полимерным каркасам

Изображения флуоресцентно меченых клеток на поверхности полимерных каркасов, сформированных методом ЭС и АЭРДФ, представлены на рисунке 3.9.





Рисунок 3.9. Изображения флуоресцентно меченых клеток на поверхности полимерных каркасов: а, в, д – МСК; б, г,е – EA-hy 926,

(а, б) – клетки на поверхности культурального пластика; (в, г) – клетки на поверхности каркаса, изготовленного методом ЭС, (д, е) – клетки на поверхности каркаса, изготовленного методом АЭРДФ.

Анализ полученных результатов показывает, что количество МСК, адгезированных на поверхности каркасов на 43% и 12% ниже, чем на поверхности культурального пластика (Таблица 3.5).

Это может быть объяснено высокой гидрофобностью каркасов, что препятствует адсорбции белков, и, следовательно, клеточной адгезии. Известно, что МСК характеризуются низкой скоростью пролиферации, что препятствует формированию конфлюэнтного монослоя в течение периода культивирования.

Напротив, количество клеток линии EA-hy 926, адгезированных на поверхности каркасов, изготовленных методами ЭС и АЭРДФ, было выше на 56% и 23%, соответственно, по сравнению с культуральным пластиком. Вероятно, это обусловлено следующими факторами. Клетки линии EA-hy 926 по сравнению с ММСК характеризуются более высокой скоростью пролиферации, о чем свидетельствует образование конфлюэнтного монослоя на поверхности культурального пластика на 5 сутки культивирования.

Таблица 3.5. Количество и жизнеспособность клеток линии EA-hy 926 и МСК культивируемых на поверхности полимерных каркасов.

Исследуемый	Количество	Относительное количество клеток			
материал	клеток на 1 мм <sup>2</sup> ,	Me (25%; 75%)			
	Me (25%; 75%).	Живых, %	Апоптоз, %	Некроз, %	
	<u> </u>	МСК			
Культуральный пластик	446 (440; 506)	97,0 (96,9; 97,2)	2,1 (1,8; 2,2)	0,7 (0,1; 1,1)	
ЭС каркас	195 (143; 340) <sup>a</sup>	96,9 (94,5; 97,6)	2,0 (1,8; 2,1)	1,6 (0,6; 2,5)	
АЭРДФ каркас	395 (358; 483) <sup>a,6</sup>	96,7 (94,5; 97,2)	2,3 (2,0; 2,4)	1,0 (0,8; 2,5)	
	]	EA-hy 926			
Культуральный пластик	2269 (1722; 2650)	98,1 (97,9; 98,5)	1,6 (1,5; 1,8)	0,2 (0,1; 0,3)	
ЭС каркас	2923 (2095; 3490) <sup>a</sup>	97,0 (96,6; 97,3)	1,9 (1,3; 2,0)	1,4 (1,0; 1,6)	
АЭРДФ каркас	3561(3200;3580) <sub>a,6</sub>	96,9 (96,4; 98,2)	1,6 (1,0; 2,0)	1,3 (0,8; 2,0)	

<sup>*a*</sup> - *p*<0,05 (по сравнению с поверхностью культурального пластика).

<sup>6</sup> - p<0,05 (по сравнению с поверхностью полимерного каркаса сформированного методом ЭС).

Так как развитая пространственная структура каркасов обладает значительной свободной поверхностью, то процесс контактного ингибирования культуры начинается позже, и клетки могут пролиферировать в течение длительного времени. Таким образом, при культивировании клеток на поверхности каркасов их количество выше по сравнению с культуральным пластиком.

Известно, что смачивание поверхности материала при культивировании клеток *in vitro* во многом определяет выраженность клеточной адгезии, при этом на гидрофильных поверхностях, как правило, адгезирует большее количество клеток [167]. Исследования краевого угла смачивания образцов не выявили достоверных отличий в значении данного показателя, оба типа сформированных каркасов отличались высокой гидрофобностью со средним значением краевого угла ~120°.

Различия в количестве адгезированных клеток, культивируемых на поверхности каркасов, изготовленных методами ЭС и АЭРДФ, могут быть обусловлены морфологическими и структурными особенностями каркасов. большей Известно, что поверхности с шероховатостью являются предпочтительными для адгезии клеток [130], таким образом, развитая поверхность волокон в каркасах, сформированных методом АЭРДФ, стимулирует прикрепление клеток. Кроме того, большое количество клеток, адгезированных на поверхности полимерных АРДФ каркасов обусловлено их более высокой пористостью и большим размером пор по сравнению с ЭС каркасами. Больший размер пор облегчает миграцию клеток в объём каркаса, а также создает благоприятные условия для поступления питательных веществ и отвода продуктов жизнедеятельности клеток [168]. С другой стороны, меньшее количество клеток, наблюдаемое на ЭС каркасах, обусловлено большим содержанием и высокой упорядоченностью сегнетоэлектрической  $\beta$  фазы. Высокое содержание и высокая упорядоченность сегнетоэлектрической  $\beta$  фазы в ЭС каркасах в ответ на механическое воздействие вызывает значительные значений изменения поверхностного потенциала, которые существенно превосходят значения, необходимые для стимулирования адгезии клеток. Ранее уменьшение количества клеток при увеличении количества сегнетоэлектрической  $\beta$  фазы было отмечено авторами работы [169]. Таким образом, можно

предположить, что существует оптимальное количество и качество сегнетоэлектрической  $\beta$  фазы, которые обеспечивают высокие показатели значения адгезии клеток.

Жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных каркасах обоих типов, достоверно не отличалось между исследуемыми группами и поверхностью культурального пластика. Отмечается низкое значения показателя мертвых клеток и клеток в состояние аппопотза (Таблица 3.5.), культивируемых на обоих типах каркасов. Отсутствие достоверных отличий в показателях жизнеспособности клеток по сравнению с контрольным образцом (культуральный пластик) свидетельствуют о низкой токсичности каркасов. С учетом того, что полимерные каркасы, сформированные методом АЭРДФ, демонстрировали достоверно более высокие показатели клеточной адгезии, эта группа каркасов использовалась для исследования местного воздействия на окружающие ткани при имплантации.

## **3.3.2.** Исследование местного токсического действия и способности интеграции каркасов с нативными тканями

Наблюдения за животными в процессе имплантации не выявили негативных изменений гомеостаза. Все животные активно передвигались в пределах клеток, принимали пишу, пили воду из поильников. Визуальный осмотр не выявил наличия интоксикации, воспаления, нагноения, инфильтратов В месте имплантации не у одного из подопытных животных. Отмечалась прочная фиксация образцов за счет прорастания соединительной ткани (рисунок 3.10). Вокруг образцов наблюдалась развитая микроциркуляторная сеть, что свидетельствует о высокой биосовместимости имплантируемого материала.



Рисунок 3.10 Макроскопическое состояние окружающих тканей в месте имплантации полимерного каркаса, изготовленного методом АЭРДФ.

каркасов Гистологические исследования полимерных демонстрируют выраженное развитие соединительной ткани в поровом пространстве каркаса. Окружающая каркас созревающая соединительная ткань характеризуется умеренным количеством сосудов. Фрагменты каркаса окружены макрофагами, фибробластами, небольшим количеством лимфоцитов, что является нормальной реакцией имплантируемый материал. Таким образом, на проведенные исследования показывают, что при имплантации полимерных каркасов в подкожную клетчатку отсутствует грануляционная ткань, отмечается умеренное или выраженное разрастание зрелой соединительной ткани, воспалительные процессы выражены слабо.



Рисунок 3.11 Гистологические срезы полимерного каркаса, изготовленного методом АЭРФ после имплантации: а – в подкожный жировой карман, б – внутримышечной.

При внутримышечной имплантации каркаса окружающая соединительная ткань развита слабо или совсем не определяется. Каркас окружен гигантскими многоядерными клетками (ГМК), умеренным количеством лимфоцитов, фибробластов, гистиоцитов, единичными плазмоцитами. Выраженное развитие соединительной ткани наблюдается в поровом пространстве каркаса, отмечается наличие пограничной мононуклеарной инфильтрации, зоны отсутствует грануляционная ткань. Зрелой соединительной ткани меньше, чем при подкожной локализации имплантируемого материала.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что сформированные методом АЭРФ полимерные каркасы на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ не вызывает общетоксического действия на лабораторных животных и способны прочно фиксироваться в тканях, более выражено при подкожной имплантации.

#### 3.4. Практическое применение полимерных каркасов

Полимерные каркасы основе сополимера ВДФ-ТеФЭ используются для проведения биомедицинских исследований и экспериментов в Российских научно-исследовательских центрах (приложения № 6 – 9) с целью:

- разработки новых методик выделения и применения аутологичных фибробластов

- отработки методик регенеративной терапии с применением каркасов в качестве носителей клеточного материала;

- реконструктивно-восстановительной хирургии мягких тканей;

- изучения в сравнительном аспекте свойств полимерных имплантатов при их тестировании на лабораторных животных;

#### 3.5. Выводы по Главе 3

1. Методом электроформования и аэродинамического формования сформированы полимерные каркасы на основе сополимера тетрафторэтилена с

винилиденфторидом. Установлено, что полимерный каркас полученный методом электроформования сформирован микроволокнами, средний диаметр которых увеличивается с  $0,2 \pm 0,2$  до  $1,7 \pm 0,7$  мкм при увеличении концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ в прядильном растворе с 3 до 11 масс %. Полимерный каркас полученный методом аэродинамического формования имеет сложную пространственную организацию, в которой жгуты формирующие каркас сформированы микроволокнами средний диаметр которых увеличивается с  $0,5 \pm 0,2$  до  $2,8 \pm 1,44$  мкм при увеличении концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ в прядильном растворе с 3 до 9 масс %.

2. Установлено, что содержание электрически активных кристаллических фаз выше в полимерных каркасах, изготовленных методом электроформования, что обусловлено воздействием электрического поля на прядильный раствор в процессе формования каркаса.

3. Установлено, что при сопоставимых показателях среднего диаметра волокон формирующих полимерный каркас, каркасы полученный методом электроформования характеризуются прочностью при растяжении более чем в 7,5 выше, полимерных каркасах сформированных раз чем В методом аэродинамического формования, что вероятно обусловлено большим содержанием сегнетоэлектрических кристаллических фаз и большей плотностью упаковки волокон.

4. Установлено, что адгезия мезенхимальных стволовых и эндотелиальных клеток к полимерным каркасам сформированных методом аэродинамического формования более чем на 200 и 120 % выше, чем к каркасам, сформированным методом электроформования, при высоких показателях жизнеспособности клеток (более 96 %) культивируемых на обоих типах каркасах.

5. Полимерные каркасы на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ, изготовленные методом аэродинамического формования, не вызывают местных отрицательных

92

тканевых реакций при имплантации в жировую и мышечную ткань, демонстрируя высокую способность к интеграции с тканями организма хозяина.

6. Высокая биологическая совместимость полимерных каркасов на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ, изготовленных методом аэродинамического формования, позволяет использовать разработанные полимерные каркасы в качестве носителя клеток (скаффолда) и имплантационного материала в биомедицинских исследованиях, направленных на разработку новых методов и методик реконструктивно-восстановительной хирургии.

# Глава 4. Исследование структуры и свойств композиционных покрытий на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ и гидроксиапатита

## 4.1. Формирование композиционных покрытий на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ и гидроксиапатита

Формирование композиционных покрытий для интрамедуллярных имплантатов осуществляли с использованием установки аэродинамического формования (рисунок 3.1). В качестве подложки использовались пластины из нержавеющей стали марки 12Х18Н9Т размером 20×40×2 мм. Для увеличения адгезии перед нанесением композитных покрытий поверхность пластин обдували корундовым песком для придания шероховатости, затем последовательно промывали в трихлорметане (CHCl<sub>3</sub>) и этиловом спирте (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) для удаления загрязнений. Для исследования влияние массового содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ на структуру и свойства композиционных каркасов использовали 6 масс % раствор сополимера в смеси органических растворителей следующего состава: ацетон ( $C_3H_6O$ ) (Экос-1, Россия) 20 масс %, этилацетат ( $C_4H_8O_2$ ) (Экос-1, Россия) 80 масс %. Приготовление раствора сополимера ВДФ-ТеФЭ проводили в герметичном реакторе при комнатной температуре и постоянном перемешивании получения однородного прозрачного раствора. Затем в ДО стеклянную герметичную емкость помешали порошок гидроксиапатита и этилацетат в соотношение 50/50 масс %, с помощью ультразвуковой установки (Сапфир 5М, Россия) в течение 8 часов приводили диспергирование порошка гидроксиапатита в этилацетате. К полученной дисперсии добавляли раствор сополимера ВДФ-ТеФЭ таким образом, чтобы содержание сополимера ВДФ-ТеФЭ в композитном материале составляло: 50 масс %, 35 масс %, 25 масс %. Блок-схема формирования композиционных покрытий методом аэродинамического формования представлена на рисунке 4.1.



Рисунок 4.1 Технологическая схема процесса формирования композиционных

покрытий

## 4.2. Исследования физико-химических свойств композиционных покрытий

## 4.2.1. Морфология и пористость покрытий

Изображения поверхности композиционных покрытий в зависимости от сополимера ВДФ-ТеФЭ, полученные содержания методом сканирующей электронной микроскопии при различных увеличениях, представлены на рисунке 4.2. При незначительных увеличениях видно, что пленка сополимера ВДФ-ТеФЭ имеет однородную гладкую поверхность (рисунок 4.2а). При значительных увеличениях (рисунок 4.2a) на поверхности наблюдаются хаотически расположенные контрастные фибриллярные структуры длинной  $1,1 \pm 0,3$  мкм и шириной 0,20 ± 0,04 мкм. Формирование подобных фибриллярных структур в неориентированных отожжённых пленках сополимера ВДФ-ТеФЭ и сополимера ВДФ-ТрФЭ, образованием областей связывают с кристаллических сегнетоэлектрической  $\beta$  фазы при высокотемпературном отжиге [170–172].

Уменьшение содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композиционном покрытии вызывает изменение структуры его поверхности. На поверхности покрытия формируется микрорельеф в виде "холмов" и "долин" со сглаженными округлыми краями. На поверхности холмов находятся частицы гидроксиапатита, вероятно, покрытые тонкой пленкой полимерного материала, которая имеет многочисленные разрывы (рисунок 4.26). Открытая пористость композитного покрытия составляет менее 8 % и вероятнее всего, обусловлена пористостью частиц гидроксиапатита.

Уменьшение содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композиционном покрытии до 35 % приводит к образованию на поверхности покрытия значительного количества макропор средним диаметром  $130 \pm 75$  мкм. На дне макропор наблюдаются микропоры средним диаметром  $3,1\pm0,8$  мкм, дно и стенки пор выстелены частицами гидроксиапатита, значительная часть которых выступает на поверхность композиционного покрытия (рисунок 4.2в). Пористость композиционного покрытия (рисунок 4.2в).

Уменьшение концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ до 25 % приводит к увеличению размера макропор в покрытии до  $153 \pm 26$  мкм, микропор до  $8,5 \pm 4,7$  мкм, пористость композиционного покрытия увеличивается до  $67 \pm 8$  %. На поверхности композитного покрытия наблюдается значительное количество частиц гидроксиапатита, слабо связанных с полимерной матрицей (рисунок 4.2г).





Рисунок 4.2 Электронно-микроскопические снимки (СЭМ) поверхности композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом: 100 % ВДФ-ТеФЭ (а); 50 % ВДФ-ТеФЭ (б); 35 % ВДФ-ТеФЭ (в); 25 % ВДФ-ТеФЭ (г).

## 4.2.2. Смачивание поверхности композиционных покрытий

Результаты исследования смачивания поверхности композиционных покрытий дистиллированной водой представлены на рисунке 4.3а. Угол смачивания водой пленки сополимера ВДФ-ТеФЭ составляет 100 ± 4°. Высокое значение угла смачивания и, как следствие, высокая гидрофобность покрытия обусловлена высокой электротрицательностью атомов фтора и является отличительной особенностью фторированных полимерных материалов [173].

Уменьшение концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ в композиционном покрытии до 50 % приводит к уменьшению краевого угла смачивания до 85 ± 3°, что обусловлено наличием на поверхности композита частиц гидроксиапатита, который по сравнению с сополимером ВДФ-ТеФЭ является значительно более гидрофильным материалом [174].



Рисунок 4.3 Краевой угол смачивания водой поверхности (а) и пористость (б) композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ.

Уменьшение концентрации сополимера ВДФ-ТеФЭ в композиционном покрытии до 35 и 25 % вызывает значительное увеличение краевого угла смачивания поверхности покрытия до  $111 \pm 2^{\circ}$  и  $138 \pm 4^{\circ}$ , соответственно. При этом увеличение краевого угла смачивания хорошо соотносится с увеличением пористости покрытия (рисунок 4.3 б). В работе [175] было показано, что пористые поверхности обладают значительно более высокими значениями краевого угла смачивания по сравнению гладкими, что обусловлено их гетерогенностью. Таким образом, значительное увеличение краевого угла смачивания композиционного покрытия при уменьшении доли гидрофобного сополимера ВДФ-ТеФЭ, вероятно, обусловлено увеличением пористости композитного покрытия.

4.2.3 Адгезионная прочность и эластичность композиционных покрытий

При исследовании адгезии композиционных покрытий к стальной подложке наблюдали когезионный характер разрушения покрытия. При этом наибольшими показателями прочности, относительного удлинения и эластичности (Таблица 4.1) обладают композиционные покрытия с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 50 масс %. С увеличением содержания гидроксиапатита показатели когезионной прочности и относительного удлинения существенно уменьшаются, что связано, с одной стороны, с ростом пористости покрытия, с другой, – с ухудшением связи между частицами гидроксиапатита при уменьшении содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композиционном покрытии.

Таблица 4.1. Механические свойства композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ.

Содержание	Адгезионная	Деформация при	Эластичность, мм
сополимера ВДФ-	прочность, МПа	растяжении, %	
ТеФЭ, масс %			
100	$4,2 \pm 1,8$	$3,6 \pm 2,4$	1
50	$21,2 \pm 3,6$	35,3 ± 5,6	2
35	$15,4 \pm 1,8$	$16,3 \pm 4,5$	3
25	$9,9 \pm 2,4$	$5,9 \pm 1,2$	5

Низкие показатели прочности и относительного удлинения у пленки сополимера ВДФ-ТеФЭ связаны с малыми значениями поверхностной энергией и шероховатости, что существенно затрудняет образование адгезионных связей между эпоксидным клеем и фторированной поверхностью.

## 4.2.4. Химический состав и конформационная структура сополимера ВДФ-ТеФЭ в композиционных покрытиях

Инфракрасные спектры образцов композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ представлены на рисунке 4.4.

В спектре пленки сополимера ВДФ-ТеФЭ можно выделить несколько полос характерных для конформаций макромолекул, обладающих поглощения, сегнетоэлектрическими свойствами: 840 см<sup>-1</sup>, 880 см<sup>-1</sup>, 1328 см<sup>-1</sup>, (*TTT* – конформация полимерной цепи), 822 см<sup>-1</sup> ( $T_3GT_3G^-$  – конформация полимерной цепи) [97,159]. Кроме этого в спектре присутствуют полосы в области 617 см<sup>-1</sup> и 925 см<sup>-1</sup>, характерные для *TGTG* конформации с параэлектрическими свойствами [97,176]. Таким образом, в исходной полимерной пленке присутствуют полимерные цепи во всех трех конформационных формах, однако наличие интенсивной полосы поглощения в области 840 см<sup>-1</sup>, характерной для фрагментов молекулы с длинными транс-последовательностями, позволяет сделать вывод о что преимущественной конформацией в пленке является наиболее том. электрически активная ТТТ конформация.



Рисунок 4.4. Инфракрасные спектры композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ.

