

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

На правах рукописи

Дубиненко Глеб Евгеньевич

**БИОАКТИВНЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ
ПОЛИ (ϵ -КАПРОЛАКТОНА) И ГИДРОКСИАПАТИТА ДЛЯ
РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНЫХ ТКАНЕЙ: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА**

1.3.8 – Физика конденсированного состояния

2.2.12 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата технических наук

Научный руководитель
кандидат физико-математических наук,
доцент НОЦ им. Б.П. Вейнберга,
Твердохлебов С.И.

Томск – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. Современные композиционные биорезорбируемые материалы для инженерии костной ткани.....	16
1.1 Строение костных тканей и принципы разработки материалов для их регенерации.....	16
1.1.1 Особенности строения и структурообразования костных тканей.....	16
1.1.2 Основные требования к материалам для остеосинтеза и инженерии костной ткани	18
1.2 Материалы для регенерации крупных дефектов костных тканей	19
1.2.1 Биорезорбируемые алифатические полиэфиры	23
1.2.2 Биоактивные композиционные материалы для регенерации костных тканей	25
1.2.2.1 Остеоиндуктивные фосфаты кальция	25
1.2.2.2 Композиционные материалы на основе биоразлагаемых полиэфиров и фосфатов кальция.....	27
1.2.2.3 Изготовление персонализированных имплантатов для замещения крупных костных дефектов	28
1.3 Модифицирование поверхности скаффолдов для регенерации костных тканей	34
1.3.1 Изменение морфологии поверхности.....	34
1.3.2 Иммобилизация биологически активных макромолекул.....	35
1.3.3 Химическое модифицирование и введение функциональных групп.....	36
1.3.4 Кальций-фосфатные покрытия	37
1.4 Постановка цели и задач диссертационного исследования	38
Глава 2. Материалы, методы и методология исследования	40
2.1 Материалы исследования.....	40
2.2 Способ получения композиционных материалов.....	41
2.3 Изготовление филаментов для 3D печати	42
2.4 3D печать скаффолдов.....	42

2.5	Способ обработки в смеси «растворитель/нерастворитель»	43
2.6	Методы исследований физико-химических свойств композиционных материалов и скаффолдов.....	44
2.6.1	Сканирующая электронная микроскопия	44
2.6.2	Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия.....	45
2.6.3	Термогравиметрический анализ.....	45
2.6.4	Дифференциальная сканирующая калориметрия	45
2.6.5	Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье	45
2.6.6	Рентгенофазовый анализ.....	46
2.6.7	Гель-проникающая хроматография	46
2.6.8	Одноосное сжатие	47
2.6.9	Эффект памяти формы.....	47
2.7	Методы исследования биологических свойств композиционных скаффолдов.....	48
2.7.1	Оценка жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток на поверхности скаффолдов.....	48
2.7.2	Оценка остеогенной дифференцировки остеобластов при культивировании со скаффолдами	49
2.7.3	Остеоинтеграция скаффолдов при имплантации в область костного дефекта с использованием лабораторных животных	50
2.7.3.1	Замещение дефекта носовой кости.....	50
2.7.3.2	Морфологическая оценка тканей в области имплантации.....	52
2.7.3.3	Замещение радиального дефекта большеберцовой кости.....	52
2.8	Статистическая обработка результатов	55
Глава 3.	Влияние способа получения и состава на физико-химические и структурно-фазовые свойства композиционных материалов	56
3.1.	Морфология и элементный состав	57
3.2.	Термические свойства	58

3.3. Структурно-фазовое строение	61
Глава 4. Влияние состава композиционных материалов на параметры формирования биомиметических скаффолдов, их физико-химические и функциональные свойства	66
4.1. Режим 3D печати.....	67
4.2. Морфология скаффолдов	69
4.3. Механические свойства скаффолдов	71
4.4. Эффект памяти формы	72
4.5. Молекулярно-массовые характеристики полимерной матрицы	74
4.6. Биосовместимость скаффолдов <i>in vitro</i>	78
4.7. Биосовместимость и биоактивность скаффолдов <i>in vivo</i>	80
Глава 5. Влияние поверхностного модифицирования композиционных биомиметических скаффолдов смесью «растворитель/не растворитель» на их функциональные свойства	84
5.1. Морфология модифицированных скаффолдов.....	84
5.2. Физико-химические характеристики поверхности модифицированных скаффолдов.....	86
5.3. Биосовместимость и биоактивность модифицированных скаффолдов <i>in vitro</i>	88
5.4. Биосовместимость и биоактивность модифицированных скаффолдов <i>in vivo</i>	89
ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98
ПРИЛОЖЕНИЕ А Акты об использовании результатов диссертационной работы в исследованиях и экспериментальной клинической практике	116
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Акт внедрения в научную деятельность	120
ПРИЛОЖЕНИЕ В Акт о внедрении в инновационную деятельность	121
ПРИЛОЖЕНИЕ Г Патент № 2775108 РФ от 28.06.22	122
ПРИЛОЖЕНИЕ Д Патент № 780930 РФ от 04.10.22.....	123

ПРИЛОЖЕНИЕ Е Патент № 2813693 РФ от 15.02.24.....	124
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж Патент № 2815644 РФ от 19.03.24.....	125
ПРИЛОЖЕНИЕ З Патент № 2820632 РФ от 06.06.24	126

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В условиях общего снижения уровня инвалидизации населения в последние десятилетия заболевания опорно-двигательной системы продолжают оставаться значимой медицинской и социальной проблемой. Несмотря на успехи современной травматологии в профилактике и лечении заболеваний, травматизм, общее старение населения и врождённые патологии приводят к сохранению высокого уровня распространенности заболеваний костно-мышечной системы. Одной из наиболее сложных задач в современной ортопедии и травматологии является хирургическое лечение крупных дефектов костей, в частности, радиальных повреждений. В связи с этим, поиск новых методов и материалов для повышения эффективности консолидации костных тканей и сокращения сроков лечения является крайне актуальным направлением исследований. Перспективным подходом в этой области является применение методов тканевой инженерии, заключающихся в использовании функциональных материалов, стимулирующих рост живых тканей. Как правило, такие материалы должны быть биорезорбируемыми и обладать биоактивными свойствами. На сегодняшний день в качестве материалов для создания биорезорбируемых имплантатов в травматологии и ортопедии широко исследуются линейные алифатические полиэфиры, в числе которых полимолочная кислота (ПМК), поли(ϵ -капролактон) (ПКЛ) и полигликолиевая кислота (ПГК), а также их сополимеры. Однако их основным недостатком является отсутствие биоактивных свойств, что ограничивает их эффективность при регенерации костных тканей. В связи с этим актуальной задачей медицинского материаловедения становится разработка биорезорбируемых композиционных материалов, состоящих из алифатических полиэфиров и биологически активных наполнителей, таких как фосфаты кальция различной химической и кристаллической структуры. Разработка таких материалов позволит существенно повысить эффективность лечения и сократить сроки остеосинтеза в клинической практике.

Степень разработанности темы исследования. Разработка и исследование композиционных материалов на основе биоразлагаемых полиэфиров для инженерии костных тканей выполняются в ряде ведущих исследовательских групп в России и за рубежом. Известны работы научных групп Университета науки и технологий МИСИС (Ф.С. Сенатов, Россия), НИЦ Курчатовского центра (С.Н. Чвалун, Россия), университета Саленте (С. Esposito Corcione, Италия), Квинслендского университета (D. Nutmacher, Австралия), университета Гренобль-Альпы (С. Picart, Франция). В Лаборатории плазменных гибридных систем НОЦ им. Б.П. Вейнберга Национального исследовательского Томского политехнического университета под руководством С.И. Твердохлебов более 10 лет ведутся разработки по созданию и функционализации полимерных, металлических и керамических материалов для создания имплантируемых изделий медицинского назначения.

Исследования показывают, что фосфаты кальция обладают высокой эффективностью в качестве наполнителей полимерных имплантатов для регенерации костных тканей. Добавление фосфатов кальция в полимерную матрицу обеспечивает биосовместимость имплантатов и способствует их лучшей остеоинтеграции. Эти характеристики делают композиционные материалы на основе алифатических полиэфиров и фосфатов кальция перспективными для использования в ортопедии и травматологии. Однако влияние высоких степеней наполнения биоактивными компонентами на физико-химические, биологические и технологические свойства таких материалов остаётся недостаточно изученным. Композиционные материалы с высоким содержанием наполнителя, превышающим 20 масс.%, способны более точно имитировать химический и фазовый состав костной ткани. Это, в свою очередь, может способствовать ускорению остеоинтеграции имплантатов и сокращению сроков остеосинтеза. Изучение и оптимизация таких высоконаполненных композиций является актуальной задачей.

Исходя из проведённого анализа, была сформулирована **цель работы** – разработка высоконаполненных биоактивных композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита для использования в качестве

материала 3D печати биомиметических скаффолдов для регенерации костных тканей.

Для достижения поставленной цели сформулированы и решены следующие **задачи**:

1. Разработать способ получения композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
2. Разработать режимы изготовления композиционных филаментов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
3. Определить оптимальные условия FDM 3D печати биомиметических скаффолдов из композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
4. Исследовать влияние способа получения и массовой доли гидроксиапатита на физико-химические и структурно-фазовые свойства композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
5. Исследовать влияние массовой доли гидроксиапатита на физико-химические и биологические свойства биомиметических скаффолдов, изготовленных методом FDM 3D печати из композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
6. Разработать способ функционализации поверхности биомиметических скаффолдов, изготовленных из композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита, для стимулирования остеогенной дифференцировки остеобластов на их поверхности.

Научная новизна:

1. Впервые предложен способ изготовления высоконаполненных композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита путём смешивания в низкоскоростной шаровой мельнице раствора поли (ϵ -капролактона) в ацетоне с порошком гидроксиапатита. Предложенный способ позволяет получить композиционные материалы с наполнением гидроксиапатитом до 40 масс.%, эффективностью наполнения от 84 до 94% и гомогенным

распределением наполнителя в полимерной матрице. Полученные композиционные материалы обладают высокой термической и химической стабильностью.

2. Для полученных композиционных материалов с наполнением гидроксиапатитом до 40 масс.% определены оптимальные режимы FDM 3D печати скаффолдов с биомиметической структурой в форме гироида. Установлены зависимости между массовой долей гидроксиапатита в материале и технологическими, физико-химическими и биологическими свойствами скаффолдов.

3. Впервые предложен способ закрепления частиц гидроксиапатита на поверхности скаффолдов путём обработки в смеси «растворитель/нерастворитель». Установлено, что обработка биомиметических скаффолдов из композиционных материалов суспензией гидроксиапатита в смеси толуола и этанола позволяет закрепить на их поверхности частицы гидроксиапатита. Частицы гидроксиапатита индуцируют остеогенную дифференцировку остеобластов на поверхности скаффолдов и обеспечивают остеоинтеграцию скаффолдов при имплантации в область радиального дефекта трубчатой кости.

Теоретическая значимость заключается в получении новых научных результатов, имеющих фундаментальное значение в областях медицинского материаловедения и разработки медицинских изделий для регенерации костных тканей. В работе установлены ключевые положения, касающиеся получения биорезорбируемых композиционных материалов на основе поли(ϵ -капролактона) и гидроксиапатита, обладающих биоактивными свойствами. Выявлены закономерности влияния состава композиционных материалов на технологические параметры 3D печати биомиметических скаффолдов по технологии FDM, их физико-химические и механические свойства, а также биосовместимость. Установлены новые взаимосвязи между массовой долей наполнителя, химическим составом, термическими и механическими свойствами, структурно-фазовым строением полученных композиционных материалов и изготовленных из них методом FDM 3D печати биомиметических скаффолдов. Установленные

закономерности способствуют развитию фундаментальных и прикладных знаний о биорезорбируемых композиционных материалах для регенерации костных тканей.

Практическая значимость состоит в том, что выявленные закономерности влияния состава и способа получения композиционных материалов на их физико-химические, биологические и технологические свойства могут быть использованы для создания новых биорезорбируемых медицинских изделий, предназначенных для регенерации костных тканей. Результаты исследования были внедрены в научную деятельность и экспериментальную клиническую практику в ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России (Акты об использовании результатов диссертационной работы в исследованиях и экспериментальной клинической практике утверждены заместителем директора по научной работе, к.б.н., Е.Н. Овчинниковым) (Приложение А), в научную деятельность ФГБОУ ВО СЗГМУ имени И.И. Мечникова Минздрава России (Акт внедрения в научную деятельность утверждён д.м.н., профессором, проректором по науке и инновационной деятельности Н.В. Бакулиной) (Приложение Б) и в инновационную деятельность ООО ИТК Эндопринт (Акт о внедрении в инновационную деятельность утверждён операционным директором А.А. Казанбаевой) (Приложение В). Разработанные в рамках исследования материалы в виде медицинского изделия «Биорезорбируемый композиционный материал на основе поликапролактона и гидроксиапатита» внесены в Перечень перспективных для коммерциализации результатов исследований и разработок (Витрина перспективных разработок) на платформе ЕГИСУ НИОКТР. Созданы 5 объектов интеллектуальной собственности – патенты: «Деградируемый биоактивный имплантат для замещения циркулярных дефектов трубчатых костей» (патент № 2775108 РФ от 28.06.22), «Цилиндрический биоактивный имплантат для замещения циркулярных дефектов трубчатых костей» (патент № 780930 РФ от 04.10.22), «Полимерный композиционный материал для 3D печати изделий медицинского назначения» (патент № 2813693 РФ от 15.02.24), «Способ получения полимерного композиционного материала для изготовления изделий медицинского назначения» (патент № 2815644 РФ от 19.03.24), «Серкляжное

полотно для охватывающей фиксации костных отломков и осколков при переломах и дефектах длинных костей» (патент № 2820632 РФ от 06.06.24).

Объект исследования: композиционные материалы на основе поли (ϵ -капролактона), наполненного гидроксиапатитом, а также изготовленные из них методом 3D печати пористые скаффолды.

Предмет исследования: физико-химические, структурно-фазовые, механические и медико-биологические свойства полимерных композиционных материалов, а также изготовленных из них методом 3D печати биомиметических скаффолдов.

Методология и методы исследования. В основе методологии проведённого исследования лежал системный научный подход, направленный на выявление взаимосвязей между составом, структурой и технологией получения композиционных материалов на основе биоразлагаемых полиэфиров, а также их свойствами, определяющими эффективность применения в тканевой инженерии костной ткани. Основной гипотезой является предположение о том, что увеличение содержания гидроксиапатита в композиционном материале на основе поли (ϵ -капролактона) свыше 10-20 масс.% приведёт к повышению биоактивных свойств при сохранении высокой эластичности, термической и химической стабильности материала благодаря свойствам выбранной полимерной матрицы.

Композиционные материалы получали смешиванием раствора поли (ϵ -капролактона) в ацетоне с порошком гидроксиапатита с использованием шаровой мельницы, разработанной в Лаборатории плазменных гибридных систем НИ ТПУ. Композиционные филаменты для 3D печати биомиметических скаффолдов изготавливали на одношнековом экструдере Filabot EX2 (Filabot HQ, США). Композиционные биомиметические скаффолды получали методом Fused deposition modeling (FDM) 3D печати с использованием 3D принтера Ultimaker S5 (Ultimaker, Нидерланды). Для комплексного анализа материалов были применены современные физико-химические и механические методы. Химический состав и распределение элементов определяли с помощью ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье (ИКФС) и энергодисперсионного рентгеновского анализа

(ЭДС). Фазовый состав исследовали методом рентгеновской дифрактометрии (РФА). Для оценки тепловых свойств и степени кристалличности полимеров использовали дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) и термогравиметрический анализ (ТГА). Молекулярно-массовые характеристики определяли методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ). Морфология поверхности и распределение наполнителя вблизи поверхности анализировались с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Механические свойства образцов оценивали при сжатии. Исследования биосовместимости *in vitro* были проведены методом оценки жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток на поверхности скаффолдов. Для исследования биоактивности *in vitro* использовался метод оценки остеогенной дифференцировки остеобластов на поверхности скаффолдов. Биосовместимость и биоактивность *in vivo* изучали с использованием лабораторных животных в экспериментах с замещением крупного радиального дефекта большеберцовой кости барана и замещения дефекта носовой кости кролика. Статистическую обработку полученных экспериментальных результатов осуществляли с помощью программных комплексов Prism software (GraphPad, США) и OriginPro (OriginLab Corporation, США).

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ получения композиционных материалов для 3D печати биомиметических скаффолдов на основе ПКЛ с наполнением до 40 масс.% ГА, заключающийся в смешивании в шаровой мельнице при скорости вращения 72 об/мин в течение 12 часов раствора ПКЛ в ацетоне и порошка ГА с последующим удалением ацетона при нагреве до 150 °С в течение 20 минут. Способ обеспечивает получение композиционных материалов с гомогенным распределением ГА в полимерной матрице с эффективностью наполнения до 94%.

2. Разработаны оптимальные режимы FDM 3D печати скаффолдов с биомиметической структурой в форме гироида из композиционных материалов на основе ПКЛ с наполнением ГА до 40 масс.%. Установлено, что скаффолды с наполнением ГА 40 масс.% сохраняют эластичность, сопоставимую с эластичностью скаффолдов из ПКЛ, характеризуемую пределом текучести, равным

3,4 МПа, и стимулируют увеличение количества активных остеобластов при имплантации в область костного дефекта.

3. Обработка биомиметических скаффолдов из ПКЛ и из композиционных материалов на основе ПКЛ и ГА смесью «растворитель/не растворитель» на основе толуола и этилового спирта в объёмном соотношении 3:7 с добавлением 10 масс.% порошка гидроксиапатита позволяет закрепить на их поверхности частицы гидроксиапатита, стимулирующие усиление остеогенной дифференцировки в 1,5-2 раза в сравнении с позитивным контролем с добавлением остеофакторов и обеспечивающие остеоинтеграцию скаффолда при имплантации в область радиального дефекта большеберцовой кости со значением рентгенологической плотности костного регенерата к 30-му дню после имплантации, составляющим 76% от плотности минерализованных костных структур.

Степень достоверности результатов обеспечивается применением современных аналитических методов и оборудования, а также их сопоставлением с данными, представленными в литературе по композиционным полимерным материалам для костной регенерации. Обоснованность выводов подтверждается корректной обработкой экспериментальных данных с использованием статистических методов.

Апробация результатов исследования. Результаты диссертационного исследования были представлены в форме докладов на 11 всероссийских и международных конференциях, конгрессах и саммитах: «International Congress on Energy Fluxes and Radiation Effects» (Томск, 2018 г.); Всероссийский научный семинар «Междисциплинарные проблемы аддитивных технологий» (Томск, 2018); Международная конференция «Перспективные материалы конструкционного и медицинского назначения» (Томск, 2018); Международная конференция «Наноматериалы и биоматериалы» (Барселона, 2018); Международная конференция «Перспективные материалы конструкционного и медицинского назначения» (Томск, 2019); Международная конференция «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2019 и 2022 г.); Саммит молодых учёных и инженеров «Большие вызовы для общества, государства и науки» (Сочи,

2019); Международная конференция «Ломоносов 2020» (Москва, 2020), Международная конференция «StemCellBio 2023» (Санкт-Петербург, 2023); Международная конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2023).

Связь работы с научными программами и темами. Результаты научно-квалификационной работы получены, в том числе при выполнении проектов:

– ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса на 2014-2020 годы», соглашение № 14.575.21.0140, «Разработка остеостимулирующих имплантатов на основе гибридных технологий модифицирования их поверхности и компьютерного моделирования выхода лекарственных препаратов для персонализированной медицины при политравме и онкологии» (2017–2020, руководитель – С.И. Твердохлебов, в числе исполнителей – Г.Е. Дубиненко);

– Приоритет-2030-НИП/ИЗ-127-375-2023 «3D полимерные имплантаты и материалы для остеозамещения», научно-исследовательская политика и политика в области инноваций и коммерциализации разработок, стратегический проект «Инженерия здоровья» (2023, руководитель работ по биорезорбируемым имплантатам – С.И. Твердохлебов, в числе исполнителей – Г.Е. Дубиненко);

– Госзадание «Разработка фундаментальных основ создания материалов, изделий, средств доставки, устройств контроля и визуализации для персонифицированной медицины и онкологии» шифр научной темы «FSWW-2023-0007» (2023–2025, руководитель – С.И. Твердохлебов, в числе исполнителей – Г.Е. Дубиненко).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие во всех этапах выполнения диссертационного исследования – от постановки задач до анализа и интерпретации результатов. Автором самостоятельно разработана экспериментальная схема, выполнены ключевые этапы получения и исследования композиционных материалов, а также проведена обработка и анализ физико-химических и биологических характеристик полученных образцов, включая обработку и анализ полученных данных, а также обработка и анализ результатов

экспериментов *in vitro* и *in vivo*. Результаты исследований оформлены автором в виде тезисов, статей, опубликованных в российских и зарубежных изданиях, представлены на всероссийских и международных конференциях и конкурсах, оформлены в виде текстов патентов. Совместно с научным руководителем С.И. Твердохлебовым обсуждались промежуточные и финальные результаты, касающиеся свойств композитов и скаффолдов. Отдельные аспекты работы выполнялись при участии соавторов, имена которых приведены в перечне публикаций по теме диссертации.

Публикации. По теме диссертации Г.Е. Дубиненко опубликовано 16 работ, в том числе 7 статей в журналах, индексируемых в базе данных Scopus, 8 публикаций в сборниках материалов международных научных, научно-практических, научно-технических конференций, 1 монография. В опубликованных работах достаточно полно изложены материалы диссертации.

Структура и объём диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка условных обозначений и сокращений, списка литературы и приложений. Материалы диссертации изложены на 126 страницах, содержат 34 рисунка, 4 таблицы и 8 приложений.

Глава 1. Современные композиционные биорезорбируемые материалы для инженерии костной ткани

1.1 Строение костных тканей и принципы разработки материалов для их регенерации

1.1.1 Особенности строения и структурообразования костных тканей

Создание новых материалов для костных имплантатов предполагает опору на знания о химических, физических и механических характеристиках естественной костной ткани, которые служат ориентиром при разработке биосовместимых систем, способных обеспечивать её восстановление и интеграцию

Кость представляет собой сложную иерархически упорядоченную структуру, представленную на рисунке 1.1 [1–3]. В этой структуре гармонично сочетаются такие противоположные свойства, как механическая прочность и функциональная пластичность, процессы новообразования и разрушения. На микроуровне костная ткань состоит из клеток и межклеточного вещества. Понимание клеточного состава костной ткани является ключевым для обоснованного выбора методов оценки биологических свойств материалов, включая биосовместимость, адгезию клеток и способность индуцировать формирование костного матрикса на поверхности. К основным клеточным элементам костной ткани относятся остеобласты, остециты и остеокласты [2,4].



Рисунок 1.1 – Структура кости [1]

Остеобласты представляют собой специализированные клетки костной ткани, ответственные за процессы костной регенерации. Они локализируются в областях активного костеобразования, преимущественно на внутренних и внешних поверхностях кости [5]. По завершении процесса формирования костного матрикса остеобласты подвергаются дифференцировке в остеоциты – зрелые клетки, располагающиеся в костных лакунах, где они образуют выстилающий слой, отделяющий костную ткань от сосудистого русла.

Остеоциты – клетки, происходящие из остеобластов. Они полностью зафиксированы в межклеточном веществе и контактируют отростками друг с другом. Остеоциты являются основными регуляторами метаболических процессов в костной ткани. Они преимущественно располагаются в периостальной области, а также на внутренних поверхностях костных структур. [5]. Остеоциты участвуют в поддержании гомеостаза костной ткани и способны дифференцироваться в остеобласты и остеокласты.

Остеокласты представляют собой многоядерные клетки, отвечающие за резорбцию костной ткани. Их активность направлена на разрушение костного матрикса, что в сочетании с синтетической функцией остеобластов обеспечивает сбалансированный процесс ремоделирования кости [5]. Динамическое взаимодействие между остеобластами и остеокластами лежит в основе непрерывной регенерации костной ткани, позволяя организму адаптироваться к изменяющимся механическим нагрузкам за счёт оптимизации структурных и функциональных характеристик скелета, таких как жёсткость, прочность и эластичность.

Органическая матрица костной ткани преимущественно представлена коллагеном, составляющим около 90–95% от общего содержания органических компонентов. Коллаген выполняет ключевую структурную функцию, придавая кости форму и обеспечивая её прочность на растяжение. Неорганическая часть костного матрикса состоит в основном из кальциевых фосфатов, а также содержит карбонаты, фториды, гидроксиды и цитраты. Минеральные компоненты поступают в костную ткань из плазмы крови, преимущественно через пищевые источники.

Кальциевые фосфаты представлены в виде кристаллического или частично кристаллизованного гидроксиапатита (ГА), а также в аморфной форме, что обеспечивает необходимую минеральную плотность и механическую прочность костной ткани [4].

1.1.2 Основные требования к материалам для остеосинтеза и инженерии костной ткани

Тканевая инженерия в настоящее время представляет собой одну из самых молодых и быстроразвивающихся областей медицины, базирующуюся на интеграции принципов молекулярной биологии, генной инженерии и материаловедения [6,7]. Междисциплинарный характер этого направления направлен главным образом на создание новых биокompозитных материалов, предназначенных для восстановления функций отдельных тканей или целых органов. Ключевой концепцией такого подхода является разработка и применение биорезорбируемых скаффолдов, которые внедряются в повреждённые ткани или органы и могут использоваться самостоятельно либо в комбинации с донорскими клетками и биоактивными агентами [8,9].

В контексте лечения заболеваний костной системы одной из главных задач тканевой инженерии является создание искусственных материалов с остеоиндуцирующими свойствами, а при восстановлении суставных поверхностей – материалов, способствующих хондрогенезу.

При проектировании костных имплантатов и тканеинженерных конструкций, ориентированных на имитацию свойств натуральной кости, необходимо учитывать ряд требований [4,10–12]:

- биосовместимость материала, исключая токсичность, воспалительные реакции, отторжение и нежелательные иммунные ответы;
- наличие биологической активности, в частности, способности стимулировать образование костной ткани (остеостимуляция);
- механическая прочность и стабильность свойств как в процессе изготовления, так и при эксплуатации имплантата в организме пациента;

- устойчивость к стерилизационным процедурам без ухудшения биосовместимости, биологической активности и механических характеристик;
- пористая структура со взаимосвязанными порами, обеспечивающая интеграцию имплантата с окружающими тканями, прорастание сосудов и нервных волокон.

Комплекс таких характеристик позволяет материалам не только выполнять опорную функцию, но и обеспечивать остеоинтеграцию, то есть прорастание клеток и сосудов в структуру имплантата (остеокондуктивность), а также стимулировать формирование костной ткани в области вокруг имплантата (остеоиндуктивность). Среди исследуемых в настоящее время материалов, удовлетворяющих этим критериям, особое внимание уделяется полимерным и композиционным системам на основе фосфатов кальция, которые рассматриваются в качестве искусственных аналогов костной ткани [13–16].

1.2 Материалы для регенерации крупных дефектов костных тканей

На сегодняшний день значительная часть населения подвержена хроническим заболеваниям костно-мышечной системы, которые в той или иной степени приводят к формированию дефектов костной ткани, её деформациям (дегенеративно-дистрофические изменения, остеопороз, воспалительные заболевания, онкологические поражения кости) [17]. Помимо этого, стремительно возрастает уровень травматизма (производственного и автомобильного), который нередко приводит к инвалидизации населения за счёт потери костной массы после повреждения или хирургического лечения. В современной медицине выделяются два принципиально различных подхода к решению проблемы восстановления костной ткани: первый – замещение повреждённого участка кости с помощью имплантатов, включая разработку биоинженерных конструкций, способных замещать не только кость, но и прилегающие суставные структуры; второй – создание благоприятных условий для естественной регенерации кости в области повреждения [6,18,19]. Обзор текущей научной литературы свидетельствует о том, что оба направления тесно связаны с применением биокерамических материалов, использование которых в клинической практике расширяется благодаря прогрессу

в химическом синтезе и совершенствованию технологий производства материалов, имитирующих свойства костной ткани.

В последние десятилетия большое внимание уделяется созданию новых искусственных материалов для регенерации крупных дефектов костных тканей [20–23]. Костная пластика с использованием аутотрансплантатов и дистракционный остеогенез с использованием аппаратов внешней фиксации считаются «золотым стандартом» при лечении крупных радиальных и сегментарных дефектов длинных костей (длиной более полутора диаметров кости) [24]. Дистракционный остеогенез – эффективная методика (в среднем не более 3–6% несращений), но она связана с риском инфекции в месте фиксации, контрактурами суставов и риском атрофии мышц при длительной иммобилизации конечности [25,26]. Сегментарные дефекты длиной до 6 см можно восстанавливать при помощи костных трансплантатов [27]. Наилучшие результаты лечения достигаются при использовании аутотрансплантатов [28,29]. Однако применение костных аутотрансплантатов ограничено объёмом донорской костной ткани и риском инфекции как в месте имплантации, так и в донорском участке [30]. Аллотрансплантация также является эффективным способом лечения, но сопряжённым с рисками отторжения трансплантата и потери значительной части остеогенной способности кости в процессе подготовки трансплантата [31–33]. По этой причине в последние десятилетия создание новых искусственных материалов для костной регенерации стало предметом интенсивных исследований [22,34]. Основными преимуществами искусственных материалов являются возможность неограниченного массового производства, персонализация и возможность модифицирования для получения необходимых функциональных свойств.

Большинство природных биологических материалов являются полимерными композитами, в которых в качестве полимерной матрицы выступают белки. Типичным примером является кость, которая представляет собой композит из коллагена (полимер) и апатита (керамика) [4,7,22]. Особенностью медицинского применения композиционных материалов является необходимость того, чтобы имплантат выполнял одновременно функциональные требования и требования к

биосовместимости. Большинство коммерческих композиционных материалов, как правило, не соответствуют этому критерию, их упругие свойства не соответствуют свойствам живых тканей, или же материал характеризуется отсутствием биосовместимости. Человеческая кость является идеальным композитом, в котором упорядоченное сочетание минерала ГА и фибрилл коллагена обеспечивает необходимые упругие и прочностные свойства, воссоздание которых является сложно инженерной задачей.

Важное место среди материалов, предназначенных для остеосинтеза, занимают металлы и их сплавы. Металлические сплавы сталей и титана демонстрируют высокую эффективность применения для остеосинтеза, однако обладают рядом недостатков при переходе от классической травматологической хирургии к инженерии костных тканей [18]. Высокая механическая прочность и жёсткость металлов обеспечивает необходимую стабильность костных отломков при остеосинтезе, однако, в то же время, является и недостатком. Большая разница в жёсткости металлов и кости приводит к возникновению так называемого stress shielding эффекта, выражающемся в снижении плотности кости и её резорбции на поверхности контакта с металлическим имплантатом вследствие избыточных механических нагрузок, передаваемых от имплантата кости [35,36]. Такой процесс ремоделирования кости может приводить к расшатыванию имплантата в костном ложе и воспалению костных тканей, в конечном счёте, приводящим к необходимости повторного хирургического вмешательства для ревизии имплантата. В качестве альтернативы металлическим сплавам для остеосинтеза и инженерии костных тканей в последние десятилетия исследуются полимерные и композиционные материалы [16]. Несмотря на относительно невысокие механические характеристики полимеров, они обладают рядом преимуществ в сравнении с металлами. Существует целый ряд биоразлагаемых полиэфиров, свойства которых хорошо согласуются с требованиями, предъявляемыми к тканеинженерным материалам. Биоразлагаемые линейные полиэферы, среди которых можно особо выделить полимолочную кислоту (ПМК), полигликолевую кислоту (ПГК), сополимер молочной-гликолевой кислот (ПМГК) и

поликапролактон (ПКЛ), являются термопластичными полимерами, поддающимися современным методам переработки и обладающих регулируемыми сроками резорбции в условиях живого организма (Рисунок 1.2) [37]. Замещение полимерного имплантата природной тканью представляет собой два параллельных процесса, скорость которых должна быть приблизительно согласована: биорезорбция полимерного материала и регенерация ткани. В этом контексте выделяются два функциональных этапа работы полимерного имплантата. На первом этапе имплантат выполняет роль скаффолда, поддерживая формирование новой живой ткани и одновременно подвергается частичной замене ею. На втором этапе продолжается деградация имплантата, при этом основная функция системы переходит к сформированной новой ткани, которая замещает имплантат.

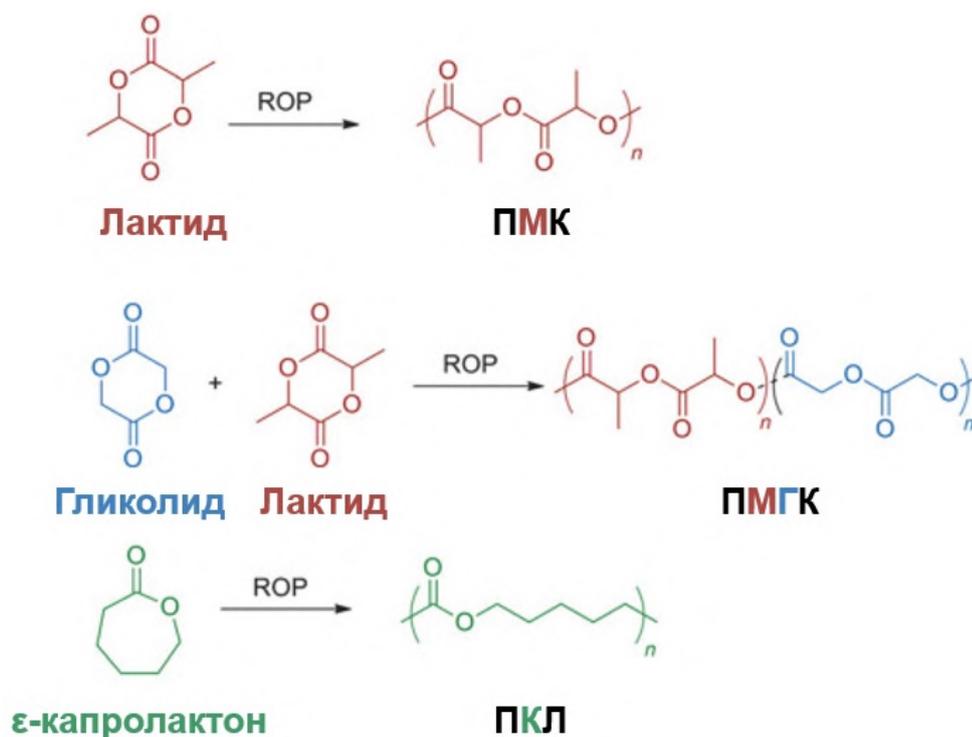


Рисунок 1.2 – Биоразлагаемые алифатические полиэфиры и мономеры для их получения [37]

Продолжительность этих этапов зависит как от материала, его физико-химических и механических свойств, так и от области имплантации [10]. В ходе биорезорбции полимерного имплантата образуется комплекс продуктов с различной молекулярной массой и химической структурой – низко- и высокомолекулярные соединения, а также олигомеры, которые отличаются по

растворимости в водных средах и транспортируются по организму с кровотоком [5,10]. Эти вещества могут выводиться из организма посредством естественных метаболических процессов. Продукты биорезорбции полимеров можно классифицировать на следующие группы [10,38]:

- продукты гидролиза, участвующие в метаболизме и обладающие низкой токсичностью (например, гликолевая, молочная и капроновая кислоты);
- продукты гидролиза, подвергающиеся дополнительным химическим превращениям (с образованием муравьиной и щавелевой кислот);
- нерастворимые продукты гидролиза, которые выводятся из организма в неизменённом виде (например, 6-амино-н-додекановая кислота);
- водорастворимые продукты гидролиза, не вовлекающиеся в метаболизм и выводимые без изменений;
- продукты, не участвующие в метаболических процессах и откладывающиеся в тканях.

Важным требованием является отсутствие токсического или иного негативного воздействия продуктов деградации полимерного материала на окружающие ткани и организм в целом на всех этапах биорезорбции.

1.2.1 Биорезорбируемые алифатические полиэфиры

Два основных биоразлагаемых полимера, исследуемых в разработке биорезорбируемых имплантатов для регенерации костных тканей и остеосинтеза – ПМК и сополимер ПМГК [13–15,39,40]. ПМК и ПМГК резорбируются, образуя нетоксичные в малых концентрациях молочную и гликолевую кислоты, которые в результате обмена веществ превращаются в двуокись углерода и воду, которые без вреда выводятся из организма. Недостатком является возможность закисления окружающих тканей при высоких скоростях деградации. Высокие концентрации гликолевой и молочной кислот могут приводить к воспалениям и формированию новообразований в тканях. Ещё один полимер данного класса – ПКЛ. Этот алифатический полукристаллический полиэфир менее исследован для применения в инженерии костной ткани. Характеризуемый температурой плавления в

диапазоне от 59 до 64 °С и температурой стеклования около -60 °С, ПКЛ обладает уникальными механическими характеристиками при температурах, близких к физиологическим: высокой эластичностью, ударной вязкостью и пластичностью. ПКЛ демонстрирует более длительное время резорбции (2–4 года), а продуктами его деградации являются менее агрессивные капроновые кислоты [41]. Из-за присутствия пяти гидрофобных фрагментов $-CH_2$ в его основной цепи ПКЛ разлагается медленнее других алифатических полиэфиров. Однако, в условиях регенерации крупных костных дефектов, увеличенные сроки деградации могут являться благоприятными и способствуют сохранению биомеханического поведения и структурной целостности имплантата из ПКЛ в течении длительного срока восстановления. Помимо этого, ПКЛ полностью растворим в низкотоксичном растворителе ацетоне, который является продуктом метаболизма человеческого организма, что позволяет получать композиты на его основе из раствора [42].

Общими недостатками биоразлагаемых полиэфиров являются низкие механические характеристики и отсутствие биоактивных свойств. Недостаток механической прочности решается комбинированием биорезорбируемых имплантатов с аппаратами внешней фиксации, что является обоснованной стратегией при восстановлении крупных костных дефектов. При таком подходе крайне желательными являются эластичные свойства имплантата, обеспечивающие эластичную деформацию костного регенерата при физических нагрузках, что, как правило, способствует регенерации костных тканей. Проблема же отсутствия биоактивных свойств решается путём получения композиционных материалов на основе полиэфиров и биоактивных наполнителей [43]. Для регенерации костных тканей в роли такого наполнителя, как правило, выступают фосфаты кальция, обладающие способностью стимулировать остеогенную дифференцировку и раннюю минерализацию костного регенерата.

Таким образом, биоразлагаемые алифатические полиэфиры, в частности ПКЛ, представляют собой перспективную основу для создания имплантируемых конструкций, предназначенных для остеосинтеза и регенерации костной ткани.

Они обладают необходимыми характеристиками биосовместимости и контролируемой деградации, позволяющими им эффективно замещать традиционные металлические имплантаты. Однако ограниченная биоактивность и низкая остеоиндуктивность полимеров требуют их функционализации или комбинирования с другими компонентами, что обуславливает создание композиционных материалов следующего поколения, способных обеспечивать направленную регенерацию кости и активное взаимодействие с живыми тканями.

1.2.2 Биоактивные композиционные материалы для регенерации костных тканей

1.2.2.1 Остеоиндуктивные фосфаты кальция

Перспективы использования биокерамик на основе фосфатов кальция определяются прежде всего возможностями адаптирования механических и биологических свойств имплантатов и приближением их к свойствам костной ткани. При сравнении механических свойств искусственных материалов и природной кости становится очевидной сложность структуры и разнообразие тканевого состава последней. Высокие механические характеристики компактного вещества кости обусловлены специфическим пространственным расположением её структурных элементов – костных пластинок толщиной от 3 до 10 мкм [44]. Органическая составляющая кости, представленная преимущественно коллагеном (костным матриксом), составляет около 20–25% от общей массы, неорганические фосфаты кальция – около 60–65%, а вода занимает примерно 9–10%. Кроме того, в костной ткани присутствуют в малых концентрациях другие органические соединения, включая нематриксные белки, полисахариды и липиды. Коллаген обеспечивает необходимую механическую прочность тканей при воздействии растягивающих и изгибающих нагрузок. Его молекулы состоят из трёх спирально скрученных полипептидных цепей и способны формировать волокна диаметром от 100 до 2000 нм. Минеральная составляющая, главным образом представленная ГА, отвечает за прочность кости на сжатие. Кристаллы ГА в кости имеют форму пластин с размерами примерно $50 \times 20 \times 5$ нм и ориентированы определённым образом относительно оси коллагеновых волокон.

Использование искусственных материалов, аналогичных минеральному компоненту кости, для пластики дефектов берёт начало с 1960-х годов [45,46]. Несмотря на широкий спектр фосфатов кальция, в клинической практике чаще всего применяются два основных материала: трикальцийфосфат (ТКФ) и ГА, которые характеризуются высоким сродством к костной ткани и способностью к биорезорбции [47]. В настоящее время кальций-фосфатные материалы, включая ГА, широко применяются в медицине в виде биосовместимой керамики для замещения дефектов кости, средств адресной доставки лекарств, биологически активных покрытий на металлические имплантаты, кальций-фосфатных цементов и других изделий [11,14,47].

ГА является полным химическим и кристаллохимическим аналогом минерального компонента костной ткани млекопитающих, что обуславливает его уникальные биологические свойства: абсолютную иммунную совместимость, биоактивность, стимулирующую остеогенез, способность интегрироваться с костью и выступать в качестве строительного материала для формирования новой костной ткани, замещающей имплантат. Его усреднённая формула обычно представлена как $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Рисунок 1.3) [48].

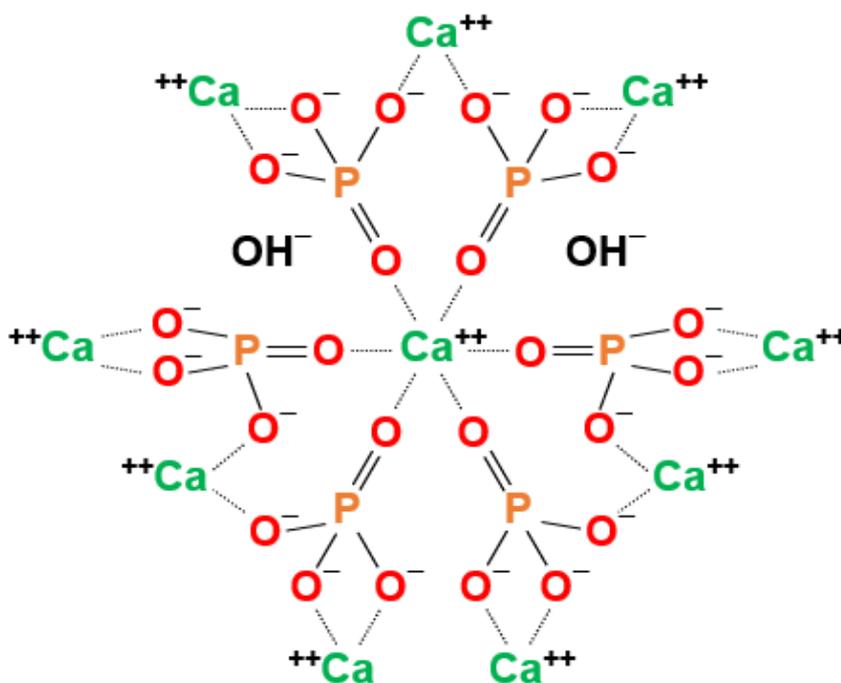


Рисунок 1.3 – Химическое строение ГА

Известно, что синтетический ГА обладает недостаточно высокой растворимостью для применения в чистом виде в качестве имплантируемого материала [49]. Поэтому для повышения общей растворимости подобных материалов необходимы дополнительные модификации. Одним из таких подходов является использование фосфатов кальция с меньшим отношением кальция к фосфору (Ca/P) по сравнению с ГА. В частности, снижение этого показателя с 1,67 у ГА до 1,5 у ТКФ приводит к увеличению растворимости почти в десять раз [11,47,48]. Однако при замещении крупных костных дефектов, длительная растворимость ГА может являться преимуществом, благодаря которому высвобождение ионов кальция будет обеспечиваться на протяжении всего периода восстановления. Непрерывное высвобождение ионов кальция является благоприятным для стимуляции пролиферации и остеогенной дифференцировки остеобластов, что является крайне важным для сокращения сроков регенерации костных тканей.

1.2.2.2 Композиционные материалы на основе биоразлагаемых полиэфиров и фосфатов кальция

Органический костный матрикс и неорганический компонент образуют сложный композиционный материал. Воссоздать полностью морфологию костной ткани искусственным путём, чтобы достичь идентичного сочетания биологических и механических характеристик, пока невозможно. Тем не менее биоматериалы, используемые в качестве имплантатов, должны соответствовать требованиям, вытекающим из структуры, состава и свойств костной ткани:

- химическая стабильность – отсутствие нежелательных химических реакций с тканями и межклеточной жидкостью, а также устойчивость к коррозии;
- механические характеристики – близость показателей жёсткости (упругости) и трещиностойкости к параметрам кости (значительные различия в упругости могут привести к снижению нагрузки на прилегающую кость и вызвать её резорбцию);
- биоактивность – отсутствие иммунных реакций, остеокондуктивность (способность к прорастанию микрососудов и остеогенных клеток по поверхности

материала, включая сквозные поры оптимального размера) и остеоиндуктивность (способность адгезировать и стимулировать дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты, активируя их остеогенную функцию), что обеспечивает интеграцию с костной тканью.

Среди синтетических материалов, применяемых для имплантации, наиболее перспективной является керамика на основе фосфатов кальция. В частности, ГА отличается высокой биосовместимостью и биоактивностью, особенно в форме нанокристаллов, аналогичных природным структурам кости [50]. Основным ограничением керамики является её хрупкость, поэтому наиболее эффективным решением является использование композитов типа «гидроксиапатит-полимер», сочетающих механические свойства, близкие к костным, и высокую биоактивность.

Композиционные материалы с содержанием фосфатов кальция можно разделить на две основные категории [11]:

- керамические материалы, армированные дисперсными частицами, дискретными или непрерывными волокнами;
- биосовместимые полимеры, наполненные дисперсными керамическими частицами.

Известно, что биокерамика на основе чистого ГА является материалом, не способным выдерживать ударные механические нагрузки из-за собственной хрупкости, поэтому одним из наиболее перспективных подходов к повышению прочности и уменьшению хрупкости ГА является изготовление композитов ГА-полимер. При введении дисперсного ГА в полимерную матрицу реализуется эффект упрочнения полимера, что позволяет получить композиционный материал с усреднёнными механическими характеристиками.

1.2.2.3 Изготовление персонализированных имплантатов для замещения крупных костных дефектов

Технологии 3D печати позволяют изготавливать индивидуальные изделия сложной формы, что в медицине обеспечивает персонализированный подход при лечении. Применение технологий 3D печати в медицине имеет ряд отличий от

промышленного использования этих технологий [51,52]. Если в промышленности технологии 3D печати заняли свою нишу на этапе проектирования и создания модельных прототипов, что позволяет существенно упростить проектирование и повысить ресурсоэффективность производства, то в медицине 3D печать позволяет реализовать персонализированный подход. Под персонализированным подходом подразумевается возможность создания индивидуального имплантата для пациента на основании данных компьютерной томографии. С развитием технологий 3D печати изготовление таких индивидуальных имплантатов становится всё более востребованным и экономически оправданным.

Наиболее широко применяемыми на сегодняшний день технологиями 3D печати являются: лазерная стереолитография (SLA), моделирование методом послойного наплавления (Fused deposition modeling, FDM), селективное лазерное спекание (SLS), электронно-лучевое плавление (EBM). Эти технологии позволяют на основании трёхмерных моделей изготавливать из металлов, керамик и полимеров изделия сложной формы с разрешением до 50-200 мкм.

В медицине такой передовой метод диагностической визуализации, как компьютерная томография, широко используется врачами всех хирургических специальностей, включая ортопедию, для отображения и наблюдения сложных патологий. Наблюдение взаимного расположения и взаимосвязи анатомических структур является важным этапом при подготовке к оперативному вмешательству. Однако с развитием технологий 3D печати, визуализация позволяет не только наблюдать анатомическое строение на экране монитора, но и получать на основании компьютерных данных трёхмерные модели для дальнейшего предоперационного прототипирования и моделирования персонализированных имплантатов. В целом, применение технологий 3D печати в ортопедии за последние 30 лет разделилось на четыре основных направления [52]:

- предоперационное анатомическое моделирование (с конца 1980-х годов по настоящее время);
- изготовление персонализированных имплантатов (с начала 1990-х до настоящего времени);

- изготовление шаблонов для тотальной арthroпластики суставов (с середины 2000-х годов по настоящее время);
- изготовление шаблонов для корригирующей остеотомии (с конца 2000-х годов до настоящего времени).

Преимуществом композиционных материалов с полимерной матрицей, в роли которой выступает термопластичный полимер, является возможность 3D печати по технологии FDM. В отличие от технологий SLS и EBM, применяемых для печати керамик и металлов и требующих дорогостоящего оборудования стоимостью в десятки миллионов рублей и специализированных микроразмерных порошков, печать по технологии FDM намного менее ресурсозатратна и намного более экономически выгодна. Для FDM печати используется филамент (пруток) диаметром порядка 1,75-2,85 мм, который расплавляется при прохождении через нагретую печатающую головку принтера, расплав послойно наносится на платформу (Рисунок 1.4).

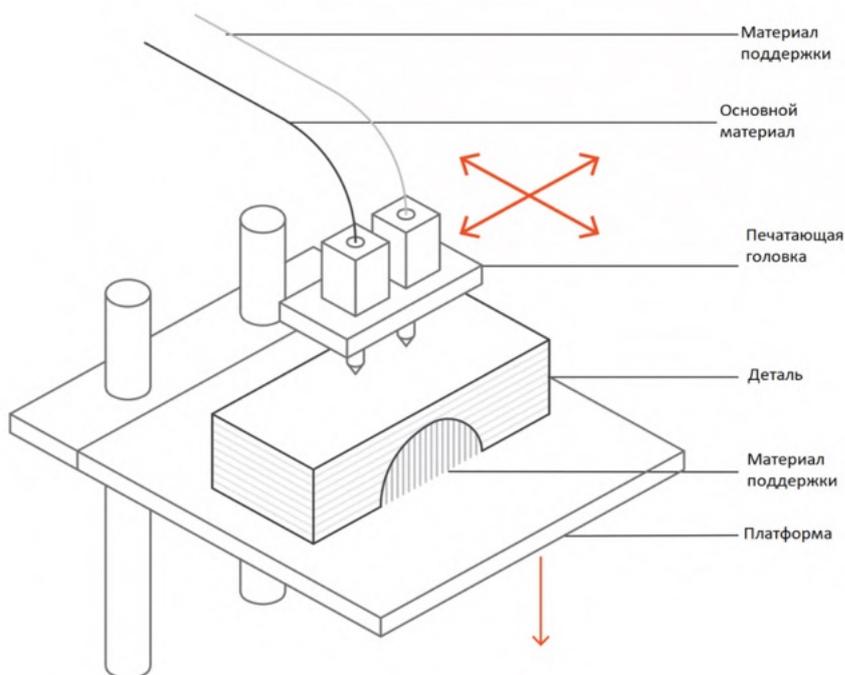


Рисунок 1.4 – Принципиальное устройство FDM 3D принтера

В зависимости от конструкции принтера и печатающей головки, в процессе печати может использоваться от 1 до 2 и более различных филаментов.

В настоящее время в мире активно ведутся исследования, направленные на разработку технологии получения композиционных материалов на основе алифатических полиэфиров и фосфатов кальция для 3D печати персонализированных костных имплантатов. Так, группой Corcione был предложен метод ротационного формования для изготовления композитного филамента на основе ПМК/ГА [53,54]. Предложенная технология позволяет без использования органических растворителей формировать качественный филамент с равномерным распределением ГА в объеме филамента, высокую степень повторяемости качества и свойств филамента, высокое качество печати. Одним из недостатков предложенного метода является относительно низкое содержание ГА в композиционном филаменте до ~ 15 масс%, что снижает способность имплантата продуцировать костную ткань и механическую прочность. Использование двухшнекового экструдера позволило увеличить содержание ГА в композиционном филаменте ПМК/ГА до 50%, однако авторы отмечают недостаточную прочность модельных имплантатов, полученных с использованием разработанного филамента [55]. Группой Сенатова были получены композиционный филамент ПМК/ГА с использованием для смешивания ПМК и порошка ГА конический экструдер [56]. Полученный филамент содержал около 15 масс.% порошка ГА, а модельные 3D имплантаты, изготовленные с использованием такого филамента, обладали эффектом памяти формы. Зуев с соавторами для повышения смачиваемости остеокондуктивных биорезорбируемых имплантатов получали композиционный ПМК/ТКФ филамент с наполнением до 50 масс.% [57]. В работе не использовали растворители и связующие, смешивание компонентов проводили после предварительного нагрева ПМК и замешивания в расплав порошка ТКФ с последующей гомогенизацией композита методом многочисленных измельчений и пропусков через экструдер. Из полученного филамента были успешно напечатаны высокопористые структуры, однако, одним из недостатков предложенного метода является формирование в композите агрегатов ТКФ размером 1 мкм и более, несмотря на многократную экструзию при температурах, близких к температуре плавления ПМК. Петровская и коллеги с

целью увеличения прочности и содержания ГА в композиционном филаменте использовали метод предварительного смешивания порошка ГА в растворе ПМК в полярном растворителе в присутствии пластификатора [58]. Для удаления растворителя использовался процесс вакуумирования при повышенных температурах. Для получения филамента сформированный композит измельчали и экструдировали при помощи одношнекового экструдера. Предложенная технология позволяет получить филамент с содержанием ГА до 30% и прочностью на сжатие до 62 МПа. Группой Гердес были оптимизированы параметры печати композитных скаффолдов ПКЛ/ГА [59]. Однако 3D печать композита ПКЛ с 40 масс.% ГА оказалась неудачной из-за высокой вязкости расплава, образующегося в печатающей головке в процессе печати. Pierantozzi с коллегами предложили одностадийный метод 3D печати композиционных скаффолдов ПКЛ/ГА с содержанием ГА до 20 масс.% [60]. Скаффолды продемонстрировали хорошую степень биосовместимости, обеспечили высокую клеточную адгезию, пролиферацию и дифференцировку. В других исследованиях скаффолды ПКЛ/ГА для замещения дефектов костной и хрящевой ткани различных составов были изготовлены методами 3D печати и поверхностно модифицированы биоактивными и антимикробными веществами [61–67].

Пространственная внутренняя структура и свойства поверхности являются одними из наиболее важных характеристик для биосовместимости скаффолдов [68]. Идеальный скаффолд должен обладать поверхностью, обеспечивающей оптимальную адгезию клеток и взаимосвязанную пористую внутреннюю структуру для васкуляризации и формирования внеклеточного матрикса [69,70]. Последние исследования показывают, что структура заполнения скаффолда, формируемого при 3D печати, также важна для их биосовместимости [71–73]. В частности, трижды периодические минимальные поверхности (Triply Periodic Minimal Surface, TPMS, Рисунок 1.5) привлекли к себе внимание благодаря высокому отношению поверхности к объёму и взаимосвязанной пористости, что напоминает структуру природных материалов [74,75].

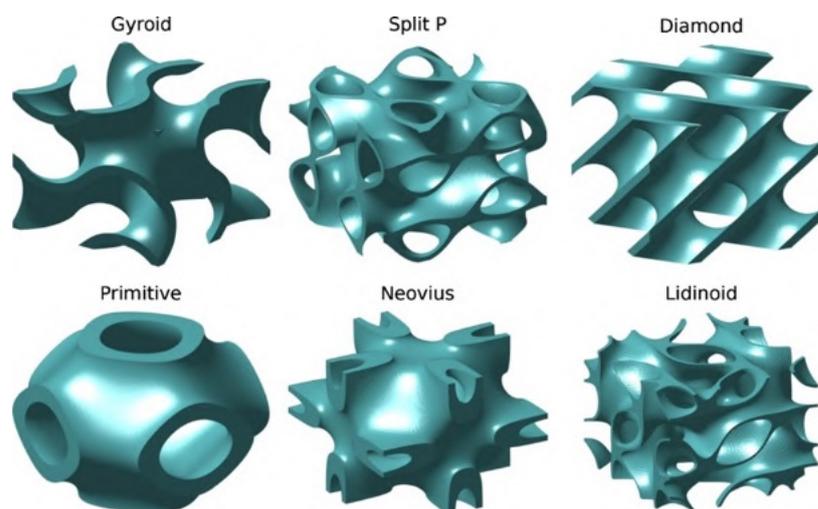


Рисунок 1.5 – Типичные TPMS структуры [75]

Более того, в некоторых исследованиях структуры TPMS применялись для математического моделирования костных тканей и подтвердили их биомиметическую геометрию [76–78]. В работах по 3D печати скаффолдов из ПКЛ и композитов на основе ПКЛ структуры типа TPMS мало исследованы. Группа Эрнандеса заполняли ПКЛ скаффолды смесью альгината и желатина для улучшения цитосовместимости [79]. Количество загруженного гидрогеля было наибольшим для скаффолдов с гироидной структурой, что положительно сказалось на адгезии и жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток человека (ММСК). Группа Fonseca напечатала неортогональные гироидоподобные скаффолды из ПКЛ и показали влияние формы заполнения на механические и биологические свойства [80]. Неортогональная гироидная структура положительно влияет на биологические характеристики культивируемых клеток, что выражается в более высокой степени минерализации, более высокой активности генов, связанных с остеогенезом, и более существенном отложении минерализованного матрикса. Hashimi с коллегами изготовили скаффолды из ПКЛ с двумя TPMS структурами методом пневматической экструзии расплава и исследовали их механические свойства и пролиферацию клеток [81]. Структуры TPMS обладали более высокой механической прочностью и обеспечивали лучшую пролиферацию остеобластов по сравнению с кубическими структурами заполнения. Группой Wang были напечатаны гироидные скаффолды из композита ПКЛ/ГА с

содержанием ГА до 25 масс.% [58]. Композиционные скаффолды с гиридной структурой обладали лучшей смачиваемостью и прочностью на сжатие.

Исходя из анализа литературных данных, внутреннее строение, содержание биоактивного наполнителя, а также химическая и молекулярная структура полимерной матрицы являются важными характеристиками для создания эффективных биорезорбируемых скаффолдов для регенерации костных тканей [73]. Эти характеристики оказывают ключевое влияние на механизм биорезорбции, механические свойства, биосовместимость и биоактивность скаффолда [68,72]. В связи с этим выбор материала полимерной матрицы, степени наполнения, технологии и режимов получения и переработки композиционного материала оказывает прямое влияние на функциональные свойства конечного медицинского изделия.

1.3 Модифицирование поверхности скаффолдов для регенерации костных тканей

Отсутствие биоактивных свойств у скаффолдов из биорезорбируемых полимеров ограничивает их использование для инженерии костной ткани. Для изменения поверхностных свойств скаффолдов применяют различные способы модифицирования. Модифицирование, как правило, направлено на придание скаффолдам биологической активности путём улучшения адгезии, пролиферации, дифференцировки и общей активности клеток. На основании обзора научной литературы можно выделить наиболее изученные и часто применимые методы модифицирования поверхности скаффолдов из биоразлагаемых полиэфиров для инженерии костной ткани.

1.3.1 Изменение морфологии поверхности

Изменение морфологии поверхности – широко изученная и эффективная стратегия модифицирования поверхности биорезорбируемых полиэфирных скаффолдов из ПМК, ПМГК и ПКЛ. Этот подход направлен на изменение физической геометрии поверхности скаффолда в микро- и наномасштабах с целью имитирования естественной среды внеклеточного матрикса костной ткани. Клетки реагируют на физические сигналы через пути механотрансдукции, которые влияют

на их адгезию, ориентацию, пролиферацию и дифференцировку [82,83]. Формирование микро- и наноразмерных структур на поверхности скаффолдов, как правило, улучшает смачиваемость и обеспечивает области прикрепления для клеток, усиливая их адгезию. К основным способам такого модифицирования можно отнести следующие:

– Нанопечатная литография (Nanoimprint Lithography, NIL). Используется для создания высокоточных наноразмерных структур и рельефов на поверхности алифатических полиэфиров с разрешением около 250 нм и глубиной около 150 нм. Такие структуры могут направлять ориентацию клеток и влиять на их дифференцировку. Например, стволовые клетки костного мозга человека, культивируемые на наноструктурированных полимерных подложках, демонстрировали ориентированные ядра и повышенное содержание остеогенных маркеров по сравнению с контрольными образцами с плоской поверхностью [84].

– Плазменная обработка. Плазменная обработка может приводить к травлению или функционализации поверхности скаффолдов путём создания иерархических микро- и наноструктур. С помощью плазменной литографии были изготовлены скаффолды с многомасштабными нанотопографиями, которые способствуют остеогенной минерализации и регенерации костной ткани *in vivo* [85].

– Кислотное или щелочное травление. Методы химического травления придают поверхности шероховатость, избирательно удаляя полимерный материал, увеличивая площадь поверхности и её гидрофильность, что улучшает адгезию клеток и остеогенез [86].

Основные биологические эффекты изменения морфологии поверхности скаффолдов: влияние на ориентацию и морфологию клеток, повышение адгезии и пролиферативной активности клеток, усиление остеогенной дифференцировки.

1.3.2 Иммобилизация биологически активных макромолекул

Иммобилизация биологически активных макромолекул, например, покрытие белком или желатином, является широко изученным и эффективным методом обработки поверхности с целью повышения биоактивности биорезорбируемых

полиэфирных скаффолдов для инженерии костной ткани. Этот подход направлен на имитацию естественного внеклеточного матрикса путём введения биологически активных молекул, которые способствуют адгезии, пролиферации и остеогенной дифференцировке клеток. Природные макромолекулы, такие как коллаген и желатин, являются основными компонентами костного внеклеточного матрикса, обеспечивающими биохимические сигналы, необходимые для прикрепления и функционирования клеток и повышающими смачиваемость поверхности [87,88]. К основным способам иммобилизации биологически активных макромолекул на поверхности скаффолдов можно отнести:

– Окунание. Распространённый и простой способ, при котором скаффолды погружаются в растворы желатина или коллагена, что позволяет адсорбировать или физически удерживать макромолекулы на поверхности. Таким образом, например, скаффолды из ПКЛ, изготовленные методом 3D печати, были покрыты желатином для формирования тонких, однородных биоактивных покрытий [87].

– Сшивка. Для стабилизации желатинового покрытия и предотвращения его быстрого растворения используются сшивающие агенты, такие как глутаральдегид. Сшитые желатиновые покрытия сохраняют целостность в физиологических условиях и поддерживают пролонгированное высвобождение биоактивных молекул [89].

Основными биологическими эффектами иммобилизации биоактивных макромолекул являются усиление клеточной адгезии и пролиферации, усиление остеогенной дифференцировки и пролонгированное высвобождение остеоиндуктивных компонентов.

1.3.3 Химическое модифицирование и введение функциональных групп

Введение функциональных групп и химическое модифицирование являются ключевыми стратегиями обработки поверхности для повышения биоактивности биоразлагаемых полиэфирных скаффолдов для инженерии костной ткани [90,91]. Эти методы позволяют вводить химически активные группы на поверхность скаффолдов для повышения гидрофильности, ковалентного прикрепления

биоактивных молекул и изменения поведения при деградации без ухудшения объёмных свойств. Введение функциональных групп разного химического строения и состава оказывает различное влияние на поверхностные свойства скаффолдов:

- Карбоксильная группа (-COOH) повышает гидрофильность и обеспечивает места для карбодиимид-опосредованного соединения аминоксодержащих биомолекул.

- Аминогруппа (-NH₂) способствует ковалентному связыванию с карбоксилсодержащими молекулами и увеличивают заряд поверхности для лучшего взаимодействия с клетками.

- Гидроксильная (-OH) группа улучшает смачиваемость и может служить реактивными участками для дальнейшей химической прививки.

Для введения функциональных групп в состав поверхности скаффолдов, как правило, используются методики гидролиза, аминолита, плазменной обработки. Основными биологическими эффектами введения функциональных групп являются повышение гидрофильности поверхности, усиление адгезии, пролиферации и остеогенной дифференцировки клеток.

1.3.4 Кальций-фосфатные покрытия

Минеральное покрытие с использованием биоактивного стекла или ГА является распространённым методом обработки поверхности биорезорбируемых полиэфирных скаффолдов, направленным на повышение их биоактивности и остеокондуктивности. Такое покрытие имитирует минеральную фазу кости, способствует адсорбции белков, адгезии клеток и их дифференцировке в остеогенном направлении, тем самым ускоряя формирование новой костной ткани и её минерализацию [92,93]. К основным способам формирования кальций-фосфатных покрытий на полимерных биорезорбируемых скаффолдах можно отнести следующие методики:

- Биомиметическая минерализация. Скаффолды инкубируются в модифицированном буфере, имитирующем жидкости организма (Simulated Body

Fluid, SBF), перенасыщенном ионами кальция и фосфата, что вызывает зарождение и рост непрерывного минерального слоя, напоминающего костный апатит.

– Прямое осаждение. В качестве способов прямого осаждения фосфатов кальция на поверхности применяются электрофоретическое осаждение, окувание или распыления частиц ГА или биоактивного стекла на поверхность скаффолдов с последующим спеканием.

Основными биологическими эффектами кальций-фосфатных покрытия на биорезорбируемых скаффолдах являются значительно усиленная адгезия остеобластов, их пролиферация и дифференцировка в остеогенном направлении, ускорение остеоинтеграции вследствие усиления экспрессии остеогенных маркеров, таких как щелочная фосфатаза, остеокальцин и коллаген I типа, а также сокращение сроков минерализации костного регенерата. Минеральное покрытие полимерных биорезорбируемых скаффолдов является высокоэффективным способом модифицирования поверхности для повышения целевых функциональных свойств скаффолдов. Несмотря на такие проблемы, как стабильность покрытия и время минерализации, минеральные покрытия остаются краеугольным методом создания биомиметических, механически компетентных и биоактивных полиэфирных скаффолдов для восстановления костей.

1.4 Постановка цели и задач диссертационного исследования

Проведённый литературный обзор показал, что разработка и получение композиционных материалов на основе гидроксиапатита и биорезорбируемых полиэфиров является одним из наиболее перспективных направлений по созданию новых материалов для регенерации костных тканей и, в частности, для замещения крупных костных дефектов [13,40,94]. Представленные исследования показывают, что выбор полимерной матрицы, способа получения композиционного материала и массовой доли биоактивного наполнителя оказывают ключевое влияние на физико-химические и биологические свойства изготавливаемых из них скаффолдов. Малоизученным является влияние высоких степеней наполнения (свыше 20-30 масс.%) гидроксиапатита на свойства полимерной матрицы и получаемых композиционных материалов. Основной гипотезой настоящего

исследования является предположение о том, что увеличение содержания гидроксиапатита в композиционном материале на основе поли (ϵ -капролактона) свыше 10-20 масс.% приведёт к повышению биоактивных свойств при сохранении высокой эластичности, термической и химической стабильности материала благодаря свойствам выбранной полимерной матрицы. Исходя из проведённого анализа, была сформулирована цель работы – разработка высоконаполненных биоактивных композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита для использования в качестве материала 3D печати биомиметических скаффолдов для регенерации костных тканей.

Для достижения поставленной цели сформулированы и решены следующие задачи:

1. Разработать способ получения композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
2. Разработать режимы изготовления композиционных филаментов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
3. Определить оптимальные условия FDM 3D печати биомиметических скаффолдов из композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
4. Исследовать влияние способа получения и массовой доли гидроксиапатита на физико-химические и структурно-фазовые свойства композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
5. Исследовать влияние массовой доли гидроксиапатита на физико-химические и биологические свойства биомиметических скаффолдов, изготовленных методом FDM 3D печати из композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита с наполнением до 40 масс.%.
6. Разработать способ функционализации поверхности биомиметических скаффолдов, изготовленных из композиционных материалов на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита, для стимулирования остеогенной дифференцировки остеобластов на их поверхности.