В спектре порошка гидроксиапатита наблюдаются следующие основные полосы: 563 см<sup>-1</sup>, 600 см<sup>-1</sup> ( $v_4 PO^{3-}_4$ ), 963 см<sup>-1</sup> ( $v_1 PO^{3-}_4$ ), 1090 см<sup>-1</sup> ( $v_3 PO^{3-}_4$ ), 1026 ( $PO^{3-}_4$ ) [69]. Слабая полоса в области 875 см<sup>-1</sup> характерна для группы ( $HPO^{2-}_4$ ). Отмечаются незначительные, но вполне различимые полосы в области 1412 см<sup>-1</sup>, 1456 см<sup>-1</sup>, характерные для валентных колебаний в группе  $CO_3$  [70, 71], что позволяет характеризовать используемый биологически активный наполнитель, как карбонат замещенный гидроксиапатит.

Уменьшение содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композиционном покрытии приводит к появлению в спектре полос поглощения в области 560 см<sup>-1</sup>, 600 см<sup>-1</sup> ( $v_4$ PO<sup>3-</sup><sub>4</sub>), 630 см<sup>-1</sup> (OH<sup>-</sup>), широкого плеча в области 1024 см<sup>-1</sup> (PO<sup>3-</sup><sub>4</sub>) и полосы в области 1090 см<sup>-1</sup> ( $v_3$ PO<sup>3-</sup><sub>4</sub>), 963 см<sup>-1</sup> ( $v_1$ PO<sup>3-</sup><sub>4</sub>) [177,178]. При этом отсутствие новых полос поглощения, а так же отсутствие сдвигов полос поглощения в области 1058 см<sup>-1</sup>, 1156 см<sup>-1</sup>, 1395 см<sup>-1</sup> и 1430 см<sup>-1</sup>, характерных для сополимера ВДФ-ТеФЭ, позволяет сделать вывод об отсутствии значительных изменений химической структуры сополимера ВДФ-ТеФЭ в процессе формирования композитного покрытия.

## 4.2.5. Кристаллическая структура композиционных покрытий

Рентгенограммы образцов композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ представлены на рисунке 4.4.

На рентгенограмме пленки, изготовленной из раствора сополимера ВДФ-ТеФЭ, наблюдается интенсивный рефлекс в области 19,4°, соответствующий кристаллографическим плоскостям (110,200) сегнетоэлектрической  $\beta$  фазы [179]. На рентгенограмме порошка гидроксиапатита отмечается ряд интенсивных рефлексов: 26,0° (002), 31,7° (211), 32,1° (112), 32,9° (300), 34,2° (202), 39,9° (310), 46,8° (222) и 49,6° (213), а так же ряд слабых пиков 21,8° (200), 23,0° (111), 28,2° (210), 35,6° (301), 39,3° (212), 42,1° (311), 43,9° (113), 45,6° (203), 50,7° (321), 51,4° (410), которые соответствуют гидроксиапатиту в высоко кристаллическом состояние (Ca<sub>10</sub>(PO4)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>).



Рисунок 4.5. Рентгенограммы композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в диапазоне 2*θ*: а – 15÷50, б – 17÷21.

Уменьшение содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композиционном покрытии приводит к сдвигу рефлекса сегнетоэлектрической  $\beta$  фазы в область более низких значений углов  $2\theta$ , что свидетельствует об уменьшении плотности упаковки кристаллической решётки в направление осей *a* и *b* [180]. Отмечается увеличение полуширины рефлекса в области 19,4° (Рисунок 4.56), что свидетельствует об уменьшении размеров полимерных кристаллитов (*l*) сегнетоэлектрической  $\beta$  фазы в плоскости (110) (Таблица 4.2).

Таблица 4.2. Размер кристаллита сегнетоэлектрической β фазы в плоскости (110) композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ

Содержание				
сополимера ВДФ-	100	50	35	25
ТеФЭ, масс %				
<i>l</i> <sub>110</sub> , нм	$13,4 \pm 0,5$	$12,2 \pm 0,3$	$10,9 \pm 0,2$	9,8±0,3

С уменьшением содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ увеличивается интенсивность гало в области  $18^{\circ}$ , что свидетельствует об увеличении содержания параэлектрической  $\alpha$ -фазы. Таким образом, результаты исследований композиционных покрытий с различным содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ свидетельствуют о том, что с увеличением содержания гидроксиапатита затрудняется кристаллизация сополимера ВДФ-ТеФЭ в сегнетоэлектрической  $\beta$  фазе, но, тем не менее, эта кристаллическая форма остается преимущественной.

Таблица 4.3 Размер кристаллитов гидроксиапатита в композиционных покрытиях в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ

Содержание	Кристаллографическая плоскость				
сополимера ВДФ-	31,7° (211) 32,1° (112) 32,9° (300)				
ТеФЭ, масс %	Размер кристаллита, нм				
0	58,8 ± 3,2	62,4±2,2	62,3±2,7		
50	$60,2 \pm 2,8$	61,1±2,7	$63,\!4\pm 2,\!4$		
35	$59,8 \pm 2,9$	61,2±3,1	$63,\!6\pm 2,\!8$		
25	59,4± 3,9	61,3±2,9	$62,8 \pm 2,2$		

С уменьшением содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ на рентгенограммах композиционных покрытий не отмечается сдвигов рефлексов гидроксиапатита, а так же достоверных изменений размеров кристаллитов (таблица 4.3) по наиболее интенсивным рефлексам. Это свидетельствует о сохранении параметров кристаллической решётки гидроксиапатита в процессе формирования композитного покрытия вне зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в нем.

### 4.2.6. Темплофизические свойства композиционных покрытий

Термограммы композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ, полученные методом дифференциальной сканирующей калориметрии, представлены на рисунке 4.6.

На термограмме пленки, изготовленной из раствора сополимера ВДФ-ТеФЭ, можно отметить два перекрывающихся интенсивных эндотермических 134°C, районе второй районе 144°C. эффекта: первый В В Первый эндотермический эффект соответствует переходу Кюри в сополимере ВДФ-ТеФЭ, второй эффект соответствует плавлению. Такая термограмма характерна для образцов сополимера ВДФ-ТеФЭ с высоким содержанием сегнетоэлектрической β фазы [163].

На термограмме порошка гидроксиапатита и композиционных покрытий наблюдается слабый эндотермический эффект в районе 116 °C, обусловленный удалением слабосвязанной воды. Уменьшение содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композитном покрытии приводит к появлению на термограмме эффекта в районе 116 °C и смешению эндотермического эффекта, соответствующего переходу Кюри в область низких температур, что свидетельствует о нарушении в кристаллической структуры сегнетоэлектрической β фазы.



Рисунок 4.5. Термограммы композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ.

Это подтверждается уменьшенме теплоты плавления композиционных покрытий по сравнению с расчетными значениями (Таблица 4.4).

кристаллической Изменения ВДФ-ТеФЭ, В структуре сополимера наблюдаемые при уменьшении его содержания в композитном покрытии, можно объяснить следующим образом. Известно, что процесс взаимодействия полимерных цепей с поверхностью наполнителя приводит к уменьшению их подвижности в результате абсорбции полимера на поверхности наполнителя. В результате изменяется кинетика кристаллизации полимера и эффективность образования зародышей. С уменьшением содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ увеличивается количество центров кристаллизации, ЧТО сопровождается увеличением скорости кристаллизации и уменьшением размеров формируемых кристаллитов в результате конкурентного процесса их образования.

Таблица 4.4 Степень кристалличности композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ.

	Измеренная	Расчетная	Изменение
Содержание	теплота	теплота	степени
сополимера	плавления	плавления	кристалличности
ВДФ-ТеФЭ, масс	композитного	композитного	по сравнению с
%	покрытия $arDelta H_{\mathit{fm}}$ ,	покрытия $\varDelta H_{ft}$ ,	расчетным
	Дж/грамм	Дж/грамм	значением $\varDelta X_c$
100	$31,3 \pm 0,8$	$31,3 \pm 0,8$	1
50	$10,1 \pm 0,5$	$15,8\pm0,8$	0,64
35	6,0 ± 0,3	$10,9 \pm 0,8$	0,55
25	$4,5 \pm 0,3$	$7,3 \pm 0,8$	0,62

С другой стороны известно, что введение наполнителя увеличивает вязкость расплавов кристаллизующихся полимеров и, как следствие, препятствует протеканию процесса кристаллизации. Уменьшение степени кристалличности при

увеличении содержания неорганических наполнителей во фторуглеродных полимерных матрицах отмечено и авторами работ [181–183].

## 4.3. Исследования биологических свойств композиционных покрытий

## 4.3.1 Исследования жизнеспособности и эффективности адгезии клеток к композиционным покрытиям

Изображения флуоресцентно меченых стволовых клеток на поверхности композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ представлены на рисунке 4.7. Пленка сополимера ВДФ-ТеФЭ обладает низкой способностью к адгезии клеток (рисунок 4.7а), поскольку обладает низкой высокой гидрофобностью пористостью И поверхности. Известно, что поверхности, обладающие такие свойствами, затрудняют прикрепление клеток [171]. Низкие показатели клеточной адгезии к неполяризованным образцам ПВДФ наблюдали в работе [92]. При содержании сополимера ВДФ-ТеФЭ в композитном покрытий 50 % количество адгезированных клеток на поверхности покрытия более чем 5 раз выше (рисунок 4.76), чем на поверхности пленки сополимера ВДФ-ТеФЭ (таблица 4.5), это связано с увеличением гидрофильности и шероховатости композитного покрытия.

Таблица 4.5 Количество адгезированных стволовых клеток на поверхности композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ.

Ofmanau	Содержание сополимера ВДФ-ТеФЭ, масс %			
Ооразец	100%	50 %	35 %	25 %
Количество				
адгезированных	$59\pm7$	$337 \pm 30*$	$290 \pm 20*$	$318 \pm 26*$
клеток, шт./мм <sup>2</sup>				

\* p < 0,05 отличия от группы ВДФ-ТеФЭ 100%

Образование клеточных агломератов на поверхности композитного покрытия с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 50 %, вероятно, связано с наличием зон, в которых частицы гидроксиаппатита выходят на поверхность композитного покрытия (рисунок 4.7 б), что создает благоприятные условия для прикрепления клеток.



Рисунок 4.7. Флюорисцентная микроскопия ММСК на поверхности композиционных покрытий в зависимости от содержания сополимера ВДФ-

ТеФЭ: а − 100 %, б − 50 %, в − 35 %, г − 25 %.

Уменьшение содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ до 35 и 25 масс %, достоверному соответственно, не приводит к увеличению количества клеток (Таблица 4.5). Однако уменьшение адгезированных содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ приводит к изменению структуры адгезии клеток на поверхности композитного покрытия (рисунок 4.7 В г). Клетки \_ преимущественно адгезируются вокруг пор покрытия, не проникая в них, что связано с высокой гидрофобностью поверхности. Высокая гидрофобность поверхности композитного покрытия затрудняет проникновения жидкости в поры и, как следствие, клеточное заселение внутренних поровых пространств затрудняется.

Результаты исследования жизнеспособности адгезрованных клеток при их совместном культивировании с композиционными покрытиями с различным
содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ, проведённого методом проточной цитометрии, продемонстрировали высокие показатели биологической совместимости покрытий (Таблица 4.6).

Таблица 4.6. Показатели жизнеспособности мультипотентных стволовых клеток, культивируемых на поверхности композиционных покрытий, в зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ.

Показатели	Содержание сополимера ВДФ-ТеФЭ, масс %					
жизнеспособности	100%	50 %	35 %	25 %		
Живые клетки, %,	91,4±0,8	90,8±1,4	90,9±1,7	91,5±2,0		
Некроз, %	3,7 ±0,7	4,7±0,7	3,5±0,6	3,3±1,0		
Апоптоз, %	2,0 ±0,4	2,2±0,1	3,1±0,4	2,8±0,1		

Анализ результатов жизнеспособности клеток, культивируемых на покрытиях из чистого сополимера ВДФ-ТеФЭ и опытных образцах покрытий с различным его содержанием, не выявил достоверных различий в количестве живых, погибших клеток и клеток в состояние апоптоза.

Таким образом, сополимер ВДФ-ТеФЭ и его композиты с гидроксиапатитом продемонстрировали отсутствие цитотоксичности при краткосрочном культивировании мультипотентных стволовых клеток.

## 4.3.2. Исследования способности покрытий продуцировать костную ткань в тесте эктопического костеобразования

Визуальный осмотр места имплантации композиционных покрытий не выявил признаков воспаления, гиперчувствительности и иных отрицательных тканевых реакций на имплантаты во всех исследуемых группах. Покрытия были окружены тонкой стромальной капсулой, которая имела незначительное сцепление с каркасом и легко удалялась. На поверхности всех исследуемых образцов отмечалось формирование тканевых пластинок (16 из 16 образцов). Морфометрически площадь тканевых пластинок увеличивалась до 123–206 % по сравнению с начальными значениями (Таблица 4.7), что свидетельствует об адгезии костного мозга и его продвижении по поверхности покрытий.

Гистологический анализ тканевых пластинок на поверхности чистого сополимера ВДФ-ТеФЭ показывает, что сформированные тканевые пластинки состоят из соединительной и жировой ткани (Таблица 4.7) (рисунок 4.8 а – б). При этом на поверхности композиционных каркасов (Таблица 4.7, рисунок 4.8 в – з) в 10 из 12 случаев (83 %) наблюдалось формирование костной ткани, содержащей костный мозг.

Таким образом, тестируемые образцы способствовали адгезии и продвижению клеток по поверхности каркасов (гистологической кондукции) в условиях постоянной циклической биомеханической нагрузки, вызванной движением мышц и кожи лабораторных животных.

Поскольку исходные значения площади костного мозга статистически не различались, то площадь сформированной тканевой пластинки и тип сформированной ткани на поверхности покрытий обусловлен его физикохимическими характеристиками.

Известно, что гистологическая кондукция является важным, но недостаточным условием эктопического костеобразования. Решающую роль в процессе костеобразования играют физико-химические свойства имплантата, такие как наличие фосфатов кальция и топология поверхности имплантата [184,185]. Таким образом, формирование жировой и соединительной ткани на поверхности чистого сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом обусловлено его низкой шероховатостью, затрудняющей адгезию клеток, и отсутствием фосфатов кальция, необходимых для дифференцировки клеток в остеогенном направлении.

На поверхности композиционных покрытий с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 50 % в 75 % (3 из 4 случаев) происходит рост кости и костного мозга (рисунок 4.8 в – г). Одна тканевая пластинка с васкуляризированной рыхлой

неоформленной соединительной тканью на поверхности покрытия была расценена как неуспех имплантации (рисунок 4.8. г).

Таблица 4.7 Влияние массового содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композитном покрытии на геометрические и гистологические характеристики тканей, формирующихся из костного мозга в тесте эктопического остеогенеза.

Содержание сополимера ВДФ- ТеФЭ, масс %	Площадь костного мозга до имплантации, мм <sup>2</sup>	Площадь сформированной тканевой пластинки после имплантации, % от начального значения.	Тканевый состав сформированной пластинки
100 %	6,9 ± 1,0	$133\pm109$	Соединительная (рисунок 4.7 а) и жировая ткань (рисунок 4.7 б)
50 %	6,2 ± 1,2	206 ± 142	Кость с костным мозгом в 75 % случаев (рисунок 4.7 в), соединительная ткань в 25 % случаях(рисунок 4.7 г)
35 %	4,8 ± 1,6	$162 \pm 124$	Кость с костным мозгом в 100 % случаев (рисунок 4.7 д-е)
25 %	6,1 ± 1,5	123 ± 102	Кость с костным мозгом (рисунок 4.7 ж) в 75 % случаев, тонкая костная пластинка с соединительной тканью 25 % случаях (рисунок 4.7 3)

Тканевые пластинки на поверхности композиционных покрытий с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 % сформированы костной тканью и костным мозгом (рисунок 4.8 д – е). Композиционные покрытия с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 25 % продемонстрировали врастание костной ткани в пористую структуру композитного покрытия (рисунок 4.8 ж). Вероятно, врастание костной ткани внутрь пористой структуры композита приводит к формированию на поверхности покрытия тканевой пластинки малой площади (Таблица 4.7). На некоторых образцах этой группы костные пластинки с костным мозгом были покрыты толстым слоем (20-40 мкм) фиброзной соединительной ткани (рисунок 4.93). Это говорит в пользу формирования костной ткани путем прямого и непрямого остеогенеза.

Известно, что кроветворные и сосудистые компоненты в составе эктопической ткани возникают из клеток организма-хозяина, другие компоненты, включая кость и хрящ, развиваются из клеток донора. Развитие кости через стадию хряща (эндохондральная оссификация) необходимо для моделирования кроветворной ткани из кроветворных стволовых клеток реципиента.













Рисунок 4.7. Гистологические срезы тканевых пластинок, сформированных на композиционных каркасах с различным содержанием сополимера

ВДФ-ТеФЭ: a, б – 100 %, в, г – 50 %, д ,e – 35 %, ж, з – 25 %

Другой путь формирования кости возможен без костного мозга через оссификацию соединительной ткани стромальными стволовыми клетками донора, минуя стадию хряща [186].

Образцы композиционных покрытий с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 % способствовали формированию костной ткани, содержащей лакуны, заполненные кроветворными клетками, что предполагает непрямой путь эндохондральной оссификации. Для двух других групп композиционных покрытий наблюдалось, как эндохондральное (75 %), так и прямое окостенение. В то же время, на композиционных покрытиях с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 50 % в одном случае отмечено отсутствие кости, что, вероятно, связано с недостаточным содержанием гидроксиапатита. Таким образом, подтверждена биосовместимость сополимера ВДФ-ТеФЭ высокая И установлено что оптимальным сочетанием физико-химических и медико-биологических свойств для применения в качестве биологически активного покрытия эластичного

интрамедуллярного имплантата, обладают композиционные покрытия с содержание сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 и ГА 65 масс %.

#### 4.4. Практическое применение композиционных покрытий

Отсутсвие токсичности и высокая способность продуцировать костную ткань разработанных композиционных покрытий на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ и ГА позволили использовать разработанные композиционные покрытия в биомедицинских экспериментах в качестве тест – систем, при исследованиях развития остеоиндуктивных и/или воспалительных (остеолитических) процессов в организме в ответ на имплантацию искусственных материалов, с учетом особенностей организма. Применение индивидуальных композиционных покрытий существенно расширяет линейку искусственных материалов для тестирования, материалами, обладающими пьезоэлектрическими свойствами, что позволяет получать новые экспериментальные данные об особенностях взаимодействия костной ткани с электрически активными искусственными структурами (приложение 12).

#### 4.5. Выводы по главе 4

- Установлено, что уменьшение содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композитном каркасе с 100 до 25 % приводит к увеличению пористости с 3,2 ± 1,3 до 67 ± 8 %, краевого угла смачивания поверхности каркаса водой с 100 ± 4° до 138 ± 4°, при уменьшается значения показателей эластичности с 1 до 3 мм адгезионной прочности каркасов к стальной подложке с 21,2 ± 3,6 до 9,9 ± 2,4 МПа.
- Установлено что уменьшение содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ в композитном каркасе затрудняет его кристаллизацию в электрически активных кристаллических модификациях.
- Установлено, что вне зависимости от содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ композиционные каркасы способствуют высокой выживаемости МСК при

краткосрочном культивировании, при этом уменьшение содержания сополимера в ВДФ-ТеФЭ с 100 до 25 % увеличивает значение показателя адгезии МСК с  $59 \pm 7$  до  $318 \pm 26$  шт./мм<sup>2</sup>.

- 4. Установлено, отсутсвие местных отрицательных тканевых реакций при имплантации композиционных каркасов вне зависимости содержания сополимера в ВДФ-ТеФЭ, при этом уменьшение содержания сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 масс.% приводит формированию на поверхности каркаса зрелой костной ткани в тесте эктопического костеобразования.
- 5. Установлено, что оптимальным сочетанием физико-химических и медикобиологических свойств для применения в качестве биологически активного покрытия для эластичного интраммедуллярного имплантанта, обладают каркасы с содержание сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 и ГА 65 масс %.
- 6. Показана, возможность практического применения композиционных каркасов в качестве качестве тест систем, при исследованиях развития остеоиндуктивных и/или воспалительных (остеолитических) процессов в организме в ответ на имплантацию искусственных материалов, с учетом индивидуальных особенностей организма.