Глава 2. Материалы, методы и методология исследования

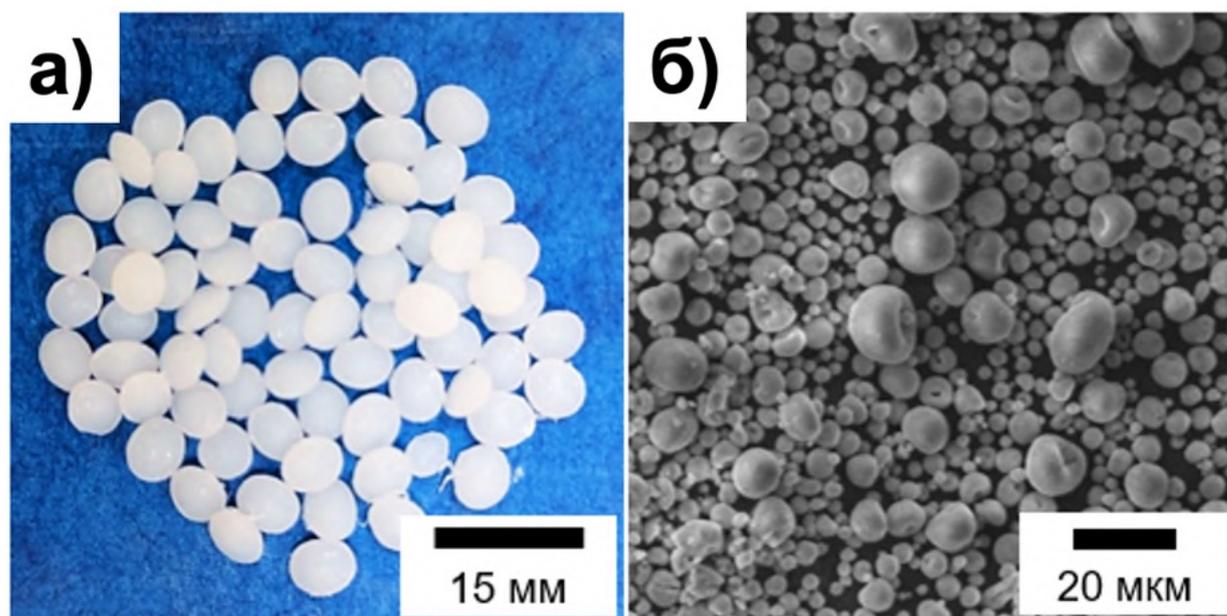
2.1 Материалы исследования

В данной работе исследовались чистый поли (ε-капролактон) и композиционные материалы на основе поли (ε-капролактона) и гидроксиапатита трех составов (Таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Условные обозначения экспериментальных образцов

Условное обозначение	Расшифровка
ПКЛ	Поликапролактон без добавления гидроксиапатита
ПКЛ90	Композиционный материал, состоящий из 90 масс.% поли (ε-капролактона) и 10 масс.% гидроксиапатита.
ПКЛ80	Композиционный материал, состоящий из 80 масс.% поли (ε-капролактона) и 20 масс.% гидроксиапатита.
ПКЛ60	Композиционный материал, состоящий из 60 масс.% поли (ε-капролактона) и 40 масс.% гидроксиапатита.

Для получения композиционных материалов использовались гранулы поли (ε-капролактона) (ПКЛ, $M_n \sim 80000$ г/моль, Sigma-Aldrich, Германия) и порошок гидроксиапатита (ГА, средний размер частиц 10 ± 2 мкм, Fluidinova S.A., Португалия) и ацетон (ЭКОС-1, Россия) в качестве растворителя для поли (ε-капролактона) (Рисунок 2.1).

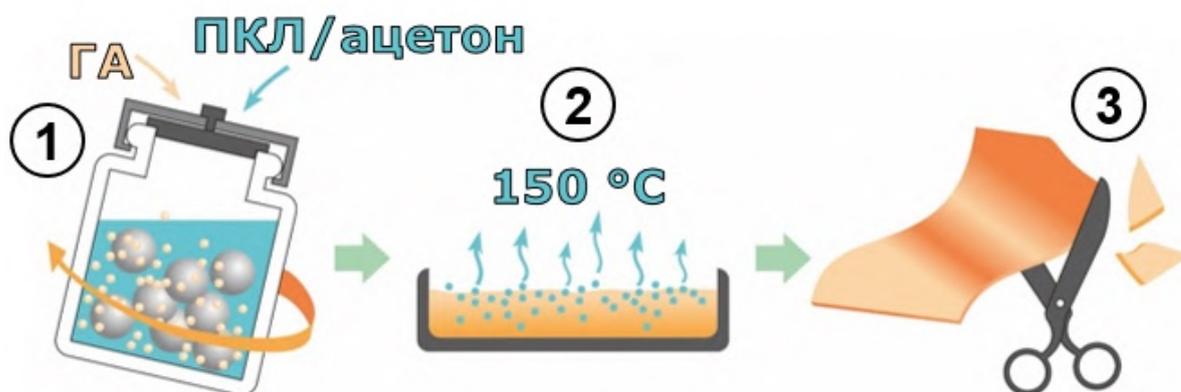


а – pellets ПКЛ, б – частицы ГА

Рисунок 2.1 – Компоненты, использованные для получения композиционных материалов

2.2 Способ получения композиционных материалов

Для получения композитов ПКЛ растворяли в ацетоне при температуре 45°C и воздействии ультразвука до полного растворения при концентрации 15 масс.%. ГА предварительно измельчали в барабане шаровой мельницы с керамическими мелющими телами при добавлении ацетона в массовом соотношении 1,5:1 и скорости вращения 72 об/мин в течение 4 часов. После измельчения ГА раствор ПКЛ добавляли в керамический барабан, смесь продолжали перемешивать на шаровой мельнице в течение 12 часов при скорости вращения 72 об/мин. Полученную смесь выливали в предварительно нагретую до 150°C фторопластовую форму тонким слоем ~5 мм и нагревали в атмосфере воздуха при 150°C в течение 20 минут для удаления ацетона. Полученные композиционные материалы с различными концентрациями ГА сушили в вакууме (10 мбар) при 35°C в течение 12 часов для удаления остаточного ацетона и влаги. После сушки листы композиционных материалов измельчали в тихоходной дробилке для полимеров SG-1621N (Shini, Тайвань) при скорости вращения ножей 230 об/мин. Измельчённый композит сушили в вакуумном сушильном шкафу ВТШ-К24-250 (АКТАН, Россия) при давлении 10 мбар и комнатной температуре в течение 24 часов для удаления остаточной влаги, после чего хранили в герметичной упаковке с силикагелем при температуре +2...+4°C. Последовательность действий при получении композиционных материалов представлена на рисунке 2.2.

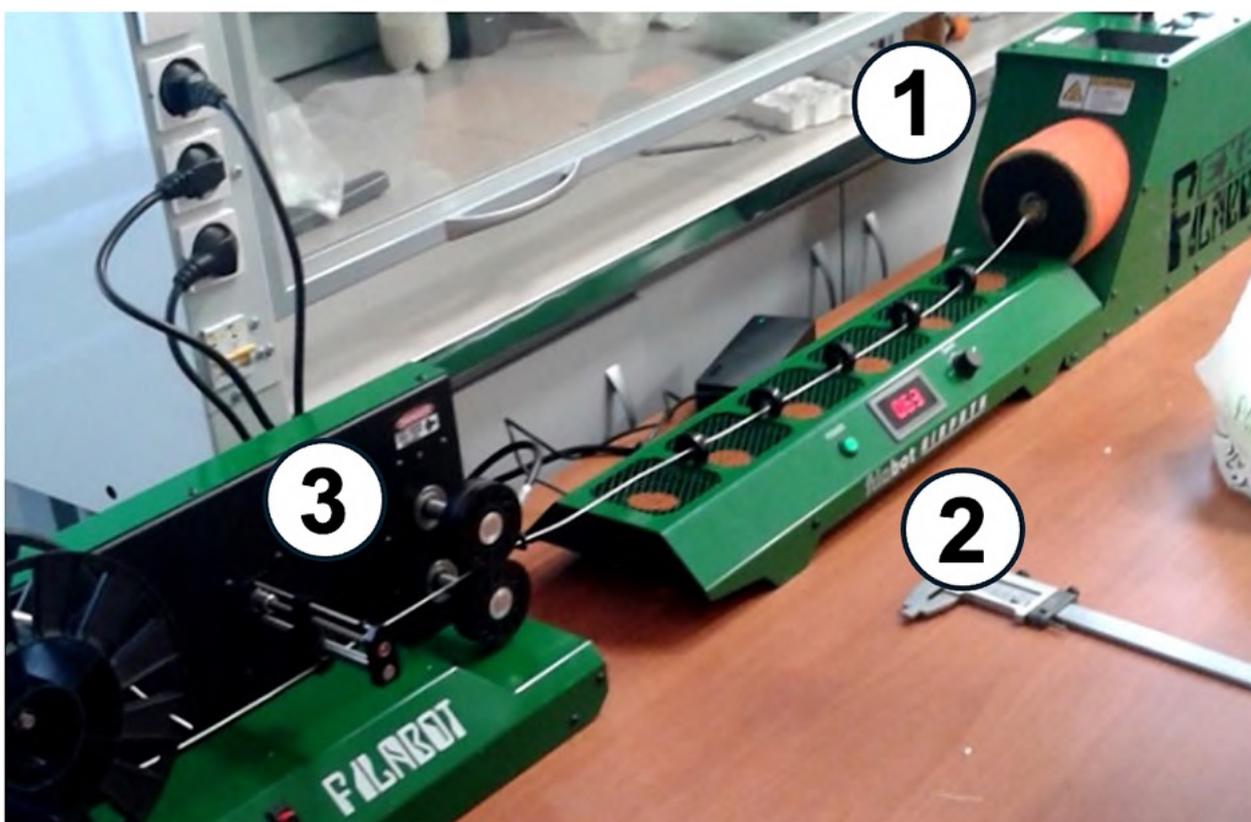


1 – смешивание компонентов в барабане шаровой мельницы,
2 – удаление растворителя, 3 – измельчение

Рисунок 2.2 – Схема последовательности действий при получении композиционных материалов

2.3 Изготовление филаментов для 3D печати

Экструзию филамента из полученных композиционных материалов выполняли на горизонтальном одношнековом экструдере Filabot EX2 (Filabot, США) (Рисунок 2.2). Охлаждение филаментов выполняли воздушным потоком для увеличения скорости затвердевания материала и уменьшения пластической деформации (вытягивания) при намотке на сборную катушку. Для компенсации роста вязкости расплава композиционных материалов с большей концентрацией ГА (Таблица 2.3) температуру экструзии увеличивали на 5°C. Для печати контрольных образцов экструдировали филамент из чистого ПКЛ. Диаметр полученных филаментов составлял $2,8 \pm 0,1$ мм.



1 – экструдер, 2 – линия воздушного охлаждения, 3 – система намотки филамента
Рисунок 2.3 – Линия экструзии филамента

2.4 3D печать скаффолдов

3D печать опытных образцов пористых скаффолдов выполняли на 3D принтере Ultimaker S5 (Ultimaker, Нидерланды) (Рисунок 2.4). Данный принтер реализует печать полимерами и полимерными композитами по технологии FDM – филамент подаётся в печатающую головку через трубку Боудена.

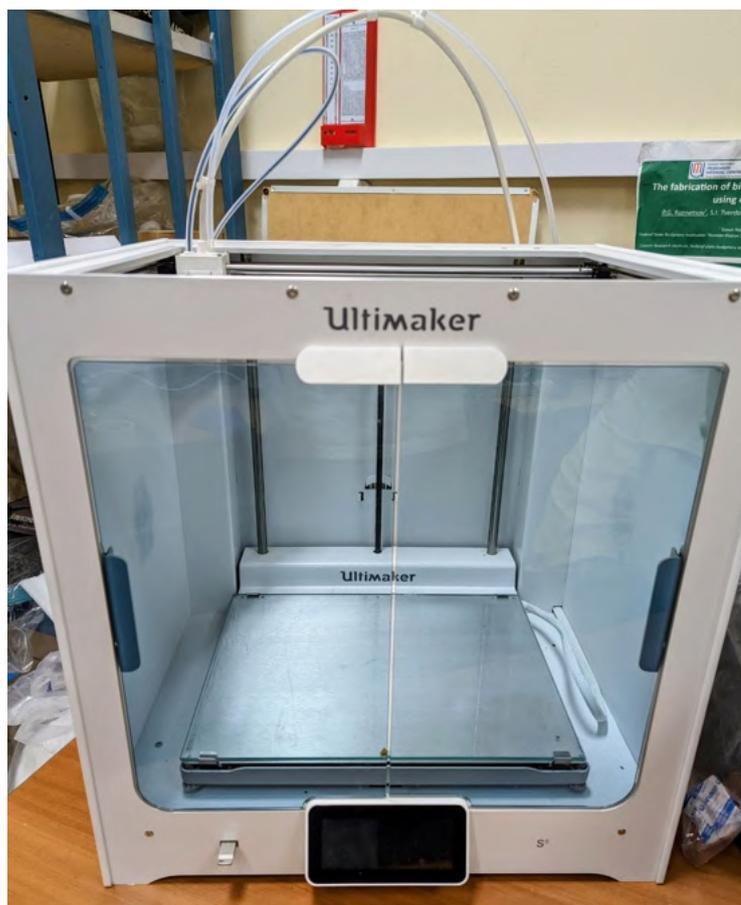


Рисунок 2.4 – FDM 3D принтер Ultimaker S5

Печать выполняли путём экструзии расплавов филаментов чистого ПКЛ и композитов на стеклянную подложку через сопло диаметром 0,4 мм. Температура сопла и подложки составляла 200°C и 37°C соответственно.

Таблица 2.2 – Температурные параметры изготовления образцов филамента и скаффолдов

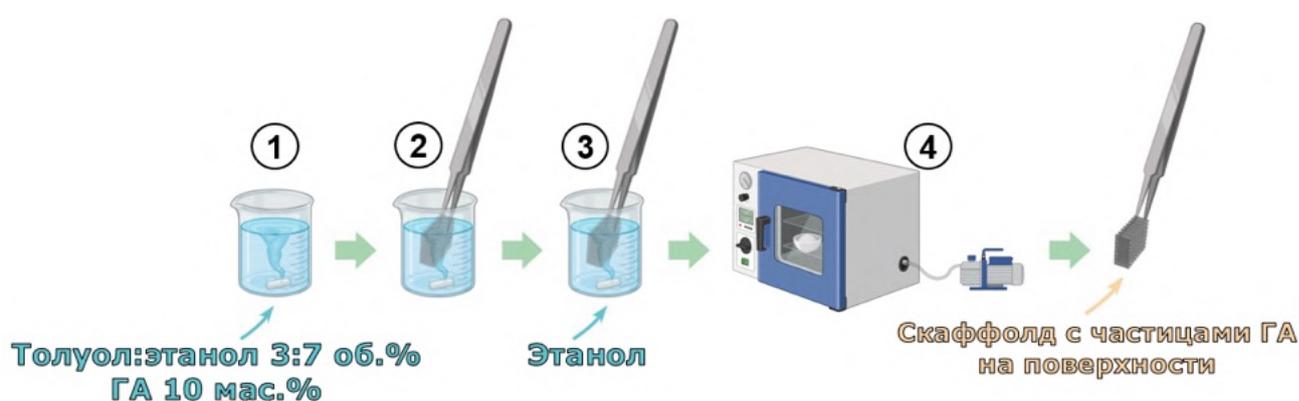
Группа	Температура экструзии филамента, °C	Температура фильеры при 3D печати, °C	Температура стола при 3D печати, °C
ПКЛ	80	200	37
ПКЛ90	80		
ПКЛ80	85		
ПКЛ60	90		

2.5 Способ обработки в смеси «растворитель/нерастворитель»

Для нанесения на поверхность скаффолдов биоактивных частиц ГА были использован способ обработки в смеси «растворитель/нерастворитель».

В качестве растворителей для нанесения на поверхность скаффолдов частиц ГА использовали толуол (безводный, 99,8%, ЭКОС-1, Россия), этанол ($\geq 99,5\%$,

вода $\leq 0,20\%$, Merck KGaA, Германия). Обработку скаффолдов в смеси «растворитель/нерастворитель» проводили с использованием толуола и этанола в объёмном соотношении 3:7. ГА добавляли в смесь толуол/этанол в концентрации 10 масс.% и перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение 30 минут для получения суспензии. Скаффолды погружали в суспензию на 2 минуты при комнатной температуре и непрерывном перемешивании, после чего извлекали, промывали этанолом и сушили в течение 24 часов в вакуумном сушильном шкафу ВТШ-К24-250 (АКТАН, Россия) при комнатной температуре и давлении 10 мбар (Рисунок 2.5).



- 1 – приготовление суспензии ГА в смеси «растворитель/не растворитель»,
 2 – окунание скаффолда в суспензию, 3 – промывка скаффолда,
 4 – высушивание скаффолда

Рисунок 2.5 – Последовательность действий при обработке в смеси «растворитель/нерастворитель»

2.6 Методы исследований физико-химических свойств композиционных материалов и скаффолдов

2.6.1 Сканирующая электронная микроскопия

Для исследования влияния состава и способа получения на морфологию композиционных материалов и изготовленных методом 3D печати скаффолдов, а также распределение частиц наполнителя в их приповерхностном слое, использовался метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Исследования проводили с использованием микроскопов JEOL JCM-6000 (JEOL, Япония) и Quanta 200 (FEI, Нидерланды) в режиме низкого вакуума при ускоряющем напряжении 15 кВ. Предварительно при помощи JEOL Smart Coater

(JEOL, Япония) методом магнетронного напыления на образцы наносили токопроводящее золотое покрытие. Распределение частиц наполнителя в материале оценивали в режиме детектирования обратно-рассеянных электронов.

2.6.2 Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

Анализ элементного состава полученных композиционных материалов проводили с использованием электронного микроскопа Quanta 200 (FEI, Нидерланды) с приставкой энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) EDAX Pegasus (АМЕТЕК, США).

2.6.3 Термогравиметрический анализ

Температуру деструкции композиционных материалов и содержание наполнителя оценивали методом термогравиметрического (ТГ) анализа на приборе синхронного термического анализа NETZSCH STA 449 F3 Jupiter (NETZSCH, Германия). Анализ выполняли в диапазоне температур от 30 до 1000°C со скоростью нагрева 10°C/мин.

2.6.4 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Термические свойства и кристалличность материалов оценивали методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) с использованием прибора NETZSCH DSC 204 F1 Phoenix (NETZSCH, Германия). Исследование выполняли в атмосфере аргона в диапазоне температур от 25 до 120°C. Первый нагрев выполнялся от комнатной температуры до 120°C со скоростью 10°C/мин с последующим охлаждением до 30°C со скоростью 1°C/мин и повторным нагревом до 120°C со скоростью 10°C/мин. Кристалличность полимерной матрицы рассчитывали согласно формуле 2.1 [95]:

$$W_c = \left(\frac{\Delta H_f \cdot w_p}{\Delta H_{f,100\%}} \right) \cdot 100\%, \quad (2.1)$$

где ΔH_f^m энтальпия плавления, w_p массовая доля ПКЛ в композите, $\Delta H_{f,100\%}$ энтальпия плавления полностью кристаллического ПКЛ, равная 139 Дж/гр [96].

2.6.5 Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

Химический состав композитов и скаффолдов исследовали методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИКФС) на установке

Tensor 27 (Bruker Optik GmbH, Германия) с использованием кристалла ZnSe в диапазоне 530-4000 см^{-1} с разрешением 2 см^{-1} .

2.6.6 Рентгенофазовый анализ

Кристаллическую структуру и структурно-фазовое строение материалов исследовали методом рентгенофазового анализа (РФА) на дифрактометре XRD 6000 (Shimadzu, Япония). Образцы подвергали воздействию монохроматического $\text{CuK}\alpha$ -излучения с длиной волны 1,5405 Å, съёмку проводили в диапазоне углов сканирования от 10° до 80° с шагом сканирования 0,06°. Для аппроксимации рентгенограмм использовалось программное обеспечение «Match!» (Crystal Impact, Германия) и Origin (OriginLab Corporation, США).

Размер области когерентного рассеяния оценивали по результатам расчёта согласно формуле Шеррера (2.2):

$$l_c = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}, \quad (2.2)$$

где $k = 0,9$, λ – длина волны, β – ширина рефлекса на его полувысоте, θ – угол дифракции.

2.6.7 Гель-проникающая хроматография

Молекулярно-массовое распределение полимерной матрицы скаффолдов исследовали методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) на приборе Agilent 1200 Infinity (Agilent Technologies, США) с использованием колонки PLgel 5 мкм MIXED-C. Скаффолды растворяли в хлороформе в концентрации 0,8 об.% и фильтровали через шприцевой фильтр 0,45 мкм. Для калибровки прибора использовались стандарты полистирола, а в качестве элюента применялся хлороформ при скорости потока 1 мл/мин.

Расчёт среднечисловой молекулярной массы выполняли по формуле 2.3:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}, \quad (2.3)$$

где N_i – число молекул с молекулярной массой M_i .

Расчёт средневесовой молекулярной массы выполняли по формуле 2.4:

$$\overline{M_w} = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \quad (2.4)$$

Полидисперсность оценивали по результатам расчёта согласно формуле 2.5:

$$D = \frac{M_w}{M_n} \quad (2.5)$$

2.6.8 Одноосное сжатие

Механические испытания на сжатие проводили на универсальной электромеханической испытательной машине Instron 3369 (Instron, США) при скорости нагружения 1 мм/мин до разрушения. Предел текучести и предел прочности при сжатии определяли по кривым напряжения-деформации, модуль упругости рассчитывали по наклону кривых напряжения-деформации. Образцы для испытания имели форму пористых цилиндров высотой 10 мм и диаметром 10 мм с заполнением в форме гироида с расстоянием между линиями печати 1 мм.

2.6.9 Эффект памяти формы

Для оценки эффекта памяти формы изготавливали пористые образцы размером 30×5×3 мм и оснастку для изгиба на 90° (Рисунок 2.6). Образцы и оснастку помещали на 5 минут в дистиллированную воду при температурах 37, 43 и 50°C, после чего образцы изгибали путём помещения в паз оснастки. Изогнутый образец охлаждали в дистиллированной воде при температуре +5°C в течение 5 минут, после чего извлекали из оснастки, обсушивали фильтровальной бумагой и оставляли на воздухе при комнатной температуре на 10 минут.

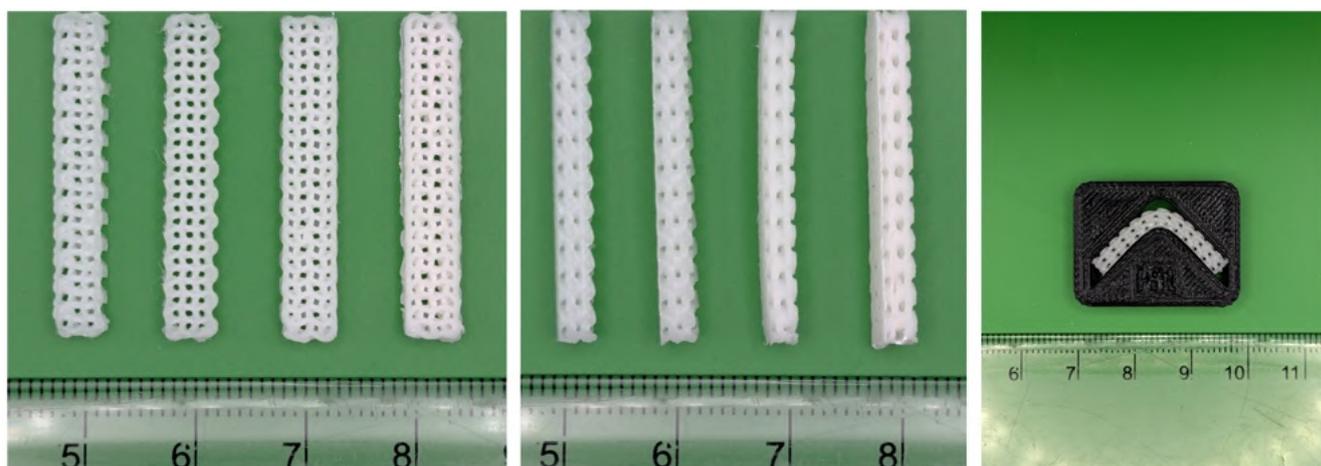


Рисунок 2.6 – Образцы и оснастка для оценки памяти формы

С использованием транспортира и миллиметровой бумаги измеряли угол изгиба образца и рассчитывали коэффициент его фиксации (R_f) по формуле 2.6:

$$R_f = \frac{180^\circ - \theta_f}{90^\circ} \times 100\%, \quad (2.6)$$

где θ_f – угол фиксации изгиба образца после снятия нагрузки.

После оценки коэффициента фиксации образец вновь помещали в воду при нагреве, наблюдали восстановление его формы, после чего извлекали образец, обсушивали фильтровальной бумагой и оставляли на воздухе при комнатной температуре на 10 минут. С использованием транспортира и миллиметровой бумаги измеряли угол изгиба образца и рассчитывали коэффициент восстановления формы (R_r) по формуле 2.7:

$$R_r = \frac{\theta_f - \theta_r}{\theta_f} \times 100\%, \quad (2.7)$$

где θ_f – угол фиксации изгиба образца после снятия нагрузки, θ_r – угол изгиба образца после восстановления формы.

2.7 Методы исследования биологических свойств композиционных скаффолдов

2.7.1 Оценка жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток на поверхности скаффолдов

Исследование проводилось на мезенхимальных стволовых клетках (МСК), полученных с применением ферментативного метода из липоасpirата пациентов НИИ онкологии ТНИМЦ (Томск, Россия). Перед посевом клеток исследуемые образцы замачивали в питательной среде (ПанЭко, Россия) на 30 минут, после чего переносили в 24-луночные планшеты. На каждый образец наносили 20 мкл клеточной суспензии, содержащей 100 тыс. клеток, и оставляли на 10 минут. Данная процедура проводилась с целью предотвращения потери («смыва») клеток при их добавлении к образцам, находящимся в жидкой среде, тем самым обеспечивалось одинаковое количество клеток на каждом образце. В каждую лунку планшета добавляли питательную среду и инкубировали при 37°C, 5% уровне CO₂ во влажной среде.

Оценку клеточной адгезии проводили методом флуоресцентной окраски клеток непосредственно на исследуемых образцах. Для этого удаляли супернатант из лунок и дважды проводили отмывку образцов фосфатным буфером (ПанЭко, Россия). После этого клетки фиксировали 2% раствором формальдегида в течение 20 минут при 4°C. После фиксации проводили отмывку образцов в фосфатном буфере дважды и далее окрашивали с помощью ядерного красителя DAPI. Регистрацию флуоресценции клеток проводили на 3 и 10 сутки после посева. Визуализация осуществлялась с помощью системы EVOS M7000 (Thermo Scientific, США).

2.7.2 Оценка остеогенной дифференцировки остеобластов при культивировании со скаффолдами

Влияние скаффолдов на процессы остеогенной дифференцировки было исследовано в условиях *in vitro* на остеобластах – клетках костной ткани мезенхимного происхождения, играющих важную роль в ремоделировании костей и развитии скелета. Остеобласты в концентрации 80 тысяч клеток были посеяны на скаффолды с модифицированной частицами ГА и не модифицированной поверхностью. Клетки со скаффолдами культивировали в высокоглюкозной питательной среде DMEM 4.5 с добавлением 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 15% FBS NuClone, 2 mM L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина, при 37°C и 5% CO₂. Остеогенную дифференцировку индуцировали путём смены питательной среды на соответствующую с добавлением остеофакторов, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 0,1 мкМ дексаметазона и 10 mM β-глицерофосфата. В качестве контроля использовали клеточные культуры, культивировавшиеся на скаффолдах в контрольной питательной среде без добавления остеофакторов, а также клетки культивировавшиеся на пластике в контрольной и остеогенной среде в отсутствие скаффолдов. Клетки культивировали в течение 14 дней, питательную среду меняли 2 раза в неделю. По истечению времени культивирования культуры клеток окрашивали ализариновым красным для определения кальцификации внеклеточного матрикса. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером и фиксировали 70% этанолом в течение 1 часа, дважды отмывали дистиллированной

водой и после инкубировали в растворе ализаринового красного в соответствии с протоколом производителя в течение 20–30 минут при комнатной температуре. Оценить кальцификацию внеклеточного матрикса остеобластов непосредственно на скаффолдах, модифицированных ГА, не представляется возможным, так как при окраске матриц с клетками раствором ализаринового красного, краситель связывается не только с кальцием, который синтезируют клетки в процессе дифференцировки, но и с частицами ГА, входящими в структуру матрицы. По этой причине оценивали влияние скаффолдов на остеогенную дифференцировку клеток костной ткани, которые адгезировали на пластик в присутствии экспериментальных образцов.

2.7.3 Остеоинтеграция скаффолдов при имплантации в область костного дефекта с использованием лабораторных животных

2.7.3.1 Замещение дефекта носовой кости

Исследования выполнены согласно «Правилам о надлежащей лабораторной практике» (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016) и «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [97]. Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes, Страсбург, 1986).

В исследовании использовались кролики вида *Oryctolagus cuniculus* L. Линия/Сток: шиншилла советская. Вес к началу введения в исследование: 2,3-2,5 кг. Количество кроликов: 6 самцов; 10 самок. Имплантацию скаффолдов (Рисунок 2.7) выполняли под общим комбинированным наркозом. За 10-15 минут до наркоза осуществлялась премедикация из расчёта атропин – 0,025 мг/кг, димедрол – 0,025 мг/кг, сульфокамфокаин – 2,5 мг/кг. Наркоз проводили при помощи внутривенного введения пропофол – 10 мг/кг и ксила – 2 мг/кг. Длительность наркоза планировалась из расчёта 15-20 минут хирургического манипулирования на каждого животного.

Животные фиксировались на препаровочном столике в положении лёжа на животе. Доступ осуществлялся к области лицевого отдела черепа по средней линии, в проекции носовой кости. Каждому животному в области носовой кости по средней линии при помощи «моторной системы» и шаровидной фрезы формировался костный дефект размером 9×9 мм глубиной не менее 5 мм для размещения в нём цилиндрической части имплантата.

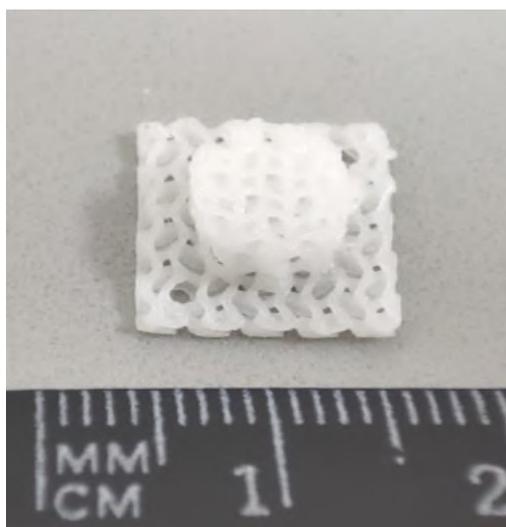


Рисунок 2.7 – Внешний вид скаффолда, изготовленного методом 3D печати

Практически во всех случаях отмечалось сообщение дефекта с полостью носа. Всем животным в область сформированного дефекта устанавливался стерильный скаффолд (Рисунок 2.8).



Рисунок 2.8 – Скаффолд, установленный в области дефекта и закреплённый титановыми минивинтами

Цилиндрическая часть скаффолда плотно входила в сформированное костное отверстие на носовой кости, плоская часть скаффолда размещалась на костной поверхности. Фиксация исследуемого скаффолда осуществлена к краю костного дефекта при помощи 2 титановых минивинтов длиной 5 мм (Конмет, Россия). Животные помещались в клетки по одному. После «пробуждения» животные восстанавливали свою двигательную активность в течение 15-20 мин. Срок наблюдения составлял 60 суток.

2.7.3.2 Морфологическая оценка тканей в области имплантации

Морфологическому исследованию подвергался материал в виде костной ткани из области имплантации. Полученный материал помещался в 10% рН-нейтральный забуференный раствор формалина. Общая продолжительность фиксации материала не превышала 18–24 часов. Проводка тканевых образцов проводилась стандартным способом в автоматическом гистопроцессоре ASP6025 S (Leica Biosystems, Германия) с использованием раствора для гистологической обработки Изопреп (Биовитрум, Россия). Из парафиновых блоков готовили гистологические срезы толщиной 4–5 мкм. Микротомию проводили с помощью санного микротомы HM 430 (Thermo Fisher Scientific, США). Для окрашивания микропрепаратов применяли готовые растворы красителей гематоксилина и эозина. Окрашивание гистологических срезов проводили в аппарате Varistain Gemini (Thermo Fisher Scientific, США). Морфологическое исследование проводилось с помощью светового микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Съёмку гистологических окрашенных микропрепаратов выполняли с использованием цифровой камеры микроскопа Eclipse Ni (Nikon, Япония).

2.7.3.3 Замещение радиального дефекта большеберцовой кости

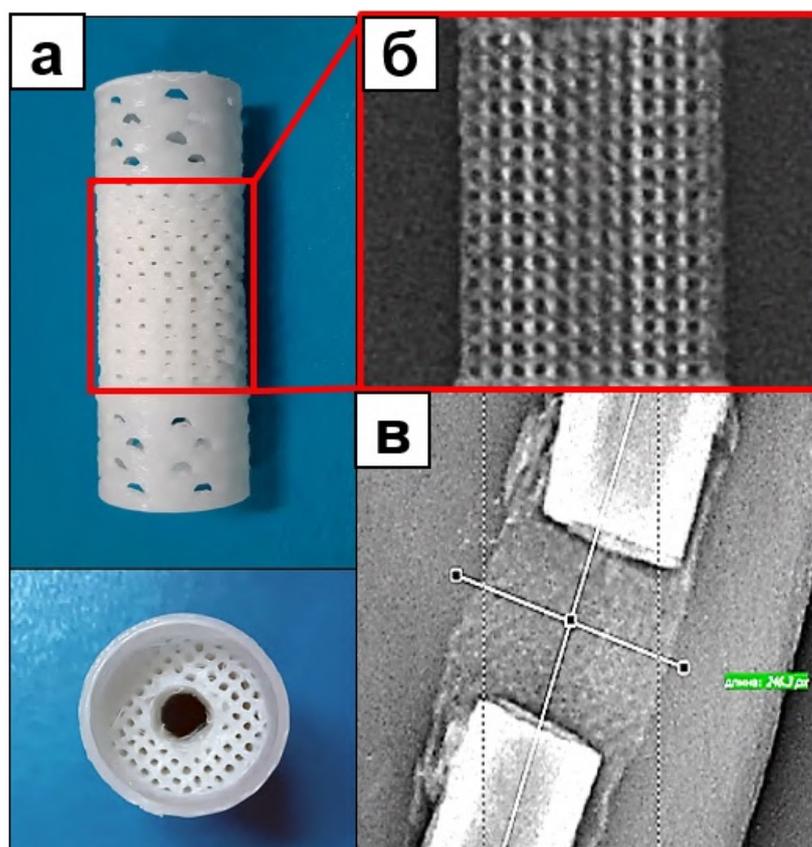
Перед проведением эксперимента было получено одобрение институционального комитета по этике (Комитет по этике ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган, Россия, код протокола 1(71), дата одобрения 28.04.2022). Оперативное вмешательство, уход за животными и эвтаназия соответствовали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других

научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes, Страсбург, 1986), принципам ухода за лабораторными животными (публикация НИИ № 85-23, пересмотренная в 1985 г.) и национальному законодательству. Нерандомизированное исследование было проведено на пяти овцах смешанной породы обоих полов в возрасте 1 года. Все овцы получали одинаковый послеоперационный уход и одинаковое полноценное кормление, их осматривал ветеринарный врач 5 дней в неделю. Им разрешалось ходить без ограничений в адаптированном виварии.

Для исследования методом FDM 3D печати изготавливали скаффолды длиной 40 мм и диаметром 18 мм (Рисунок 2.9). Размеры и форма имплантатов были спроектированы в точном соответствии с поперечными размерами большеберцовой кости экспериментальных животных. Структура средней части скаффолдов длиной 20 мм была выполнена в виде гироида, разделённого на ячейки диаметром 1 мм с толщиной стенок 450 мкм. В центре пористой части был сформирован интрамедуллярный канал диаметром 10 мм. Внешние стенки цилиндра имели поры диаметром 300 мкм для облегчения врастания кровеносных сосудов в костный дефект со стороны периостальных тканей и интрамедуллярного канала соседних костных фрагментов. Торцевые поверхности скаффолдов были выполнены в виде полых цилиндров высотой 10 мм с мелкими порами (500 мкм).

Протокол исследования включал следующие этапы:

- 1-2 дня до операции: физический осмотр и рентгенограммы обеих голеней, включая прилегающие суставы;
- День 0: операция;
- послеоперационный период: рентгенограммы делались на День 1 и далее каждую неделю;
- Эвтаназия на День 30.



а – внешний вид скаффолда, б – компьютерная томография пористой части скаффолда, в – рентгенологический снимок области дефекта с имплантированным скаффолдом

Рисунок 2.9 – Скаффолд для замещения радиального дефекта длинной трубчатой кости

Все оперативные вмешательства проводили под общей анестезией 5% раствором тиопентала натрия (10-15 мг/кг) с добавлением атропина. Первый этап операции заключался в моделировании дефекта большеберцовой кости: по передней поверхности большеберцовой кости выполнялся продольный разрез, обнажалась большеберцовая кость. Надкостница рассекалась в продольном направлении, и с помощью осциллирующей пилы резецировался сегмент кости длиной 20 мм. Затем на место дефекта устанавливали цилиндрический имплантат путём интеграции свободных концов костных фрагментов в полые цилиндры на торцевых поверхностях имплантата. Рану послойно ушивали, а конечность фиксировали аппаратом Илизарова. Внешняя фиксация области имплантации продолжалась в течение 30 дней у каждого животного. Цефазолин назначался внутримышечно в течение 7 дней после операции (0,5 г дважды в день). В

послеоперационном периоде раны подвергались ежедневному контролю, уход за раной осуществлялся каждые 2 дня.

Рентгенографический контроль проводился с использованием рентгеновской системы Premium VET (Toshiba, Япония) и цифровой рентгенографической системы с плоскопанельным детектором CXDI-401C COMPACT (Canon Inc. Medical Equipment Group, Япония). Оптическая плотность межфрагментарной щели, заполненной имплантатом и новообразованной костной тканью, измерялась с помощью оригинального программного обеспечения (Сертификат на программу для ЭВМ № 2014611777 РФ) при поперечном и продольном сканировании.

Компьютерная томография анатомических образцов проводилась с использованием настольной микротомографической системы PRODIS Compact (ООО «ПРОДИС». НДТ, Россия) и программного обеспечения VG Studio 3.5 (Volume Graphics GmbH, Германия).

Для морфологического исследования образцы препарировали в продольном направлении для визуальной оценки состояния костной и мягких тканей, лежащих на поверхности имплантата, оценки тканевого субстрата, заполняющего ячейки имплантата, и продольного осевого канала имплантата.

2.8 Статистическая обработка результатов

Размер частиц ГА и пор в сформированных скаффолдах оценивали при помощи программного обеспечения ImageJ (версия 1.54g, National Institutes of Health, США). Анализ данных и статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программ OriginPro 2023 (версия 10.0.0.154, OriginLab Corporation, США) и ImageJ (версия 1.54g, National Institutes of Health, США). Все данные представлены как среднее значение со стандартным отклонением, различия считаются статистически значимыми при $p < 0,05$ согласно одностороннему тесту ANOVA.

Глава 3. Влияние способа получения и состава на физико-химические и структурно-фазовые свойства композиционных материалов

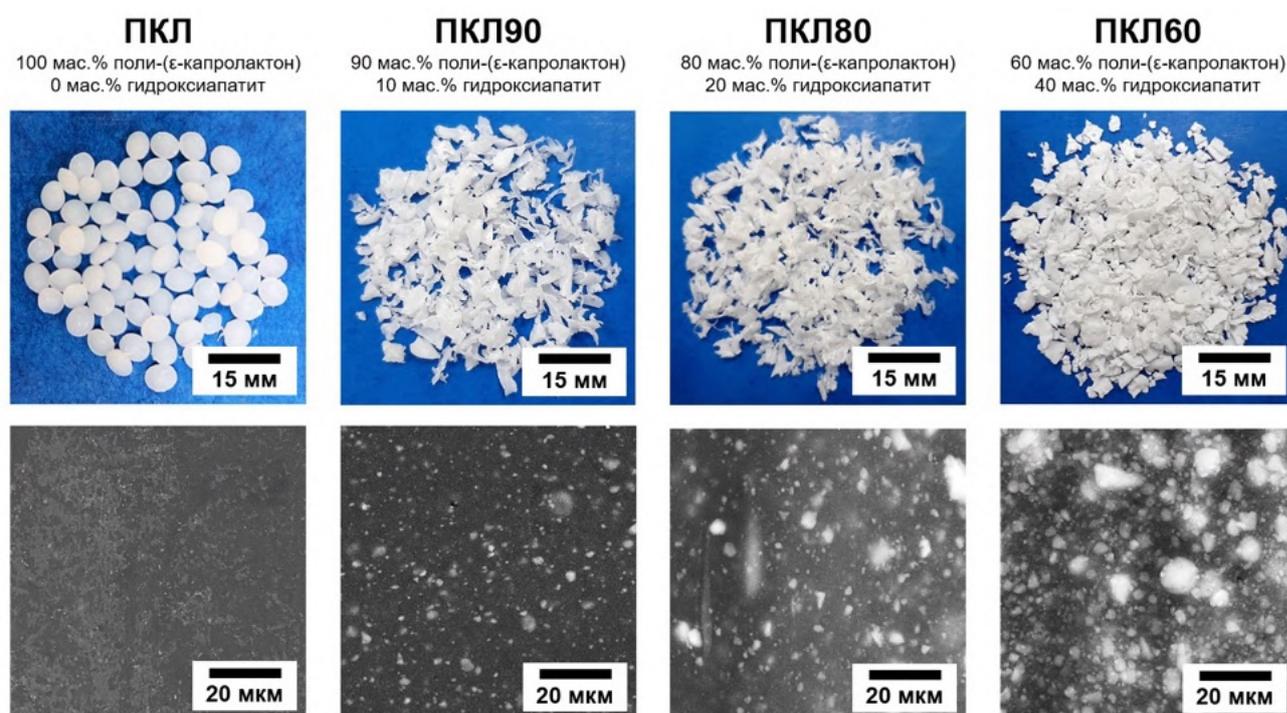
Растворные методы получения высоконаполненных полимерных композиционных материалов обеспечивают возможность продолжительного и равномерного перемешивания полимерной матрицы с неорганическим наполнителем, способствуя его более однородному распределению в объёме [98,99]. Однако одной из существенных проблем подобных подходов является склонность наполнителя к осаждению в процессе удаления растворителя, что обусловлено его значительно большей плотностью по сравнению с полимером и органическими растворителями. В связи с этим, традиционно, толщина отливаемого слоя раствора не превышает 1–2 мм, что ограничивает геометрию получаемых образцов и обуславливает формирование композитов преимущественно в виде тонких плёнок. В диссертационной работе было предложено перемешивание раствора полимера с частицами наполнителя с использованием шаровой мельницы, как способ предотвращения агломерации наполнителя. Нагрев смеси свыше температуры кипения растворителя по окончании перемешивания позволяет значительно увеличить интенсивность удаления растворителя для предотвращения оседания частиц наполнителя. Высокие напряжения сдвига в шаровой мельнице разрушают агломераты наполнителя до микро- и наноразмерных частиц, а быстрое испарение растворителя при нагреве фиксирует распределение частиц, предотвращая их повторную агломерацию, что особенно важно для систем с высокой вязкостью [100].

Смешивание раствора ПКЛ в ацетоне с порошком предварительно измельчённого ГА осуществлялось в керамическом барабане шаровой мельницы. В качестве мелющих тел использовались керамические шары двух типоразмеров: диаметром 5 мм и 15 мм, что обеспечивало эффективное перемешивание компонентов и способствовало дополнительному измельчению частиц ГА. По завершении процесса смешивания полученную суспензию выливали во фторопластовую форму слоем толщиной около 1 см и подвергали нагреву до 150

°С в течение 20 минут с целью полного удаления ацетона. После охлаждения до полного затвердевания материал измельчали с использованием дробилки для полимеров.

3.1. Морфология и элементный состав

Морфология полученных композиционных материалов существенно зависит от содержания неорганического наполнителя. При увеличении массовой доли ГА наблюдалось изменение морфологии композитов: от полимероподобных, пластичных, полупрозрачных плёнок (составы ПКЛ90 и ПКЛ80) к керамоподобным хрупким частицам (состав ПКЛ60), что наглядно представлено на рисунке 3.1 (верхний ряд). При наблюдении поверхности частиц методом СЭМ в режиме регистрации обратно рассеянных электронов отмечается гомогенное распределение частиц ГА в полимерной матрице композитов всех групп (Рисунок 3.1 нижний ряд). При этом наблюдается существенное измельчение частиц ГА относительно их исходного размера, равного 10 ± 2 мкм. Средний размер частиц в композите ПКЛ90 был $1,7 \pm 0,4$ мкм, в композите ПКЛ80 – $2,9 \pm 0,5$ мкм, в композите ПКЛ60 – $3,7 \pm 1,3$ мкм.



Верхний ряд – морфология частиц измельчённых композиционных материалов, нижний ряд – распределение частиц ГА в приповерхностном слое композитов
Рисунок 3.1 – Измельчённые композиционные материалы

Таким образом, увеличение содержания ГА в смеси сопровождается снижением эффективности его измельчения, что, вероятно, связано с ограничением подвижности частиц в объёме и снижением удельной интенсивности механического воздействия мелющих тел. Данный фактор необходимо учитывать при масштабировании и адаптации технологии к получению композитов с более высокой степенью наполнения.

Химическая устойчивость ГА к процессу механической обработки при измельчении в шаровой мельнице была оценена по изменению соотношения Ca/P. Согласно данным ЭДС анализа (Таблица 3.1), данное соотношение сохранялось на уровне, близком к стехиометрическому значению 1,67, что свидетельствует об отсутствии фазовых превращений ГА при измельчении в шаровой мельнице. Сохранение стехиометрического соотношения кальция и фосфора указывает на устойчивость к возможным механохимическим реакциям и подтверждает пригодность выбранного способа диспергирования для получения композитов с воспроизводимыми и предсказуемыми физико-химическими характеристиками наполнителя.

Таблица 3.1 – Элементный состав композиционных материалов

Группа	C, ат.%	O, ат.%	Ca, ат.%	P, ат.%	Ca/P
ПКЛ	65,71 ± 0,99	34,11 ± 0,99	-	-	-
ПКЛ90	67,52 ± 0,43	31,87 ± 0,14	0,37 ± 0,03	0,22 ± 0,06	1,68 ± 0,07
ПКЛ80	66,89 ± 0,33	32,74 ± 0,06	0,41 ± 0,06	0,25 ± 0,08	1,64 ± 0,05
ПКЛ60	56,68 ± 0,35	39,38 ± 0,32	2,44 ± 0,28	1,50 ± 0,11	1,62 ± 0,06

3.2. Термические свойства

Для оценки термической стабильности полученных композитов и подтверждения эффективности введения ГА в полимерную матрицу был проведён ТГ анализ. Термическая стабильность чистого ПКЛ и композитов оценивалась по температуре потери образцом 5% массы ($T_{5\%}$), которую считали температурой начала термической деградации полимерной матрицы [101,102]. Термическая деградация ПКЛ начинается при температуре 320 °С, что согласуется с литературными данными [103]. Введение ГА в полимерную матрицу приводит к незначительному снижению температуры начала деструкции, так $T_{5\%}$ для

композиций ПКЛ90 и ПКЛ80 составила 310 °С, а для образца ПКЛ60 — 302 °С (Рисунок 3.2). При этом важно отметить, что потеря массы в области температур, характерных для переработки материала (75–200 °С), не превышает 1,5% для всех образцов, что указывает на высокую термическую стабильность композитов и их пригодность к использованию в технологии экструзии филамента и 3D печати. Дополнительно на основе оценки неорганического остатка, оставшегося после полной деградации органической фазы, была подтверждена эффективность наполнения. Масса остатка составила от 8,59% для ПКЛ90 до 37,4% для ПКЛ60, что соответствует содержанию ГА в полученных композиционных материалах и свидетельствует об эффективности его введения в состав композитов не менее 84% от рецептурного значения.

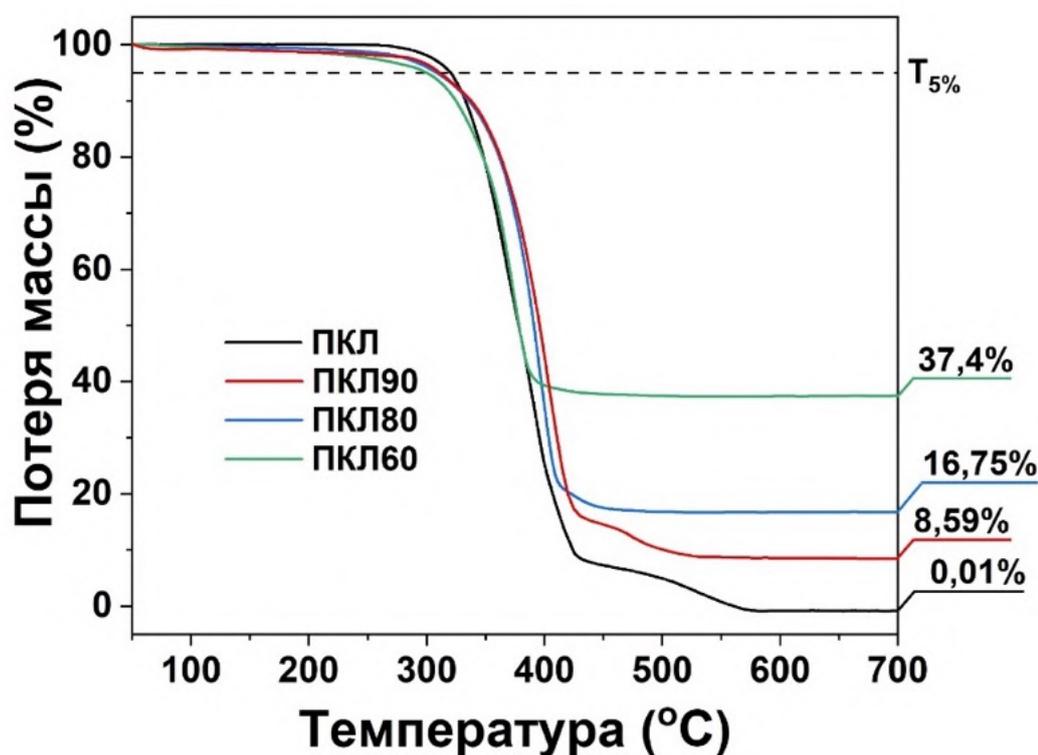
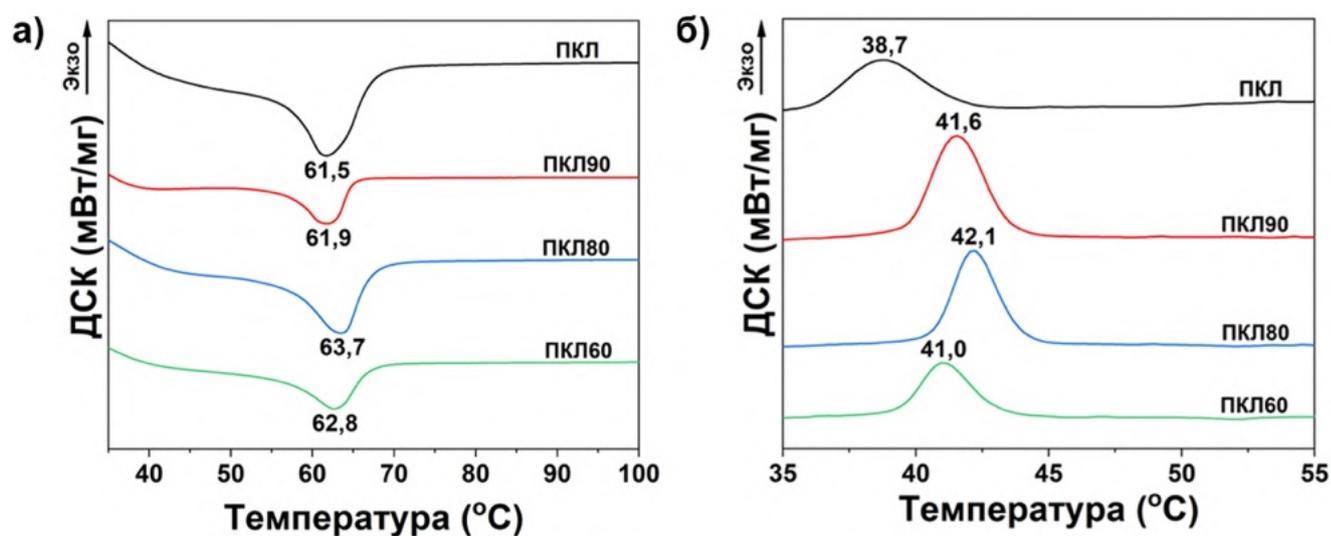


Рисунок 3.2 – ТГА-термограммы материалов с указанием температуры начала деструкции (T_{5%}) и остаточного содержания наполнителя

Исследование термических свойств материалов методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) позволило установить влияние ГА и его массовой доли на характер фазовых переходов в полимерной матрице. Анализ термограмм показал повышение как температуры кристаллизации (T_к), так и

температуры плавления ($T_{пл}$) композитов по сравнению с чистым ПКЛ (Рисунок 3.3). Температура плавления чистого полимера составляет $61,5 \pm 0,2$ °С. При введении 10 масс.% ГА наблюдается её незначительное увеличение до $61,9 \pm 0,1$ °С, далее $T_{пл}$ возрастает до $63,7 \pm 0,2$ °С для образца с 20 масс.% ГА, после чего вновь снижается до $62,8 \pm 0,3$ °С для композита с наибольшим содержанием ГА (Рисунок 3.3а). Аналогичная зависимость отмечается и для температуры кристаллизации. Для чистого ПКЛ T_k составляет $38,7 \pm 0,4$ °С. Введение 10 и 20 масс.% ГА способствует увеличению температуры кристаллизации до $41,6 \pm 0,2$ °С и $42,1 \pm 0,2$ °С соответственно, что указывает на активное участие неорганического наполнителя в процессе кристаллизации полимерной фазы. Однако при дальнейшем увеличении содержания ГА до 40 масс.% T_k снижается до $41,0 \pm 0,1$ °С (Рисунок 3.3б). При этом степень кристалличности материала снижается пропорционально увеличению содержания ГА от $31,8 \pm 0,4\%$ для чистого ПКЛ до $25,8 \pm 0,3\%$ и $25,5 \pm 0,2\%$ для ПКЛ90 и ПКЛ80 соответственно и до $15,5 \pm 0,2\%$ для композита ПКЛ60 (Таблица 3.2). Такое поведение может быть обусловлено двумя факторами: изменением макромолекулярной подвижности полимерной матрицы и механизма её кристаллизации с изменением содержания наполнителя. Частицы ГА выступают в роли центров гетерогенной кристаллизации полимерной матрицы, инициируя кристаллизацию ПКЛ при более высоких температурах [104–106]. С другой стороны, высокая концентрация и дисперсность частиц снижает подвижность полимерных макромолекул ПКЛ и препятствует формированию высокоориентированных пространственных кристаллических структур. Существенное снижение кристалличности в образце композита ПКЛ60, вероятно, является причиной падения температуры плавления. Существенное снижение кристалличности в образце ПКЛ60, по-видимому, и обуславливает уменьшение температуры плавления вследствие снижения энергозатрат на переход материала в аморфное состояние. Уменьшение объёма кристаллических структур в материале сопровождается увеличением доли аморфной фазы, переход которой в расплав требует меньшего количества энергии и происходит при более низкой температуре.

Таким образом, результаты ТГ анализа и ДСК подтверждают, что введение ГА оказывает значительное влияние на термическое поведение композитов на основе ПКЛ. Несмотря на небольшое снижение температуры начала термической деструкции, все образцы сохраняют высокую стабильность в диапазоне температур, характерных для процессов экструзии и 3D печати. Одновременно наблюдаемое повышение температур кристаллизации и плавления при содержании наполнителя до 20 масс.% свидетельствует о формировании дополнительных центров гетерогенной кристаллизации в полимерной матрице. Однако при содержании ГА 40 масс.% происходит снижение кристалличности, что обуславливает смещение температур плавления в область более низких значений.



а – второй нагрев, б – охлаждение

Рисунок 3.3 – ДСК-термограммы материалов

3.3. Структурно-фазовое строение

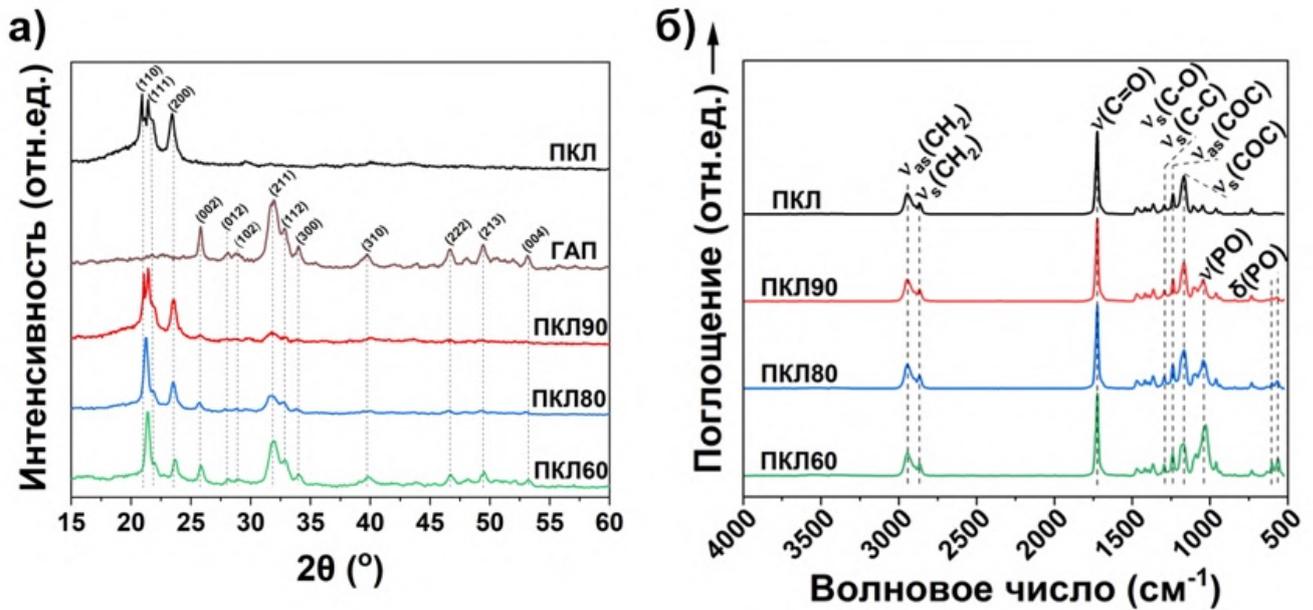
Исследование методом рентгенофазового анализа (РФА) позволило более детально оценить влияние ГА на процессы кристаллообразования в композитах на основе ПКЛ. Полученные рентгенограммы чистого ПКЛ демонстрируют выраженные дифракционные рефлексы при углах 2θ равных $20,9^\circ$, $21,6^\circ$ и $23,7^\circ$, которые, согласно литературным данным, соответствуют кристаллографическим плоскостям (110), (111) и (200) соответственно (Рисунок 3.4а) [107]. Эти рефлексы характерны для кристаллической фазы ПКЛ, и их присутствие дополнительно подтверждает наличие упорядоченных структур в материале.

Таблица 3.2 – Кристаллические свойства материалов

Группа	Кристалличность*, %	Область когерентного рассеяния, нм
ПКЛ	31,8 ± 0,4	6,15 ± 0,33
ПКЛ90	25,8 ± 0,3	7,76 ± 0,54
ПКЛ80	25,5 ± 0,2	16,42 ± 0,73
ПКЛ60	15,5 ± 0,2	16,07 ± 0,58

*по результатам ДСК

В случае композиционных образцов с добавлением ГА наблюдается изменение картины дифракции, в диапазоне от 25° до 60° появляются дополнительные рефлексы, характерные для кристаллической структуры ГА [108]. При этом с увеличением массовой доли ГА в составе композита заметно возрастает относительная интенсивность данных рефлексов, что свидетельствует об увеличении доли минеральной фазы. Одновременно с этим наблюдается уменьшение аморфного гало в области рефлексов, характерных для ПКЛ, а также изменение полуширины этих рефлексов. Снижение полуширины дифракционных рефлексов может быть интерпретировано как увеличение размера областей когерентного рассеяния (ОКР), или увеличение размера кристаллитов. Подобный эффект может быть обусловлен описанным в литературе процессом транскристаллизации, когда макромолекулы полимера выстраиваются в упорядоченные структуры вблизи поверхности твёрдой фазы – в данном случае частиц ГА [104]. Гетерогенные центры кристаллизации, представленные частицами минерального наполнителя, способствуют ориентации полимерных цепей, что приводит к формированию упорядоченных транскристаллических областей на границе раздела фаз. При высоком содержании наполнителя происходит ограничение подвижности макромолекул, что препятствует формированию пространственно-ориентированных кристаллитов и приводит к ранее установленному снижению общей кристалличности полимерной матрицы, однако формируются области когерентного рассеяния у поверхностей центров кристаллизации – частиц ГА. В результате может наблюдаться неравномерное распределение кристаллических фаз, при котором общая степень кристалличности материала снижается несмотря на наличие участков упорядоченного рассеяния.



а – РФА дифрактограммы материалов, б – ИКФС спектры материалов
Рисунок 3.4 – Структурно-фазовое строение материалов

Дополнительное подтверждение стабильности полимерной матрицы в композитах было получено методом инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИКФС). Спектры чистого ПКЛ демонстрируют набор характерных полос поглощения в областях 2945 см^{-1} (асимметричные колебания групп CH_2), 2868 см^{-1} (симметричные колебания групп CH_2), 1724 см^{-1} (валентные колебания карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$), а также 1294 см^{-1} , 1240 см^{-1} и 1168 см^{-1} (колебания связей $\text{C}-\text{O}$ и $\text{C}-\text{C}$ в сложноэфирной цепи) [109]. При анализе спектров композиционных материалов обнаруживаются дополнительные полосы, относящиеся к ГА, в частности в областях 1037 см^{-1} (валентные колебания PO групп), 602 и 563 см^{-1} (деформационные колебания PO групп), что указывает на присутствие минеральной фазы в составе материала [110]. Важно отметить, что существенных изменений в форме, ширине и положениях полос поглощения, характерных для ПКЛ, не наблюдается. Это указывает на отсутствие значительных химических изменений в структуре полимера при добавлении ГА. Тем не менее при повышении содержания минерального наполнителя возможно усиление процессов поверхностного окисления, что проявляется во введении дополнительных гидроксильных групп в полимерную матрицу [111]. Несмотря на это, никаких признаков глубокой окислительной деструкции полимера не

выявлено. В частности, не наблюдается уширения или сдвига полосы поглощения карбонильной группы при 1724 см^{-1} , что обычно ассоциируется с деградацией полиэфирных цепей. Отсутствие новых полос, нехарактерных ни для ПКЛ, ни для ГА, также свидетельствует об отсутствии образования новых химических связей между компонентами и, как следствие, подтверждает химическую стабильность полученных композиционных материалов.

Таким образом, результаты РФА и ИКФС анализа в совокупности демонстрируют, что введение от 10 до 40 масс.% ГА оказывает влияние на структурно-фазовые свойства ПКЛ, способствуя изменению характера кристаллизации, при этом не нарушая химическую целостность и стабильность полимерной матрицы.

Выводы по третьей главе

Проведённые комплексные исследования позволили всесторонне оценить влияние способа получения и массовой доли ГА на структуру и термические свойства композитов на основе ПКЛ. Установлено, что введение ГА в полимерную матрицу оказывает выраженное воздействие на процессы кристаллизации: в композиционных образцах наблюдается увеличение температур кристаллизации и плавления по сравнению с чистым ПКЛ, особенно при содержании ГА до 20–40 масс.%. Это свидетельствует о гетерогенной природе кристаллизации, инициируемой частицами ГА, которые, вероятно, выступают в роли центров упорядоченного роста кристаллитов. В то же время, увеличение содержания ГА приводит к снижению степени кристалличности материала, что связано с ограничением подвижности полимерных цепей и препятствием для формирования высокоориентированных структур. Полученные данные также указывают на переход кристаллизующейся фазы ПКЛ в транскристаллическое состояние вблизи поверхности минерального наполнителя. Уменьшение объёма кристаллической фазы сопровождается ростом аморфной составляющей, что объясняет снижение температуры плавления при высоких концентрациях наполнителя. Результаты РФА подтвердили наличие взаимодействия между полимерной матрицей и частицами ГА, выражающегося в формировании когерентных кристаллитов у

границ фаз. Наряду с этим, данные ИКФС не выявили признаков химической деструкции ПКЛ или образования новых химических связей между компонентами, что свидетельствует о высокой химической стабильности полученных композитов.

Важную роль в формировании свойств композитов играет способ их получения. Использование растворного способа с применением шаровой мельницы обеспечивает равномерное распределение наполнителя в объёме полимерной матрицы. Термический этап сушки и удаления ацетона при 150 °С позволяет избежать агрегации частиц ГА.

Таким образом, введение ГА в ПКЛ в сочетании с выбранным способом их смешивания позволяет получить высоконаполненные композиционные материалы со структурной однородностью, высокой химической и термической стабильностью, что делает их перспективными для дальнейшего использования в изготовлении тканеинженерных скаффолдов методами экструзии и 3D печати.