Глава 5. Сравнительные экспериментальные исследования эластичных интрамедуллярных имплантатов

## 5.1. Формирование покрытий на поверхности эластичных интрамедуллярных имплантатов

Для проведения исследований использовали три типа имплантатов. Первый тип – стальные имплантаты без покрытия. Второй тип – титановые имплантаты с покрытием, изготовленные методом МДО. Третий тип – имплантаты с покрытием на основе композиционного каркаса с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 масс %.

Формирование кальций фосфатного покрытия на поверхности титановых FIN осуществлялось методом микро дугового оксидирования с использованием импульсного тока положительной полярности импульсами прямоугольной формы, частотой 50,0 Гц длительностью 10мс. в условиях искрового разряда. Формирование покрытий осуществляли в условиях постоянного перемешивания электролита при температуре  $25 \pm 5^{\circ}$ C со скоростью подъёма амплитуды напряжения импульса 3 Вольт/сек до значения 200 В, выдержка при напряжении 200 В в течении 30 минут. Для формирования покрытий использовали электролит на основе ортофосфорной кислоты (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (Ekros, Russia) плотностью ( $\rho = 1,0550$  г/мл) в который добавляли порошок окиси кальция (CaO) (Ekros, Russia) до пересыщенного состояния и порошок ГА (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> в количестве 10 г/л.

Имплантаты с композиционным покрытием были изготовлены в соответствие с патентом РФ на полезную модель № 107473 "Спица для остеосинтеза с биоактивным покрытием" (приложение 13) Имплантат (рисунок 5.1) представлял собой цилиндрический стержень, состоящий из режущей (1), средней – рабочей (2) и хвостовой (3) частей (рисунок 5.1). Средняя рабочая часть, предназначенная для соприкосновения с тканями организма, выполнена меньшим диаметром, чем диаметр хвостовой и режущей части. На среднюю рабочую часть стержня нанесено биоактивное покрытие (как это описано в

разделе 4.1 настоящей работы) толщиной, обеспечивающей равенство диаметров средней рабочей, хвостовой и режущей частей. Конец режущей части выполнен в виде перового сверла (5). Хвостовая часть служит для закрепления в патроне ортопедической дрели.



Рисунок 5.1 Конструкция эластичного интрамедуллярного имплантата с композиционным биологически активным покрытием

При вхождении в костную ткань перовое сверло режущей части создает в кости канал. По мере углубления канала, в процессе сверления, в костную ткань заходит рабочая часть с нанесенным на неё биоактивным покрытием (4). За счет того, что диаметр рабочей части с биоактивным покрытием равен диаметру канала, образованного в костной ткани режущей частью спицы, существенно сокращается воздействие на биоактивное покрытие спицы механических, термических, и прочих факторов, вызывающих разрушение биоактивного покрытия. При этом толщина этого покрытия на рабочей части 2 спицы сохраняется. Таким образом, конструкция эластичного интрамедуллярного имплантата позволяет минимизировать воздействие на композитное биоактивное покрытие, что сохраняет его характеристики в области рабочей части.

#### 5.2. Сравнительные исследования физико-химических свойств

#### 5.2.1. Морфология поверхности эластичных интрамедуллярных

#### имплантатов

Изображения поверхности стального интрамедуллярного имплантата без покрытия, имплантата с кальций-фосфатным покрытием, сформированным методом микродугового оксидирования, и имплантата с композиционным покрытием с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 масс % (при различных увеличениях) представлены на рисунке 5.2

Поверхность стального интрамедуллярного имплантата (рисунок 5.2 а) однородная, на поверхности наблюдаются периодические структуры в виде "волн", расположенные перпендикулярно продольной оси имплантата. При значительном увеличении на поверхности наблюдаются включения средним диаметром 0,52 ± 0,12 мкм. Образование микрорельефа обусловлено воздействием обрабатывающего инструмента на поверхность в процессе вытяжки и ковки проволочной заготовки имплантата с последующей электрохимической полировкой.

Поверхность покрытия, сформированного методом микродугового оксидирования, однородная (рисунок 5.2 б), характерного серого цвета. При большем увеличении видно, что поверхность имеет развитый микрорельеф, сформированный глобулами неправильной формы средним диаметром 3,5 ± 0,7 мкм, на вершинах глобул присутствуют поры средним диаметром 1,1 ± 0,4 мкм.

Поверхность композиционного покрытия (рисунок 5.2 в) отличается сложной пространственной организацией, в которой можно выделить несколько уровней. При незначительном увеличении на поверхности видно значительное количество макропор средним диаметром 130 ± 75 мкм. На дне макропор наблюдаются микропоры средним диаметром 3,1 ± 0,8 мкм, дно и стенки которых сформированы частицами гидроксиапатита а, между которыми располагаются прослойки полимерного материала, играющего роль связующего.



Рисунок 5.2 Изображения поверхности эластичных интрамедуллярных имплантатов: а – стальной имплантат без покрытия, б – имплантат с КФ МДО покрытием, в – имплантат с композиционным покрытием с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 масс. %.

Значительная часть частиц гидроксиапатита выходят на поверхность композитного материала (рисунок 5.2 в).

## 5.2.2. Механические свойства покрытий эластичных эластичных интрамедуллярных имплантатов

Физико-механические свойства исследуемых покрытий представлены в таблице 5.1.

	Топшина	Шероховатос	Пористос	Адгезионн	Эластичнос
Тип	толщина	ТЬ	ТЬ	ал	ТЬ
имплантата	покрыти	поверхности	покрытия,	прочность	покрытия,
	я, мкм	Ra мкм	%	покрытия,	MM
			70	МПа	171171
Стальной без		0.2 + 0.1			
покрытия	-	$0,3 \pm 0,1$	-	-	-
С КФ МДО	25   5	1 4 + 0 2	16 + 2 0/	$21.1 \pm 4.2$	6
покрытием	$23 \pm 3$	$1,4 \pm 0,5$	$10 \pm 3 \%$	$21,1 \pm 4,3$	0
С					
композиционн	$180 \pm 20$	$3,8 \pm 1,3$	$26\pm6\%$	$16,8 \pm 2,2$	3
ым покрытием					

Таблица 5.1. Физико – механические свойства исследуемых покрытий.

Толщина покрытия, сформированного методом микродугового оксидирования, составила 25 ± 5 мкм, что является типичным значением для МДО покрытий [32,187]. При этом следует отметить, ограничения на дальнейший рост толщины покрытия, связанный с увеличением омического сопротивления формирующейся пленки с увеличением ее толщины. Поэтому после достижения определенной толщины процесс оксидирования практически прекращается, и дальнейшее увеличение толщины покрытия возможен при увеличении напряжения оксидирования. Однако увеличение толщины покрытий более 40 мкм приводит к

существенному снижению их физико-механических свойств, в первую очередь, адгезии и эластичности [188].

В отличие OT микродугового оксидирования, метод формирования композиционных покрытий, не накладывает ограничений на полимерных покрытий, увеличение толщины что позволяет формировать покрытия практически любой необходимой толщины.

Развитая структура поверхности композиционных покрытий обеспечивает высокие показатели значений шероховатости поверхности, что с учетом большей толщины покрытий увеличивает значение показателя пористости композиционных покрытий, измеренное методом гидростатического взвешивания.





Рисунок 5.3 Изображения эластичных интрамедуллярных имплантатов с МДО и композиционным покрытиями: а – до деформации, б – после деформации.

По сравнению с композиционными покрытиями, МДО покрытия имеют более высокую адгезию к имплантату, что, с одной стороны, обусловлено высокой

температурой их формирования (температура в дуге более 700 град), что создает благоприятные условия для образования хорошей связи между покрытием и имплантатом [189]. С другой стороны, большие значения показателя адгезионной прочности МДО покрытий могут быть объяснены их меньшей толщиной [190].

Отличия в значениях параметра эластичности покрытий обусловлены различием их структуры. Эластичность МДО покрытия в 3 раза меньше эластичности композитного ВДФ-ТеФЭ покрытия, что приводит к разрушению первого при деформациях, возникающих в ходе операции по эластичному интрамедуллярному армированию трубчатых костей (рисунок 5.3).

При формировании МДО покрытий происходит резкое охлаждение высокотемпературной плазмы микродуги водным электролитом, что приводит к образованию на поверхности имплантата керамических структур с высокими напряжениями И дефектностью, что существенно внутренними снижает эластичность покрытия.

### 5.2.3. Химический состав поверхности эластичных интрамедуллярных имплантатов

#### 5.2.3.1. Энерготрассеивающая рентгеновская спектроскопия

Энергетические спектры поверхности имплантатов, полученные методом энергодисперсионного анализа, представлены на рисунке 5.4.





Рисунок 5.4 ЭДС спектры поверхности ЭИ: а – стальной без покрытия, б – с МДО покрытием, в – с композиционным покрытием.

Состав стального имплантата без покрытия представлен железом, хромом и никелем (рисунок 5.4 а), а соотношение его элементов является характерным для нержавеющей стали (Таблица 5.2.)

Тип		Содержание элементов, атомн. %								
имплантата	С	0	F	Р	Ca	Ti	Fe	Cr	Ni	Ca/P
Стальной										
без	_	_	_	_	_	_	69,6	18,6	9,9	_
покрытия										
С КФ МДО	18.9	27.4	_	17.7	7.3	28.6	_	_	_	0.4
покрытием	10,9	_,,		1,,,	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	20,0				0,1
С композ.	37.4	14.3	20.6	10.1	18.2	_			_	1.8
покр.		,e	_ = 3,0		,					-,0

Таблица 5.2 Элементный состав поверхности имплантатов.

Химический состав МДО покрытия (рисунок 5.4 б) представлен титаном, кислородом, кальцием, фосфором и углеродом (Таблица 5.2). Значительное количество титана и кислорода в покрытии обусловлено формированием между кальций-фосфатным покрытием и металлической подложкой промежуточного слоя диоксида титана [189]. При этом сформированные покрытия являются кальций дефицитными, что типично для МДО покрытий [32,191]. Высокое

123

содержание углерода в кальций-фосфатных МДО покрытиях наблюдали и авторы работ [192,193].

Химический состав композитного покрытия (рисунок 5.4 в) с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 масс. % представлен углеродом и фтором – основными элементами полимерного связующего. Кальций, фосфор и кислород являются основными элементами биологически активного минерального наполнителя – гидроксиапатита. Отношение кальция к фосфору выше, чем в гидроксиапатите стехиометрического состава (1,67), что свойственно апатитам, полученным из биогенного сырья, и обусловлено образованием оксидов кальция в результате воздействия высоких температур при обжиге сырья.

#### 5.2.3.2. Инфракрасная спектроскопия

Инфракрасные спектры покрытий интрамедуллярных имплантатов представлены на рисунке 5.5.



Рисунок 5.5. Инфракрасные спектры: а – КФ МДО и композитного покрытия, б – спектр КФ МДО в диапазоне 500 – 650 см<sup>-1</sup>.

Полосы поглощения в спектре КФ МДО покрытия размыты (рисунок 5.4). В спектре наблюдается интенсивная широкая полоса в области 850–1250 см<sup>-1</sup>, которая принадлежит симметричным и несимметричным колебаниям фосфатной связи Р–О. В области 520 – 600 см<sup>-1</sup> (рисунок 5.5 б) наблюдается ряд полос,

соответствующих валентным деформационным колебаниям связей в фосфатной группе  $PO_4^{3-}$  [194]. Широкое плече в области 720 – 810 см<sup>-1</sup> характерно для симметричных и несимметричных валентных колебания связей в группе P–O–P [195]. Полосы в области 620–630 см<sup>-1</sup> характерны для OH<sup>-</sup> групп [178]. Плечо с центром в области 657 см<sup>-1</sup> характерно для окисла титана (TiO<sub>2</sub>) в форме рутила [195]. Отмечаются незначительные, но вполне различимые полосы в области 1412–1456 см<sup>-1</sup>, характерные для валентных колебаний в группе CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> [177].

Полосы поглощения в спектре композитного кальций-фосфатного покрытия разрешены (рисунок 5.5). В хорошо спектре композитного покрытия наблюдаются полосы поглощения, характерные для сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом в конформациях макромолекул с сегнетоэлектрическими свойствами: 840 см<sup>-1</sup>, 880 см<sup>-1</sup>, 1328 см<sup>-1</sup>, (*TTT* – конформация), 822 см<sup>-1</sup> (*T*<sub>3</sub>*GT*<sub>3</sub>*G*<sup>-</sup> - конформация) [97,159].

Наличие интенсивной полосы поглощения в области 840 см<sup>-1</sup>, характерной для фрагментов молекулы с длинными транс-последовательностями, позволяет сделать вывод о том, что преимущественной конформацией полимерных молекул является наиболее электрически активная (*TTT*) конформация [97,176]. Отмечаются интенсивные полосы в области: 520 см<sup>-1</sup>, 563 см<sup>-1</sup>, 600 см<sup>-1</sup>, 963 см<sup>-1</sup>, 1090 см<sup>-1</sup> и 1026 см<sup>-1</sup>, соответствующие валентным деформационным колебаниям связей в фосфатной группе  $PO_4^{3-}$ [196].

# 5.2.4. Кристалическая структура покрытий эластичных интрамедуллярных имплантатов

Спектры рентгеновской дифракции интрамедуллярных имплантатов представлены на рисунке 5.6.



Рисунок 5.6 Спектры рентгеновской дифракции поверхности эластичных интрамедуллярных имплантатов: а – стальной, б –с КФ МДО покрытием, в – с композиционным покрытием.

В спектре стального имплантата без покрытия (рисунок 5.6 а) присутствуют два интенсивных рефлекса в области 43,7° и 50,9°, соответствующих фазе аустенита. Незначительный рефлекс в области 44,5° соответствует фазе феррита. Наблюдаемый фазовый состав типичен для нержавеющих сталей, легированных никелем. Известно, что присутствие никеля в сплаве в количестве 8 – 10 % стабилизирует фазу аустенита [197].

Спектр титанового имплантата с МДО покрытием сильно размыт (рисунок 5.6 б). В спектре наблюдается гало в области 20 –  $33^{\circ}$ , образованное перекрывающимися друг с другом рефлексами диоксида титана (TiO<sub>2</sub>) в форме анатаза, гидроксидов титана H<sub>2</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, фосфатов кальция  $\beta$  - Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, титано фосфатов TiP<sub>2</sub>O<sub>7</sub> и кальций-титано фосфатов CaTi<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>. Образование на поверхности титана керамоподобного композита сложного химического состава с аморфной структурой при микродуговом оксидировании отмечалось в работах [31,198].

На рентгеновских спектрах композитного покрытия присутствует рефлекс в области 19,3°, соответствующий сополимеру винилиденфторида с тетрафторэтиленом [80,180], а так же рефлексы в области: 25,0°, 31,7°, 32,1°, 32,9°, 34,1°, 39,9°, 46,8° и 49,6°, которые соответствуют гидроксиапатиту в высоко кристаллическом состоянии (Ca<sub>10</sub>(PO4)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) [199].

## **5.2.5** Смачивание поверхности водой и растворение покрытий эластичных интрамедуллярных имплантатов

Результаты исследований смачивания поверхности имплантатов водой, динамики выхода ионизированного кальция в изотонический стерильный раствор хлорида натрия и pH вытяжки представлены в Таблице 5.3.

Краевой угол смачивания поверхности стального имплантата водой составил  $72 \pm 2^{\circ}$ , что является типично для полированной поверхности нержавеющей стали, используемой для изготовления имплантатов [200]. Кальций-фосфатные МДО

покрытия являются гидрофильными, что обусловлено двумя основными причинами. Во-первых, наличием значительного количества полярных гидроксильных групп, образованных в результате взаимодействия плазменной дуги, имеющей высокую температуру, с электролитом и включения продуктов разложения компонентов электролита в структуру покрытия [201]. Во-вторых, ΜЛΟ характеризуются развитой топологией поверхности покрытия на микроуровне, что способствуют растеканию капли [131].

Таблица 5.3. Смачивание поверхности имплантатов водой, динамики выхода ионизированного кальция и фосфора в изотонический стерильный раствор хлорида натрия и рН вытяжки.

Тип имплантата	Краевой угол смачивания, град.	Концентрация Ca <sup>2+</sup> , µМ/мл	рН раствора, ед.		
		$Me(Q_1-Q_3)$			
Стальной без покрытия	72 ± 2	75 (70-80)	7,14 (6,91-7,32)*		
С КФ МДО покрытием	$24 \pm 4*$	425 (225-450)*	7,20 (7,16-7,25)*		
С композиционным покрытием	111 ± 2*	130 (130-140)*	7,30 (7,30-7,30)		
Контроль растворителя	-	75 (70-80)	7,31 (7,29-7,32)		

\* p<0,05 отличия от гоуппы контроль растворителя.

Наиболее гидрофобными являются композитные покрытия, что связано с отсутствием на поверхности композитного материала достаточного количества функциональных групп. Это объясняется высокой термической стабильностью сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом в окислительной атмосфере и низкой свободной энергией поверхности, обусловленной его химическим составом [135]. При таких условиях развитая пористая поверхность композитного материала будет препятствовать растеканию капли воды [175,202].

Исследование экстрактов, полученных после 7 суток растворения, показывают, что во всех исследуемых группах значение показателя водородного показателя близко к нейтральному (Таблица 5.3).

Исследование выхода ионизированного кальция в изотонический стерильный раствор хлорида натрия при растворении исследуемых образцов в течение 7 суток показало, что наибольшей растворимостью обладают КФ МДО покрытия. Об этом свидетельствует более чем пятикратное увеличение содержание кальция в экстрактах, полученных после растворения МДО покрытий, по сравнению с экстрактом, полученным после растворения стального имплантата, и экстрактом чистого растворителя (Таблица 5.3). При этом растворение ВДФ-ТеФЭ композиционного покрытия приводило лишь к 1,7–2-кратному увеличению выхода ионизированного кальция в раствор.

Растворение композиционного покрытия не приводило к достоверному изменению водородного показателя по сравнению с экстрактом чистого растворителя, что согласуется с данными по выходу кальция и подтверждает низкую растворимость композиционных покрытий. Незначительное уменьшение значения водородного показателя для экстрактов МДО покрытий, вероятно, обусловлено экстракцией следов ортофосфорной кислоты, неизбежно присутствующих в покрытии, а так же насыщением экстракта продуктами его растворения. В случае стального имплантата изменение значения водородного показателя объясняется образованием гидроксидов железа в результате коррозии.

### **5.3.** Сравнительные исследования биологических свойств эластичных интрамедуллярных имплантантов

## 5.3.1. Исследование адгезии мультипотентных стволовых клеток к поверхности имплантантов

Изображения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток на 5.7. Ha поверхности модельных имплантатов представлены на рисунке поверхности стального имплантата (рисунок 5.7 a) клетки хорошо визуализировались, хорошо детектировались границы клеток, наблюдались единичные участки фокальной адгезии клеток к поверхности. На поверхности имплантата в среднем обнаруживалось 113 ± 47 клеток/мм<sup>2</sup>. Отмечалась низкая прочность связывания клеток с поверхностью стального модельного имплантаты, даже незначительное воздействие (перемещение имплантата для проведение окраски, и т.д.) вызывало отделение клеток от поверхности имплантата. Таким образом, по классификации, предложенной в работе [203] на поверхности стального имплантата наблюдается второй тип адгезионных взаимодействий, характеризующийся пассивной адгезией клеток с поверхностью.