Глава 4. Влияние состава композиционных материалов на параметры формирования биомиметических скаффолдов, их физико-химические и функциональные свойства

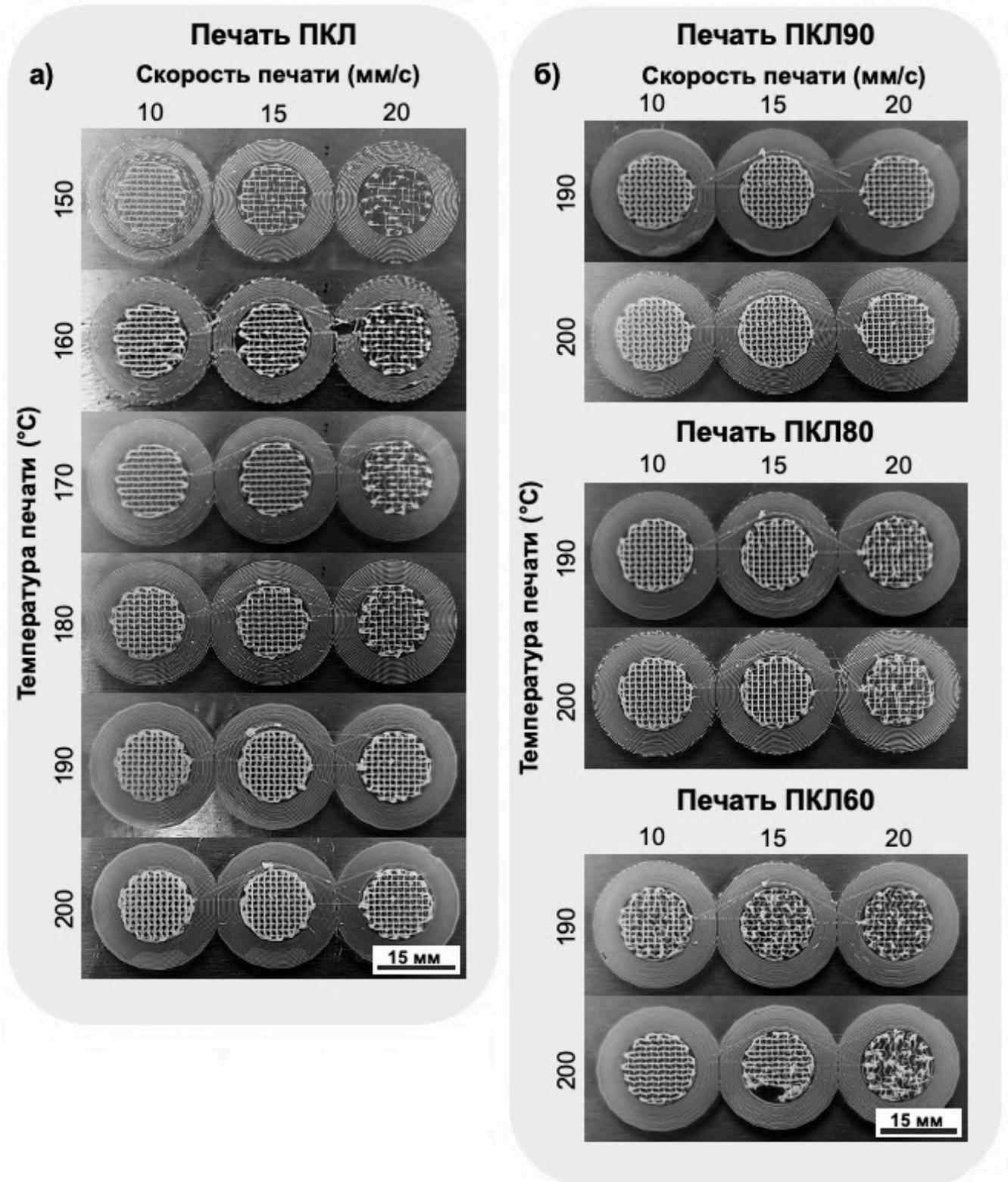
Успешная экструзия филаментов из чистого ПКЛ и композитов ПКЛ90, ПКЛ80 и ПКЛ60 была достигнута за счёт подбора температурных режимов в зоне нагрева используемого лабораторного экструдера. Повышение содержания ГА в материале сопровождалось увеличением температуры экструзии, что обусловлено снижением текучести расплава по мере увеличения доли неорганической фазы [112–115]. Это связано с ограничением подвижности макромолекул полимера и усилением межфазного взаимодействия в условиях повышенной вязкости расплава высоконаполненных композитов. Таким образом, повышение температуры с увеличением массовой доли ГА в материале обеспечивало стабильную экструзию материала, предотвращая флуктуации в толщине и морфологии филамента. Визуальный контроль полученных филаментов подтвердил их однородность и гладкость поверхности для всех составов материалов (Рисунок 4.1). Диаметр полученных филаментов составлял $2,7 \pm 0,2$ мм, что соответствует требованиям, предъявляемым к филаментам для FDM 3D печати с использованием 3D принтера Ultimaker S5.



Рисунок 4.1 – Внешний вид филаментов

4.1. Режим 3D печати

Следующим этапом работы стало определение оптимальных параметров 3D печати скаффолдов с использованием полученных филаментов. В ходе предварительных экспериментов были подобраны режимы печати, позволяющие минимизировать количество дефектов и максимально приблизить архитектуру скаффолда к выбранной гироидной структуре. Сначала оптимальные параметры отрабатывались для чистого ПКЛ. Было установлено, что печать при скорости 10 мм/с позволяет получать скаффолды с высокой точностью, близкой к 3D модели, однако в диапазоне температур от 150 до 180 °С наблюдалась неоднородность толщины формируемых элементов, вероятно, вследствие пониженной текучести расплава полимера (Рисунок 4.2а) [59]. Известно, что при низких скоростях сдвига расплав ПКЛ демонстрирует ньютоновское поведение, при котором вязкость остаётся практически постоянной вне зависимости от напряжения сдвига [113]. При этом известно, что скорость сдвига расплава на выходе из сопла FDM 3D принтера при скорости печати менее 100-150 мм/с не достигает значений, при которых поведение расплава ПКЛ переходит от ньютоновского к неньютоновскому [116]. Следовательно, вязкость расплава ПКЛ остаётся постоянной при увеличении скорости печати в диапазоне от 10 до 20 мм/с, а основным фактором, влияющим на качество напечатанного скаффолда при увеличении скорости печати, является скорость перемещения сопла относительно подложки. Однако, при температурах 190–200 °С отдельные линии печати становятся более однородными по толщине, сохраняется характерная волнистая форма линий печати гироидной структуры. Повышение температуры положительно сказывается на текучести расплава и способствует формированию более точной геометрии, соответствующей 3D модели скаффолда. Для композитов ПКЛ90 и ПКЛ80 сохраняются аналогичные зависимости. Высокая точность печати достигается в диапазоне температур 190–200°С, а допустимая скорость может варьироваться от 10 до 15 мм/с без существенного ухудшения качества (Рисунок 4.2б). Однако, при более высоком содержании ГА условия печати имеют более жёсткие ограничения.



а – скаффолды из ПКЛ, б – композиционные скаффолды
 Рисунок 4.2 – Внешний вид скаффолдов, изготовленных с различным содержанием ГА, при различных скоростях и температурах печати

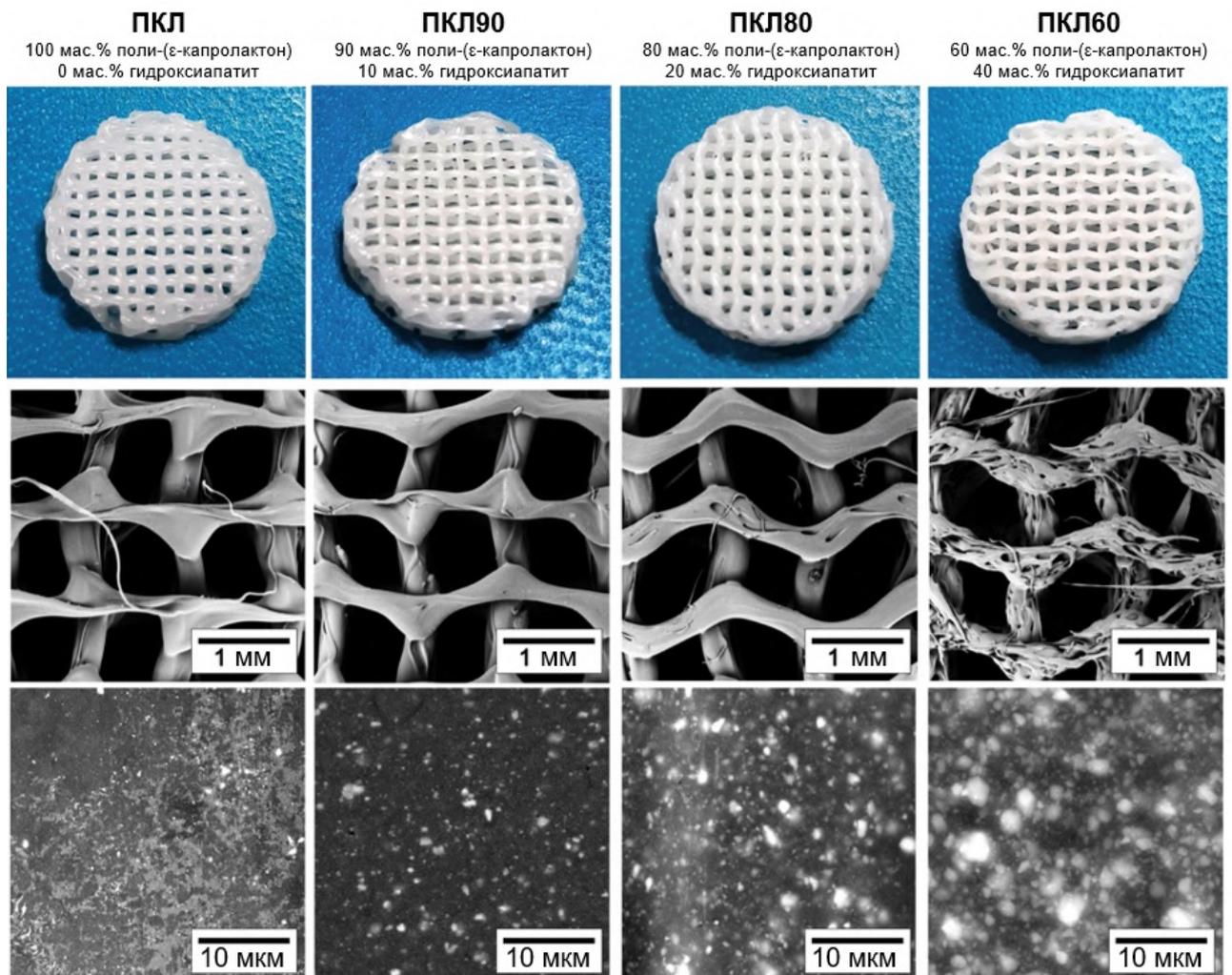
Печать бездефектных скаффолдов из композита ПКЛ60 возможно только при температуре 200 °C и скорости 10 мм/с, в остальных случаях наблюдаются нарушение геометрии, появление дефектов и надрывов в линиях печати, потеря

заданной структуры (Рисунок 4.2б). Таким образом, выбор параметров FDM 3D печати должен учитывать как состав композита, так и его реологическое поведение, которое определяется соотношением органической и неорганической фаз. Результаты ранее представленного ТГ анализа подтвердили высокую термическую стабильность ПКЛ и композитов в диапазоне температур до 200 °С, что позволяет использовать данный температурный режим без риска термической деструкции полимерной матрицы. В то же время важно отметить, что повышение скорости печати до 15-20 мм/с является допустимым для чистого ПКЛ и композитов ПКЛ90 и ПКЛ80 и может быть применено при печати крупных объектов для экономии времени. Однако такие изменения параметров печати необходимо опробовать в каждом конкретном случае, принимая во внимание возможное снижение качества изделия.

4.2. Морфология скаффолдов

Изготовленные методом FDM 3D печати скаффолды из ПКЛ и композитов демонстрируют высокую точность воспроизведения 3D модели структуры гироида. На рисунке 4.3 представлены внешний вид скаффолдов, их макроструктура, а также распределение ГА в приповерхностном слое. Во всех экспериментальных группах удалось воспроизвести заданную структуру гироида, что свидетельствует о применимости технологии FDM 3D печати для переработки высоконаполненных композитов и верно подобранных параметрах печати (Рисунок 4.3 верхний ряд). Анализ макроструктуры скаффолдов выявил, что добавление ГА оказывает заметное влияние на морфологические характеристики отдельных линий печати (Рисунок 4.3 средний ряд). В частности, скаффолды из чистого ПКЛ, а также композитов ПКЛ90 и ПКЛ80 характеризуются гладкой поверхностью линий печати, тогда как морфология поверхности образцов из ПКЛ60 становится более шероховатой, в структуре изделия присутствуют мелкие поры и надрывы. С увеличением содержания ГА наблюдается тенденция к утолщению линий печати. Средняя ширина линий печати возрастает от 350 ± 74 мкм для ПКЛ до 445 ± 56 мкм для ПКЛ60. Такое утолщение, вероятно, связано с изменением реологических свойств расплава при увеличении доли минерального

наполнителя [114,117,118]. Высокомолекулярный ПКЛ известен своей высокой вязкостью и пластичностью, которая сохраняется даже при повышенных температурах. В процессе печати это приводит к тому, что расплавленный полимер под действием сдвиговых нагрузок вытягивается, происходит истончение линий печати в зоне осаждения расплава на столик принтера. Введение в полимерную матрицу ГА снижает пластичность материала, повышает температуру и скорость кристаллизации, препятствуя тем самым деформационным изменениям отдельных линий печати. В результате линии при печати композиционными материалами становятся толще, менее подвержены деформации и имеют более точно воспроизведённую волнообразную форму, характерную для гироида.



Верхний ряд – внешний вид скаффолдов, средний ряд – макроструктура скаффолдов, нижний ряд – распределение ГА в приповерхностном слое скаффолдов

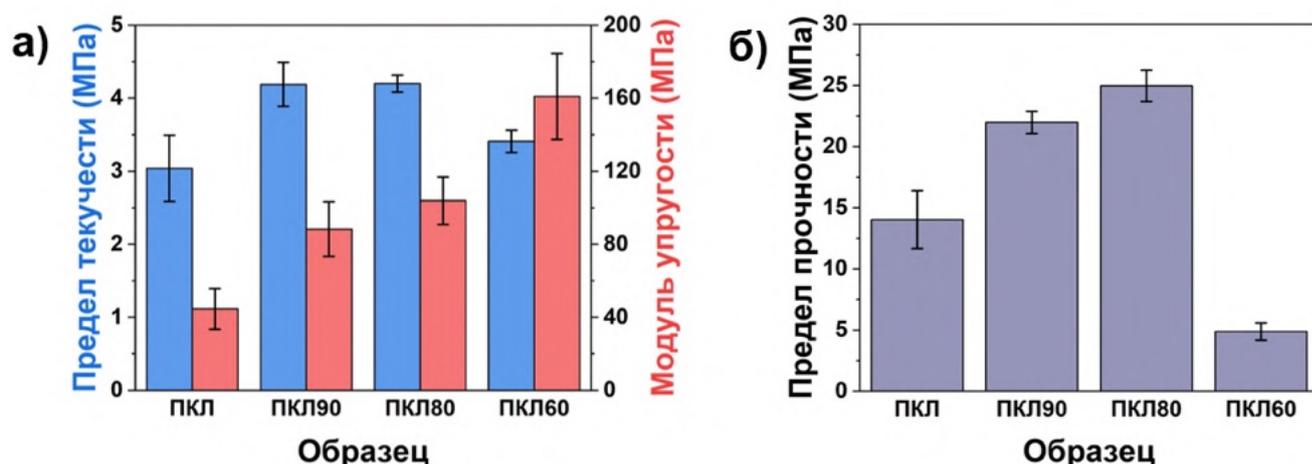
Рисунок 4.3 – СЭМ изображения скаффолдов

Несмотря на потенциальную склонность ГА к агрегации в полимерной матрице при прохождении через сопло принтера, СЭМ исследования в режим детектирования обратнорассеянных электронов демонстрируют равномерное распределение минеральных частиц в приповерхностном слое скаффолдов (Рисунок 4.3 нижний ряд). Белые области на снимках, соответствующие частицам ГА, не образуют агломератов и равномерно распределены в объёме материала. Равномерное распределение наполнителя ГА необходимо не только для пригодности композитного материала для 3D печати, но и для обеспечения его высоких механических характеристик и предсказуемого биомеханического поведения скаффолдов в организме.

4.3. Механические свойства скаффолдов

Механические испытания изготовленных биомиметических скаффолдов на сжатие позволили количественно оценить влияние содержания ГА на прочностные характеристики. На рисунке 4.4 представлены данные, демонстрирующие изменение модуля упругости, предела текучести и предела прочности скаффолдов при изменении массовой доли ГА. Общая тенденция заключается в том, что добавление минерального наполнителя приводит к увеличению жёсткости скаффолдов, что выражается в росте модуля упругости с увеличением содержания ГА (Рисунок 4.4а). Это поведение может быть объяснено эффектом армирования: ГА, равномерно распределённый в полимерной матрице, формирует прочные межфазные связи с полимером, что способствует передаче механической нагрузки и повышению величины сопротивления деформации [119,120]. Повышение модуля упругости также свидетельствует о формировании прочной межфазной адгезии на границе раздела полимерной матрицы и наполнителя [121,122]. Однако, как и в случае с другими наполненными материалами, усиление межфазного взаимодействия и уменьшение пластичности материала приводит не только к увеличению жёсткости, но и к росту хрупкости полученных скаффолдов. Этот эффект особенно заметен при анализе значений предела текучести: для чистого ПКЛ он составляет $3,40 \pm 0,45$ МПа, для композитов ПКЛ90 и ПКЛ80 $4,19 \pm 0,30$ МПа и $4,20 \pm 0,12$ МПа, соответственно, что указывает на способность скаффолдов

из этих композитов выдерживать повышенные нагрузки без пластической деформации. Тем не менее, при дальнейшем увеличении содержания ГА до 40 масс.% наблюдается снижение предела текучести до $3,41 \pm 0,15$ МПа. Морфологические дефекты, возникающие при печати композитом ПКЛ60, оказывают прямое влияние на механические свойства, снижая не только текучесть, но и общий предел прочности при сжатии. Такая закономерность особенно наглядно проявляется при анализе предела прочности, приведённого на рисунке 4.4б. Предел прочности при сжатии сначала увеличивается при переходе от чистого ПКЛ к ПКЛ90 и ПКЛ80, отражая эффект армирования. Дефекты, обнаруженные ранее при микроскопическом анализе поверхности скаффолдов, вероятно, способствуют концентрации напряжений при механической нагрузке и инициируют разрушение. Таким образом, можно заключить, что эффективное армирование наблюдается только при содержании ГА до 20 масс.%. При этом, важно отметить, что предел текучести высоконаполненного композита ПКЛ60 статистически не отличался от предела текучести чистого ПКЛ, что свидетельствует о сохранении высокой эластичности материала.



а – предел текучести и модуль упругости, б – предел прочности

Рисунок 4.4 – Механические характеристики при сжатии скаффолдов, изготовленных методом FDM 3D печати с заполнением в форме гироида

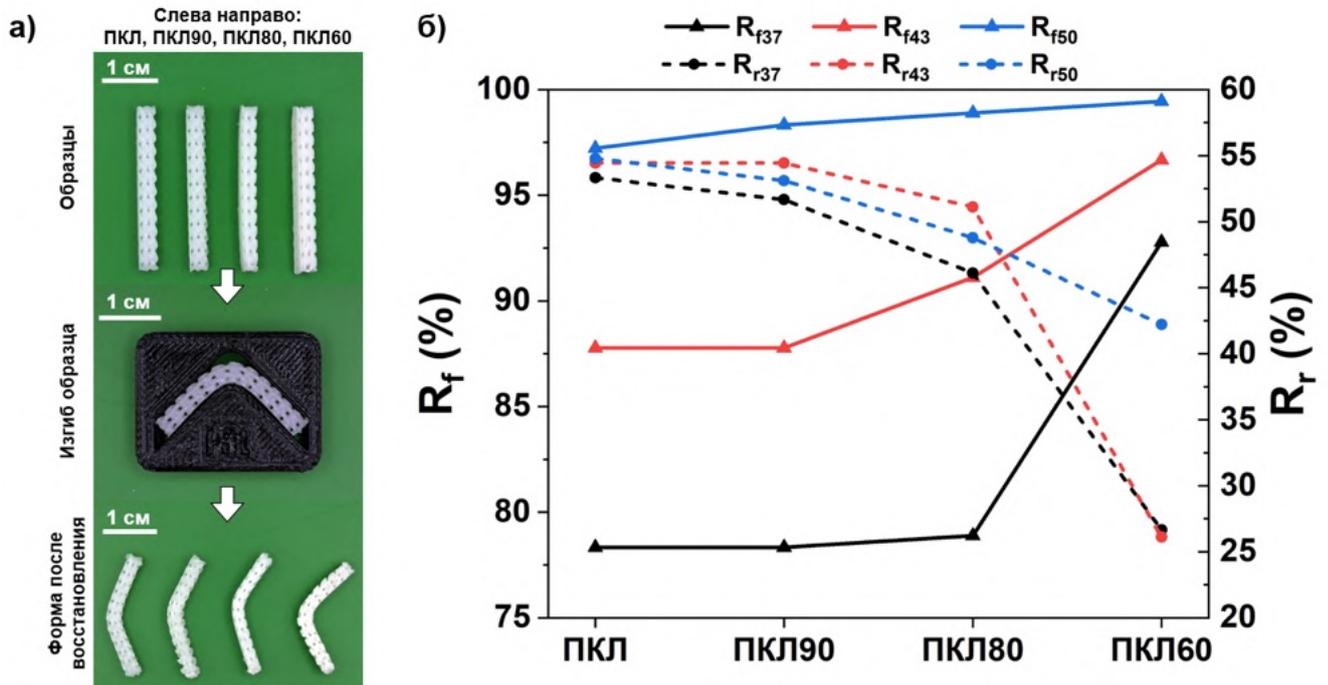
4.4. Эффект памяти формы

Помимо анализа механических характеристик, важным аспектом оценки функциональных свойств биомиметических скаффолдов является изучение их способности к проявлению эффекта памяти формы (ЭПФ), что особенно актуально

для разработки биоразлагаемых изделий, предназначенных для минимально инвазивной имплантации [123]. Исследования показали, что скаффолды, изготовленные из ПКЛ и композитов с различным содержанием ГА, демонстрируют выраженный ЭПФ при температурах, близких к физиологическим от 37 до 50 °С. Такое поведение открывает перспективы для их применения в регенеративной медицине в качестве изделий, которые могут быть имплантированы в сжатом или деформированном состоянии, и способных восстанавливать свою форму непосредственно в области имплантации, реализуя эффект самофиксации.

Эксперименты проводились по следующему протоколу: образцы скаффолдов нагревали до заданной температуры, деформировали путём изгиба на 90°, затем охлаждали в изогнутом состоянии для фиксации формы. После фиксации измеряли коэффициент фиксации формы (R_f), а затем повторно нагревали образцы и определяли коэффициент восстановления (R_r). Полученные результаты демонстрируют зависимость параметров ЭПФ от состава материала и температуры при изгибе. Было установлено, что с увеличением содержания ГА коэффициент фиксации возрастает. Это может быть связано с ростом жёсткости материала: при высоком содержании ГА возрастает доля пластической деформации скаффолда. Для коэффициента восстановления формы наблюдается противоположная тенденция – его значения снижаются с увеличением доли ГА. Такое поведение также обусловлено тем, что при высоком содержании наполнителя усиливается доля необратимой пластической деформации при изгибе, что препятствует полному восстановлению скаффолда к исходной геометрии при повторном нагреве. Таким образом, ГА, с одной стороны, улучшает фиксацию формы, но с другой, ограничивает способность материала к полному восстановлению формы. Несмотря на это, даже при содержании 40 масс.% ГА скаффолды демонстрируют удовлетворительное восстановление более 40% при температуре 50 °С, что можно считать допустимым для биомедицинского применения. Эти результаты указывают на возможность реализации эффекта памяти формы для самофиксации

и имплантации в труднодоступные области организма за счёт подбора состава скаффолда.



а – способ оценки эффекта памяти формы, б – значения коэффициентов фиксации (R_f) и коэффициентов восстановления (R_r) формы скаффолдов
Рисунок 4.5 – Оценка памяти формы гидроидных скаффолдов

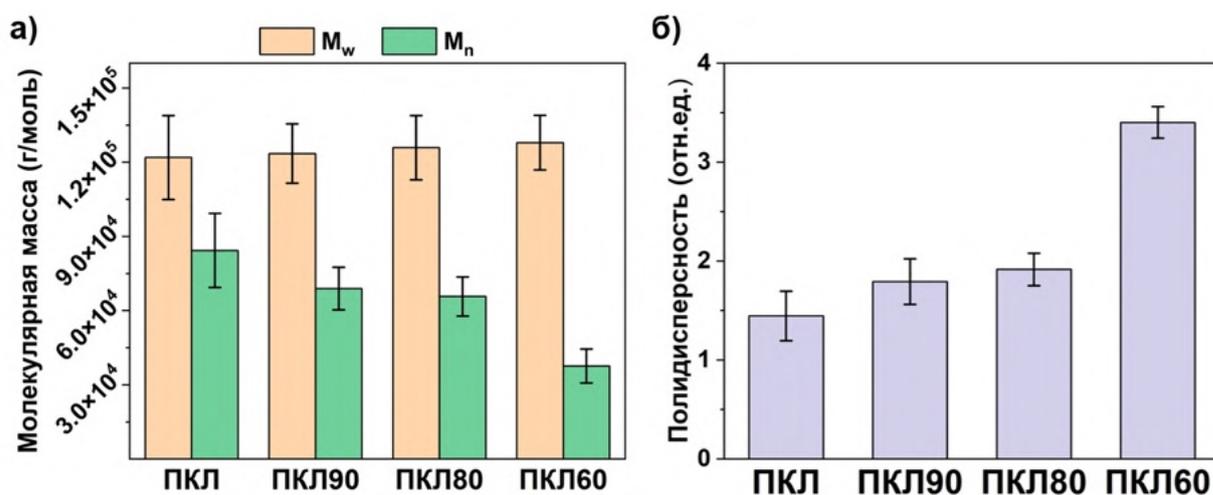
4.5. Молекулярно-массовые характеристики полимерной матрицы

Помимо морфологических особенностей и характера распределения неорганического наполнителя, важное влияние на механические свойства и, как следствие, на биомеханическое поведение композиционных скаффолдов оказывает изменение молекулярно-массового распределения полимерной матрицы. Молекулярно-массовые характеристики определяют не только прочностные свойства материала, но и его устойчивость к деструктивным воздействиям, в том числе термическим и гидролитическим, что особенно актуально в контексте использования биodeградируемых полимеров в тканевой инженерии.

Согласно результатам гель-проникающей хроматографии (ГПХ), с увеличением содержания ГА в композиционных скаффолдах наблюдается существенное снижение среднечисловой молекулярной массы (M_n) полимерной фазы от 84000 г/моль в скаффолдах из чистого ПКЛ до 38000 г/моль в скаффолдах с максимальным содержанием наполнителя ПКЛ60. При этом средневесовая

молекулярная масса (M_w) остаётся практически неизменной, что приводит к росту полидисперсности с увеличением содержания ГА. Важно отметить, что полидисперсности скаффолдов из чистого ПКЛ и композитов ПКЛ90 и ПКЛ80 близка к 2, что является её характерным значением для полимеров в процессе деструкции [124–126]. Подобное расхождение между M_n и M_w , в совокупности с ростом полидисперсности, указывает на сдвиг в сторону присутствия в полимерной матрице более коротких полимерных цепей, при сохранении общей массы более длинных фрагментов [127]. Такое поведение характерно для процессов деструкции, при которых происходит преимущественное разрушение более коротких макромолекулярных цепей, в то время как более длинные макромолекулы сохраняют относительную стабильность.

Такие изменения в молекулярной структуре ПКЛ могут быть обусловлены как термической деструкцией полимера на стадиях приготовления филамента и 3D печати, так и возможным каталитическим действием частиц ГА. Известно, что один из ключевых механизмов разрушения биоразлагаемых алифатических полиэфиров – гидролиз сложноэфирных связей, скорость которого может возрастать в присутствии кислых или основных катализаторов, а также неорганических наполнителей [128–130]. В частности, наличие в ГА гидроксильных и фосфатных групп может способствовать локальному изменению рН и ускорению процессов гидролиза [131,132]. Дополнительное подтверждение данного предположения дают результаты ТГ анализа. Согласно ранее представленным данным термостабильность чистого ПКЛ и композитов с содержанием ГА до 20 масс.% сохраняется на одном уровне. Однако для композитов с содержанием ГА 40 масс.% наблюдается снижение термической стабильности, что может быть связано с каталитическим действием частиц наполнителя на термическую деструкцию полимерных цепей.



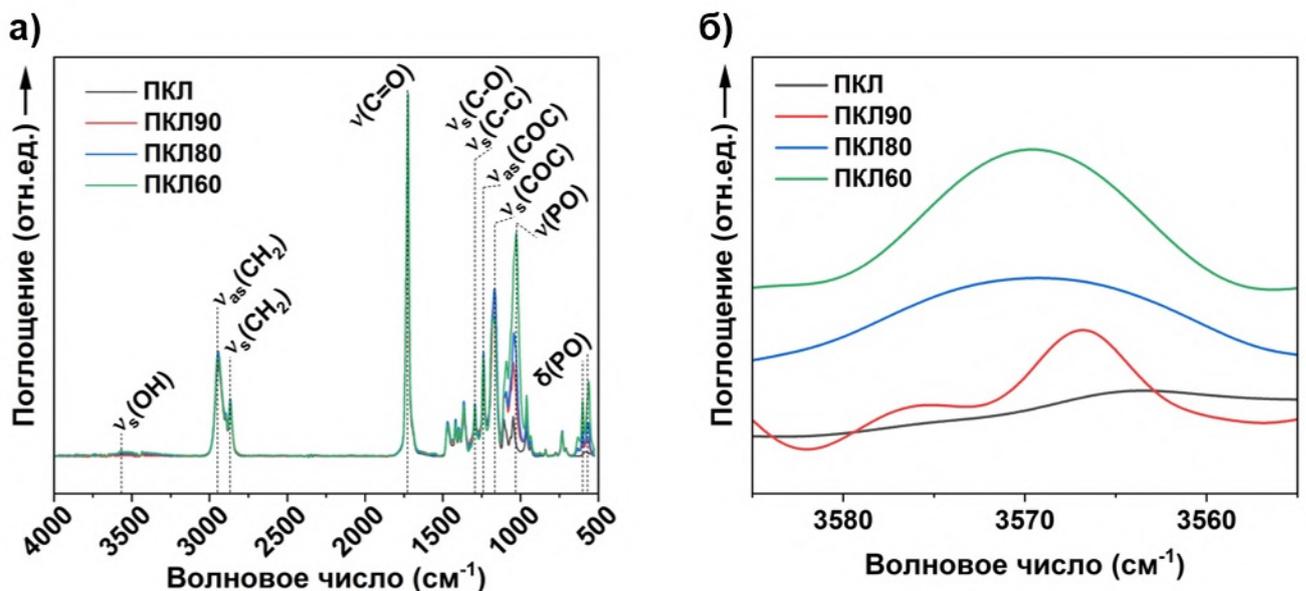
а – средневесовая (M_w) и среднечисловая (M_n) молекулярная масса,
б – полидисперсность

Рисунок 4.6 – Изменение молекулярно-массовых характеристик полимерной матрицы скаффолдов при увеличении содержания ГА

Для более глубокого понимания природы изменений молекулярно-массового распределения полимерной матрицы и оценки возможного вклада гидролитических процессов в деструкцию ПКЛ были проанализированы инфракрасные спектры скаффолдов. ИКФС как метод, чувствительный к функциональным группам в молекулах, позволяет оценивать наличие и изменения химических связей, в том числе образование новых концевых групп в результате гидролитических процессов.

Для всех образцов спектры демонстрируют характерные полосы поглощения, соответствующие основным колебаниям валентных и деформационных связей в макромолекулах ПКЛ и в структуре ГА (Рисунок 4.7а). Однако, на фоне этих характерных сигналов в спектрах скаффолдов была выявлена дополнительная слабо выраженная полоса поглощения в области $3590\text{--}3570\text{ см}^{-1}$, относительная интенсивность которой увеличивалась пропорционально содержанию ГА в составе скаффолда (Рисунок 4.7б). Данная полоса соответствует колебаниям –ОН групп и может быть интерпретирована как признак присутствия свободных концевых гидроксильных групп, формирующихся при гидролитическом расщеплении сложноэфирных связей [133–135]. Таким образом, увеличение её интенсивности указывает на возможность протекания гидролиза полиэфирной матрицы при термическом воздействии в процессе 3D печати.

Тем не менее, несмотря на наблюдаемое увеличение интенсивности полосы –ОН групп, её относительная низкая интенсивность свидетельствует о том, что вклад гидролитических процессов в изменение молекулярно-массовых характеристик весьма ограничен. Это позволяет предположить, что основным механизмом деструкции полимерной цепи при 3D печати композиционных скаффолдов является не гидролиз, а случайный разрыв полимерной цепи, вызванный механотермической деструкцией вследствие сдвиговых напряжений, возникающих при прохождении расплава композита через сопло 3D принтера в процессе печати. Такие напряжения, в сочетании с температурой, приближающейся к верхнему пределу термической стабильности материала и повышенным содержанием минерального наполнителя, создают условия для механотермической деструкции, проявляющейся в укорочении полимерных цепей и повышении полидисперсности. Таким образом, результаты ИКФС подтверждают гипотезу о преимущественно физико-механической природе деградиационных процессов, происходящих при 3D печати скаффолдов. Это важно учитывать при выборе условий переработки и проектировании состава композита, с целью минимизации необратимых изменений в молекулярной структуре полимера и обеспечения стабильности механических характеристик готового изделия.



а – ИКФС спектры скаффолдов, б – ИКФС спектры скаффолдов в области полосы поглощения –ОН групп

Рисунок 4.7 – Химическая структура скаффолдов

4.6. Биосовместимость скаффолдов *in vitro*

Установленные изменения молекулярно-массовых характеристик полимерной матрицы, вызванные преимущественно механотермической деструкцией, могут потенциально повлиять не только на физико-химические свойства скаффолдов, но и на их биологические свойства. Известно, что при деградации полиэфиров возможно образование низкомолекулярных продуктов, включая олигомеры и мономеры, обладающих цитотоксическими свойствами [103,136]. В связи с этим важным этапом исследования стала оценка биосовместимости скаффолдов.

Для анализа влияния содержания ГА и способа изготовления на клеточную совместимость были проведены *in vitro* эксперименты с использованием мезенхимальных стромальных клеток (МСК), культивируемых на поверхности скаффолдов в течение 3 и 10 суток. Результаты клеточных тестов показали, что независимо от массовой доли ГА в составе композитов, скаффолды не оказывали токсического воздействия на клетки. Это свидетельствует об отсутствии критических концентраций токсичных продуктов деградации, способных нарушать клеточную жизнеспособность или вызывать апоптоз. Флуоресцентное окрашивание ядер клеток красителем DAPI позволило визуализировать распределение клеток на поверхности образцов. Клетки демонстрировали равномерное прикрепление и активную пролиферацию, что говорит о благоприятной адгезивной способности поверхности композитов. На 10-е сутки наблюдалось существенное увеличение числа ядер, что свидетельствует о высокой пролиферативной активности МСК на всех типах скаффолдов, включая образцы с наибольшим содержанием ГА. Полученные результаты позволяют заключить, что даже при наличии структурных изменений в полимерной матрице и возможных продуктах деструкции, биосовместимость композитов сохраняется на высоком уровне. Это делает эти материалы перспективными для тканеинженерных применений, включая создание имплантируемых конструкций, поддерживающих адгезию и пролиферацию клеток в процессе регенерации тканей.

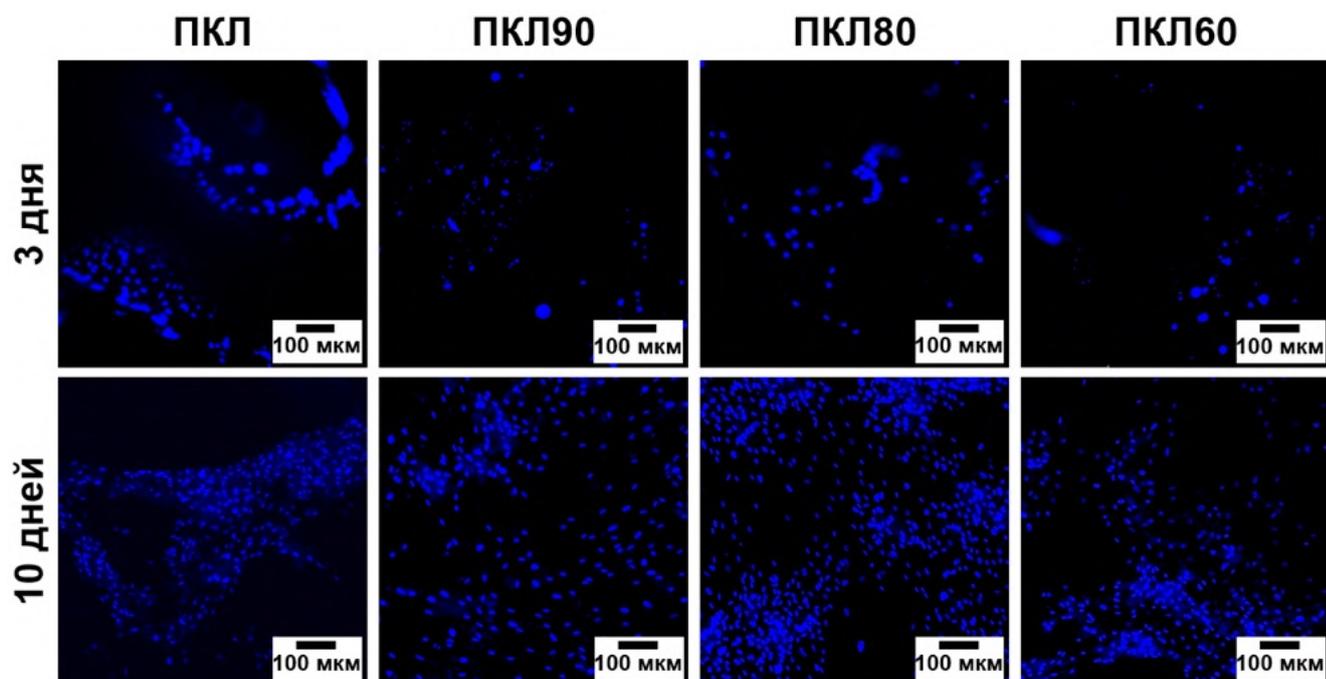
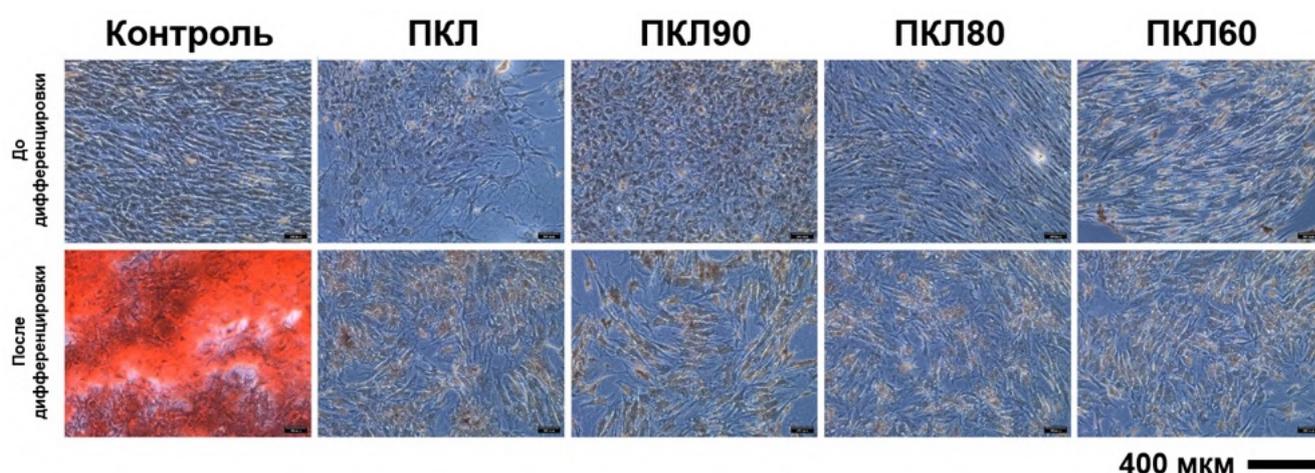


Рисунок 4.8 – Мезенхимальные стволовые клетки, окрашенные ядерным красителем DAPI, на поверхности скаффолдов из ПКЛ и композитов с различным содержанием ГА на 3-и и 10-е сутки после начала инкубации

Положительные результаты клеточных тестов, продемонстрировавшие хорошую биосовместимость и пролиферативную активность МСК на поверхности скаффолдов, являются необходимым, но не единственным условием для оценки их применимости в тканевой инженерии костной ткани. Для практического применения в регенерации костных дефектов критически важной характеристикой материала также является его биоактивность – способность не только поддерживать жизнедеятельность клеток, но и инициировать остеогенную дифференцировку остеобластов и способствовать минерализации внеклеточного матрикса.

С целью оценки остеоиндуктивных свойств изготовленных скаффолдов было проведено исследование *in vitro*, в рамках которого образцы культивировали в присутствии остеобластов в течение двух недель. По завершении инкубации клетки фиксировали и окрашивали ализариновым красным, специфически взаимодействующим с отложениями кальция, что позволяет количественно и визуально оценить степень минерализации внеклеточного матрикса.

Результаты исследования подтвердили высокую биосовместимость исследуемых скаффолдов: к 14-му дню эксперимента остеобласты имели типичную продолговатую распластannую морфологию с выраженным разрастанием цитоплазмы, что свидетельствует об их хорошей жизнеспособности. Однако, выраженных признаков остеогенной дифференцировки в экспериментальных группах зафиксировано не было. Минерализация матрикса отсутствовала или наблюдалась в незначительной степени, независимо от содержания ГА в составе композитов. Такое поведение может быть связано с низкой биодоступностью частиц ГА в объёме скаффолдов [90,137]. Несмотря на высокое общее содержание неорганического наполнителя, его нахождение под слоем полимерной матрицы может ограничивать контакт клеток с частицами ГА и, как следствие, снижать остеоиндуктивный потенциал скаффолдов [63,138]. Данная проблема хорошо описана в литературе и обычно решается за счёт поверхностного модифицирования скаффолдов. Таким образом, несмотря на отсутствие выраженной остеоиндукции, композиционные скаффолды демонстрируют высокую клеточную совместимость.



Верхний ряд – клетки до дифференцировки, нижний ряд – клетки после дифференцировки

Рисунок 4.9 – Остеогенная дифференцировка остеобластов в присутствии скаффолдов

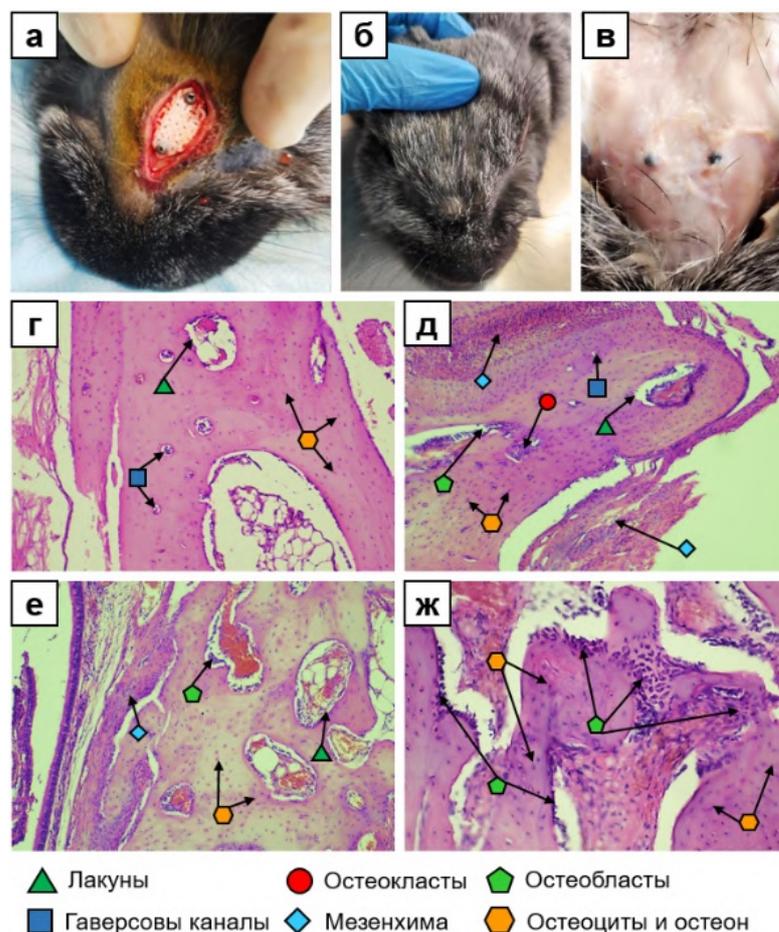
4.7. Биосовместимость и биоактивность скаффолдов *in vivo*

Несмотря на ограниченную остеоиндуктивность скаффолдов в условиях *in vitro*, полученные результаты не исключают их потенциальную эффективность в

условиях живого организма, где регенеративные процессы протекают в более сложной биологической среде с участием множества факторов, от клеточных взаимодействий до системной регуляции метаболизма. Для комплексной оценки биологического ответа на имплантацию скаффолдов, а также их способности интегрироваться в костную ткань следующим этапом были исследования *in vivo* на животной модели.

Скаффолды были имплантированы в область дефекта носовой кости кроликов, гистологическое исследование тканей проводилось на 60 сутки после операции. По результатам анализа было зафиксировано отсутствие признаков воспалительной реакции, что свидетельствует о хорошей биосовместимости материалов и отсутствии токсического или иммунного ответа со стороны организма. Более того, в зоне имплантации наблюдалось активное формирование новой костной ткани с характерной морфологией: в гистологических срезах чётко визуализировались лакуны, гаверсовы каналы, остециты и остеобласты, а также мезенхимные элементы, что свидетельствует о прогрессирующем ремоделировании ткани. Особенно выраженный остеогенез наблюдался в группе животных, которым были имплантированы скаффолды состава ПКЛ60. В этих образцах отмечалось существенное увеличение количества активных остеобластов по сравнению с другими группами. Подобный эффект можно объяснить рядом факторов, ранее установленных на этапе физико-химических и морфологических исследований. Так, скаффолды с высоким содержанием ГА характеризовались более шероховатой и пористой структурой, способствующей клеточной адгезии, а также сниженной среднечисловой молекулярной массой ПКЛ, что указывает на способность к раннему запуску процессов деструкции полимерной матрицы. Снижение молекулярной массы, как правило, обуславливает более интенсивную деградацию материала в условиях *in vivo* [139,140]. В процессе разложения композитов происходит постепенное высвобождение ионов кальция ГА, что, как известно, стимулирует пролиферацию и активность остеобластов, усиливая процессы костеобразования. Таким образом, высокая остеогенная активность в данной группе скаффолдов объясняется синергетическим действием

морфологических характеристик скаффолдов, ускоренной деградацией полимерной матрицы и повышенной биодоступностью ГА.



а – установленный в костном дефекте скаффолд,
 б – внешний вид животного через 2 месяца после операции, в – внешний вид области имплантации через 2 месяца после операции, г – гистологический срез ПКЛ, д – гистологический срез ПКЛ90, е – гистологический срез ПКЛ80, ж – гистологический срез ПКЛ60

Рисунок 4.10 – Имплантация скаффолдов и гистологические срезы тканей в области имплантации

Выводы по четвёртой главе

В четвёртой главе представлены результаты комплексного исследования скаффолдов, изготовленных методом FDM 3D печати из композиционных материалов на основе ПКЛ и ГА с содержанием наполнителя до 40 масс.%. Основное внимание уделено анализу влияния морфологических, структурных и молекулярно-массовых характеристик на механические и биологические свойства полученных материалов. Установлено, что введение ГА в ПКЛ существенно изменяет морфологию скаффолдов, способствует формированию шероховатой

дефектной структуры при наполнении до 40 масс.% ГА. С повышением содержания ГА наблюдается снижение среднечисловой молекулярной массы ПКЛ при сохранении средневесовой массы на прежнем уровне, что указывает на термоиндуцированную деструкцию полимера в процессе 3D печати.

Биосовместимость скаффолдов была подтверждена как в экспериментах с мезенхимальными стволовыми клетками, так и с остеобластами. Пролиферативная активность и адгезия клеток на поверхности скаффолдов сохраняется на высоком уровне независимо от содержания ГА. Однако остеогенная дифференцировка *in vitro* не наблюдалась, вероятно, из-за низкой биодоступности ГА в объёме скаффолдов. Данный эффект, как показано в литературе, может быть преодолен путём поверхностного модифицирования композитов.

Глава 5. Влияние поверхностного модифицирования композиционных биомиметических скаффолдов смесью «растворитель/не растворитель» на их функциональные свойства

Как было показано в предыдущей главе, композиционные скаффолды на основе ПКЛ и ГА, изготовленные методом 3D печати, обладают высокой биосовместимостью и демонстрируют успешную остеоинтеграцию при имплантации *in vivo*. Однако при *in vitro* испытаниях была выявлена ограниченная способность скаффолдов индуцировать остеогенную дифференцировку клеток, что, вероятно, связано с недостаточной биодоступностью частиц ГА, распределённых в объёме полимерной матрицы. С целью устранения данного недостатка и повышения остеоиндуктивных свойств материала была предложена стратегия поверхностного модифицирования скаффолдов частицами ГА, что должно способствовать активации клеточной дифференцировки и усилению процессов минерализации на ранних этапах остеогенеза.

5.1. Морфология модифицированных скаффолдов

Для закрепления биоактивных частиц ГА на поверхности скаффолдов был применён метод обработки в смеси «растворитель/нерастворитель». Ранее данный подход успешно применялся для иммобилизации органических молекул и макромолекул на поверхности биоразлагаемых полиэфиров [141–144], однако его применение для нанесения неорганических частиц, в частности ГА, предложено впервые. Принцип метода основан на кратковременной и контролируемой обработке поверхности полимерного материала смесью органического растворителя и нерастворителя, вызывающей частичное поверхностное размягчение или набухание полимера. Это позволяет внедрить частицы наполнителя в приповерхностный слой и надёжно их закрепить после испарения растворителя. Такой способ позволяет избежать полного растворения полимера, сохраняя геометрию и пористость исходных скаффолдов.

Анализ поверхности скаффолдов методом СЭМ показал, что предложенный метод позволяет равномерно закрепить частицы ГА как на внешней поверхности, так и в глубине межпорового пространства скаффолдов из чистого ПКЛ (Рисунок

5.1). Это подтверждает то, что частицы проникают в объёмные поры за счёт низкой вязкости суспензии и незначительной длительности обработки, не вызывая разрушения структуры пор. По результатам количественной оценки методом ТГ анализа массовая доля закреплённого на поверхности ГА составила в среднем 5,7% от общей массы покрытого образца (Рисунок 5.2), при этом средняя площадь покрытия поверхности частицами ГА достигала $34 \pm 7\%$. Такое распределение частиц обеспечивает потенциальную доступность ГА на поверхности материала для взаимодействия его с клетками, что должно способствовать усилению остеоиндуктивного ответа [63,138].

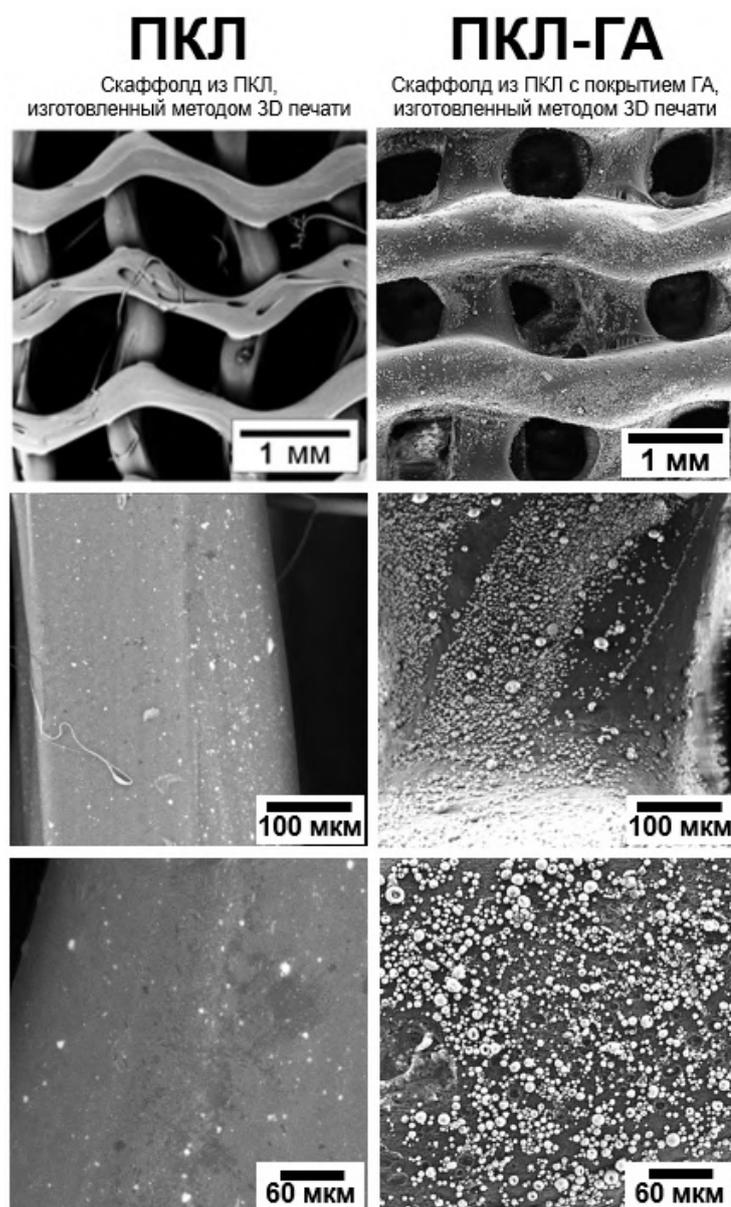


Рисунок 5.1 – СЭМ-изображения поверхности скаффолдов из ПКЛ без покрытия и с покрытием ГА (ПКЛ-ГА) при различных увеличениях

5.2. Физико-химические характеристики поверхности модифицированных скаффолдов

Термические свойства скаффолдов до и после поверхностного модифицирования частицами ГА были исследованы методом ТГ анализа. На рисунке 5.2 представлены кривые потери массы скаффолдов ПКЛ и ПКЛ-ГА в диапазоне температур от 30 до 800 °С. Из анализа кривых видно, что основной этап термического разложения скаффолдов начинается в области 200–350 °С, что соответствует термодеструкции основного органического компонента – ПКЛ. Начало термического разложения модифицированного образца ПКЛ-ГА наблюдается при более низкой температуре по сравнению с немодифицированным ПКЛ скаффолдом. На завершающем этапе при температурах свыше 600 °С остаточная масса образца ПКЛ-ГА составляла 5,7%, что соответствует содержанию неорганического остатка – частиц ГА. Для чистого ПКЛ остаточная масса после полного разложения составляет около 0%, что ожидаемо для органического полимера. Таким образом, результаты ТГ анализа подтвердили успешное закрепление частиц ГА на поверхности скаффолдов.

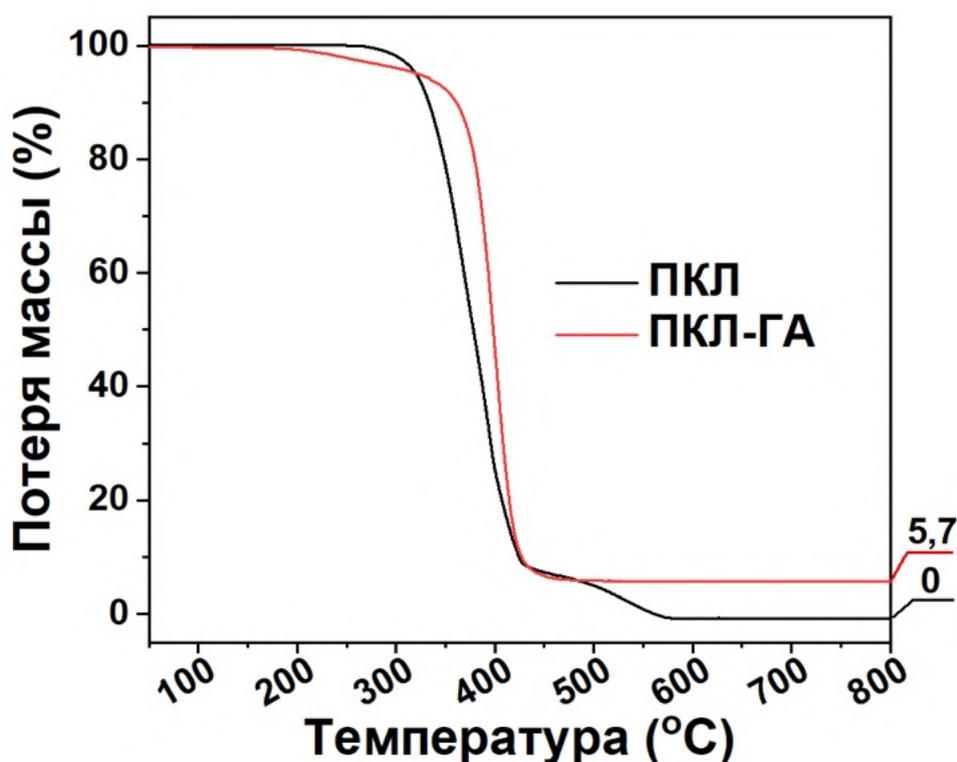


Рисунок 5.2 – ТГА-термограммы скаффолдов из ПКЛ без покрытия и с покрытием ПКЛ-ГА

Химическую структуру скаффолдов до и после модифицирования оценивали методом ИКФС. На рисунке 5.3 приведены ИКФС-спектры ПКЛ скаффолда и модифицированного скаффолда ПКЛ-ГА. На спектре немодифицированного скаффолда ПКЛ наблюдаются характерные полосы поглощения, соответствующие функциональным группам ПКЛ. Так, в области 2940 и 2865 см^{-1} регистрируются полосы валентных колебаний метиленовых $-\text{CH}_2$ групп. Полоса в области 1720 см^{-1} соответствует валентным колебаниям карбонильной $\text{C}=\text{O}$ группы, типичной для полиэфирных соединений [109]. В интервале 1295–1160 см^{-1} зафиксированы полосы, обусловленные колебаниями эфирных $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ и $\text{C}-\text{C}$ связей в основной цепи макромолекулы. На спектре модифицированного скаффолда ПКЛ-ГА сохраняются все основные полосы, соответствующие ПКЛ, что свидетельствует об отсутствии химической деструкции полимера в процессе модифицирования. Наряду с ними, в модифицированном образце появляются дополнительные полосы в области 1050–960 см^{-1} , соответствующие валентным деформационным колебаниям фосфатных PO_4^{3-} групп, входящих в состав кристаллической решётки ГА [110]. Эти полосы подтверждают присутствие ГА на поверхности скаффолда и его успешное закрепление в процессе модифицирования. Следует отметить, что спектры не демонстрируют новых полос, характерных для образования ковалентных связей между компонентами, что подтверждает физическую природу закрепления частиц ГА преимущественно за счёт их механического зацепления к поверхности полимера. Таким образом, данные ИКФС в комплексе с ТГ анализом подтверждают успешное модифицирование поверхности скаффолдов частицами ГА без разрушения полимерной матрицы и с сохранением её структурной целостности.

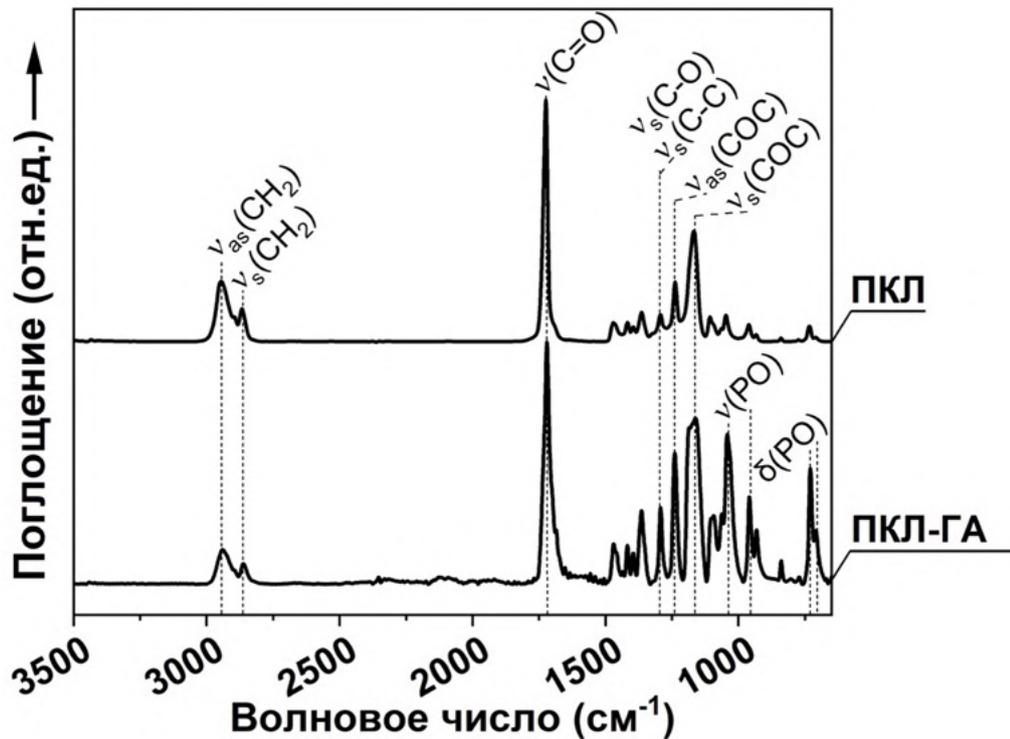
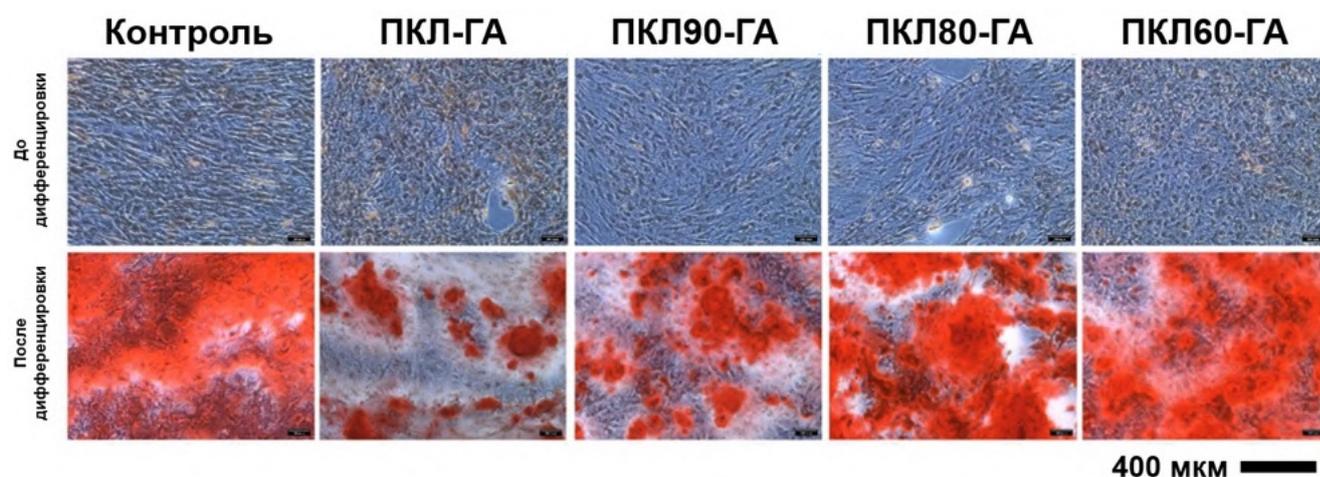


Рисунок 5.3 – ИКФС спектры скаффолда из ПКЛ и модифицированного покрытием ГА скаффолда из ПКЛ

5.3. Биосовместимость и биоактивность модифицированных скаффолдов *in vitro*

После подтверждения успешного закрепления частиц ГА на поверхности скаффолдов следующим этапом было оценка их остеоиндуктивного потенциала *in vitro*. Основная задача этапа: установить, способствует ли нанесение ГА на поверхность скаффолдов активации остеогенной дифференцировки клеток без добавления экзогенных остеогенных факторов.

При культивировании скаффолдов с остеобластами в течение 14 дней была отмечена индукция остеогенной дифференцировки остеобластов во всех экспериментальных группах, подвергнутых поверхностному модифицированию (Рисунок 5.4). Визуальная оценка окрашивания ализариновым красным, подтверждающего минерализацию внеклеточного матрикса, показала выраженное накопление кальцифицированных отложений.



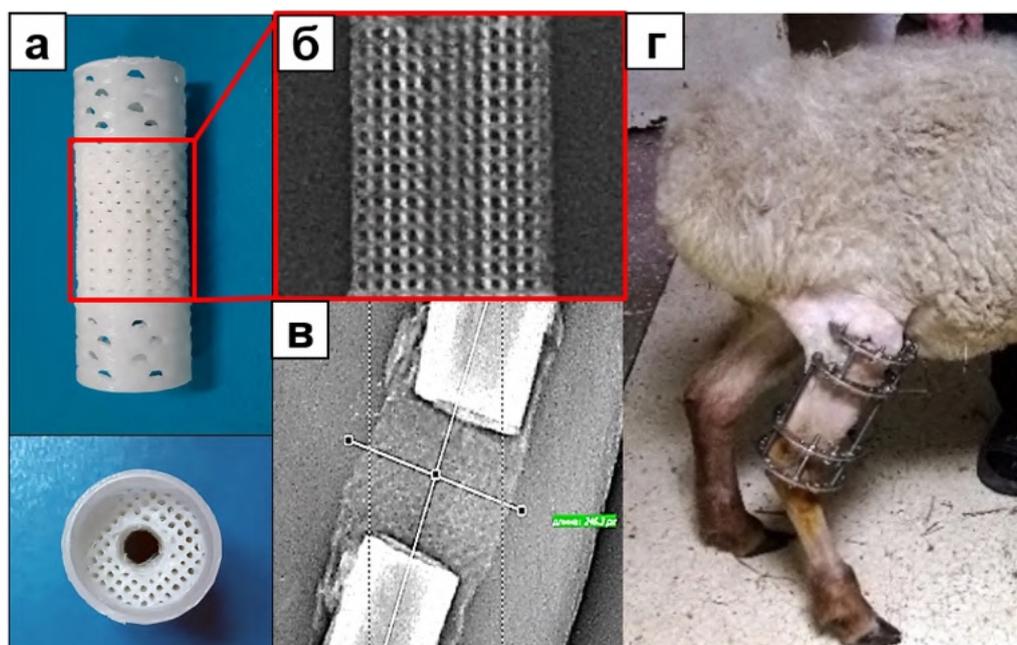
Верхний ряд – клетки до дифференцировки, нижний ряд – клетки после дифференцировки

Рисунок 5.4 – Остеогенная дифференцировка остеобластов в присутствии модифицированных скаффолдов

Сравнительный количественный анализ интенсивности окрашивания показал, что скаффолды с частицами ГА на поверхности усиливают остеогенную дифференцировку в 1,5–2 раза по сравнению с контрольной группой, в которой остеобласты культивировались на лабораторном пластике с добавлением остеоиндуцирующих факторов. Это свидетельствует о том, что даже в отсутствие внешнего остеогенного стимула в виде остеофакторов модифицированные скаффолды обладают выраженными остеоиндуктивными свойствами.

5.4. Биосовместимость и биоактивность модифицированных скаффолдов *in vivo*

Полученные *in vitro* результаты по активации остеогенной дифференцировки на поверхности скаффолдов, модифицированных частицами ГА, потребовали подтверждения их эффективности в условиях живого организма. Для этого была проведена имплантация таких скаффолдов в модель радиального дефекта длиной трубчатой кости крупного лабораторных животных. Скаффолды из ПКЛ с закреплёнными на поверхности частицами ГА были имплантированы в область радиального дефекта большеберцовой кости у овец смешанной породы (Рисунок 5.5). Уже к 30-м суткам после операции наблюдалось формирование плотного костно-имплантационного блока с выраженными очагами минерализации регенерата и признаками остеоинтеграции (Рисунок 5.6).