На модельном имплантате с КФ МДО покрытием (рисунок 5.7 б) клетки равномерно расположены на всей поверхности, распластаны, хорошо связаны с поверхностью, Наблюдаются двуядерные клетки и умеренное количество очагов фокальной адгезии клеток к поверхности имплантата, что позволяет характеризовать культуру клеток на поверхности как активно пролиферирующую. Количество адгезированных клеток на поверхности модельного имплантата с КФ МДО покрытием достоверно не отличалось от аналогичного показателя для стального модельного имплантата и в среднем составило 117 ± 59 клеток/мм<sup>2</sup>.



Рисунок 5.7. Изображения мультипотентных стволовых клеток на поверхности модельных имплантатов: а – стальной без покрытия, б – с КФ МДО покрытием, в – с композиционным покрытием. Зеленый – цитоплазма клеток (винкулин), Синий – ядра окраска DAPI.

На поверхности модельного имплантата с композитным покрытием (рисунок 5.7 в) наблюдалось наибольшее количество адгезированных клеток 134 53 клеток/мм<sup>2</sup>  $\pm$ ядра клеток хорошо визуализировались. Клетки преимущественно расположены в порах покрытия имплантата. Высокий уровень фоновой флюоресценции OT композиционного материала В широком спектральном диапазоне, а так же развитый рельеф композиционного покрытия существенно затруднял визуализацию цитоплазмы клеток. Визуализированные клетки в основном веретенообразной формы, наблюдаются клетки, цитоплазма которых локализуются вокруг ядра. Отсутствие распластанных клеток, очагов фокальной адгезии свидетельствует в пользу того что адгезия клеток к поверхности композиционного материала осуществляется преимущественно в местах "выхода" на поверхность частиц гидроксиапатита.

Проведенные исследования показывают, что в условиях in vitro наилучшее условиями для прикрепления МСК создают модельные имплантаты с КФ МДО покрытием. На имплантатах с композиционным покрытием клетки адгезируют преимущественно в порах покрытия, соскальзывая с гребней. Стальные модельные имплантаты не обеспечивают необходимых условий для прикрепления МСК.

### **5.3.2.** Исследование остеоиндуктивных свойств имплантантов в тесте эктопического костеобразования

Визуальный осмотр места имплантации дисков с исследуемыми покрытиями в подкожный жировой карман не выявил воспалении, нагноений или дргих признаков отрицательных тканевых реакций во всех исследуемых группах. Имплантаты были окружены тонкой стромальной капсулой, которая имела незначительное сцепление с поверхностью модельного имплантата и легко удалялась. На поверхности модельных имплантатов с композиционным и КФ МАО покрытиями отмечалось наличие тканевых пластинок, на поверхности стальных модельных имплантатов тканевая пластинка отсутствовала. Отсутствие тканевой пластинки на поверхности стальных модельных имплантатов

132

объясняется низкой прочностью связывания клеток с поверхностью. Низкая адгезия клеток к поверхности приводит к соскальзыванию клеток, в результате воздействия на имплантат окружающих тканей, в период его нахождения в подкожной жировом кармане животного.



Рисунок 5.8. Гистологические срезы тканей сформированные на поверхности модельных имплантантов: а,б – на поверхности имплантанта с КФ МДО покрытием, в,г – на поверхности имплантанта с композиционным покрытием.

Гистологический анализ тканевых пластинок, сформированных на поверхности модельного имплантата с КФ МДО покрытием, продемонстрировал, что в ~80 % случаев на поверхности имплантата формировались костные лакуны, заполненные красным костным мозгом (рисунок 5.8a). В 20 % случаев на

поверхности КФ МДО покрытий наблюдалось формирование тканевой пластинки, состоящей преимущественно из соединительной ткани с мышечными волокнами и тонких костных пластинок (рисунок 5.8 б).

На поверхности композиционного покрытия в 93 % наблюдалось формирование костных лакун, заполненные красным костным мозгом, отмечалось врастание тканей в поры покрытия (рисунок 5.8 в). В 7 % случаев на поверхности композиционного покрытия наблюдалось формирование костной пластинки покрытой слоем соединительной ткани (рисунок 5.8 г).

Проведенные исследования показывают что наибольшей способностью формировать костную ткань в тесте эктопического костеобразования обладают модельные имплантанты с композиционным покрытия и КФ МДО покрытиями. Стальные имплантаты не проявили сколь-нибудь значимых остеоиндуктивных свойств.

### 5.3.3. Исследование процессов интеграции имплантантов с костной тканью

Одним из общепринятых способов оценки способности имплантантов интегрироваться с костной тканью является тест, разработанный Т. Nakamura [204,205]. Тест позволяет по значению усилий отрыва имплантата с биоактивной поверхностью от костного ложа судить о его остеоиндуктивной и остеокондуктивной способности.

Результаты исследования прочности сцепления различных типов эластичных интрамедуллярных имплантатов с костной тканью приведены в Таблице 5.4.

Наименьшие усилие отрыва демонстрируют стальные эластичные интрамедуллярные имплантаты без покрытия. Сформированный микропористый кальций-фосфатный слой на поверхности эластичного интрамедуллярного имплантата, изготовленного из титана, более чем на 130 % увеличивает прочность его сцепления с костной тканью по сравнению со стальным имплантатом без покрытия.

Тип имплантата	Напряжение		
	отрыва, МПа		
Стальной без покрытия	$356 \pm 10$		
С КФ МДО покрытием	$494\pm30$		
С композиционным покрытием	$514 \pm 10$		

Таблица 5.4 Напряжение отрыва при удалении различных типов эластичных интрамедуллярных имплантатов.

Стальные имплантаты с композиционным покрытием продемонстрировали прочность сцепления с костной тканью, сравнимую с результатами для титановых имплантатов с КФ МДО покрытием. Высокие показатели прочности сцепления имплантатов с кальций фосфатными покрытиями свидетельствует о высокой способности к интеграции с губчатой костной тканью в интрамедуллярном канале трубчатой кости. Сравнительные гистологические исследования тканей, вокруг различных типов сформированных эластичных интрамедуллярных имплантатов, подтверждают этот вывод.

Так вокруг стального интрамедуллярного имплантата без покрытия формируется слой фиброзной ткани толщиной до 2 мм, который изолирует его поверхность. Формирование костного футляра происходит на периферии фиброзного кольца и характеризуется разряженной трабекулярной сетью. Таким образом, использование стального интрамедуллярного имплантата без покрытия гистологически характеризуется слабо выраженным дистантным остеогенезом (рисунок 5.9 а).

Поскольку анатомическое размещение интрамедуллярного имплантата характеризуется оптимальными условиями кровообращения и высоким уровнем МСК, способных дифференцировке остеобласты, к В поэтому низкие свойства остеоиндуктивные эластичного интрамедуллярного стального имплантата обусловлены отсутствием на поверхности необходимых условий для прикрепления и пролиферации МСК, в частности, низкой шероховатостью,

отсутствием фосфатов кальция, а так же диффузией продуктов коррозии имплантата в окружающие ткани.

Тканевая реакция на титановые эластичные интрамедуллярные имплантаты с КФ МДО покрытием характеризуется отсутствием вокруг имплантата кольца из фиброзной ткани. Молодая костная ткань имеет плотное трабекулярное строение, срастается с эндостальной поверхностью костномозгового канала, плотно прилегает к поверхности имплантата (рисунок 5.9 б). Такая тканевая реакция свидетельствует о высоких остеоиндуктивные свойствах КФ МДО покрытий, что подтверждает ранее полученные результаты [33].



Рисунок 5.9. Гистологические срезы тканей, сформированных вокруг интрамедуллярных имплантатов: а – стальной имплантат без покрытия, б – имплантат с КФ МДО покрытием, в – имплантат с композиционным покрытием. Гистологическая картина вокруг стального интрамедуллярного имплантата с композиционным покрытием сравнима с гистологической картиной вокруг титановых имплантатов с КФ МДО покрытием. Костная муфта плотного трабекулярного строения плотно прилегает к поверхности имплантата без образования кольца из фиброзной ткани (рисунок 5.9 в), что свидетельствует о высоких остеоиндуктивных свойствах имплантата с композиционным покрытием.

### 5.3.4. Сравнительные исследования процесса удлинения трубчатой кости с использованием различных типов имплантантов

Послеоперационное наблюдение за животными не выявило миграции имплантатов относительно проксимального фрагмента большеберцовой кости, вторичного поперечного смещения костных фрагментов или угловых смещений.

Рентгенологический контроль процесса регенерации кости осуществляли в конце периода дистракции (28 дней), через 14 дней периода фиксации и через три недели после демонтажа аппарата Илизарова (Рисунки 5.10 – 5.12).

28 Ha сутки периода дистракции при использование стальных интрамедуллярных имплантатов (рисунок 5.10 б) размер поперечного сечения костных отломков достоверно не отличался от размера поперечного сечения костного регенерата. Костный регенерат характеризовался слабой плотностью и низкой продольной исчерченностью. Высота зоны формирования костного регенерата составляла 5-7 мм. В половине случаев в костном регенерате наблюдали структуры "облаковидной" формы. В непосредственной близости от остеотомии наблюдали тени периостальных структур на костных отломках, толщиной до 1 мм.

На 14 сутки периода фиксации (рисунок 5.10 в) размер поперечного сечения костного регенерата не увеличивался и по-прежнему не отличался от размера поперечного сечения костных отломков. Высота зоны формирования костного регенерата составляла 3 – 5 мм, значительная часть зоны формирования костного регенерата была перекрыта трабекулярными тенями. Структура костного

регенерата характеризовалась значительной продольной исчерченностью. На костных отломках наблюдались тени периостальных структур толщиной до 3 мм.

На 21 сутки день после снятия аппарата Г.А. Илизарова (рисунок 5.10 г) на рентгеновских снимках наблюдалось незначительное увеличение поперечного сечения регенерата по сравнению с поперечным сечением костных отломков. Зона формирования костного регенерата костного регенерата была плохо различима и сплошь пересечена трабекулярными тенями. На костных отломках наблюдались тени периостальных структур толщиной до 3 мм. Структура костного регенерата характеризовалась значительной продольной исчерченностью.



Рисунок 5.10. Экспериментальное удлинение кости со стальными интрамедуллярными имплантатами: а – день операции; б – 28 сутки периода дистракции; в – 14 сутки периода фиксации; г – 21 сутки после снятия аппарата Илизарова.

Таким образом, при удлинении конечности методом комбинированного остеосинтеза аппаратом Илизарова с использованием в качестве эластичных интрамедуллярных имплантатов двух стальных спиц, структура дистракционного

регенерата практически не отличалась от структуры дистракционного регенерата, формирующейся при использовании классического метода удлинения по Г.А. Илизарову [9].

Периодические рентгенографические наблюдения за процессом формирования костного регенерата обнаружили выраженный репаративный остегенез у животных с интрамедуллярными имплантатами с композиционным и КФ МДО покрытиями. Для предотвращения преждевременной консолидации костных отломков в период дистракции, скорость дистракции была увеличена с  $1.0 \pm 0.1$  до  $1.5 \pm 0.1$  мм/сутки с 7 по 14 сутки дистракции, а затем до 2.0 мм/сутки с 14 по 28 сутки дистракции. Высота зоны формирования костного регенерата варьировалась от 2 до 3 мм.



Рисунок 5.11. Экспериментальное удлинение кости титановым интрамедуллярными имплантатами с КФ МДО покрытием : а – день операции; б – 28 сутки периода дистракции; в –14 сутки периода фиксации; г – 21 сутки после снятия аппарата Илизарова.

К концу периода дистракции (28 сутки) при использовании имплантантов с КФ МДО покрытием структура костного регенерата имела значительную оптическую плотность, высота зоны формирования костного регенерата составляла порядка 1 мм (рисунок 5.11 б). Трабекулярные тени пересекали зону формирования костного регенерата на всем ее протяжении. На костных отломках наблюдались тени переостальных структур длинной до 7мм. Длина проекций поперечного сечения костного регенерата была на 4 – 5 мм больше по сравнению с длиной проекций поперечного сечения костных отломков.

На 14 сутки периода фиксации отмечалась полная консолидация костных отломков в зоне формирования костного регенерата (рисунок 5.11 в), структура костного регенерата имела высокую оптическую плотность. На костных отломках наблюдались тени переостальных структур длинной от 5 до 7мм. Длина проекций поперечного сечения костного регенерата была на 5 – 7 мм больше по сравнению с длиной проекций поперечного сечения костных отломков.

На 21 сутки после снятия аппарата Илизарова (рисунок 5.11 г), наблюдалось однородная структура костного регенерата значительной оптической плотности. Отмечалось увеличение толщины кортикального слоя кости на 1-2 мм, при этом длина проекций поперечного сечения костного регенерата была на 6 – 8 мм больше по сравнению с длиной проекций поперечного сечения костных отломков.

Костный регенерат формирующейся при использовании имплантантов с композиционным покрытием, на 28 сутки периода дистракции (рисунок 5.12 б) по сравнению с костным регенератом в формирующимся при использовании стальных интрамедуллярных имплантантов, характеризовался повышенной оптической плотностью. На костных отломках наблюдались тени периостальных структур длинной до 3 мм. Длина проекций поперечного сечения костного регенерата была на 1,5 – 2 мм больше длины проекций поперечного сечения костных отломков, при этом зона формирования костного регенерата была полностью пересечена трабекулярными тенями.

140



Рисунок 5.12. Экспериментальное удлинение кости стальными интрамедуллярными имплантатами с композиционным покрытием : а – день операции; б – 28 сутки периода дистракции; в –14 сутки периода фиксации; г – 21 сутки после снятия аппарата Илизарова.

На 14 сутки периода фиксации (рисунок 5.12 в) наблюдалось уменьшение высоты зоны формирования костного регенерата до 1 – 2 мм. Перекрытие зоны формирования костного регенерата трабекулярными тенями на всем ее протяжение. Увеличение длинны теней переостальных структур на костных отломках до 3 – 4 мм. Отмечалось увеличение оптической плотности зоны костного регенерата и завершение формирование однородной структуры регенерата.

На 21 сутки после снятия аппарата Илизарова (рисунок 5.12 г) наблюдается формирование полноценного однородного костного регенерата, о чем свидетельствует отсутствие зоны формирования костного регенерата с низкой оптической плотностью. Сплошное пересечение зоны костного регенерата трабекулярными тенями. Наблюдалось увеличение толщины кортикального слоя на 0,5 - 1 мм, а так же увеличение длина проекций поперечного сечения костного

141

регенерата на 2 – 3 мм по сравнению с длиной проекций поперечного сечения костных отломков.

Проведенные исследования показывают, что во всех исследуемых группах консолидация костных отломков наступала к 14 суткам периода фиксации. В этот период характерная зональность костного дистракционного регенерата была утрачена у всех животных. С учетом положительной динамики регенерации костной ткани аппарат внешней фиксации был демонтирован. После демонтажа аппарата Илизарова мы не отметили не одного случая деформаций или перелома костного регенерата у животных во всех исследуемых группах.

Наличие биоактивного слоя сформированного на поверхности интрамедуллярного имплантата значительно активизировало формирование дистракционного костного регенерата, о чем свидетельствовала формирование костномозговой полости, повышенная оптическая плотность костного регенерата, выраженная переостальная реакция на всем протяжении костных отломков и увеличение длины проекций поперечного сечения костного регенерата по сравнению с длиной проекций поперечного сечения костных отломков.

#### 5.4 Анализ полученных результатов

Поскольку взаимодействие имплантата с тканями происходит на его поверхности, поэтому такие свойства поверхности, как смачивание водой, морфология, химический состав, кристаллическая структура, растворимость и т.д., во многом, определяют поляризацию клеток, изменение их морфологии, пространственную ориентация компонентов цитоскелета, организацию внутриклеточного транспорта [206]. Таким образом, тканевая реакция на имплантат определяется совокупностью его физико-химических свойств [207].

Известно, что развитая структура поверхности покрытий стимулирует прикрепление остеобластов, дифференцировку МСК в остеобласты в системе *in vitro*, образование костной ткани в системах *in vivo* [24]. Исследования влияния шероховатости поверхности на остеоинтеграцию дентальных титановых имплантатов показали, что оптимальное значение параметра *Ra* находится в интервале 1 – 2 мкм [208]. Вероятно, оптимальное значение параметра шероховатости (таблица 5.1) кальций-фосфатных МДО покрытий способствует процессу остеоинтеграции имплантата. При этом микропористая структура покрытий, напоминающая структуру молодой ректикулофиброзной костной ткани, стимулирует адгезию МСК на поверхности имплантата [21].

Проведенные исследования КФ МДО покрытий показывают, что они сформированы аморфными кальций титанофосфатами, имеющими высокую растворимость в модельных биологических жидкостях. Высокая способность к растворению этих покрытий приводит к появлению высокой концентрации кальция в месте имплантации. Известно, что на клеточной мембране МСК экспрессируются Ca<sup>2+</sup> чувствительные рецепторы, которые регулируют их хоминг и дифференцировочный потенциал. Таким образом, достаточное количество кальция в месте имплантации является стимулирующим фактором для запуска процесса дифференцировки клеток в остеобласты и образования новой костной [209]. Следовательно, способность КФ ткани высокая ΜДΟ покрытий продуцировать костную ткань определяется их высокой растворимостью. При этом отсутствие токсичных продуктов коррозии имплантата стимулируют этот процесс.

Смачивание поверхности имплантата водой является интегральным показателем, который определяется химическим составом поверхности, наличием на ней функциональных групп, топологией [167], и во многом определяет процесс остеоинтеграции имплантата [106]. Поверхность аморфных КФ МДО покрытий характеризуется высокой поверхностной концентрацией функциональных групп, образованных в результате воздействия высокой температуры в плазменном канале, что обеспечивает ее высокую гидрофильность. На сегодняшней день можно считать доказанной связь между гидрофильностью поверхности и ее способностью к остеоинтеграции [131]. Считается, что лучшей способностью к остеоинтеграции обладают гидрофильные поверхности, поскольку обеспечивают лучшие условия взаимодействия имплантата с биологическими жидкостями, клеточными элементами, имеющие особое значение на ранних этапах остеоинтеграции [210]. Таким образом, высокая способность к интеграции КФ МДО имплантатов обусловлена, в том числе, и гидрофильностью их поверхности.

Проведенные исследования показывают, что значения параметров основных физико-химических характеристик композитного покрытия, во многом, определяющих биологический отклик тканей на имплантированный материал, отличаются от характеристик МДО покрытий. В отличие от МДО покрытий, композиционные кальций-фосфатные сформированы покрытия химически инертным полимерным связующим с значением концентрации низким функциональных групп на поверхности. Поэтому имплантаты с композиционным покрытием характеризуются высоким значением показателя краевого угла смачивания водой.

Низкая концентрация кальция, наблюдаемая в вытяжке, полученной при растворении композиционных покрытий имплантатов, обусловлена высокой стабильностью кристаллического гидроксиапатита в биологических жидкостях [211], что препятствуют насыщению ионами кальция места имплантации и затрудняет дифференцировку стволовых клеток в остеобласты [26].

Учитывая анатомическое расположение имплантата И наличие В композитном покрытии электрически активных кристаллических фаз, можно предположить, что высокая способность продуцировать костную ткань в условиях интрамедуллярного армирования, обусловлена пьезоэлектрическими свойствами покрытия на основе сополимера ВДФ-ТеФЭ. Поэтому механические напряжения, действующие на имплантат, вызывают изменения электрического потенциала его поверхности. В свою очередь электрические поля, индуцируемые на поверхности, воздействуют на окружающие ткани, стимулируя процессы остеогенеза. Подтверждением этого утверждения являются результаты исследований in vitro, которые продемонстрировали улучшение адгезии остеобластов к поверхности пленки из ПВДФ при её механической деформации [43]. Возможность остеогенной дифференцировки пула МСК на нетканых материалах, обладающих пьезоэлектрическими свойствами, показана [44] даже в отсутствие фосфатов
кальция. Формирование молодой костной ткани вокруг одноосно вытянутых пленок ПВДФ при обертывании ими длинных трубчатых костей, а так же при их имплантации в костную ткань, наблюдали в работах [94,212].