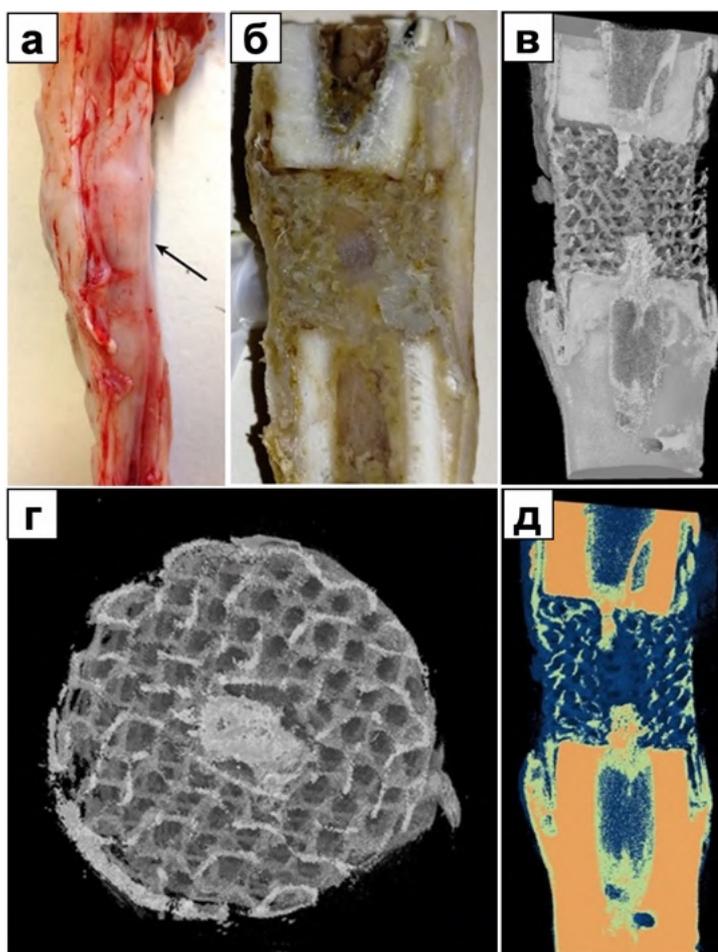
а – внешний вид скаффолда (диаметр 18 мм, длина 40 мм), б – компьютерная томограмма пористой части скаффолда, в – рентгенологический снимок области дефекта с имплантированным скаффолдом, г – внешний вид лабораторного животного

Рисунок 5.5 – Эксперимент по замещению радиального дефекта большеберцовой кости

Визуальный осмотр мягких тканей не выявил признаков воспаления или патологической реакции: подкожная клетчатка, фасции, мышцы и надкостница сохраняли нормальную структуру (Рисунок 5.6а). Морфологическая оценка имплантатов после эвтаназии показала, что все ячейки и продольные осевые каналы были равномерно заполнены новообразованной губчатой костной тканью (Рисунок 5.6б-5.6д). Компьютерная томография выявила в наружных порах и внутренних ячейках скаффолдов интенсивно окрашенные участки, соответствующие костной ткани, что указывает на активное врастание кости внутрь структуры. В продольном канале фиксировались трабекулярные структуры длиной 5–6 мм, соединяющие проксимальный и дистальный костные фрагменты. Их плотность соответствовала кортикальной кости, а снаружи имплантаты были покрыты компактной костной тканью периостального происхождения (Рисунок 5.6в и 5.6д). Также в ячейках скаффолдов присутствовали слабоминерализованные костные трабекулы, что указывает на продолжающийся процесс ремоделирования.

Признаки резорбции или пористости компактной пластинки костных фрагментов отсутствовали.

Результаты эксперимента продемонстрировали высокую эффективность модифицированных скаффолдов при замещении крупных костных дефектов: произошло не только структурное заполнение, но и функциональное встраивание имплантата в регенерирующую костную ткань за счёт остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств покрытия. К 30-му послеоперационному дню скаффолд и костный дефект были полностью заполнены новообразованной костной тканью.



а – анатомический препарат берцовой кости с указанием расположения скаффолда, б – продольный распил анатомического препарата, в – КТ изображение продольного распила анатомического препарата, г – КТ изображение сечения анатомического препарата, д – цветная визуализация томографической плотности тканей в продольном распиле анатомического препарата

Рисунок 5.6 – Костно-имплантационный блок на 30-е сутки эксперимента

Таким образом, при имплантации скаффолдов из ПКЛ с закреплёнными на поверхности частицами ГА в область радиального дефекта большеберцовой кости

лабораторных животных – овец, было отмечено формирование плотного костно-имплантационного блока к 30 дню эксперимента. Отмечается отсутствие воспалительных эффектов в окружающих тканях и области минерализации костного регенерата в объёме пористого скаффолда. При этом рентгенологическая плотность костного регенерата в области имплантации достигала 76% относительно плотности окружающих минерализованных тканей.

Выводы по пятой главе

В пятой главе была изучена возможность повышения остеоиндуктивных свойств скаффолдов из ПКЛ и композитов за счёт поверхностного модифицирования частицами ГА с использованием метода обработки в смеси «растворитель/нерастворитель». Впервые данный подход был применён для фиксации неорганических компонентов на поверхности биоразлагаемых полиэфирных скаффолдов, что обеспечило успешное закрепление ГА как на внешней поверхности, так и в глубине пор скаффолдов из ПКЛ и композитов. Морфологический анализ продемонстрировал равномерное распределение частиц ГА с покрытием ими $34 \pm 7\%$ площади поверхности скаффолдов. При культивировании остеобластов на поверхности модифицированных скаффолдов была установлена выраженная индукция остеогенной дифференцировки, превосходящая контрольную группу с добавлением остеофакторов в 1,5–2 раза. Это свидетельствует о формировании на поверхности модифицированных скаффолдов благоприятной среды, стимулирующей клеточную активность без необходимости внешних индукционных стимулов.

In vivo испытания на модели радиального дефекта большеберцовой кости овец подтвердили высокую биосовместимость и остеointеграционные свойства модифицированных скаффолдов. Уже к 30-м суткам после имплантации наблюдалось вращение новообразованной костной ткани как из краевых фрагментов, так и со стороны периоста, при полном отсутствии признаков воспаления или негативных тканевых реакций. Формирование костно-имплантационного блока и наличие трабекулярной структуры высокой плотности указывает на успешную остеокондукцию и начало процессов ремоделирования.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют высокую прикладную значимость предложенного способа модифицирования, позволяющего существенно повысить остеоиндуктивность скаффолдов. Данный подход открывает перспективы для создания эффективных материалов, применимых при регенерации сложных костных дефектов и интеграции с природными тканями.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

Проведённое исследование позволяет сформулировать следующие выводы:

1. Разработан способ получения высоконаполненных композиционных материалов на основе ПКЛ и ГА, заключающийся в смешивании в шаровой мельнице раствора ПКЛ в ацетоне концентрацией 15 масс.% с порошком ГА в течение 12 часов при скорости вращения 72 об/мин с последующим удалением растворителя при нагреве до 150 °С, обеспечивающий эффективность наполнения ГА не ниже 84% и его гомогенное распределение в полимерной матрице при наполнении до 40 масс.%.
2. Полученные композиционные материалы обладают высокой термической стабильностью и характеризуются потерей массы не более 1,4% при нагреве до 200 °С.
3. Полученные композиционные материалы характеризуются высокой химической стабильностью, а их полимерная матрица вне зависимости от изменения массовой доли ГА не подвержена гидролитической деградации.
4. Оптимальные режимы FDM 3D печати биомиметических скаффолдов из ПКЛ и из композиционных материалов на его основе в зависимости от массовой доли ГА находятся в интервале температуры печати от 170 до 200 °С, скорости печати от 10 до 20 мм/с. Для обеспечения точности 3D печати высоконаполненными композитами с содержанием ГА от 20 до 40 масс.% требуется повышенная температура печати 200 °С и низкая скорость печати 10 мм/с.
5. Увеличение массовой доли ГА в материале до 40 масс.% приводит к снижению предела прочности скаффолдов при сжатии. При этом эластичность композиционных скаффолдов сохраняется на уровне эластичности скаффолдов из ПКЛ со значением 3,4 МПа.
6. Биомиметические скаффолды со структурой в форме гироида, изготовленные методом FDM 3D печати, обладают эффектом памяти формы при температурах, близких к физиологическим. Коэффициент фиксации формы

скаффолдов при температуре 37 °С увеличивается от 78 до 93% с ростом содержания ГА от 10 до 40 масс.%. В тоже время, коэффициент восстановления формы снижается с 52% при содержании ГА 10 масс.% до 27% при содержании ГА 40 масс.%.

7. Введение ГА в ПКЛ приводит к снижению среднечисловой молекулярной массы полимерной матрицы и росту её полидисперсности в процессе FDM 3D печати при температуре 200 °С и скорости печати 10 мм/с. Установлена прямая зависимость между увеличением массовой доли ГА в композиционном материале и снижением среднечисловой молекулярной массы ПКЛ.

8. Биомиметические скаффолды, изготовленные методом FDM 3D печати из полученных композиционных материалов, обладают высокой биосовместимостью и обеспечивают адгезию мезенхимальных стволовых клеток на своей поверхности вне зависимости от массовой доли ГА в материале.

9. Биомиметические скаффолды, изготовленные методом FDM 3D печати из полученных композиционных материалов, не вызывают воспалительных реакций и способствуют формированию костной ткани при имплантации в область костного дефекта носовой кости кроликов породы шиншилла. С увеличением содержания ГА в материале скаффолдов до 40 масс.% значительно возрастает активность остеобластов в тканях, формирующихся в области дефекта.

10. Разработан способ поверхностного модифицирования биомиметических скаффолдов с целью повышения их биоактивности, заключающийся в обработке скаффолдов в суспензии ГА в смеси толуола и этанола. Закреплённые таким способом на поверхности скаффолдов частицы ГА индуцируют остеогенную дифференцировку остеобластов.

11. Биомиметические скаффолды, изготовленные методом FDM 3D печати из ПКЛ с последующим поверхностным модифицированием в суспензии ГА 10 масс.% в смеси толуола и этанола с объёмным соотношением 3:7, обеспечивают остеоинтеграцию с образованием костно-имплантационного блока с очагами минерализации костного регенерата на 30-ые сутки после имплантации в область

радиального дефекта большеберцовой кости овец смешанной породы. Рентгенологическая плотность костного регенерата к 30-му дню после имплантации достигает 76% от плотности минерализованных костных структур.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертационного исследования был разработан способ получения высоконаполненных композиционных материалов на основе ПКЛ и ГА с содержанием наполнителя ГА до 40 масс.%. Разработанный способ обеспечивает равномерное распределение частиц ГА в полимерной матрице при сохранении высокой химической и термической стабильности материала. Композиционные материалы были успешно использованы для 3D печати биомиметических пористых скаффолдов, обладающих высокой биосовместимостью. Для повышения биоактивных свойств скаффолдов был разработан способ модифицирования с целью закрепления на их поверхности дисперсных частиц ГА. Модифицированные скаффолды обладают высокой биосовместимостью, способностью стимулировать остеогенную дифференцировку остеобластов и обеспечивают эффективную остеоинтеграцию.

Научным результатом работы является получение новых научных знаний, имеющих фундаментальное значение в областях медицинского материаловедения и разработки медицинских изделий для регенерации костных тканей. В работе установлены ключевые положения, касающиеся получения биорезорбируемых композиционных материалов на основе ПКЛ и ГА, обладающих биоактивными свойствами. Также в рамках работы была подтверждена основная научная гипотеза, положенная в основу исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Строение Костей Человека - Функции Костной Ткани Available online: <https://www.esma.ru/anatomy/stroenie-kostei-cheloveka.php> (accessed on 6 May 2025).
2. Florencio-Silva, R.; Sasso, G.R.D.S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015, 2015, 421746, doi:10.1155/2015/421746.
3. Liu, Y.; Luo, D.; Wang, T. Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering. *Small* 2016, 12, 4611–4632, doi:10.1002/SMLL.201600626;WGROUП:STRING:PUBLICATION.
4. Hench, L.L.; Jones, J.R.; Institute of Materials, M. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*; CRC Press, 2005; ISBN 9781845690861.
5. С.Л. Кузнецов, Н.Н.М. Гистология, Цитология и Эмбриология: Учебник Для Медицинских Вузов.; ООО «Медицинское информационное агентство»: М, 2007;
6. Bharadwaz, A.; Jayasuriya, A.C. Recent Trends in the Application of Widely Used Natural and Synthetic Polymer Nanocomposites in Bone Tissue Regeneration. *Materials Science and Engineering C* 2020, 110.
7. Koons, G.L.; Diba, M.; Mikos, A.G. Materials Design for Bone-Tissue Engineering. *Nat Rev Mater* 2020, doi:10.1038/s41578-020-0204-2.
8. Wang, W.; Yeung, K.W.K. Bone Grafts and Biomaterials Substitutes for Bone Defect Repair: A Review. *Bioact Mater* 2017, 2, 224–247.
9. Prasad, A. State of Art Review on Bioabsorbable Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. In *Proceedings of the Materials Today: Proceedings*; Elsevier, January 8 2021; Vol. 44, pp. 1391–1400.
10. Штильман М.И. Полимеры Медико-Биологического Назначения; ИКЦ Академкнига: М, 2006;
11. Ю. П. Шаркеев, С. Г. Псахье, Е.В.Л. и др. Биоконпозиты На Основе Кальцийфосфатных Покрытий, Наноструктурных и Ультрамелкозернистых Биоинертных Металлов, Их Биосовместимость и Биодеградация; Издательский Дом Томского государственного университета: Томск, 2014;

12. Niinomi, M. (Mitsuo); Narushima, T.; Nakai, M. *Advances in Metallic Biomaterials: Tissues, Materials and Biological Reactions*; ISBN 9783662468357.
13. Macha, I.J.; Ben-Nissan, B.; Santos, J.; Cazalbou, S.; Stamboulis, A.; Grossin, D.; Giordano, G. Biocompatibility of a New Biodegradable Polymer-Hydroxyapatite Composite for Biomedical Applications. *J Drug Deliv Sci Technol* 2017, 38, 72–77, doi:10.1016/j.jddst.2017.01.008.
14. Nagata, F.; Miyajima, T.; Kato, K. Preparation of Phylloquinone-Loaded Poly(Lactic Acid)/Hydroxyapatite Core–Shell Particles and Their Drug Release Behavior. *Advanced Powder Technology* 2016, 27, 903–907, doi:10.1016/J.APT.2016.02.007.
15. Lin, P.L.; Fang, H.W.; Tseng, T.; Lee, W.H. Effects of Hydroxyapatite Dosage on Mechanical and Biological Behaviors of Polylactic Acid Composite Materials. *Mater Lett* 2007, 61, 3009–3013, doi:10.1016/j.matlet.2006.10.064.
16. Gritsch, L.; Perrin, E.; Chenal, J.-M.; Fredholm, Y.; Maçon, A.L.; Chevalier, J.; Boccaccini, A.R. Combining Bioresorbable Polyesters and Bioactive Glasses: Orthopedic Applications of Composite Implants and Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Appl Mater Today* 2021, 22, 100923, doi:10.1016/j.apmt.2020.100923.
17. Shastov, A.L.; Ermakov, A.M.; Popkov, A. V.; Kononovich, N.A.; Gorbach, E.N.; Stogov, M. V. Assessment of the Need for Bioactive Implants with Antimicrobial Properties in the Treatment of Patients with Orthopedic Pathology Complicated by Infection. *Biomed Eng (NY)* 2024, 58, 55–58, doi:10.1007/S10527-024-10365-4/TABLES/1.
18. Pereira, H.F.; Cengiz, I.F.; Silva, F.S.; Reis, R.L.; Oliveira, J.M. Scaffolds and Coatings for Bone Regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2020, 31.
19. Vidal, L.; Kamleitner, C.; Brennan, M.; Hoornaert, A.; Layrolle, P. Reconstruction of Large Skeletal Defects: Current Clinical Therapeutic Strategies and Future Directions Using 3D Printing. *Front Bioeng Biotechnol* 2020, 8.
20. Wubneh, A.; Tsekoura, E.K.; Ayranci, C.; Uludağ, H. Current State of Fabrication Technologies and Materials for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater* 2018, 80, 1–30, doi:10.1016/J.ACTBIO.2018.09.031.

21. Bharadwaz, A.; Jayasuriya, A.C. Recent Trends in the Application of Widely Used Natural and Synthetic Polymer Nanocomposites in Bone Tissue Regeneration. *Materials Science and Engineering: C* 2020, 110, 110698, doi:10.1016/J.MSEC.2020.110698.
22. Cheah, C.W.; Al-Namnam, N.M.; Lau, M.N.; Lim, G.S.; Raman, R.; Fairbairn, P.; Ngeow, W.C. Synthetic Material for Bone, Periodontal, and Dental Tissue Regeneration: Where Are We Now, and Where Are We Heading Next? *Materials* 2021, Vol. 14, Page 6123 2021, 14, 6123, doi:10.3390/MA14206123.
23. Kadhim, M.; Holmes, L.; Gesheff, M.G.; Conway, J.D. Treatment Options for Nonunion With Segmental Bone Defects: Systematic Review and Quantitative Evidence Synthesis. *J Orthop Trauma* 2017, 31, 111–119, doi:10.1097/BOT.0000000000000700.
24. Lasanianos, N.G.; Kanakaris, N.K.; Giannoudis, P. V. Current Management of Long Bone Large Segmental Defects. *Orthop Trauma* 2010, 24, 149–163, doi:10.1016/j.mporth.2009.10.003.
25. Thorey, F.; Bruenger, J.; Windhagen, H.; Witte, F. Muscle Response to Leg Lengthening during Distraction Osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Research* 2009, 27, 483–488, doi:10.1002/jor.20784.
26. Yin, P.; Ji, Q.; Li, T.; Li, J.; Li, Z.; Liu, J.; Wang, G.; Wang, S.; Zhang, L.; Mao, Z.; et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of Ilizarov Methods in the Treatment of Infected Nonunion of Tibia and Femur. *PLoS One* 2015, 10, e0141973, doi:10.1371/journal.pone.0141973.
27. Zhang, M.; Matinlinna, J.P.; Tsoi, J.K.H.; Liu, W.; Cui, X.; Lu, W.W.; Pan, H. Recent Developments in Biomaterials for Long-Bone Segmental Defect Reconstruction: A Narrative Overview. *J Orthop Translat* 2020, 22, 26–33, doi:10.1016/j.jot.2019.09.005.
28. Flierl, M.A.; Smith, W.R.; Mauffrey, C.; Irgit, K.; Williams, A.E.; Ross, E.; Peacher, G.; Hak, D.J.; Stahel, P.F. Outcomes and Complication Rates of Different Bone Grafting Modalities in Long Bone Fracture Nonunions: A Retrospective Cohort Study in 182 Patients. *J Orthop Surg Res* 2013, 8, 33, doi:10.1186/1749-799X-8-33.

29. Baldwin, P.; Li, D.J.; Auston, D.A.; Mir, H.S.; Yoon, R.S.; Koval, K.J. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma* 2019, 33, 203–213, doi:10.1097/BOT.0000000000001420.
30. Lauthe, O.; Soubeyrand, M.; Babinet, A.; Dumaine, V.; Anract, P.; Biau, D.J. The Indications and Donor-Site Morbidity of Tibial Cortical Strut Autografts in the Management of Defects in Long Bones. *Bone Joint J* 2018, 100-B, 667–674, doi:10.1302/0301-620X.100B5.BJJ-2017-0577.R2.
31. Lomas, R.; Chandrasekar, A.; Board, T.N. Bone Allograft in the UK: Perceptions and Realities. *HIP International* 2013, 23, 427–433, doi:10.5301/hipint.5000018.
32. Mroz, T.E.; Joyce, M.J.; Steinmetz, M.P.; Lieberman, I.H.; Wang, J.C. Musculoskeletal Allograft Risks and Recalls in the United States. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2008, 16, 559–565, doi:10.5435/00124635-200810000-00001.
33. Fernandez de Grado, G.; Keller, L.; Idoux-Gillet, Y.; Wagner, Q.; Musset, A.M.; Benkirane-Jessel, N.; Bornert, F.; Offner, D. Bone Substitutes: A Review of Their Characteristics, Clinical Use, and Perspectives for Large Bone Defects Management. *J Tissue Eng* 2018, 9, doi:10.1177/2041731418776819.
34. Lobb, D.C.; DeGeorge, B.R.; Chhabra, A.B. Bone Graft Substitutes: Current Concepts and Future Expectations. *Journal of Hand Surgery* 2019, 44, 497-505.e2.
35. Tyagi, S.A.; M, M. Additive Manufacturing of Titanium-Based Lattice Structures for Medical Applications – A Review. *Bioprinting* 2023, 30, e00267, doi:10.1016/J.BPRINT.2023.E00267.
36. Quinn, J.; McFadden, R.; Chan, C.-W.; Carson, L. Titanium for Orthopaedic Applications: An Overview of Surface Modification to Improve Biocompatibility and Prevent Bacterial Biofilm Formation. *iScience* 2020, 101745, doi:10.1016/j.isci.2020.101745.
37. Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1 | ScienceDirect Available online:

<https://www.sciencedirect.com/book/9780081019979/stimuli-responsive-polymeric-nanocarriers-for-drug-delivery-applications-volume-1> (accessed on 7 May 2025).

38. Дженкинс М.Дж. Полимеры в Биологии и Медицине; Научный мир: М, 2011;
39. Prasad, A.; Bhasney, S.M.; Ravi Sankar, M.; Katiyar, V. Fish Scale Derived Hydroxyapatite Reinforced Poly (Lactic Acid) Polymeric Bio-Films: Possibilities for Sealing/Locking the Internal Fixation Devices; 2017; Vol. 4;.
40. Wang, Y.; Liang, D.; Liu, F.; Zhang, W.; Di, X.; Wang, C. A Polyethylene Glycol/Hydroxyapatite Composite Phase Change Material for Thermal Energy Storage. *Appl Therm Eng* 2017, 113, 1475–1482, doi:10.1016/j.applthermaleng.2016.11.159.
41. Ntrivala, M.A.; Pitsavas, A.C.; Lazaridou, K.; Baziakou, Z.; Karavasili, D.; Papadimitriou, M.; Ntagkopoulou, C.; Balla, E.; Bikiaris, D.N. Polycaprolactone (PCL): The Biodegradable Polyester Shaping the Future of Materials – a Review on Synthesis, Properties, Biodegradation, Applications and Future Perspectives. *Eur Polym J* 2025, 114033, doi:10.1016/J.EURPOLYMJ.2025.114033.
42. Kalapos, M.P. Possible Physiological Roles of Acetone Metabolism in Humans. *Med Hypotheses* 1999, 53, 236–242, doi:10.1054/MEHY.1998.0752.
43. Hajiali, F.; Tajbakhsh, S.; Shojaei, A. Fabrication and Properties of Polycaprolactone Composites Containing Calcium Phosphate-Based Ceramics and Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering: A Review. *Polymer Reviews* 2018, 58, 164–207.
44. Ripamonti, U.; Crooks, J.; Khoali, L.; Roden, L. The Induction of Bone Formation by Coral-Derived Calcium Carbonate/Hydroxyapatite Constructs. *Biomaterials* 2009, 30, 1428–1439, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.065.
45. Tang, Z.; Li, X.; Tan, Y.; Fan, H.; Zhang, X. The Material and Biological Characteristics of Osteoinductive Calcium Phosphate Ceramics. *Regen Biomater* 2018, 5, 43–59, doi:10.1093/rb/rbx024.
46. Su, Y.; Zheng, Y.; Tang, L.; Qin, Y.X.; Zhu, D. Calcium Phosphate Coatings for Metallic Orthopedic Biomaterials. In *Orthopedic Biomaterials: Advances and*

Applications; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 167–183 ISBN 9783319736648.

47. Elliott, J.C. (James C. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates; ISBN 9781483290317.

48. Ван Везер Джон Фосфор и Его Соединения; Издательство иностранной литературы: М, 1962;

49. Holmes, R.E.; Bucholz, R.W.; Mooney, V. Porous Hydroxyapatite as a Bone Graft Substitute in Diaphyseal Defects: A Histometric Study. *Journal of Orthopaedic Research* 1987, 5, 114–121, doi:10.1002/jor.1100050114.

50. Pawłowski, L. Synthesis, Properties and Applications of Hydroxyapatite. In *Industrial Chemistry of Oxides for Emerging Applications*; John Wiley & Sons Ltd: Chichester, UK, 2018; pp. 311–352.

51. Li, X.; Cui, R.; Sun, L.; Aifantis, K.E.; Fan, Y.; Feng, Q.; Cui, F.; Watari, F. 3D-Printed Biopolymers for Tissue Engineering Application. *Int J Polym Sci* 2014, 2014, 56, doi:10.1155/2014/829145.

52. Yan, Q.; Dong, H.; Su, J.; Han, J.; Song, B.; Wei, Q.; Shi, Y. A Review of 3D Printing Technology for Medical Applications. *Engineering* 2018, 4, 729–742, doi:10.1016/j.eng.2018.07.021.

53. Corcione, C.E.; Gervaso, F.; Scalera, F.; Montagna, F.; Maiullaro, T.; Sannino, A.; Maffezzoli, A. 3D Printing of Hydroxyapatite Polymer-Based Composites for Bone Tissue Engineering. *Journal of Polymer Engineering* 2017, 37, 741–746, doi:10.1515/polyeng-2016-0194.

54. Esposito Corcione, C.; Gervaso, F.; Scalera, F.; Montagna, F.; Sannino, A.; Maffezzoli, A. The Feasibility of Printing Polylactic Acid–Nanohydroxyapatite Composites Using a Low-Cost Fused Deposition Modeling 3D Printer. *J Appl Polym Sci* 2017, 134, 1–10, doi:10.1002/app.44656.

55. Esposito Corcione, C.; Gervaso, F.; Scalera, F.; Padmanabhan, S.K.; Madaghiele, M.; Montagna, F.; Sannino, A.; Licciulli, A.; Maffezzoli, A. Highly Loaded Hydroxyapatite Microsphere/ PLA Porous Scaffolds Obtained by Fused Deposition Modelling. *Ceram Int* 2019, 45, 2803–2810.

56. Senatov, F.S.; Niaza, K. V.; Zadorozhnyy, M.Y.; Maksimkin, A. V.; Kaloshkin, S.D.; Estrin, Y.Z. Mechanical Properties and Shape Memory Effect of 3D-Printed PLA-Based Porous Scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater* 2016, 57, 139–148, doi:10.1016/j.jmbbm.2015.11.036.
57. Zuev, D.M.; Klimashina, E.S.; Evdokimov, P. V.; Filippov, Ya.Yu.; Putlyaev, V.I. Preparation of β -Ca₃(PO₄)₂/Poly(D,L-Lactide) and β -Ca₃(PO₄)₂/Poly(ϵ -Caprolactone) Biocomposite Implants for Bone Substitution. *Inorganic Materials* 2018, 54, 87–95, doi:10.1134/S002016851801017X.
58. Petrovskaya, T.S.; Toropkov, N.E.; Mironov, E.G.; Azarmi, F. 3D Printed Biocompatible Polylactide-Hydroxyapatite Based Material for Bone Implants. *Materials and Manufacturing Processes* 2018, 33, 1899–1904, doi:10.1080/10426914.2018.1476764.
59. Gerdes, S.; Mostafavi, A.; Ramesh, S.; Memic, A.; Rivero, I. V.; Rao, P.; Tamayol, A. Process-Structure-Quality Relationships of Three-Dimensional Printed Poly(Caprolactone)-Hydroxyapatite Scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2020, 26, 279–291, doi:10.1089/ten.tea.2019.0237.
60. Pierantozzi, D.; Scalzone, A.; Jindal, S.; Stipniece, L.; Šalma-Ancāne, K.; Dalgarno, K.; Gentile, P.; Mancuso, E. 3D Printed Sr-Containing Composite Scaffolds: Effect of Structural Design and Material Formulation towards New Strategies for Bone Tissue Engineering. *Compos Sci Technol* 2020, 191, 108069, doi:10.1016/j.compscitech.2020.108069.
61. Gong, L.; Li, J.; Zhang, J.; Pan, Z.; Liu, Y.; Zhou, F.; Hong, Y.; Hu, Y.; Gu, Y.; Ouyang, H.; et al. An Interleukin-4-Loaded Bi-Layer 3D Printed Scaffold Promotes Osteochondral Regeneration. *Acta Biomater* 2020, 117, 246–260, doi:10.1016/j.actbio.2020.09.039.
62. Tian, L.; Zhang, Z.; Tian, B.; Zhang, X.; Wang, N. Study on Antibacterial Properties and Cytocompatibility of EPL Coated 3D Printed PCL/HA Composite Scaffolds. *RSC Adv* 2020, 10, 4805–4816, doi:10.1039/c9ra10275b.
63. Cho, Y.S.; Quan, M.; Lee, S.H.; Hong, M.W.; Kim, Y.Y.; Cho, Y.S. Assessment of Osteogenesis for 3D-Printed Polycaprolactone/Hydroxyapatite Composite

Scaffold with Enhanced Exposure of Hydroxyapatite Using Rat Calvarial Defect Model. *Compos Sci Technol* 2019, 184, 107844, doi:10.1016/j.compscitech.2019.107844.

64. Zhu, Y.; Gao, C.; Liu, X.; Shen, J. Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells. *Biomacromolecules* 2002, 3, 1312–1319, doi:10.1021/BM020074Y.

65. Park, S.A.; Lee, S.H.; Kim, W.D. Fabrication of Porous Polycaprolactone/Hydroxyapatite (PCL/HA) Blend Scaffolds Using a 3D Plotting System for Bone Tissue Engineering. *Bioprocess Biosyst Eng* 2011, 34, 505–513, doi:10.1007/s00449-010-0499-2.

66. Bittner, S.M.; Smith, B.T.; Diaz-Gomez, L.; Hudgins, C.D.; Melchiorri, A.J.; Scott, D.W.; Fisher, J.P.; Mikos, A.G. Fabrication and Mechanical Characterization of 3D Printed Vertical Uniform and Gradient Scaffolds for Bone and Osteochondral Tissue Engineering. *Acta Biomater* 2019, 90, 37–48, doi:10.1016/j.actbio.2019.03.041.

67. Gómez-Lizárraga, K.K.; Flores-Morales, C.; Del Prado-Audelo, M.L.; Álvarez-Pérez, M.A.; Piña-Barba, M.C.; Escobedo, C. Polycaprolactone- and Polycaprolactone/Ceramic-Based 3D-Bioplotting Porous Scaffolds for Bone Regeneration: A Comparative Study. *Materials Science and Engineering C* 2017, 79, 326–335, doi:10.1016/j.msec.2017.05.003.

68. Jiang, S.; Wang, M.; He, J. A Review of Biomimetic Scaffolds for Bone Regeneration: Toward a Cell-free Strategy. *Bioeng Transl Med* 2021, 6, doi:10.1002/BTM2.10206.

69. Chan, B.P.; Leong, K.W. Scaffolding in Tissue Engineering: General Approaches and Tissue-Specific Considerations. *European Spine Journal* 2008, 17, 467, doi:10.1007/S00586-008-0745-3.

70. Carotenuto, F.; Politi, S.; Haq, A.U.; Matteis, F. De; Tamburri, E.; Terranova, M.L.; Teodori, L.; Pasquo, A.; Nardo, P. Di From Soft to Hard Biomimetic Materials: Tuning Micro/Nano-Architecture of Scaffolds for Tissue Regeneration. *Micromachines (Basel)* 2022, 13, 780, doi:10.3390/MI13050780.

71. Olivares, A.L.; Marsal, È.; Planell, J.A.; Lacroix, D. Finite Element Study of Scaffold Architecture Design and Culture Conditions for Tissue Engineering. *Biomaterials* 2009, 30, 6142–6149, doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2009.07.041.
72. Ravoor, J.; Thangavel, M.; Renold Elsen, S. Comprehensive Review on Design and Manufacturing of Bio-Scaffolds for Bone Reconstruction. *ACS Appl Bio Mater* 2021, 4, 8129–8158, doi:10.1021/ACSABM.1C00949/ASSET/IMAGES/MEDIUM/MT1C00949_0011.GIF.
73. Zhao, F.; Xiong, Y.; Ito, K.; van Rietbergen, B.; Hofmann, S. Porous Geometry Guided Micro-Mechanical Environment Within Scaffolds for Cell Mechanobiology Study in Bone Tissue Engineering. *Front Bioeng Biotechnol* 2021, 9, 819, doi:10.3389/FBIOE.2021.736489/BIBTEX.
74. Siddique, S.H.; Hazell, P.J.; Wang, H.; Escobedo, J.P.; Ameri, A.A.H. Lessons from Nature: 3D Printed Bio-Inspired Porous Structures for Impact Energy Absorption – A Review. *Addit Manuf* 2022, 58, 103051, doi:10.1016/J.ADDMA.2022.103051.
75. Lehder, E.F.; Ashcroft, I.A.; Wildman, R.D.; Ruiz-Cantu, L.A.; Maskery, I. A Multiscale Optimisation Method for Bone Growth Scaffolds Based on Triply Periodic Minimal Surfaces. *Biomech Model Mechanobiol* 2021, 20, 2085–2096, doi:10.1007/S10237-021-01496-8/FIGURES/13.
76. Rammohan, A.V.; Lee, T.; Tan, V.B.C. A Novel Morphological Model of Trabecular Bone Based on the Gyroid. <https://doi.org/10.1142/S1758825115500489> 2015, 7, doi:10.1142/S1758825115500489.
77. Dong, Z.; Zhao, X. Application of TPMS Structure in Bone Regeneration. *Engineered Regeneration* 2021, 2, 154–162, doi:10.1016/J.ENGREG.2021.09.004.
78. Guerreiro, R.; Pires, T.; Guedes, J.M.; Fernandes, P.R.; Castro, A.P.G. On the Tortuosity of TPMS Scaffolds for Tissue Engineering. *Symmetry* 2020, Vol. 12, Page 596 2020, 12, 596, doi:10.3390/SYM12040596.
79. Hernandez, I.; Kumar, A.; Joddar, B. A Bioactive Hydrogel and 3D Printed Polycaprolactone System for Bone Tissue Engineering. *Gels* 2017, Vol. 3, Page 26 2017, 3, 26, doi:10.3390/GELS3030026.

80. Fonseca, D.R.; Sobreiro-Almeida, R.; Sol, P.C.; Neves, N.M. Development of Non-Orthogonal 3D-Printed Scaffolds to Enhance Their Osteogenic Performance. *Biomater Sci* 2018, 6, 1569–1579, doi:10.1039/C8BM00073E.
81. Hashimi, N.S. Al; Soman, S.S.; Govindharaj, M.; Vijayavenkataraman, S. 3D Printing of Complex Architected Metamaterial Structures by Simple Material Extrusion for Bone Tissue Engineering. *Mater Today Commun* 2022, 31, 103382, doi:10.1016/j.mtcomm.2022.103382.
82. Zhu, M.; Zhang, R.; Mao, Z.; Fang, J.; Ren, F. Topographical Biointerface Regulating Cellular Functions for Bone Tissue Engineering. *Biosurf Biotribol* 2022, 8, 165–187, doi:10.1049/BSB2.12043;CTYPE:STRING:JOURNAL.
83. Richbourg, N.R.; Peppas, N.A.; Sikavitsas, V.I. Tuning the Biomimetic Behavior of Scaffolds for Regenerative Medicine through Surface Modifications. *J Tissue Eng Regen Med* 2019, 13, 1275, doi:10.1002/TERM.2859.
84. Ribeiro, S.; Pugliese, E.; Korntner, S.H.; Fernandes, E.M.; Gomes, M.E.; Reis, R.L.; O’Riordan, A.; Bayon, Y.; Zeugolis, D.I. Assessing the Combined Effect of Surface Topography and Substrate Rigidity in Human Bone Marrow Stem Cell Cultures. *Eng Life Sci* 2022, 22, 619, doi:10.1002/ELSC.202200029.
85. Kim, W.; Gwon, Y.; Kim, Y.K.; Park, S.; Kang, S.J.; Park, H.K.; Kim, M.S.; Kim, J. Plasma-Assisted Multiscale Topographic Scaffolds for Soft and Hard Tissue Regeneration. *NPJ Regen Med* 2021, 6, 1–13, doi:10.1038/S41536-021-00162-Y;SUBJMETA=2035,490,54,61,631,994;KWRD=REGENERATIVE+MEDICINE,TISSUE+ENGINEERING,ISSUES.
86. Oliveira Lobo, A.; Yang, J.; Kargozar, S.; Bu, Y.; Ma, J.; Bei, J.; Wang, S. Surface Modification of Aliphatic Polyester to Enhance Biocompatibility. *Front Bioeng Biotechnol* 2019, 7, 453079, doi:10.3389/FBIOE.2019.00098.
87. Remy, M.T.; Upara, C.; Ding, Q.J.; Miszuk, J.M.; Sun, H.; Hong, L. MicroRNA-200c Release from Gelatin-Coated 3D-Printed PCL Scaffolds Enhances Bone Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng* 2024, 10, 2337–2350, doi:10.1021/ACSBIOMATERIALS.3C01105/ASSET/IMAGES/LARGE/AB3C01105_0009.JPEG.