Грунтовочный слой композиционного покрытия, сформированный на имплантате, защищает его от коррозии и снижает выход токсичных продуктов в окружающие ткани [128], что увеличивает его биосовместимомть.

Клинический потенциал эластичных интрамедуллярных имплантатов с композиционным покрытием (приложения 14-15) может быть увеличен за счет качестве биологически использования В активного наполнителя быстрорастворимых фосфатов кальция, таких как аморфные фосфаты кальция, кальций-фосфатные трикальцийфосфат стекла И т.д., способствующих насыщению места имплантации ионами кальция и фосфора [105,213,214]. Улучшение электрофизических свойств пьезоэлектрического связующего может быть проведено следующим образом:

- использование дополнительной "положительной" или "отрицательной" поляризации имплантата [160],

- оптимизация кристаллической структуры путем подбора технологических параметров формирования покрытия [176,215],

- модифицирование поверхности композитного покрытия имплантат с целью увеличения гидрофильности, например, в плазме ВЧ магнетронного разряда [171].

# 5.5. Использование индивидуальных эластичных интрамедуллярных имплантатов с биологически активным композиционным покрытием для исправления деформаций длинных трубчатых костей

Полученные результаты позволили использовать индивидуальные эластичные интрамедуллярные имплантаты с композиционным покрытием с содержанием сополимера ВДФ-ТеФЭ 35 масс %. для исправления врожденного укорочение левого бедра на 4 см осложненного вальгусной деформацией левого

коленного сустава на 160 градусов. Исследования были проведены на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации г. Курган. Эластичные интрамедуллярные имплантаты предназначенные для проведения исследований были изготовлены с использованием патентов: РФ на полезную модель № 107473, РФ на изобретение № 2428207.

показали, Исследования что процедура имплантации эластичного имплантата в интрамедуллярный канал длинной трубчатой кости не вызывает отслоений и разрушения композитного покрытия на поверхности разработанного Установленные интрамедуллярного имплантата. имплантаты продемонстрировали высокую клиническую эффективность при монолокальном бедра дистракционном остеосинтезе левого аппаратом Илизарова С интрамедуллярным армированием эластичным имплантатом с композиционным Использование имплантатом покрытием. эластичных с композиционным покрытием позволило удлинить бедро на 4 см при среднесуточном темпе дистракции 0,9 мм/сутки, сократить время фиксации удлинённого сегмента до 23 суток при показателе индекса фиксации до 7,5 суток/см, что позволило добиться уменьшения значения индекса остеоинтеграции до 20 дней/см (приложение 16).

# 5.6. Выводы по Главе 5

1. Имплантация стального эластичного имплантата с композиционным покрытием (толщина  $180 \pm 20$  мкм, эластичность 2 мм, пористость  $26 \pm 6$  %, адгезионной прочностью покрытия  $16,8 \pm 2,2$  МПа, отношением Ca/P  $1,8 \pm 0,3$ ) в интрамедуллярный канал трубчатой кости не вызывает отслоений и разрушения композитного покрытия.

2. Стальные интрамедуллярные имплантаты с композиционным покрытием содержащие 35 масс % сополимера ВДФ-ТеФЭ при имплантации в интрамедуллярный канал трубчатой кости не проявляет канцерогенных,

146

токсических и аллергических тканевых реакций, обладает высокой способностью к интеграции с тканями внутри интрамедуллярного канала длинной трубчатой кости, стимулируют образование вокруг имплантата плотной костной ткани трабекулярного строения.

3. Разработано новое медицинское изделие – стальной эластичный интрамедуллярный имплантат для остеосинтеза, позволяющий сократить индекс остеосинтеза до 20 дней/см при удлинение конечности методом монолокального дистракционного остеосинтеза аппаратом Илизарова в сочетании с интрамедуллярным армированием эластичным имплантатом.

# Основные выводы

1. На основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом методом электроформования и аэродинамического формования сформированы полимерные каркасы с высоким содержанием электрически активных (сегнетоэлектрических) кристаллических фаз характеризующиеся высокими показателями адгезии и жизнеспособности стволовых и эндотелиальных клеток, не вызывающие отрицательных тканевых реакций при имплантации в мягкие ткани. Сополимер винилиденфторида с тетрафторэтиленом использован в качестве связующего для разработки композиционного покрытия интрамедуллярного имплантата.

2. Полимерные каркасы, изготовленные методом аэродинамического формования, характеризуются сложной пространственной организацией, в можно выделяются два размерных уровня. Первый уровень которой макроструктуры представлены жгутами диаметром 8,3 ± 3,4 мкм и глобулами диаметром 5,8 ± 2,2 мкм. Второй уровень – микроструктуры представлены волокнами формирующими жгуты и заполняющие пространство между ними, диаметр волокон увеличивается с 0,5 ± 0,2 до 2,8 ± 1,4 мкм при увеличении концентрации сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом в прядильном растворе с 3 до 9 масс %. Каркасы сформированных методом аэродинамического формования ПО сравнению с каркасами сформированными методом электроформования обеспечивают более чем в 2 и 1,2 раза высокие показатели адгезии мезенхимальных и эндотелиальных клеток. Полимерные каркасы на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом, изготовленные методом аэродинамического формования могут быть использованы в качестве подложек для культивирования клеток.

3. Полимерные каркасы, изготовленные методом электроформования, сформированы отдельными микроволокнами правильной цилиндрической формы, диаметр которых увеличивается с 0,4 ± 0,2 до 1,7 ± 0,7 мкм при увеличении концентрации сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом в прядильном

растворе с 3 до 11 масс %. Прочность полимерных каркасов сформированных методом электроформования больше в ~7,5 раз по сравнению с каркасами сформированными методом аэродинамического формования, что обусловлено большей степенью кристалличности каркасов, большим содержанием сегнетоэлектрических кристаллических фаз и большей плотностью упаковки волокон. Полимерные каркасы на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом, изготовленные методом электроформования могут быть использованы в качестве имплантатов.

4. Уменьшение содержания сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом с 100 до 25 % в композиционном покрытии для интрамедуллярного имплантата, обеспечивает увеличение пористости покрытия с  $3,2 \pm 1,3$  до  $67 \pm 8$  %, краевого угла смачивания поверхности водой с  $100 \pm 4^{\circ}$  до  $138 \pm 4^{\circ}$ , при уменьшение значения показателей эластичности с 1 до 3 мм адгезионной прочности к стальной подложке с  $21,2 \pm 3,6$  до  $9,9 \pm 2,4$  МПа, и относительному уменьшению электрически активных кристаллических фаз в сополимере винилиденфторида с тетрафторэтиленом более чем на 47 %.

5. Композиционные покрытия включающие сополимер винилиденфторида с тетрафторэтиленом и гидроксиапатит способствуют высокой выживаемости мультипотентных стволовых клеток, вне зависимости от содержания сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом, при этом уменьшение содержания сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом с 100 до 25 % увеличивает значение показателя адгезии клеток с  $59 \pm 7$  до  $318 \pm 26$  шт./мм<sup>2</sup>. Оптимальным сочетанием физико-химических и медико-биологических свойств обладают композиционные покрытия содержащие 35 масс. % сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом и 65 масс. % гидроксиапатита.

6. Интрамедуллярный имплантат в виде спицы, средняя часть которого выполнена меньшим диаметром, чем диаметр хвостовой и режущей части, что позволяет создавать канал в кости, диаметром равным режущей части спицы, исключая нарушения целостности покрытия. При этом предложенный эластичный интрамедуллярный имплантат позволяет использовать в качестве биоактивных покрытий материалы, обладающие незначительной адгезией к металлическому телу имплантата.

7 Стальные интрамедуллярные имплантаты с композиционным покрытием содержащие 35 масс % сополимера ВДФ-ТеФЭ при имплантации в интрамедуллярный канал трубчатой кости обладает высокой способностью к интеграции с тканями внутри интрамедуллярного канала длинной трубчатой кости, стимулируют образование вокруг имплантата плотной костной ткани трабекулярного строения, стимулирует образование костного регенерата в области остеотомии при удлинение длинной трубчатой кости.

8 Разработано новое медицинское изделие – эластичный интрамедуллярный имплантат с композиционным биологически активным покрытием.

9 Разработано и изготовлено технологическое оборудование, позволяющие методом аэродинамического формования, изготавливать широкий спектр полимерных каркасов и композиционных покрытий для приложений реконструктивно-восстановительной хирургии твердых и мягких тканей.

# Заключение

что В результате диссертационной работы показано, сополимер винилиденфторида с тетрафторэтиленом благодаря высокой химической и термической стабильности, способности растворятся В низкотоксичных органических растворителях и наличию пьезоэлектрических свойств является перспективным материалом для создания на его основе широкой гаммы изделий для реконструктивно-восстановительной хирургии.

Научным результатом работы стало представлений развитие 0 формирование электрически активных кристаллических фаз в сополимере винилиденфторида с тетрафторэтиленом в при его кристаллизации из раствора в условиях интенсивного испарения растворителя; при его кристаллизации из расплава в присутствие мелкодисперсных частиц фосфатов кальция; получение новых знаний об особенностях взаимодействия электрически активных полимерных и композиционных материалов с клетками и тканями в системах in vitro, in vivo.

разработка Практическим результатом работы является нового медицинского изделия стального интрамедуллярного имплантата c биологически активным композиционным покрытием на основе сополимера винилиденфторида тетрафторэтиленом с гидроксиапатита; конструкции интрамедуллярного имплантата позволяющего минимизировать разрушительной воздействие на биологически активное покрытие имплантата в процессе имплантации; технологическое оборудования предназначенное для изготовления медицинских изделий (нетканые широкого спектра материалы ДЛЯ регенеративной медицины и тканевой инженерии, покрытия на металлические, керамические и полимерные имплантаты, подложки для культивирования клеток) методом аэродинамического формования из полимерных и композиционных материалов.

151

Заложен значительный потенциал увеличения остеопродуктивных свойств эластичных интрамедуллярных имплантатов с композиционным покрытием качестве биологически путем использования В активного наполнителя быстрорастворимых фосфатов кальция, таких как аморфные фосфаты кальция, т.д., кальций-фосфатные трикальцийфосфат стекла, И способствующих насыщению места имплантации ионами кальция и фосфора; улучшения электрофизических свойств полимерного связующего посредством дополнительной "положительной" или "отрицательной" поляризации имплантата, оптимизации кристаллической структуры подбором технологических параметров формирования покрытия; модифицирования поверхности композитного покрытия с целью увеличения гидрофильности, например, в плазме магнетронного разряда.

# Благодарности

Автор выражает глубокую признательность коллегам и близким, участие которых в настоящей работе невозможно переоценить. Научному руководителю В. М. Бузнику и руководителю лаборатории "Плазменных гибридных систем" ТПУ С. И. Твердохлебову за доверие, внимание, постоянную помощь и поддержку, объективную критику при проведении исследований и интерпретации их результатов. Профессионалам, во многом сформировавшим мое отношение к исследовательской деятельности: Попокову А.В., Хлусову И.А., Попкову Д.А., Гузееву В.В., Карлову А.В, Антоновой Л.В., Чердынцевой Н.В., Ростовцеву А.В., Зайцеву К.В., Головкину А.С., Светличному В., Лапину И.Н., Верешагину В.И., Козику В.В., моей супруге Больбасовой Лидии, а так же моим родителям Галине Петровне и Николаю Федоровичу.

# Список сокращений и условных обозначений

- ЭИ эластичный интрамедуллярный имплантант;
- АВФ аппарат внешней фиксации;
- МСК мультипотентные стволовые клетки;
- ПК полимерный каркас;
- КК композиционный каркас;
- КФ кальций фосфатное покрытие;
- МДО метод микродугового оксидирования;
- ПВДФ поливинилиденфторид;
- ТеФЭ тетрафторэтилен;
- ВДФ-ТеФЭ сополимер винилиденфторида с тетрафторэтиленом;
- ВДФ-ТрФЭ сополимер винилиденфторида с трифторэтиленом;
- ГА гидроксиапатит;
- ЭС метод электроформования (электроспинниг);
- АЭРДФ метод аэродинамического формования;
- СЭМ сканирующая электронная микроскопия;
- ДСК дифференциальная сканирующая калориметрия;
- ИК инфракрасная спектроскопия;
- FITС изотиоцианат флуоресцеина;
- РЕ фикоэритрин;
- ЛВЖ легковоспламеняющиеся жидкости
- СМС синтетические моющие средства

# Список используемой литературы

- Петрушин А.Л. Склеротические остеодисплазии / А.Л. Петрушин, Н.Н. Тюсова, Т.В. Нехорошкова // Травматалогия и ортопедия России. – 2016. – № 79. – С. 136–150.
- Kochenova, E.A. O Treatment of wrist deformities in children with arthrogryposis multiplex congenita / E.A. Kochenova, O.E. Agranovich, M. V Savina // Pediatr. Traumatol. Orthop. Reconstr. Surg. – 2016. – Vol. 4 - № 1. – P. 26.
- Experience of using the ilizarov external fixator in the treatment of children with recurrent congenital clubfoot / V. V Kozhevnikov [et al.] // Pediatr. Traumatol. Orthop. Reconstr. Surg. – 2016. – Vol. 4 - № 1. – P. 5.
- Shevtsov, V.I. Professor G. A. Ilizarov's contribution to the method of transosseous osteosynthesis // Bull. Hosp. Jt. Dis. – 1997. – Vol. 56 – № 1. – P. 11–5.
- 5. Ilizarov, G.A. Basic principles of transosseous compression and distraction osteosynthesis // Ortop. Travmatol. Protez. - 1971. – Vol. 32 – № 11. – P. 7–15.
- 6. Formation of an organic matrix in the traction method of bone regeneration and characteristics of its mineralization in experimental tibia lengthening / G.A. Ilizarov [et al.] // Vopr. Med. Khim. Vol. 28 № 6. P. 27–33.
- 7. Shevtsov, V.I. Muscle spindles in elongation of the extremity: Proprioceptive conflict or activity deficit? / V.I. Shevtsov, M.S. Saifutdinov, N.K. Chikorina // Bull. Exp. Biol. Med. 2008. Vol. 146 № 1. P. 104–106.
- 8. Ilizarov, G.A. The principles of the Ilizarov method // Bull. Hosp. Jt. Dis. Orthop. Inst. – 1988. – Vol. 48 – № 1. – P. 1–11.
- 9. Ilizarov, G.A. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening // Clin. Orthop. Relat. Res. – 1990. - № 250. – P. 8–26.
- Ilizarov, G.A. The replacement of long tubular bone defects by lengthening distraction osteotomy of one of the fragments / G.A. Ilizarov, V.I. Ledyaev // Clin. Orthop. Relat. Res. – 1992. – № 280. – P. 7–10.
- 11. Bone Healing by Using Ilizarov External Fixation Combined with Flexible Intramedullary Nailing versus Ilizarov External Fixation Alone in the Repair of

Tibial Shaft Fractures: Experimental Study / A. V. Popkov [et al.] // Sci. World J. – 2014. – Vol. 2014 – P. 1–8.

- 12. Elastic stable intramedullary nailing of femoral shaft fractures in children / J.N.
   Ligier [et al.] // J. Bone Joint Surg. Br. 1988. Vol. 70 № 1. P. 74–78.
- Flexible intramedullary nail use in limb lengthening / D. Popkov[et al.] // J. Pediatr.
   Orthop. 2010. Vol. 30 P. 910–918.
- 14. Role of the flexible intramedullary nailing in limb lengthening in children: Comparative study based on the series of 294 lengthenings / D. Popkov[et al.] // Eur. Orthop. Traumatol. – 2012. – Vol. 3 – P. 17–24.
- 15. Bone regeneration: current concepts and future directions / R. Dimitriou [et al.] // BMC Med. – 2011. – Vol. 9 – № 1. – P. 66.
- 16. Analysis of segmental residual growth after progressive bone lengthening in congenital lower limb deformity / D. Popkov [et al.] // Orthop. Traumatol. Surg. Res. 2012. Vol. 98 № 6. P. 621–628.
- 17. Mingazov, E.R. Surgical methods for treatment of limb deformities in children with osteogenesis imperfecta (A review of the literature) / E.R. Mingazov, G.M. Chibirov, D.A. Popkov // Genij Ortop. 2016. № 2. P. 97–103.
- 18. Elastic intramedullary nailing as a complement to Ilizarov's method for forearm lengthening: A comparative pediatric prospective study / T. Jager [et al.] // Orthop. Traumatol. Surg. Res. 2012. Vol. 98 № 4. P. 376–382.
- 19. Femoral lengthening by combined technique in melorheostosis: a case report / A. Aranovich [et al.] // Eur. Orthop. Traumatol. 2014. Vol. 5 № 2. P. 175–179.
- 20. Ollier's disease limb lenghtening: Should intramedullary nailing be combined with circular external fixation? / D. Popkov [et al.] // Orthop. Traumatol. Surg. Res. 2010. Vol. 96 № 4. P. 348–353.
- 21. Functional coatings formed on the titanium and magnesium alloys as implant materials by plasma electrolytic oxidation technology: Fundamental principles and synthesis conditions / S.V. Gnedenkov [et al.] // Corros. Rev. 2016. Vol. 34 № 1–2. P. 65–83.

- 22. Albrektsson, T. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. / T. Albrektsson, C. Johansson // Eur. Spine J. 2001. Vol. 10 P. 96–101.
- 23. Mesenchymal Stem Cell-Organized Bone Marrow Elements: An Alternative Hematopoietic Progenitor Resource / Y. Miura [et al.] // Stem Cells 2006. Vol. 24 № 11. P. 2428–2436.
- 24. Artificial Niches for Stromal Stem Cells as a Potential Instrument for the Design of the Surface of Biomimetic Osteogenic Materials / I.A. Khlusov [et al.] // Russ.
  Phys. J. 2014. Vol. 56 № 10. P. 1206–1211.
- 25. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications // Mater. Sci. Eng. C 2015. Vol. 55 P. 272–326.
- 26. LeGeros, R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials // Chem. Rev. 2008. Vol. 108 № 11. P. 4742–53.
- 27. Ir'ianov, I.M. Fracture healing under intramedullary insertion of wires with hydroxyapatite coating / I.M. Ir'ianov, N.A. Kir'ianov, A. V Popkov // Vestn. Ross. Akad. Meditsinskikh Nauk 2014. № 7–8. P. 127–32.
- 28. Bone Healing by Using Ilizarov External Fixation Combined with Flexible Intramedullary Nailing versus Ilizarov External Fixation Alone in the Repair of Tibial Shaft Fractures: Experimental Study / A. V. Popkov[et al.] // Sci. World J. – 2014. – Vol. 2014 – P. 1–8.
- 29. Popkov, A. Results of deformity correction in children with X-linked hereditary hypophosphatemic rickets by external fixation or combined technique / A. Popkov [et al.] // Int. Orthop. 2015. Vol. 39 № 12. P. 2423–2431.
- 30. Рентгеноморфологические особенности консолидации перелома диафиза большеберцовой кости при интрамедуллярном остеосинтезе спицами с покрытием из гидроксиапатита / А.В. Попков [и др.] // Гений ортопедии – 2015. – №. 1 – С. 23–27.
- 31. The biocompatibility of nanostructured calcium phosphate coated on micro-arc oxidized titanium / Y. Li [et al.] // Biomaterials 2008. Vol. 29 № 13. P. 2025–32.
- 32. The Structure and Physical and Mechanical Properties of a Novel Biocomposite

Material, Nanostructured Titanium – Calcium – Phosphate Coating / Y.P.

Sharkeev [et al.] // Compos. Interfaces – 2009. – Vol. 16 – P. 535–546.

- 33. Review of the biocompatibility of micro-arc oxidation coated titanium alloys / Y.
  Wang [et al.] // Mater. Des. 2015. Vol. 85 P. 640–652.
- 34. Randomized controlled trial comparing stabilization of fresh close femoral shaft fractures in children with titanium elastic nail system versus stainless steel elastic nail system / N. Goyal [et al.] // Acta Orthop. Belg. – 2014. – Vol. 80 – № 1. – P. 69–75.
- 35. Wall, E.J. Complications of Titanium and Stainless Steel Elastic Nail Fixation of Pediatric Femoral Fractures // J. Bone Jt. Surg. – 2008. – Vol. 90 – № 6. – P. 1305.
- 36. Biomechanical Comparison of Flexible Stainless Steel and Titanium Nails with External Fixation Using a Femur Fracture Model / U.S. Mani [et al.] // J. Pediatr. Orthop. 2006. Vol. 26 № 2. P. 182–187.
- 37. The Biosynthesis of Collagen and Its Disorders / D.J. Prockop [et al.] // N. Engl. J. Med. 1979. Vol. 301 № 2. P. 77–85.
- 38. Lysaght, M.J. The growth of tissue engineering / M.J. Lysaght, J. Reyes // Tissue Eng. - 2001. - Vol. 7 - № 5. - P. 485-493.
- 39. Weiner, S. The material bone: Structure-Mechanical Function Relations / S. Weiner,
  H.D. Wagner // Annu. Rev. Mater. Sci. 1998. Vol. 28 № 1. P. 271–298.
- 40. Hastings, G.W. Electrical effects in bone / G.W. Hastings, F.A. Mahmud // J. Biomed. Eng. 1988. Vol. 10 № 6. P. 515–521.
- 41. Fukada, E. On the Piezoelectric Effect of Bone / E. Fukada, I. Yasuda // J. Phys.
  Soc. Japan 1957. Vol. 12 № 10. P. 1158–1162.
- 42. Piezoelectric Effect in Human Bones Studied in Nanometer Scale / C. Halperin [et al.] // Nano Lett. 2004. Vol. 4 № 7. P. 1253–1256.
- 43. El Messiery, M.A. Ferro-electricity of dry cortical bone / M.A. El Messiery, G.W. Hastings, S. Rakowski // J. Biomed. Eng. 1979. Vol. 1 № 1. P. 63–65.
- 44. An anatomical model for streaming potentials in osteons / S.R. Pollack [et al.] // J. Biomech. 1984. Vol. 17 № 8. P. 627–636.

- 45. Riddle, R.C. From streaming-potentials to shear stress: 25 years of bone cell mechanotransduction / R.C. Riddle, H.J. Donahue // J. Orthop. Res. 2009. Vol. 27 № 2. P. 143–149.
- 46. Ciombor, D.M. The Role of Electrical Stimulation in Bone Repair / D.M. Ciombor,
  R.K. Aaron // Foot Ankle Clin. 2005. Vol. 10 № 4. P. 579–593.
- 47. Mycielska, M.E. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. / M.E. Mycielska, M.B. a Djamgoz // J. Cell Sci. – 2004. – Vol. 117 – № 9. - P. 1631–1639.
- 48. Yamashita, K. Acceleration and Deceleration of Bone-Like Crystal Growth on Ceramic Hydroxyapatite by Electric Poling / K. Yamashita, N. Oikawa, T. Umegaki // Chem. Mater. – 1996. – Vol. 8 – № 12. – P. 2697–2700.
- 49. Kotwal, A. Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials // Biomaterials 2001. Vol. 22 № 10. P. 1055–1064.
- 50. Bassett, C.A. Biologic significance of piezoelectricity // Calcif. Tissue Res. 1967.
   Vol. 1 № 1. P. 252–272.
- 51. Effects of Electric Currents on Bone in Vivo / C.A. Bassett [et al.] // Nature 1964.
   Vol. 204 P. 652–654.
- 52. Nerem, R.M.Tissue engineering: from biology to biological substitutes / R.M.
   Nerem, A. Sambanis // Tissue Eng. 1995. Vol. 1 P. 3–13.
- 53. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering / S. Wu [et al.]// Mater. Sci. Eng. R Reports – 2014. – Vol. 80 – P. 1–36.
- 54. Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: Instructive and smart functions / F. Barrère [et al.] // Mater. Sci. Eng. R Reports 2008. Vol. 59 № 1–6. P. 38–71.
- 55. Two-Photon Lithography of 3D Nanocomposite Piezoelectric Scaffolds for Cell
   Stimulation / A. Marino [et al.] // ACS Appl. Mater. Interfaces 2015. Vol. 7 № 46. P. 25574–25579.
- 56. Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells / G. Ciofani [et al.] // Colloids Surfaces B Biointerfaces –

2013. – Vol. 102 – P. 312–320.

- 57. Biocompatible evaluation of barium titanate foamed ceramic structures for orthopedic applications / J.P. Ball [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. Part A 2014.
  Vol. 102 № 7. P. 2089–2095.
- 58. Piezoelectric ceramic implants:in vivo results / J.B. Park [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 1981. – Vol. 15 – № 1. – P. 103–110.
- 59. Improved osteoblasts growth on osteomimetic hydroxyapatite/BaTiO3 composites with aligned lamellar porous structure / B. Liu [et al.] // Mater. Sci. Eng. C – 2016. – Vol. 61 – P. 8–14.
- 60. Jianqing, F. Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic / F. Jianqing, Y. Huipin, Z. Xingdong // Biomaterials 1997. Vol. 18 № 23. P. 1531–1534.
- Aligned porous barium titanate/hydroxyapatite composites with high piezoelectric coefficients for bone tissue engineering / Y. Zhang [et al.] // Mater. Sci. Eng. C 2014. Vol. 39 P. 143–149.
- 62. New Coll–HA/BT composite materials for hard tissue engineering / A.V. Zanfir [et al.] // Mater. Sci. Eng. C 2016. Vol. 62 P. 795–805.
- 63. Dielectric behaviors of PHBHHx–BaTiO3 multifunctional composite films / S. Ke [et al.]// Compos. Sci. Technol. 2012. Vol. 72 № 2. P. 370–375.
- 64. Effect of particle size and volume fraction of BaTiO3 powders on the functional properties of BaTiO3/poly(ε-caprolactone) composites / M. Airimioaei [et al.]// Mater. Chem. Phys. 2016. Vol. 182 P. 246–255.
- 65. Nanocomposite Membranes Enhance Bone Regeneration Through Restoring Physiological Electric Microenvironment / X. Zhang [et al.]// ACS Nano – 2016. – Vol. 10 – № 8. – P. 7279–7286.
- 66. Poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite for in vivo support of bone formation / H.B. Lopes [et al.] // J. Biomater. Appl. 2013. Vol. 29 № 1. P. 104–112.
- 67. Participation of MicroRNA-34a and RANKL on bone repair induced by poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate membrane / H.B. Lopes [et al.]

// J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2016. – Vol. 27 – № 13. – P. 1369–1379.

- 68. Electrical activity of ferroelectric biomaterials and its effects on the adhesion, growth and enzymatic activity of human osteoblast-like cells / P. Vaněk [et al.] // J. Phys. D. Appl. Phys. 2016. Vol. 49 № 17. P. 175403.
- 69. Biocompatibility of ferroelectric lithium niobate and the influence of polarization charge on osteoblast proliferation and function / N.C. Carville [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. Part A 2015. Vol. 103 № 8. P. 2540–2548.
- 70. Dubey, A.K. Piezoelectric sodium potassium niobate mediated improved polarization and in vitro bioactivity of hydroxyapatite / A.K. Dubey, R. Kinoshita, K. Kakimoto // RSC Adv. 2015. Vol. 5 № 25. P. 19638–19646.
- 71. Perovskite ceramic nanoparticles in polymer composites for augmenting bone tissue regeneration / A. Bagchi [et al.]// Nanotechnology 2014. Vol. 25 № 48. P. 485101.
- 72. Barium ion leaching from barium titanate powder in water / D.H. Yoon [et al.]// J. Mater. Sci. Mater. Electron. 2003. Vol. 14 № 3. P. 165–169.
- 73. Cytotoxicity and degradation behavior of potassium sodium niobate piezoelectric ceramics / S.W. Yu [et al.] // Ceram. Int. 2012. Vol. 38 № 4. P. 2845–2850.
- 74. De C. Campos, J.S. Preparation and characterization of PVDF/CaCO3 composites / J.S. De C. Campos, A.A. Ribeiro, C.X. Cardoso // Mater. Sci. Eng. B 2007. Vol. 136 № 2–3. P. 123–128.
- 75. Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications / C.
  Ribeiro [et al.] // Colloids Surfaces B Biointerfaces 2015. Vol. 136 P. 46–55.
- 76. Rajabi, A.H. Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review / A.H. Rajabi,
  M. Jaffe, T.L. Arinzeh // Acta Biomater. 2015. Vol. 24 P. 12-23.
- 77. Ramadan, K.S. A review of piezoelectric polymers as functional materials for electromechanical transducers / K.S. Ramadan, D. Sameoto, S. Evoy // Smart Mater. Struct. – 2014. – Vol. 23 – № 3. – P. 33001.
- 78. Das-gupta, D.K. Pyroelectricity in polymers // Ferroelectrics 1991. Vol. 118 № 1. – P. 165–189.

- 79. Martins, P. Electroactive phases of poly(vinylidene fluoride): Determination, processing and applications / P. Martins, A.C. Lopes, S. Lanceros-Mendez // Prog. Polym. Sci. 2014. Vol. 39 № 4. P. 683–706.
- 80. Kochervinskii, V. V The structure and properties of block poly(vinylidene fluoride) and systems based on it // Russ. Chem. Rev. 2007. Vol. 65 P. 865–913.
- 81. Furukawa, T. Recent advances in ferroelectric polymers // Ferroelectrics 1990. –
   Vol. 104 № 1. P. 229–240.
- 82. Kochervinskii, V. V. Specifics of structural transformations in poly(vinylidene fluoride)-based ferroelectric polymers in high electric fields // Polym. Sci. Ser. C 2008. Vol. 50 P. 93–121.
- 83. Sencadas, V. α to β Phase Transformation and Microestructural Changes of PVDF Films Induced by Uniaxial Stretch / V. Sencadas, S. Lanceros-Méndez // J. Macromol. Sci. – 2009. – Vol. 48 – № 3. – P. 514–525.
- 84. Matsushige, K. Direct Observation of Crystal Transformation Process of Poly (vinylidene fluoride) under High Pressure by PSPC X-Ray System / K. Matsushige, K. Nagata, T. Takemura // Jpn. J. Appl. Phys. 1978. Vol. 17 № 3. P. 467–472.
- 85. Electric-field-induced phase changes in poly(vinylidene fluoride) / G.T. Davis [et al.] // J. Appl. Phys. 1978. Vol. 49 № 10. P. 4998.
- 86. Influence of Processing Conditions on Polymorphism and Nanofiber Morphology of Electroactive Poly(vinylidene fluoride) Electrospun Membranes / C. Ribeiro [et al.]// Soft Mater. – 2010. – Vol. 8 – № 3. – P. 274–287.
- 87. Nakhmanson, S.M. Collective polarization effects in β -polyvinylidene fluoride and its copolymers with tri- and tetrafluoroethylene / S.M. Nakhmanson, M.B. Nardelli, J. Bernholc // Phys. Rev. B 2005. Vol. 72 № 11. P. 115210.
- 88. Zhong, Z. Molecular scale imaging and observation of electron beam-induced changes of polyvinylidene fluoride molecules in electrospun nanofibers / Z.
  Zhong, J.Y. Howe, D.H. Reneker // Polymer 2013. Vol. 54 № 15. P. 3745–3756.
- 89. Piezoelectric poly(vinylidene fluoride) microstructure and poling state in active

tissue engineering / C. Ribeiro [et al.]// Eng. Life Sci. – 2015. – Vol. 15 – № 4. – P. 351–356.

- 90. Structural changes in PVDF fibers due to electrospinning and its effect on biological function / S.M. Damaraju [et al.]// Biomed. Mater. 2013. Vol. 8 P. 45007.
- 91. Enhancement of adhesion and promotion of osteogenic differentiation of human adipose stem cells by poled electroactive poly(vinylidene fluoride) / J. Pärssinen [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. A 2014.– Vol. 72 № 11. P. 113–119.
- 92. Dynamic piezoelectric stimulation enhances osteogenic differentiation of human adipose stem cells. / C. Ribeiro [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. A 2014.– Vol. 72 № 11. P. 113–119.
- 93. Osteogenesis induced by bimorph polyvinylidene fluoride films / J.J. Ficat [et al.] //
  Ferroelectrics 2011. Vol. 51 № 1. P. 121–128.
- 94. Quasi-static charge interactions in bone / A.A. Marino [et al.] // J. Electrostat. –
  1988. Vol. 21 P. 347–360.
- 95. Adhesion strength characterization of PVDF/HA coating on cp Ti surface modified by laser beam irradiation / A.A. Ribeiro [et al.] // Appl. Surf. Sci. 2012. Vol. 258 № 24. P. 10110–10114.
- 96. Structural, dielectric, and thermal investigation of the Curie transition in a tetrafluoroethylene copolymer of vinylidene fluoride / A.J. Lovinger [et al.] // J. Appl. Phys. 1984. Vol. 56 № 9. P. 2412.
- 97. Tashiro, K. Structural changes in ferroelectric phase transitions of vinylidene fluoride-tetrafluoroethylene copolymers: 1. Vinylidene fluoride content dependence of the transition behaviour / K. Tashiro, H. Kaito, M. Kobayashi // Polymer. 1992. Vol. 33 № 14. P. 2915–2928.
- 98. Lando, J.B. The polymorphism of poly(vinylidene fluoride). I. The effect of head–to-head structure / J.B. Lando, W.W. Doll // J. Macromol. Sci. Part B 1968. Vol. 2 № 2. P. 205–218.
- 99. Local piezoelectric response, structural and dynamic properties of ferroelectric copolymers of vinylidene fluoride–tetrafluoroethylene / V. V. Kochervinskii [et al.] // Colloid Polym. Sci. 2014. Vol. 293 P. 533–543.

- 100. Ferroelectric polymer scaffolds based on a copolymer of tetrafluoroethylene with vinylidene fluoride: fabrication and properties / E.N. Bolbasov [et al.] // Mater.
  Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. 2014. Vol. 40 P. 32–41.
- 101. Cui, Z. Recent progress in fluoropolymers for membranes / Z. Cui, E. Drioli, Y.M. Lee // Prog. Polym. Sci. 2014. Vol. 39 № 1. P. 164–198.
- 102. Dorozhkin, S. V Bioceramics of calcium orthophosphates // Biomaterials 2010. –
   Vol. 31 № 7. P. 1465–1485.
- 103. Kubarev, O.L. Bioactive ceramic composite materials in hydroxyapatite-tricalcium phosphate system / O.L. Kubarev, V.S. Komlev, S.M. Barinov // Inorg. Mater. Appl. Res. – 2010. – Vol. 1 – № 3. – P. 182–187.
- 104. Porous materials made from calcium phosphates (Review) / A. V. Belyakov [et al.]
  // Glas. Ceram. 2008. Vol. 65 № 9–10. P. 337–339.
- 105. Barinov, S.M. Calcium phosphate-based ceramic and composite materials for medicine // Russ. Chem. Rev. – 2010. – Vol. 79 – № 1. – P. 13–29.
- 106. Engineering biocompatible implant surfaces / S. Bauer [et al.]// Prog. Mater. Sci. –
  2013. Vol. 58 № 3. P. 261–326.
- 107. de Jong, W.F. La Substance Minérale Dans les Os // Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas – 2010. – Vol. 45 – № 6. – P. 445–448.
- 108. Crystal Structure of Hydroxyapatite / M.I. Kay [et al.] // Nature 1964. Vol. 204 № 4963. P. 1050–1052.
- 109. On the substructure of compact ceramics based on hydroxyapatite / V.M. Ievlev [et al.] // Dokl. Chem. 2011. Vol. 437 № 1. P. 57–59.
- 110. Yao, F. Simultaneous incorporation of carbonate and fluoride in synthetic apatites: Effect on crystallographic and physico-chemical properties / F. Yao, J.P. LeGeros, R.Z. LeGeros // Acta Biomater. – 2009. – Vol. 5 – № 6. – P. 2169–2177.
- 111. Effect of titanium and zirconium substitutions for calcium on the formation and structure of tricalcium phosphate and hydroxyapatite / V. V. Smirnov [et al.] // Inorg. Mater. 2017. Vol. 53 № 12. P. 1254–1260.
- 112. Synthesis and structure of magnesium-substituted hydroxyapatite / I. V. Fadeev [et al.] // Inorg. Mater. 2003. Vol. 39 № 9. P. 947–950.

- 113. Effect of Fluoride-substituted Apatite on In Vivo Bone Formation / M. Inoue [et al.] // J. Biomater. Appl. 2011. Vol. 25 № 8. P. 811–824.
- 114. Ozsvath, D.L. Fluoride and environmental health: a review // Rev. Environ. Sci.
  Bio. Technology 2009. Vol. 8 № 1. P. 59–79.
- 115. Effect of the concentration of carbonate groups in a carbonate hydroxyapatite ceramic on its in vivo behavior / V.S. Komlev [et al.] // Inorg. Mater. 2009. Vol. 45 № 3. 329–334 P.
- 116. Yao, F. Carbonate and fluoride incorporation in synthetic apatites: Comparative effect on physico-chemical properties and in vitro bioactivity in fetal bovine serum / F. Yao, R.Z. LeGeros // Mater. Sci. Eng. C 2010. Vol. 30 № 3. P/ 423–430.
- 117. Structural changes in carbonated hydroxyapatite at high temperatures as probed by
  1H NMR and Raman spectroscopy / V.M. Buznik [et al.] // Dokl. Chem. 2007. Vol. 413 № 1. P. 64–67.
- 118. Carbonate release from carbonated hydroxyapatite in the wide temperature rage / S.M. Barinov [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2006. Vol. 17 № 7. P. 597–604.
- 119. Silicon-containing hydroxylapatite nanopowders / N. V. Bakunova [et al.] // Russ.
  J. Inorg. Chem. 2007. Vol. 52 № 10. P. 1492–1497.
- 120. Solonenko, A.P. Silicate-substituted carbonated hydroxyapatite powders prepared by precipitation from aqueous solutions / A.P. Solonenko, O.A. Golovanova // Russ. J. Inorg. Chem. 2014. Vol. 59 № 11. P. 1228–1236.
- 121. In vitro osteoclast formation and resorption of silicon-substituted hydroxyapatite ceramics / R.J. Friederichs [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. Part A 2015. Vol. 103 № 10. P. 3312–3322.
- 122. In vivo assessment of hydroxyapatite and silicate-substituted hydroxyapatite granules using an ovine defect model / N. Patel [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2005. Vol. 16 № 5. P. 429–440.
- 123. Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals / A. Bigi [et al.] // Inorganica
   Chim. Acta 2007. Vol. 360 № 3. P. 1009–1016.

- 124. Comparison study of biomimetic strontium-doped calcium phosphate coatings by electrochemical deposition and air plasma spray: morphology, composition and bioactive performance / L. Li [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2012. Vol. 23 № 10. P. 2359–2368.
- 125. Ion-substituted calcium phosphate coatings deposited by plasma-assisted techniques: A review / G. Graziani [et al.] // Mater. Sci. Eng. C 2017. Vol. 74 P. 219–229.
- 126. Mróz, W. Structural studies of magnesium doped hydroxyapatite coatings after osteoblast culture / W. Mróz [et al.] // J. Mol. Struct. 2010. Vol. 977 № 1–3. P. 145–152.
- 127. Influence of manganese on stability and particle growth of hydroxyapatite in simulated body fluid / Ľ. Medvecký [et al.] // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2006. Vol. 281 № 1–3. P. 221–229.
- 128. Biological Composites Based on Fluoropolymers with Hydroxyapatite for Intramedullary Implants / A.M. Aronov [et al.] // Biomed. Eng. (NY). – 2010. – Vol. 44 – 108–113 P.
- 129. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion / N.J. Hallab [et al.] // Tissue Eng. – 2001. – Vol. 7 – № 1. – P. 55–71.
- 130. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in the absence of osteogenic supplements: A surface-roughness gradient study / A.B. Faia-Torres [et al.] // Acta Biomater. – 2015. – Vol. 28 – P. 64–75.
- 131. Gittens, R.A. A review on the wettability of dental implant surfaces II: Biological and clinical aspects / R.A. Gittens [et al.] // Acta Biomater. 2014. Vol. 10 № 7. P. 2907–2918.
- 132. Karageorgiou, V. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis //
  Biomaterials 2005. Vol. 26 № 27. P. 5474–5491.
- 133. Rogozhin, V.M. Determination of the porosity of spray-deposited coatings by hydrostatic weighing / V.M. Rogozhin, L. V. Akimova, Y. V. Smirnov // Sov. Powder Metall. Met. Ceram. 1980. Vol. 19 № 9. P. 617–620.

- 134. Hicks, J.C. Ferroelectric properties of poly(vinylidene fluoride-tetrafluoroethylene)
  / J.C. Hicks, T.E. Jones, J.C. Logan // J. Appl. Phys. 1978. Vol. 49 № 12. –
  P. 6092.
- 135. Tasaka, S. Effects of crystal structure on piezoelectric and ferroelectric properties of copoly(vinylidenefluoride-tetrafluoroethylene) / S. Tasaka, S. Miyata // J. Appl. Phys. 1985. Vol. 57 № 3. P. 906.
- 136. Kochervinskii, V. V. The properties and applications of fluorine-containing polymer films with piezo- and pyro-activity // Russ. Chem. Rev. 1994. Vol. 63 № 4. P. 367–371.
- 137. Vibrational spectrum of PVDF and its interpretation / Y. Bormashenko [et al.] //
  Polym. Test. 2004. Vol. 23 № 7. P. 791–796.
- 138. Kochervinskii, V. V. The structure and properties of block poly(vinylidene fluoride) and systems based on it // Russ. Chem. Rev. 1996. Vol. 65 № 10. P. 865–913.
- 139. The effect of processing conditions on the morphology, thermomechanical, dielectric, and piezoelectric properties of P(VDF-TrFE)/BaTiO3 composites / S.D. Vacche [et al.] // J. Mater. Sci. 2012. Vol. 47 № 11. P. 4763–4774.
- 140. Guide for the care and use of laboratory animals / H.W. C.G. Janet [et al.] // J.
  Appl. Phys. 1985. Vol. 57 № 3. P. 906.
- 141. Dmitrieva, R.I. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Differences and similarities / R.I. Dmitrieva[et al.] // Cell Cycle 2012. Vol. 11 № 2. P. 377–383.
- 142. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier / P. Kasten [et al.] // Biomaterials 2005.
   Vol. 26 № 29. P. 5879–89.
- 143. Taylor, D. Bone maintenance and remodeling: A control system based on fatigue damage // J. Orthop. Res. 1997. Vol. 15 № 4. P. 601–606.
- 144. Osteogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow in Situ: Role of Physicochemical Properties of Artificial Surfaces / I.A. Khlusov [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. 2005. Vol. 140 № 1. P. 144–152.

- 145. Osteogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow in Situ: Role of Physicochemical Properties of Artificial Surfaces / I.A. Khlusov [et al.] // Bull. Exp. Biol. Med. 2005. Vol. 140 № 1. P. 144–152.
- 146. Y.Filatov, A.Budyka, V.K. Electrospinning of Micro- and Nanofibers:
   Fundamentals in Separation and Filtration Processes / V.K. Y.Filatov, A.Budyka –
   2007.
- 147. Electrospinning of Polymer Nanofibers for Tissue Regeneration / T. Jiang [et al.] //
   Prog. Polym. Sci. 2014. Vol. 46 P. 1–24.
- 148. Generation of polymer ultrafine fibers through solution (air-) blowing / L. Zhang [et al.] // J. Appl. Polym. Sci. 2009. Vol. 114 № 6. P. 3479–3486.
- 149. Nano and submicrometric fibers of poly(D,L-lactide) obtained by solution blow spinning: Process and solution variables / J.E. Oliveira [et al.] // J. Appl. Polym. Sci. 2011. Vol. 122 № 5. P. 3396–3405.
- 150. A Review of the Fundamental Principles and Applications of Solution Blow
   Spinning / J.L. Daristotle [et al.] // ACS Appl. Mater. Interfaces 2016. Vol. 8 –
   № 51. P. 34951–34963.
- 151. Solution blowing nylon 6 nanofiber mats for air filtration / L. Shi [et al.] // Fibers
  Polym. 2013. Vol. 14 № 9. P. 1485–1490.
- 152. Fiber average size and distribution dependence on the electrospinning parameters of poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene) membranes for biomedical applications / V. Sencadas [et al.] // Appl. Phys. A Mater. Sci. Process. – 2012. – Vol. 109 – P. 685–691.
- 153. Structural and morphological characterization of micro and nanofibers produced by electrospinning and solution blow spinning: A comparative study / J.E. Oliveira [et al.] // Adv. Mater. Sci. Eng. – 2013.
- 154. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century) / D. Lukáš [et al.] // Text. Prog. 2009. Vol. 41 № 2. P. 59–140.
- 155. Theoretical and experimental investigation of physical mechanisms responsible for polymer nanofiber formation in solution blowing / S. Sinha-Ray [et al.] //

Polymer. - 2015. - Vol. 56 - P. 452-463.

- 156. Sinha-Ray, S. Meltblowing: I-basic physical mechanisms and threadline model / S. Sinha-Ray, A.L. Yarin, B. Pourdeyhimi // J. Appl. Phys. 2010. Vol. 108 –P. 034912.
- 157. Bhardwaj, N. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique / N.
   Bhardwaj, S.C. Kundu // Biotechnol. Adv. 2010. Vol. 28 № 3. P. 325–347.
- 158. Basu, A. Progress in air-jet spinning // Text. Prog. 1999. Vol. 29 № 3. P. 1–
  38.
- 159. Tashiro, K. Structural changes in ferroelectric phase transitions of vinylidene fluoride-tetrafluoroethylene copolymers: 2. Normal-modes analysis of the infrared and Raman spectra at room temperature / K. Tashiro, H. Kaito, M. Kobayashi // Polymer. 1992. Vol. 33 № 14. P. 2929–2933.
- 160. Polarization of block textured films of ferroelectric copolymers of vinylidene fluoride with tetrafluoroethylene in an external field / V. V. Kochervinskii [et al.]
  // Polym. Sci. Ser. A 2014. Vol. 56 P. 587–602.
- 161. Matsumoto, K.I. Molecular orientation in thin film grown on au, ag, al and si substrates by vacuum evaporation of copolymer of vinylidene fluoride and tetrafluoroethylene / K.I. Matsumoto, K. Maki // Ferroelectrics 1995. Vol. 171 № 1. P. 163–176.
- 162. Murata, Y. Curie transition in poled and unpoled copolymer of vinylidene fluoride and tetrafluoroethylene. // Polym. J. – 1987. – Vol. 19 – P. 337–346.
- 163. Murata, Y. Ferroelectric behavior in vinylidene fluoride-tetrafluoroethylene copolymers / Y. Murata, N. Koizumi // Ferroelectrics 1989. Vol. 92 P. 47–54.
- 164. Furukawa, T. Ferroelectric properties of vinylidene fluoride copolymers // Phase
   Transitions 1989. Vol. 18 № 3–4. P. 143–211.
- 165. Characterization and in vitro cytocompatibility of piezoelectric electrospun scaffolds / N. Weber [et al.] // Acta Biomater. – 2010. – Vol. 6 – P. 3550–3556.
- 166. Morphology, polymorphism behavior and molecular orientation of electrospun poly(vinylidene fluoride) fibers / W.A. Yee [et al.] // Polymer. – 2007. – Vol. 48 –

№ 2. – P. 512–521.

- 167. A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects / F. Rupp [et al.] // Acta Biomater. 2014. Vol. 10 № 7. 2894–2906 P.
- 168. 3D cell culture and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells plated onto jet-sprayed or electrospun micro-fiber scaffolds / M.Á. Brennan [et al.] // Biomed. Mater. – 2015. – Vol. 10 – № 4. – P. 45019.
- 169. Structural changes in PVDF fibers due to electrospinning and its effect on biological function / S.M. Damaraju [et al.] // Biomed. Mater. 2013. Vol. 8 № 4. P. 45007.
- 170. El Hami, K. Nanoscopic measurements of the electrostriction responses in P(VDF/TrFE) ultra-thin-film copolymer using atomic force microscopy / K. El Hami, H. Yamada, K. Matsushige // Appl. Phys. A Mater. Sci. Process. 2001. Vol. 72 № 3. P. 347–350.
- 171. Research of the surface properties of the thermoplastic copolymer of vinilidene fluoride and tetrafluoroethylene modified with radio-frequency magnetron sputtering for medical application / S.I. Tverdokhlebov [et al.] // Appl. Surf. Sci. 2012. Vol. 263 P. 187–194.
- 172. Crystalline morphologies of P(VDF-TrFE) (70/30) copolymer films above melting point / W. Li [et al.] // Appl. Surf. Sci. 2008. Vol. 254 № 22. P. 7321–7325.
- 173. Ameduri, B. From vinylidene fluoride (VDF) to the applications of VDFcontaining polymers and copolymers: recent developments and future trends. // Chem. Rev. – 2009. – Vol. 109 – № 12. – 6632–86 P.
- 174. Aronov, D. Trap state spectroscopy studies and wettability modification of hydroxyapatite nanobioceramics / D. Aronov, G. Rosenman // J. Appl. Phys. 2007. Vol. 101 № 3. P. 34701.
- 175. Cassie, A.B.D. Wettability of porous surfaces / A.B.D. Cassie, S. Baxter // Trans.
  Faraday Soc. 1944. Vol. 40 P. 546.
- 176.  $\alpha$  and  $\beta$ -poly(vinylidene fluoride) evoke different cellular behaviours / Y.K.A.

Low [et al.] // J. Biomater. Sci. Polym. Ed. – 2011. – Vol. 22 – № 12. – P. 1651– 67.

- 177. The FTIR spectroscopy and QXRD studies of calcium phosphate based materials produced from the powder precursors with different ratios / A. Ślósarczyk [et al.]
  // Ceram. Int. 1997. Vol. 23 № 4. P. 297–304.
- 178. Ślósarczyk, A. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods / A. Ślósarczyk, Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiewicz // J. Mol. Struct. 2005. Vol. P. 657–661.
- 179. Influence of parameters of molecular mobility on formation of structure in ferroelectric vinylidene fluoride copolymers / V. Kochervinskii [et al.] // J. Appl. Phys. 2015. Vol. 117 № 21. P. 214101.
- 180. Lovinger, A.J. Compositional variation of the structure and solid-state transformations of vinylidene fluoride/tetrafluoroethylene copolymers / A.J. Lovinger [et al.] // Macromolecules 1988. Vol. 21 № 1. P. 78–83.
- 181. Lonjon, A. Mechanical improvement of P(VDF-TrFE) /nickel nanowires conductive nanocomposites: Influence of particles aspect ratio / A. Lonjon [et al.]
  // J. Non. Cryst. Solids 2012. Vol. 358 № 2. P. 236–240.
- 182. Microporous membranes of NaY zeolite/poly(vinylidene fluoride– trifluoroethylene) for Li-ion battery separators / J. Nunes-Pereira [et al.] // J. Electroanal. Chem. – 2013. – Vol. 689 – P. 223–232.
- 183. Bhatt, A.S. Crystallinity, conductivity, and magnetic properties of PVDF-Fe3O4 composite films / A.S. Bhatt, D.K. Bhat, M.S. Santosh // J. Appl. Polym. Sci. 2011. Vol. 119 № 2. P. 968–972.
- 184. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations / B.-S.
  Chang [et al.] // Biomaterials 2000. Vol. 21 № 12. P. 1291–1298.
- 185. Oreffo, R.O. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics / R.O.. Oreffo, J. Triffitt // Bone – 1999. – Vol. 25 – № 2. – P. 5S–9S.
- 186. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation
   / C.K.F. Chan et al.] // Nature 2009. Vol. 457 № 7228. P. 490–494.
- 187. Effect of microplasma modes and electrolyte composition on micro-arc oxidation

coatings on titanium for medical applications / O.P. Terleeva [et al.] // Surf. Coatings Technol. – 2010. – Vol.  $205 - N_{2} 6. - P. 1723-1729.$ 

- 188. Sankara Narayanan, T.S.N. Strategies to improve the corrosion resistance of microarc oxidation (MAO) coated magnesium alloys for degradable implants: Prospects and challenges / T.S.N. Sankara Narayanan, I.S. Park, M.H. Lee // Prog. Mater. Sci. – 2014. – Vol. 60 – P. 1–71
- 189. Structure and Properties of Microarc Calcium Phosphate Coatings on the Surface of Titanium and Zirconium Alloys / E. V. Legostaeva [et al.] // Russ. Phys. J. – 2014. – Vol. 56 – № 10. – P. 1130–1136.
- 190. Sharkeev, Y.P. Regularities of Forming Calcium Phosphate Coatings on Zirconium from Electrolytes Based on Synthesized and Biological Hydroxyapatite / Y.P. Sharkeev, K.S. Kulyashova // Russ. Phys. J. 2014. Vol. 56 № 10. P. 1170–1175.
- 191. Effect of Surface Topography and Chemical Composition on Wettability of Calcium Phosphate Coatings Formed on Ti-40Nb Alloy / E. Komarova [et al.] // Key Eng. Mater. – 2016. – Vol. 683 – P. 370–376.
- 192. Nie, X. Deposition of layered bioceramic hydroxyapatite/TiO2 coatings on titanium alloys using a hybrid technique of micro-arc oxidation and electrophoresis / X. Nie, A. Leyland, A. Matthews // Surf. Coatings Technol. 2000. Vol. 125 № 1–3. P. 407–414.
- 193. Han, Y. Structure and in vitro bioactivity of titania-based films by micro-arc oxidation / Y. Han, S.-H. Hong, K. Xu // Surf. Coatings Technol. 2003. Vol. 168 № 2–3. P. 249–258.
- 194. Sharkeev, Y.P. Regularities of Forming Calcium Phosphate Coatings on Zirconium from Electrolytes Based on Synthesized and Biological Hydroxyapatite / Y.P. Sharkeev, K.S. Kulyashova // Russ. Phys. J. 2014. Vol. 56 № 10. P. 1170–1175.
- 195. Characteristics and in vitro response of thin hydroxyapatite-titania films produced by plasma electrolytic oxidation of Ti alloys in electrolytes with particle additions
  / A.Y. Yeung [et al.] // RSC Adv. 2016. Vol. 6 P 12688.

- 196. The formation of calcium phosphate coatings by pulse laser deposition on the surface of polymeric ferroelectric / E.N. Bolbasov [et al.] // Appl. Surf. Sci. – 2015. – Vol. 349 – P. 420–429.
- 197. Dadfar, M. Effect of TIG welding on corrosion behavior of 316L stainless steel /
  M. Dadfar [et al.] // Mater. Lett. 2007. Vol. 61 № 11–12. P. 2343–2346.
- 198. Physical, chemical and biological properties of micro-arc deposited calcium phosphate coatings on titanium and zirconium-niobium alloy / E.V. Legostaeva [et al.] // Materwiss. Werksttech. – 2013. – Vol. 44 – № 2–3. – P. 188–197.
- 199. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere /
  C.-J. Liao [et al.] // Biomaterials 1999. Vol. 20 № 19. P. 1807–1813.
- 200. In-vitro dissolution and structural and electrokinetic characteristics of titanium-oxynitride coatings formed via reactive magnetron sputtering / V.F. Pichugin [et al.] // J. Surf. Investig. X-ray, Synchrotron Neutron Tech. 2016. Vol. 10 № 2. P. 282–291.
- 201. Formation and Properties of Bioactive Surface Layers on Titanium / S. V
  Gnedenkov [et al.] // Inorg. Mater. Appl. Res. 2011. Vol. 2 № 5. P. 474–481.
- 202. Hawker, M.J. Innovative Applications of Surface Wettability Measurements for Plasma-Modified Three-Dimensional Porous Polymeric Materials: A Review / M.J. Hawker, A. Pegalajar-Jurado, E.R. Fisher // Plasma Process. Polym. – 2015. – P.1963.
- 203. Chen, L., Functional polymer surfaces for controlling cell behaviors / L. Chen, C. Yan, Z. Zheng // Mater. Today – 2017. (in press).
- 204. Four calcium phosphate ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing / T.
  Kitsugi [et al.] // Biomaterials 1993. Vol. 14 № 3. P. 216–224.
- 205. Enhancement of bone-bonding strengths of titanium alloy implants by alkali and heat treatments / S. Nishiguchi [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. 1999. Vol. 48 № 5. P. 689–696.
- 206. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants / L. Bacakova [et al.] // Biotechnol. Adv. 2011. Vol. 29 №

6. – P. 739–767.

- 207. Burg, K.J. Biomaterial developments for bone tissue engineering. / K.J. Burg, S. Porter, J.F. Kellam // Biomaterials 2000. Vol. 21 P. 2347–2359.
- 208. Wennerberg, A. Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review / A. Wennerberg, T. Albrektsson // Clin. Oral Implants Res. 2009. Vol. 20 №. 4. P. 172–184.
- 209. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. / G.B. Adams [et al.] // Nature 2006. Vol. 439 № 7076. P. 599–603.
- 210. Von der Mark, K. Engineering biocompatible implant surfaces. Part II: Cellular recognition of biomaterial surfaces: Lessons from cell-matrix interactions / K. von der Mark, J. Park // Prog. Mater. Sci. 2012. Vol. 58 № 3. P. 327–381.
- 211. LeGeros, R.Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics // Clin. Mater. – 1993. – Vol. 14 – № 1. – P. 65–88.
- 212. Piezoelectric induction of bone formation: Ultrastructural observations / J.J. Ficat
  [et al.] // Ferroelectrics 1984. Vol. 60 № 1. P. 313–316.
- 213. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials // J. Mater. Sci. 2009. Vol. 44 № 9. P. 2343–2387.
- 214. Iron-substituted tricalcium phosphate ceramics / I. V. Fadeeva [et al.] // Dokl.
  Chem. 2016. Vol. 468 № 1. P. 159–161.
- 215. Structural changes in PVDF fibers due to electrospinning and its effect on biological function / S.M. Damaraju [et al.] // Biomed. Mater. 2013. Vol. 8 № 4. P. 45007.

# Приложение 1 Проект требований к биологически активным композиционным материалам на основе сополимеров тетрафторэтилена и фосфатов кальция

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Федеральное государственное учреждение «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имении академика Г.А. Илизарова Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощии ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологии»



#### ТОМСКИЙ ФИЛИАЛ

Россия, 634029,г. Томся, ул. Никитина, д.17 Тел.: (3822) 53-14-75 клипика: (3822) 64-84-15 Факс: (3822) 53-14-75



### Проект требований биологически активным композиционным материалам на основе сополимеров тетрафторэтилена и фосфатов кальция для травматологии и ортопедии

С целью оптимизации совместных исследований ТФ ФГУ "РНЦ"ВТО" им.акад. Г.А. Илизарова и ГОУ ВПО ТПУ по теме "Перспективные полимерные композиты на основе сополимеров тетрафторэтилена и фосфатов кальция" направленных на разработку отечественных остеоиндуктивных, биологически активных покрытий, предлагается перечень основных физико-химических свойств необходимых для успешного применения разрабатываемых композитов в области ортопедии и травматологии

 многоуровневая взаимосвязанная пористость не менее 50 %, с размером макропор порядка 100-150 мкм.

- 2) развитая поверхность, в том числе стенок пор в нанодиапазоне.
- 3) адгезионная прочность не менее 3 кг/мм
- 4) толщина покрытия на имплантате не менее 150 мкм.
- 5) эластичность не менее 3-4 мм (по ИСО 1519).
- возможность нанесения на различные виды подложек (титан, нержавеющая сталь).
- 7) отношение Са/Р не менее 1.4

С точки зрения воздействия, на организм разрабатываемые композиционные материал должен отвечать следующим основным требованиям

- не вызывать токсического действия и не быть аллергеном;
- 2) не быть канцерогеном;
- 3) не вызывать антигенного воздействия;
- не вызывать свертывания крови и гемолиза;
- не вызывать денатурации и разложения белков и ферментов;
- не нарушать электролитический баланс и не вызывать отклонений в системе метаболизма.
- обладать высокими остеоиндуктивными свойствами.

Ученый секретарь, к.м.н

A Дворниченко М.В

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ Томский филнал Федерального государственного учреждения «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова Росмедтехнологий»

# ВЫПИСКА из протокола заседания Ученого совета №6 от «13» ноября 2009 г.

В составе совета \_\_\_\_\_18\_\_\_чел. Присутствовали: \_\_\_\_\_17\_\_\_чел.

Слушали: Научного сотрудника ТФ ФГУ "РНЦ "ВТО" Больбасова Е.Н с докладом : "Проект требований к перспективным биологически активным композиционным материалам на основе сополимеров тетрафторэтилена и фосфатов кальция для травматологии и ортопедии" по теме квалификационной работы «Технология и средства изготовления биоактивных композиционных материалов на основе фторполимеров и фосфатов кальция на поверхности имплантатов для травматологии и ортопедии».

Участвовали в голосовании:		17	чел.
Результаты голосования:	30	17	чел.,
	nnonius	0	чел.

#### По результатам голосования принято решение:

Решили: Утвердить проект требований к перспективным биологически активным композиционным материалам на основе сополимеров тетрафторэтилена и фосфатов кальция для травматологии и ортопедии по теме квалификационной работы Больбасова Е.Н. «Технология и средства изготовления биоактивных композиционных материалов на основе фторполимеров и фосфатов кальция на поверхности имплантатов для травматологии и ортопедии».

и.о.директора ТФ ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий» д.м.н., профессор

Учёный секретарь, канд. мед. наук



# Приложение 2 Приказ о расширение перечня уникального оборудования ТПУ

# МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

РАСПОРЯЖЕНИЕ

02.06. 2015

Nº 54/p

г. Томск

О расширении перечня уникального научного оборудования ТПУ

§1

На основании соответствия критериям уникального научного оборудования, установленным Департаментом стратегии и перспективных проектов в образовании и науке Минобрнауки РФ (письмо № 11-14 от 25.01.2010 г. с приложением «Анкета уникального научного оборудования») признать уникальными следующие установки, используемые для прикладных научных исследований, проводимых по Соглашению о предоставлении субсидии № 14.578.21.0031 от «05» июня 2014 г., в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014 - 2020 годы»:

- Магнетронная распылительная система Установка для нанесения кальцийфосфатных покрытий методом высокочастотного распыления мишени.
- Установка для аэродинамического формования полимерных материалов в турбулентном газовом потоке.

\$2

Продолжить дальнейшую модернизацию указанного оборудования с целью получения научных результатов, превосходящих мировые достижения.

Приложения:

- Анкета «Магнетронная распылительная система Установка для нанесения кальций-фосфатных покрытий методом высокочастотного распыления мишени».
- Анкета «Установка для аэродинамического формования полимерных материалов в турбулентном газовом потоке».

Проректор по научной работе и инновациям

Berent

А.Н. Дьяченко

В.А. Тарбоков (3822) 60 62 58

# Приложение 3 Лабораторный технологический регламент формирования полимерных каркасов методом аэродинамического формования.

Министерство образования и науки РФ федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УТВЕРЖДАЮ Даректор ИЯТШ ТНУ O.O. HOIMATOB 100 2018 1

ЛАБОРАТОРНЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ ФОРМИРОВАНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ КАРКАСОВ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА ВИНИЛИДЕНФТОРИДА С ТЕТРАФТОРЭТИЛЕНОМ МЕТОДОМ АЭРОДИНАМИЧЕСКОГО ФОРМОВАНИЯ

Разработчик: инженер лаборатории гибридных биоматериалов ИЯТШ ТПУ

Е.Н. Больбасов rin2 hTQ. 2018 г.

Томск 2018

ı.

Приложение 4 Акт об использование результатов диссертационной работы



AKT

об использовании результатов диссертационной работы Больбасова Е.Н. в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечнососудистых заболеваний»

Настоящий акт составлен представителями ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ) по результатам проведенных совместно с Томским политехническим университетом (ТПУ) экспериментальных исследований полимерных каркасов на основе сополимера с винилиденфторида с тетрафторэтиленом. Для изготовления полимерных каркасов использовалась, в том числе, разработанная Е.Н. Больбасовым установка формования полимерных материалов в турбулентном газовом потоке, которая была отнесена к разряду уникальных научных установок ТПУ.

Использование установки позволило определить основные технологические факторы (концентрации полимерного раствора, давление сжатого газа, количество прядильного раствора), влияющие на морфологические характеристики нетканых материалов, определить физико-химические свойства каркасов. Изготовленные полимерные каркасы имеют высокое отношение площади поверхности к общему объему, обладают высокой биосовместимостью.

Полимерные каркасы, разработанные в диссертационной работе Больбасова Е.Н., используются в НИИ КПССЗ для изучения в сравнительном аспекте свойств полимерных имплантатов, в том числе, при проведении экспериментов с использованием клеточных технологий и в биологических моделях при тестировании полимерных имплантатов на лабораторных животных.

Директор НИИ КПССЗ,

член-корреспондент РАН, профессор



О.Л. Барбараш
# Приложение 5 Акт об использование результатов диссертационной работы

# Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» (Томский НИМЦ)

Кооперативный пер., д. 5, Томск, 634009, тел./ факс (3822) 51 10 39/ 51 40 97, e-mail: center@thimc.ru ОКПО 01895186, ОГРН 1027000861568, ИНН/КПП 7019011979/701701001

28.03.2017

Nº 02-564

#### AKT

об использовании результатов диссертационной работы Больбасова Е.Н. в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Настоящий Федерального акт составлен представителями бюджетного научного «Томский государственного учреждения национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ) по результатам проведенных совместно с Томским политехническим университетом (ТПУ) экспериментальных исследований полимерных каркасов на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом, изготовленных на разработанной в ТПУ уникальной научной установке формования полимерных материалов в турбулентном газовом потоке (распоряжение ТПУ № 54/р от 02.06.2015).

Полимерные каркасы, изготовленные методом аэродинамического формования, в режимах, подобранных Е.Н. Больбасовым, характеризуются сложной организацией на микро- и макроуровнях, являются не токсичными, обладают высокой биосовместимостью, стимулируют ангиогинез, интегрируются с живыми тканями лабораторных животных.

Использование разработанных каркасов позволило развить современные подходы к выбору имплантатов для замещения сложных пострезекционных дефектов у онкологических больных.

По результатам совместной работы была определена возможность использования полимерных каркасов на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом для реконструктивновосстановительной хирургии мягких тканях, даны рекомендации по дальнейшим исследованиям и применению в клинической практике.

Директор Томского НИМЦ, Е.Л. Чойнзонов академик РАН, профессор С.н.с., к.м.н. Д.Е. Кульбакин НИИ онкологии Томского НИМЦ

181

# Приложение 6 Акт об использование результатов диссертационной работы

ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ФИЛИАЛ ТОМСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КУРОРТОЛОГИИ И ФИЗИОТЕРАПИИ (Филиал ТНИИКиФ ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России) 634026, г.Томск, ул.Р.Люксембург, д.1 Тел: (382-2) 512-005; Факс: (382-2) 512-115 E-Mail: prim@niikf.tomsk.ru OFPH 1147024000309. ИНН/КПП 7024038542/702401001 18-01 18.03 2014

No. Ha № OT

AKT

об использовании результатов диссертационной работы Больбасова Е.Н. в Филиале «Томский научно – исследовательский институт курортологии и физиотерации федерального государственного бюджетного учреждения «сибирский федеральный научно – клинический центр федерального медико-биологического агентства»

Настоящий акт составлен представителями Филиал ТНИИКиФ ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России по результатам проведенных совместно с Томским политехническим университетом (ТПУ) экспериментальных исследований полимерных и композитных каркасов на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом, изготовленных на разработанной в ТПУ экспериментальной установке формования полимерных материалов в турбулентном газовом потоке.

Полимерные и композитные каркасы, разработанные и изготовленные Больбасовым Е.Н., исследовались на пролиферативную активность фибробластов, динамики заселения биоматериала фибробластами, токсичность, апирогенность.

Исследованные материалы показали свою перспективность и были рекомендованы для дальнейшего использования в экспериментальных исследованиях ТНИИКиФ ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России в области регенеративной медицины с целью создании протоколов доклинических испытаний клеточных технологий лечения различных заболеваний, включая следующие направления:

апробация различных методик длительного культивирования стволовых клеток,

разработка новых методик выделения и применения аутологичных фибробластов,
отработка методик регенеративной терапии с применением каркасов в качестве носителей клеточного материала.

Директор Филиала ТНИИКиФ ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России

А.А. Зайцев ΜП

Заведующий экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий к.м.н. К.В. Зайцев

#### Приложение 7 Акт об использование результатов диссертационной работы



AKT

об использовании результатов диссертационной работы Больбасова Е.Н. в федеральном государственном бюджетном учреждение «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя - директора института молекулярной биологии и генетики, к.м.н. Костаревой А.А. и членов: заведующей лабораторией молекулярной биологии, к.б.н. Малашичевой А.Б., руководителя группы генно-клеточной инженерии, д.м.н. Головкина А.С. удостоверяем, что образцы полимерных каркасов, изготовленных на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом методами аэродинамического формования и электроформования, разработанные в ходе выполнения диссертационной работы «Эластичные интрамедуллярные имплантаты с остеоиндуктивным композиционным покрытием на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом и гидроксиапатита» Больбасовым Е.Н. применяются институтом молекулярной биологии и генетики ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России в качестве прототипов, для проведения биомедицинских исследований и экспериментов, направленных на разработку протяженных синтетических сосудистых имплантатов. Использование разработанных Больбасовым Е.Н. полимерных каркасов позволило установить диапазон оптимальных значений морфологических параметров (толщины стенки графта, внутреннего диаметра, открытой пористости, среднего диаметра волокон, формирующих каркас), обеспечивающих высокие показатели адгезии и жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток к поверхности каркаса при низких значениях некроза и апоптоза клеточной культуры. По результатам проведенных исследований разрабатываются рекомендации по возможному клиническому применению полимерных каркасов, а так же улучшению их медико-биологических свойств.

Председатель: Директор института молекулярной биологии и генетики, к.м.н. Заведующий лабораторией молекулярной биологии, к.б.н. Руководитель группы генно-клеточной инженерии, д.к.н.

Костарева А.А. Малашичева А.Б.

Головкин А.С. <u>Кос</u>т реребона А Подпись <u>Меля инчеевой</u> Б. удостоверято Голования А Специаниет отасы престака «15» «Сромины миссика <u>М. В. Тир емо бъ. Мич</u> «<u>19</u>» <u>08</u> 20 <u>Б.</u>

# Приложение 8 Лабораторный технологический регламент формирования композиционных покрытий

Министерство образования и науки РФ федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»



ЛАБОРАТОРНЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ ФОРМИРОВАНИЯ КОМПОЗИЦИОННЫХ ПОКРЫТИЙ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА ВИНИЛИДЕНФТОРИДА С ТЕТРАФТОРЭТИЛЕНОМ И ГИДРОКСИАПАТИТА НА ПОВЕРХНОСТИ СТАЛЬНЫХ ЭЛАСТИЧНЫХ ИНТРАМЕДУЛЛЯРНЫХ ИМПЛАНТАТОВ

Разработчик: инженер лаборатории гибридных биоматериалов ИЯТШ ТПУ

Е.Н. Больбасов Va 2018 r.

Томек 2018

# Приложение 9 Патент на изобретение



# Приложение 10 Акт об использовании результатов диссертационной работы

МИНОБРНАУКИ РОССИИ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» (БФУ им. И. Канта) Ne 00 /30 "By sevence 2017 r. г. Каленинград Утверждаю» Проректор ис научной работе БФУ ны. И. Канта Зильбер Э.К. 2017 r. AKT об использовании результатов диссертационной работы Е.Н. Больбасова «Эластичные интрамедуллярные имплантаты с остеонидуктивными композиционными покрытиями на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом и гидроксиапатита» в Лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Балтийского федерального университета имени Иммануила Канта Мы нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя зав. Лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий, д-ра мед. наук Литвиновой Л.С. и членов комиссии: научного сотрудника Лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий, канд. биол. наук Шуплецовой В.В., научного сотрудника Лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий, канд. мед. наук Юровой К.А. настоящим удостоверяем, что образцы композиционных каркасов на основе сополимера вниклюденфторида с тетрафторэтиленом и гидроксианатита, разработанные в ходе выполнения диссертационной работы

с тетрафторэтиленом и гидроксиапатита, разработанные в ходе выполнения диссертационной работы Больбасовым Е.Н., применяются в биомедицинских экспериментах в качестве тест – систем, при исследованиях развития остеонидуктивных и/или воспалительных (остеолитических) процессов в организме в ответ на имплаитацию искусственных материалов, с учетом индивидуальных особенностей организма, проводимых Лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий в рамках проекта РНФ №16-15-10031. Применение композиционных каркасов существенно расширяет линейку искусственных материалов для тестирования, материалами, обладающими пьезоэлектрическими свойствами, что позволяет получать новые экспериментальные данные об особенностях взаимодействия костной ткани с электрически активными искусственными структурами.

#### Председатель комиссии:

зав. Лабораторней иммунологии и клеточных биотехнологий, д-р мед. наук

Члены комиссии:

н.е. Лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий, канд. биол. наук

н.с. Лабораторни иммунологии и клеточных биотехнологий, канд. мед. наук Ляттвинова Л.С.

Шуплецова B.B.

Юрова К.А.



# Приложение 11 Патент на полезную модель

#### Приложение 12 Акт об использовании результатов диссертационной работы

#### МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедни» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ФГБУ «ННИИТО» Минздравсопразвития России)

> Фрунзе ул., 17, Новосибирск, 630091 телефоны: (383) 363-31-31, факс: (383) 224-55-70 E-mail: niito@niito.ru ОГРН 1035402451765, ИНН/КПП 5406011563/540601001

No. 23. 12. 2011 or 01-16/45 на №

AKT

об использовании результатов диссертационной работы Больбасова Е.Н. в ФГБУ «ННИИТО» Минздравсоцразвития России

-Настоящий акт составлен представителями Новосибирского научноисследовательского института травматологии и ортопедии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию по результатам проведенных совместно с КНПО «Биотехника» и Томским политехническим университетом экспериментальных исследований титановых спиц для остеосинтеза с композитным покрытием на основе сополимера тетрафторэтилена с винилиденфторидом, наполненного гидроксиапатитом патент РФ № 2428207 от 2010.05.05 г.

На спицы для остеосинтеза изготовленные в соответствие патентом РФ на полезную модель № 107473 от 2011.03.11 для улучшения их функциональных свойств и увеличения биологической активности нанесено биологически активное покрытие сохраняющие свою целостность в ходе процедуры хирургического вмешательства.

Использование разработанных спиц и покрытий позволило существенно улучшить функциональные свойства и биологическую активность спиц для остеосинтеза. Применение спиц для остеосинтеза с биологически активным покрытием в аппаратах внешней фиксации, позволяет увеличить жесткость фиксации костных отломков и сократить сроки реабилитации пациентов.

По результатам совместной работы были даны рекомендации по применению спиц с композитным покрытием на основе тетрафторэтилена с винилиденфторидом, наполненного гидроксиапатитом, в клинической практике.

Директор института, д.м.н., профессор

М.А. Садовой

И.В. Пронских

Старший научный сотрудник к.м.н.

# Приложение 13 Акт об использование результатов диссертационной работы

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени вклдемика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации ФГБУ «РИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава России.

 ya. M. Yanamoroli, r. Kypran, 640014, Poenna Tun. (352-2) 45-47-47, quice (352-2) 45-40-60, 45-45-05 E-mail: officer@rucets.cu. Internet: www.ilinarov.cu

> УТВЕРЖДАЮ Директор ФГБУ «РИЦЕНТО) им. академика Г.А.Изизарова д.м.н. Губин А.В. «С2 и июня 2017

17/11/10

#### AKT

об использовании результатов диссертационной работы Больбасова Е.Н. в федеральном государственном бюджетном учреждение «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Мы нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя – гл. науч. сотр., д.м.н., профессора Попкова А.ВФ. и членов комиссии: ведущего нач. сотрудника, к.в.н. Кононович Н.А., руководителя клиники «Нейроортопедии» д.м.н. Попкова Д.А. удостоверяем, что образцы стальных эластичных интрамедуллярных имплантатов с биологически активным композиционным покрытием на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом и гидроксиапатита, разработанные в ходе выполнения диссертационной работы «Эластичные интрамедуллярные имплантаты с остеоиндуктивным композиционным покрытием на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом и гидроксиапатита» Больбасова Е.Н. применяются в качестве армирования длинных трубчатых костей при удлинении и исправления деформаций конечностей, а также при доклинических испытаниях новых технологий лечения переломов костей конечности, при замедленной консолидации и псевдоартрозах длинных трубчатых костей.

Использование разработанных Больбасовым Е.Н. полимерных покрытий, позволило установить диапазон оптимальных значений параметров (толщины покрытия, открытой пористости, количественную оценку биологической активности покрытия), обеспечивающих высокие показатели адгезии и жизнеспособности культуры мезенхимальных стволовых клеток к поверхности имплантата при практическом отсутствии некроза или воспаления окружающих тканей.

По результатам проведенных исследований разработаны рекомендации по клиническому применению разработанных биологически активных имплантатов, а так же намечены пути улучшения их медико-биологических свойств и разработки принципиально новых деградируемых имплантатов для замещения костных дефектов.

Председатель: Гл. науч. сотр. начно-клинич. лаборатории «Коррекции леформация»	
и удлинения конечностей», д.м.н., профессор	(Попков А.В.)
Ведущий науч. сотр. экспериментального водать с с с с с с с с с с с с с с с с с с с	(Кононович Н.А.)
Руководитель клиники «Нейроортеледина»	(Попков Д.А.)
Подписи Попкова А.В., Кононовичен А. и Попкова Д.А. удостоверяю. Уч секретарь РНЦ «ВТО» им. академика Г.А.Илизарова, к.б.в.	(Овчинников Е.Н.)

Система менедамента качества сертифицирована на соответствие ISO 9001:2008

### Приложение 14 Акт об использование результатов диссертационной работы



or 25.10.2013r.

#### Вышясной эпикрал

#### Кибирева Алина Денисовна, 22.05.2003г.р.,

находилась на стационарном лечении и травматолого-ортопелическом отделении №13 ФГБУ РНЦ «ВТО» с

Диагиюх: Врожденное укорочение левой нижней конечности Зсм. Вальгусная деформация левого коленного сустава 160°, наружная торсия левого бедра.

#### Проведена операции:

05.08.2013г. - Монолокальный листракционный остеосинтез веного бедра аппаратом Илизарова с интрамедуллярным армированием спицами с биоактивным покрытием (пластик+ГА). Остеотомия в нижней quent senior desperiment neuri-

Ранних послеоперационных осложнений нет. Получала лечение обезболивающие препараты, антибиотики, перевязки, ЛФК:

Левое бедро удлиненно на 4см, период дистракции 43 дия. ИФ = 7.6 дв/см. 24.10.2013г. - аппарат Илизарова демонтирован

На момент выписки девая нижняя конечность длиннее на 1см, неь конечности правильная, функция сустава сохранена.

Гекомендовано:

- Ходьба с постепенню возрастающей нагрузкой;
- 2. ЛФК коленного сустава;
- 3. Массаж мышп левой нижней конечности:
- 4. Явка на контрольный осмотр через 2 месяца.