88. Richbourg, N.R.; Peppas, N.A.; Sikavitsas, V.I. Tuning the Biomimetic Behavior of Scaffolds for Regenerative Medicine through Surface Modifications. *J Tissue Eng Regen Med* 2019, 13, 1275, doi:10.1002/TERM.2859.
89. Carmagnola, I.; Chiono, V.; Ruocco, G.; Scalzone, A.; Gentile, P.; Taddei, P.; Ciardelli, G. PLGA Membranes Functionalized with Gelatin through Biomimetic Mussel-Inspired Strategy. *Nanomaterials* 2020, 10, 2184, doi:10.3390/NANO10112184.
90. Croll, T.I.; O'Connor, A.J.; Stevens, G.W.; Cooper-White, J.J. Controllable Surface Modification of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical, Chemical, and Theoretical Aspects. *Biomacromolecules* 2004, 5, 463–473, doi:10.1021/BM0343040;CTYPE:STRING:JOURNAL.
91. Romero-Torrecilla, J.A.; Echanove-González de Anleo, M.; Martínez-Ohárriz, C.; Ripalda-Cemboráin, P.; López-Martínez, T.; Abizanda, G.; Valdés-Fernández, J.; Prandota, J.; Muiños-López, E.; Garbayo, E.; et al. 3D-Printed Polycaprolactone Scaffolds Functionalized with Poly(Lactic-Co-Glycolic) Acid Microparticles Enhance Bone Regeneration through Tunable Drug Release. *Acta Biomater* 2025, 198, 219–233, doi:10.1016/J.ACTBIO.2025.04.021.
92. Suárez-González, D.; Barnhart, K.; Migneco, F.; Flanagan, C.; Hollister, S.J.; Murphy, W.L. Controllable Mineral Coatings on PCL Scaffolds as Carriers for Growth Factor Release. *Biomaterials* 2011, 33, 713, doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.09.095.
93. Wu, X.; Walsh, K.; Hoff, B.L.; Camci-Unal, G. Mineralization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Bioengineering* 2020, 7, 132, doi:10.3390/BIOENGINEERING7040132.
94. Petricca, S.E.; Marra, K.G.; Kumta, P.N. Chemical Synthesis of Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)/Hydroxyapatite Composites for Orthopaedic Applications. *Acta Biomater* 2006, 2, 277–286, doi:10.1016/j.actbio.2005.12.004.
95. Dalle Vacche, S.; Oliveira, F.; Leterrier, Y.; Michaud, V.; Damjanovic, D.; Månson, J.A.E. The Effect of Processing Conditions on the Morphology, Thermomechanical, Dielectric, and Piezoelectric Properties of P(VDF-TrFE)/BaTiO₃ Composites. *J Mater Sci* 2012, 47, 4763–4774, doi:10.1007/s10853-012-6362-x.

96. Crescenzi, V.; Manzini, G.; Calzolari, G.; Borri, C. Thermodynamics of Fusion of Poly- β -Propiolactone and Poly- ϵ -Caprolactone. Comparative Analysis of the Melting of Aliphatic Polylactone and Polyester Chains. *Eur Polym J* 1972, 8, 449–463, doi:10.1016/0014-3057(72)90109-7.

97. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: учеб. пособие для системы послевуз. проф. образования врачей / Федер. служба по надзору в сфере здравоохранения и соц. развития Федер. гос. учреждение Науч. центр экспертизы средств мед. применения ; под общ. ред. Р.У. Хабриева. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : Изд-во Медицина : Изд-во Шико, 2005. — 826, [1] с. : ил., табл. : 24 см.; ISBN 5-225-04219-8 (в пер.);

98. Biscaia, S.; Branquinho, M. V.; Alvites, R.D.; Fonseca, R.; Sousa, A.C.; Pedrosa, S.S.; Caseiro, A.R.; Guedes, F.; Patrício, T.; Viana, T.; et al. 3D Printed Poly(ϵ -Caprolactone)/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Comparative Study on a Composite Preparation by Melt Blending or Solvent Casting Techniques and the Influence of Bioceramic Content on Scaffold Properties. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 2318 2022, 23, 2318, doi:10.3390/IJMS23042318.

99. Šupová, M. Problem of Hydroxyapatite Dispersion in Polymer Matrices: A Review. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2009 20:6 2009, 20, 1201–1213, doi:10.1007/S10856-009-3696-2.

100. Trakhtenberg, I.S.; Rubshtein, A.P.; Volkova, E.G.; Petrova, S.A.; Fishman, A.Y.; Zakharov, R.G.; Vykhodets, V.B.; Kurennykh, T.E. Effect of Mechanical Activation on the Morphology and Structure of Hydroxyapatite. *Inorganic Materials* 2011 47:1 2010, 47, 45–50, doi:10.1134/S0020168510121052.

101. Chalermthai, B.; Chan, W.Y.; Bastidas-Oyanedel, J.R.; Taher, H.; Olsen, B.D.; Schmidt, J.E. Preparation and Characterization of Whey Protein-Based Polymers Produced from Residual Dairy Streams. *Polymers* 2019, Vol. 11, Page 722 2019, 11, 722, doi:10.3390/POLYM11040722.

102. Murariu, M.; Galluzzi, A.; Paint, Y.; Murariu, O.; Raquez, J.M.; Polichetti, M.; Dubois, P. Pathways to Green Perspectives: Production and Characterization of Polylactide (PLA) Nanocomposites Filled with Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. *Materials* 2021, 14, 5154, doi:10.3390/MA14185154/S1.
103. Sivalingam, G.; Madras, G. Thermal Degradation of Poly (ϵ -Caprolactone). *Polym Degrad Stab* 2003, 80, 11–16, doi:10.1016/S0141-3910(02)00376-2.
104. Quan, H.; Li, Z.M.; Yang, M.B.; Huang, R. On Transcrystallinity in Semi-Crystalline Polymer Composites. *Compos Sci Technol* 2005, 65, 999–1021, doi:10.1016/J.COMPSCITECH.2004.11.015.
105. Athanasoulia, I.G.I.; Christoforidis, M.N.; Korres, D.M.; Tarantili, P.A. The Effect of Hydroxyapatite Nanoparticles on Crystallization and Thermomechanical Properties of PLLA Matrix. *Pure and Applied Chemistry* 2017, 89, 125–140, doi:10.1515/PAC-2016-0912/ASSET/GRAPHIC/J_PAC-2016-0912_FIG_008.JPG.
106. Liang, J.Z.; Zhou, L.; Tang, C.Y.; Tsui, C.P. Crystallization Properties of Polycaprolactone Composites Filled with Nanometer Calcium Carbonate. *J Appl Polym Sci* 2013, 128, 2940–2944, doi:10.1002/APP.38359.
107. Bittiger, H.; Marchessault, R.H.; Niegisch, W.D. Crystal Structure of Poly- ϵ -Caprolactone. *Acta Crystallogr B* 1970, 26, 1923–1927, doi:10.1107/s0567740870005198.
108. Powder Diffraction Card (PDF Card No. 74-0566). International Centre for Diffraction Data. - References - Scientific Research Publishing Available online: [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2243663](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2243663) (accessed on 22 September 2022).
109. Elzein, T.; Nasser-Eddine, M.; Delaite, C.; Bistac, S.; Dumas, P. FTIR Study of Polycaprolactone Chain Organization at Interfaces. *J Colloid Interface Sci* 2004, 273, 381–387, doi:10.1016/J.JCIS.2004.02.001.
110. Gheisari, H.; Karamian, E.; Abdellahi, M. A Novel Hydroxyapatite – Hardystonite Nanocomposite Ceramic. *Ceram Int* 2015, 41, 5967–5975, doi:10.1016/J.CERAMINT.2015.01.033.

111. Sabino, M.A. Oxidation of Polycaprolactone to Induce Compatibility with Other Degradable Polyesters. *Polym Degrad Stab* 2007, 92, 986–996, doi:10.1016/j.polymdegradstab.2007.03.010.
112. Jang, J.W.; Min, K.E.; Kim, C.; Wern, C.; Yi, S. Rheological Properties and 3D Printing Behavior of PCL and DMSO₂ Composites for Bio-Scaffold. *Materials* 2024, Vol. 17, Page 2459 2024, 17, 2459, doi:10.3390/MA17102459.
113. Arraiza, A.L.; Sarasua, J.R.; Verdu, J.; Colin, X. Rheological Behavior and Modeling of Thermal Degradation of Poly(ϵ -Caprolactone) and Poly(L-Lactide). *International Polymer Processing* 2007, 22, 389–394, doi:10.3139/217.2067/MACHINEREADABLECITATION/RIS.
114. Eriksson, M.; Peijs, T.; Goossens, H. The Effect of Polymer Molar Mass and Silica Nanoparticles on the Rheological and Mechanical Properties of Poly(ϵ -Caprolactone) Nanocomposites. *Nanocomposites* 2018, 4, 112–126, doi:10.1080/20550324.2018.1534792.
115. Motloun, M.P.; Mofokeng, T.G.; Ray, S.S. Viscoelastic, Thermal, and Mechanical Properties of Melt-Processed Poly (ϵ -Caprolactone) (PCL)/Hydroxyapatite (HAP) Composites. *Materials* 2022, Vol. 15, Page 104 2021, 15, 104, doi:10.3390/MA15010104.
116. Bakrani Balani, S.; Chabert, F.; Nassiet, V.; Cantarel, A. Influence of Printing Parameters on the Stability of Deposited Beads in Fused Filament Fabrication of Poly(Lactic) Acid. *Addit Manuf* 2019, 25, 112–121, doi:10.1016/J.ADDMA.2018.10.012.
117. Arraiza, A.L.; Sarasua, J.R.; Verdu, J.; Colin, X. Rheological Behavior and Modeling of Thermal Degradation of Poly(ϵ -Caprolactone) and Poly(L-Lactide). *International Polymer Processing* 2007, 22, 389–394, doi:10.3139/217.2067.
118. Cé de Andrade, J.; Cabral, F.; Clemens, F.J.; Leite Vieira, J.; B.P. Soares, M.; Hotza, D.; Fredel, M.C. Effect of Stearic Acid on the Mechanical and Rheological Properties of PLA/HA Biocomposites. *Mater Today Commun* 2023, 35, 106357, doi:10.1016/J.MTCOMM.2023.106357.

119. Kim, M.H.; Yun, C.; Chalisserry, E.P.; Lee, Y.W.; Kang, H.W.; Park, S.H.; Jung, W.K.; Oh, J.; Nam, S.Y. Quantitative Analysis of the Role of Nanohydroxyapatite (NHA) on 3D-Printed PCL/NHA Composite Scaffolds. *Mater Lett* 2018, 220, 112–115, doi:10.1016/J.MATLET.2018.03.025.
120. Rezania, N.; Asadi-Eydivand, M.; Abolfathi, N.; Bonakdar, S.; Mehrjoo, M.; Solati-Hashjin, M. Three-Dimensional Printing of Polycaprolactone/Hydroxyapatite Bone Tissue Engineering Scaffolds Mechanical Properties and Biological Behavior. *J Mater Sci Mater Med* 2022, 33, 1–14, doi:10.1007/S10856-022-06653-8/FIGURES/9.
121. Yao, H.; Zhu, W.; Zhu, X.; Yi, X.; Yao, J.; Yuan, X.; Chen, F.; Han, X. Development of Hydroxyapatite/Polycaprolactone Composite Biomaterials for Laser Powder Bed Fusion: Evaluation of Powder Characteristics, Mechanical Properties and Biocompatibility. *Polymers (Basel)* 2024, 16, 731, doi:10.3390/POLYM16060731/S1.
122. Rezania, N.; Asadi-Eydivand, M.; Abolfathi, N.; Bonakdar, S.; Mehrjoo, M.; Solati-Hashjin, M. Three-Dimensional Printing of Polycaprolactone/Hydroxyapatite Bone Tissue Engineering Scaffolds Mechanical Properties and Biological Behavior. *J Mater Sci Mater Med* 2022, 33, 1–14, doi:10.1007/S10856-022-06653-8/FIGURES/9.
123. Joo, Y.S.; Cha, J.R.; Gong, M.S. Biodegradable Shape-Memory Polymers Using Polycaprolactone and Isosorbide Based Polyurethane Blends. *Materials Science and Engineering: C* 2018, 91, 426–435, doi:10.1016/J.MSEC.2018.05.063.
124. Leroux, A.; Ngoc Nguyen, T.; Rangel, A.; Cacciapuoti, I.; Duprez, D.; Castner, D.G.; Migonney, V. Long-Term Hydrolytic Degradation Study of Polycaprolactone Films and Fibers Grafted with Poly(Sodium Styrene Sulfonate): Mechanism Study and Cell Response. *Biointerphases* 2020, 15, doi:10.1116/6.0000429.
125. Dias, J.R.; Sousa, A.; Augusto, A.; Bártolo, P.J.; Granja, P.L. Electrospun Polycaprolactone (PCL) Degradation: An In Vitro and In Vivo Study. *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 3397 2022, 14, 3397, doi:10.3390/POLYM14163397.
126. Backes, E.H.; Beatrice, C.A.G.; Shimomura, K.M.B.; Harb, S.V.; Pachane, B.C.; Selistre-de-Araujo, H.S.; Costa, L.C.; Passador, F.R.; Pessan, L.A. Development of Poly(ϵ -Polycaprolactone)/Hydroxyapatite Composites for Bone Tissue Regeneration. *J Mater Res* 2021, 36, 3050–3062, doi:10.1557/S43578-021-00316-0/FIGURES/6.

127. Sivalingam, G.; Karthik, R.; Madras, G. Kinetics of Thermal Degradation of Poly(ϵ -Caprolactone). *J Anal Appl Pyrolysis* 2003, 70, 631–647, doi:10.1016/S0165-2370(03)00045-7.
128. Bartnikowski, M.; Dargaville, T.R.; Ivanovski, S.; Hutmacher, D.W. Degradation Mechanisms of Polycaprolactone in the Context of Chemistry, Geometry and Environment. *Prog Polym Sci* 2019, 96, 1–20, doi:10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2019.05.004.
129. Popkov, A.; Kononovich, N.; Dubinenko, G.; Gorbach, E.; Shastov, A.; Tverdokhlebov, S.; Popkov, D. Long Bone Defect Filling with Bioactive Degradable 3D-Implant: Experimental Study. *Biomimetics* 2023, 8, 138, doi:10.3390/BIOMIMETICS8020138/S1.
130. Han, X.; Gao, Y.; Ding, Y.; Wang, W.; Liu, L.; Zhao, A.; Yang, P. In Vitro Performance of 3D Printed PCL- β -TCP Degradable Spinal Fusion Cage. *J Biomater Appl* 2020, 088532822097849, doi:10.1177/0885328220978492.
131. Pérez, E. Mechanical Performance of in Vitro Degraded Polylactic Acid/Hydroxyapatite Composites. *J Mater Sci* 2021, 56, 19915–19935, doi:10.1007/S10853-021-06508-7/FIGURES/11.
132. Tajvar, S.; Hadjizadeh, A.; Samandari, S.S. Scaffold Degradation in Bone Tissue Engineering: An Overview. *Int Biodeterior Biodegradation* 2023, 180, 105599, doi:10.1016/J.IBIDOD.2023.105599.
133. Popkov, A. V.; Stogov, M. V.; Gorbach, E.N.; Kononovich, N.A.; Tushina, N. V.; Tverdokhlebov, S.I.; Dubinenko, G.E.; Akimchenko, I.O.; Bolbasov, E.N.; Popkov, D.A. Hydrolysis of Bone-Replacing Materials Based on Polylactic Acid and Containing Hydroxyapatite in an In Vitro Experiment. *Bull Exp Biol Med* 2022, 174, 99–103, doi:10.1007/S10517-022-05656-3/METRICS.
134. Liu, Y.; Zheng, J.; Xiao, J.; He, X.; Zhang, K.; Yuan, S.; Peng, Z.; Chen, Z.; Lin, X. Enhanced Enzymatic Hydrolysis and Lignin Extraction of Wheat Straw by Triethylbenzyl Ammonium Chloride/Lactic Acid-Based Deep Eutectic Solvent Pretreatment. *ACS Omega* 2019, 4, 19829–19839, doi:10.1021/acsomega.9b02709.

135. Tsuji, H.; Mizuno, A.; Ikada, Y. Properties and Morphology of Poly(L-Lactide). III. Effects of Initial Crystallinity on Long-Term in Vitro Hydrolysis of High Molecular Weight Poly(L-Lactide) Film in Phosphate-Buffered Solution. *J Appl Polym Sci* 2000, 77, 1452–1464, doi:10.1002/1097-4628(20000815)77:7<1452::AID-APP7>3.0.CO;2-S.

136. Bartnikowski, M.; Dargaville, T.R.; Ivanovski, S.; Hutmacher, D.W. Degradation Mechanisms of Polycaprolactone in the Context of Chemistry, Geometry and Environment. *Prog Polym Sci* 2019, 96, 1–20.

137. Park, S.; Kim, J.E.; Han, J.; Jeong, S.; Lim, J.W.; Lee, M.C.; Son, H.; Kim, H.B.; Choung, Y.H.; Seonwoo, H.; et al. 3D-Printed Poly(ϵ -Caprolactone)/Hydroxyapatite Scaffolds Modified with Alkaline Hydrolysis Enhance Osteogenesis In Vitro. *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 257 2021, 13, 257, doi:10.3390/POLYM13020257.

138. Cho, Y.S.; Quan, M.; Kang, N.U.; Jeong, H.J.; Hong, M.W.; Kim, Y.Y.; Cho, Y.S. Strategy for Enhancing Mechanical Properties and Bone Regeneration of 3D Polycaprolactone Kagome Scaffold: Nano Hydroxyapatite Composite and Its Exposure. *Eur Polym J* 2020, 134, 109814, doi:10.1016/j.eurpolymj.2020.109814.

139. Fernández, I.A.; Haugen, H.J.; Peña, M.L.; Cantalapiedra, A.G.; Guzón, F.M. Use of 3D-Printed Polylactic Acid/Bioceramic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering in Preclinical in Vivo Studies: A Systematic Review. *Acta Biomater* 2023, doi:10.1016/J.ACTBIO.2023.07.013.

140. Basoz, D.; Karaman, M.I.; Buyuksungur, S.; Yucel, D.; Hasirci, N.; Kocaoglu, B.; Hasirci, V. 3D Printed PCL-NHAp Composite Implants for the Treatment of Segmental Bone Defects: In Vivo Application in a Rabbit Model. *Biofabrication* 2024, 17, 015041, doi:10.1088/1758-5090/AD9FE1.

141. Stankevich, K.S.; Gudima, A.; Filimonov, V.D.; Klüter, H.; Mamontova, E.M.; Tverdokhlebov, S.I.; Kzhyshkowska, J. Surface Modification of Biomaterials Based on High-Molecular Polylactic Acid and Their Effect on Inflammatory Reactions of Primary Human Monocyte-Derived Macrophages: Perspective for Personalized

Therapy. *Materials Science and Engineering: C* 2015, 51, 117–126, doi:10.1016/J.MSEC.2015.02.047.

142. Goreninskii, S.I.; Stankevich, K.S.; Nemoykina, A.L.; Bolbasov, E.N.; Tverdokhlebov, S.I.; Filimonov, V.D. A First Method for Preparation of Biodegradable Fibrous Scaffolds Containing Iodine on the Fibre Surfaces. *Bulletin of Materials Science* 2018, 41, 1–7, doi:10.1007/S12034-018-1625-Z/FIGURES/7.

143. Stankevich, K.S.; Danilenko, N. V.; Gadirov, R.M.; Goreninskii, S.I.; Tverdokhlebov, S.I.; Filimonov, V.D. A New Approach for the Immobilization of Poly(Acrylic) Acid as a Chemically Reactive Cross-Linker on the Surface of Poly(Lactic) Acid-Based Biomaterials. *Materials Science and Engineering: C* 2017, 71, 862–869, doi:10.1016/J.MSEC.2016.10.078.

144. Goreninskii, S.I.; Guliaev, R.O.; Stankevich, K.S.; Danilenko, N. V.; Bolbasov, E.N.; Golovkin, A.S.; Mishanin, A.I.; Filimonov, V.D.; Tverdokhlebov, S.I. “Solvent/Non-Solvent” Treatment as a Method for Non-Covalent Immobilization of Gelatin on the Surface of Poly(l-Lactic Acid) Electrospun Scaffolds. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019, 177, 137–140, doi:10.1016/J.COLSURFB.2019.01.060.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Акты об использовании результатов диссертационной работы в исследованиях и экспериментальной клинической практике

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

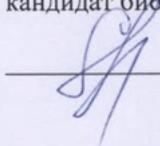
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии
имени академика Г.А. Илизарова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России
6, ул. М. Ульяновой, г. Курган, 640014, Россия
Тел. (352 2) 45-47-47, факс (3522) 45-40-60, 45-45-05
E-mail: office@ilizarov.ru Internet: www.ilizarov.ru

№ _____

«УТВЕРЖДАЮ»

На № _____ от _____

Заместитель директора по научной
работе ФГБУ «НМИЦ ТО
имени академика Г.А. Илизарова»
Минздрава России,
кандидат биологических наук


Е.Н. Овчинников

 МП

АКТ

об использовании результатов диссертационной работы
Дубиненко Г.Е. в ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Настоящий акт составлен представителями ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по результатам проведенных совместно с Томским политехническим университетом экспериментальных исследований в рамках соглашения № 89 о стратегическом партнерстве между федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» от 21 мая 2018 г.

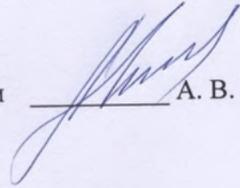
Целью работы Дубиненко Глеба Евгеньевича являлась разработка биорезорбируемых интрамедуллярных спиц с повышенными остеостимулирующими свойствами и способностью к деградации в условиях организма для их дальнейшего исследования и применения в экспериментальной клинической практике. Поставленная задача решалась путем изготовления интрамедуллярных спиц методом экструзии с использованием биоактивных материалов, разработанных в рамках диссертационной работы Дубиненко Глеба Евгеньевича.

Дубиненко Глебом Евгеньевичем были изготовлены биорезорбируемые интрамедуллярные спицы для их дальнейшего использования в ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г. А. Илизарова» в исследованиях и экспериментальной

 Система менеджмента качества сертифицирована на соответствие ISO 9001:2015

клинической практике (акты приема-передачи от 21.09.2017, 22.03.2021, 06.06.2022 г.). Проведенные исследования показали, что разработанные спицы являются эффективными благодаря своим биоактивным свойствам и способности к деградации в условиях организма, и могут применяться для лечения больных ортопедо-травматологического профиля.

Главный научный сотрудник
лаборатории коррекции деформаций
и удлинения конечностей, д.м.н., профессор,
врач травматолог-ортопед высшей категории



А. В. Попков



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

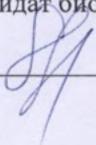
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии
имени академика Г.А. Илизарова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России
6, ул. М. Ульяновой, г. Курган, 640014, Россия
Тел. (352 2) 45-47-47, факс (3522) 45-40-60, 45-45-05
E-mail: office@ilizarov.ru Internet: www.ilizarov.ru

№ _____

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по научной
работе ФГБУ «НМИЦ ТО
имени академика Г.А. Илизарова»
Минздрава России,
кандидат биологических наук

 Е.Н. Овчинников



АКТ

об использовании результатов диссертационной работы
Дубиненко Г.Е. в ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Настоящий акт составлен представителями ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г. А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по результатам проведенных совместно с Томским политехническим университетом экспериментальных исследований в рамках соглашения № 89 о стратегическом партнерстве между федеральным государственным бюджетным учреждением «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» от 21 мая 2018 г.

Целью работы Дубиненко Глеба Евгеньевича являлась разработка деградируемых биоактивных имплантатов для замещения циркулярных дефектов трубчатых костей для их дальнейшего исследования и применения в экспериментальной клинической практике. Поставленная задача решалась путем изготовления 3D модели и последующей 3D печати пористых деградируемых имплантатов с использованием биоактивных материалов, разработанных в рамках диссертационной работы Дубиненко Глеба Евгеньевича.

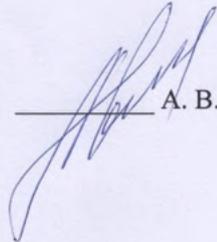
Дубиненко Глебом Евгеньевичем были изготовлены деградируемые биоактивные имплантаты для их дальнейшего использования в ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г. А. Илизарова» в исследованиях и экспериментальной



Система менеджмента качества сертифицирована на соответствие ISO 9001:2015

клинической практике (акты приема-передачи от 30.07.2020, 22.03.2021, 06.06.2022 г.). Проведенные исследования показали, что разработанные имплантаты являются перспективными и благодаря своим биоактивным свойствам и способности к деградации в условиях организма могут применяться для замещения циркулярных дефектов трубчатых костей.

Главный научный сотрудник
лаборатории коррекции деформаций
и удлинения конечностей, д.м.н., профессор,
врач травматолог-ортопед высшей категории



_____ А. В. Попков

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Акт внедрения в научную деятельность

Министерство здравоохранения
Российской Федерации



**Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "Северо-Западный
государственный медицинский университет
имени И.И. Мечникова"
Министерства здравоохранения
Российской Федерации**

(ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова
Минздрава России)

191015, Санкт-Петербург, ул. Карочная, д.41
ОКПО 30625447, ОКАТО 40298564000,
ОГРН 1117847434990, ИНН 7842461679, КПП 784201001
ОКВЭД 85.22; 86; 72.19; 84.21
тел.: (812) 303-50-00, факс: (812) 303-50-35,
e-mail: rectorat@srgmu.ru
www.srgmu.ru

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по науке и инновационной
деятельности федерального
государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Северо-Западный государственный
медицинский университет
им. И.И. Мечникова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
доктор медицинских наук, профессор
Бакулина Н.В.

« 4 » апреля 2025 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в научную деятельность научно-исследовательской лаборатории клеточных технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации результатов кандидатской диссертации аспиранта Научно-образовательного центра им. Б.П. Вейнберга Инженерной школы ядерных технологий Томского политехнического университета Дубиненко Г.Е. на тему: «Биоактивные композиционные материалы на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита для регенерации костных тканей: получение и свойства» по специальностям: 1.3.8. Физика конденсированного состояния, 2.2.12. Приборы, системы и изделия медицинского назначения.

Настоящим актом удостоверяем, что результаты кандидатской диссертации аспиранта Научно-образовательного центра им. Б.П. Вейнберга Инженерной школы ядерных технологий Томского политехнического университета Дубиненко Г.Е. на тему: «Биоактивные композиционные материалы на основе поли (ϵ -капролактона) и гидроксиапатита для регенерации костных тканей: получение и свойства» по специальностям: 1.3.8. Физика конденсированного состояния, 2.2.12. Приборы, системы и изделия медицинского назначения, внедрены и используются в научной деятельности НИЛ клеточных технологий в доклинических экспериментальных исследованиях на животных.

Разработанные Дубиненко Г.Е. композиционные материалы на основе поликапролактона и гидроксиапатита используются для изготовления биоактивных скаффолдов, предназначенных для регенерации костных тканей для терапии, реабилитации и восстановления утраченных функций живых тканей.

Старший научный сотрудник
научно-исследовательской
лабораторией клеточных технологий
к.б.н.

Енукашвили Н.И.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акт о внедрении в инновационную деятельность

ЭНДОПРИНТ

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«ИННОВАЦИОННО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ КОМПАНИЯ ЭНДОПРИНТ»

ИНН 7729039986 ОГРН 1027700128851 КПП 771701001 г. Москва

www.endoprint.ru

e-mail: info@endoprint.ru

Тел. (495) 792-45-23

Исх. № б/н от «01» апреля 2025г.

АКТ

о внедрении в инновационную деятельность результатов диссертационной работы
Г.Е. Дубиненко в обществе с ограниченной ответственностью «ИТК Эндопринт»

ООО «ИТК Эндопринт» – ведущая в России инновационно–технологическая компания полного цикла, реализующая возможности 3D-проектирования и аддитивных технологий при производстве индивидуальных эндопротезов и вспомогательного инструментария для проведения операции.

Настоящий акт составлен ООО «ИТК Эндопринт» на основании результатов работы, выполненной совместно с Томским политехническим университетом (ТПУ), в рамках договора о приоритетном сотрудничестве № 6999 от 22.06.2022.

Одной из задач, решаемых в рамках совместных работ, являлось исследование разработанных в ТПУ с участием Г.Е. Дубиненко композиционных биорезорбируемых материалов для FDM 3D печати, которые наша Компания рассматривает в качестве потенциального сырья для изготовления индивидуальных имплантатов и эндопротезов. Переданные от ТПУ по Акту приемки-передачи б/н от 13.07.2022 г. экспериментальные образцы биорезорбируемых имплантатов проходят длительные исследования на острую цитотоксичность в ФГБУ «Главный военный клинический госпиталь имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации.

Разработанные Г.Е. Дубиненко биорезорбируемые материалы на основе поликапролактона и гидроксиапатита имеют перспективу применения в качестве медицинских изделий, предназначенных для восстановления дефектов костной ткани и для терапии, реабилитации и восстановления утраченных функций живых тканей.

Операционный директор



А.А. Казанбаева

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Патент № 2775108 РФ от 28.06.22

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2775108

**ДЕГРАДИРУЕМЫЙ БИОАКТИВНЫЙ ИМПЛАНТАТ
ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ЦИРКУЛЯРНЫХ ДЕФЕКТОВ
ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ**

Патентообладатель: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Г.А. ИЛИЗАРОВА" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**

Авторы: **Попков Арнольд Васильевич (RU), Попков Дмитрий Арнольдович
(RU), Литвинов Борис Иванович (RU), Кононович Наталья Андреевна (RU),
Твердохлебов Сергей Иванович (RU), Дубиненко Глеб (RU)**

Заявка № 2021128609

Приоритет изобретения **30 сентября 2021 г.**Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **28 июня 2022 г.**Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **30 сентября 2041 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

документ подписан электронной подписью
Сертификат 68b80077c14e403a94ecbd24145d5c7
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 20.05.2022 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Патент № 780930 РФ от 04.10.22

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2780930

**ЦИЛИНДРИЧЕСКИЙ БИОАКТИВНЫЙ ИМПЛАНТАТ
ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ЦИРКУЛЯРНЫХ ДЕФЕКТОВ
ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ**

Патентообладатель: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Г.А. ИЛИЗАРОВА" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)**

Авторы: **Попков Арнольд Васильевич (RU), Попков Дмитрий Арнольдович
(RU), Литвинов Борис Иванович (RU), Кононович Наталья Андреевна (RU),
Твердохлебов Сергей Иванович (RU), Дубиненко Глеб (RU)**

Заявка № 2021128612

Приоритет изобретения **30 сентября 2021 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **04 октября 2022 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **30 сентября 2041 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

документ подписан электронной подписью
Сертификат 68b80077c14e403a94ceb524145d5c7
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 20.10.2022 по 26.05.2023

Ю.С. Зубов

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Патент № 2813693 РФ от 15.02.24

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2813693**ПОЛИМЕРНЫЙ КОМПОЗИЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ
ДЛЯ 3D ПЕЧАТИ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО
НАЗНАЧЕНИЯ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Томский политехнический университет" (RU)*

Авторы: *Дубиненко Глеб Евгеньевич (RU), Твердохлебов Сергей Иванович (RU)*

Заявка № 2023131122

Приоритет изобретения **29 ноября 2023 г.**
Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **15 февраля 2024 г.**
Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **29 ноября 2043 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*



ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 429b6a26c3853164ba96485b73b4aa7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 03.02.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Патент № 2815644 РФ от 19.03.24

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2815644**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИМЕРНОГО
КОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ
ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО
НАЗНАЧЕНИЯ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
"Национальный исследовательский Томский
политехнический университет" (RU)*

Авторы: *Дубиненко Глеб Евгеньевич (RU), Твердохлебов Сергей
Иванович (RU)*

Заявка № 2023131359

Приоритет изобретения **30 ноября 2023 г.**

Дата государственной регистрации

в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **19 марта 2024 г.**Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **30 ноября 2043 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 429b6a29c3853164ba956f5b73b4aa7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 19.03.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Патент № 2820632 РФ от 06.06.24

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2820632

**СЕРКЛЯЖНОЕ ПОЛОТНО ДЛЯ ОХВАТЫВАЮЩЕЙ ФИКСАЦИИ
КОСТНЫХ ОТЛОМКОВ И ОСКОЛКОВ ПРИ ПЕРЕЛОМАХ И
ДЕФЕКТАХ ДЛИННЫХ КОСТЕЙ**

Патентообладатели: **ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Г.А. ИЛИЗАРОВА" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU),
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ТОМСКИЙ
ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" (RU)**

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2023119791

Приоритет изобретения **27 июля 2023 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **06 июня 2024 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **27 июля 2043 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*



ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 429b6a29c3853164b995f85b73b4aa7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 03.06.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов