

Биоразлагаемые полимерные композиции с остеогенным потенциалом

Лебедев С.М.¹, Чистохин Д.М.¹, Щаденко С.В.¹, Дзюман А.Н.², Николаева О.О.³,
Митриченко Д.В.³, Просолов А.Б.³, Хлусов И.А.^{1, 2, 3, 4}

¹ Национальный исследовательский Томский политехнический университет (НИ ТПУ)
Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30

² Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

³ Научно-производственная компания (НПК) «Синтел»
Россия, 634061, г. Томск, ул. Герцена, 45

⁴ Балтийский федеральный университет (БФУ) им. И. Канта
Россия, 236041, г. Калининград, ул. А. Невского, 14

РЕЗЮМЕ

Цель. Исследование основных физико-механических свойств композитов гидроксиапатита (ГА) (до 25–50%) с полилактидом (ПЛА-ГА) и поли(ε-капролактоном) (ПКЛ-ГА), полученных методом смешения в расплаве, а также остеогенного потенциала ПЛА-ГА *in vivo*.

Материалы и методы. Все биоразлагаемые полимерные композиции изготовлены методом горячего компаундирования в расплаве, исследованы методами диэлектрической спектроскопии в частотном ходе, оптической микроскопии, рентгеноструктурного анализа и испытаний на растяжение. Способность композитов ПЛА-5% ГА, полученных методом 3D-печати, к *in vivo* индукции роста костной ткани изучена при помощи теста подкожного эктопического костеобразования на линейных мышах.

Результаты. Значения действительной составляющей комплексной диэлектрической проницаемости композиций ПЛА-ГА и ПКЛ-ГА увеличиваются на 15–30% по сравнению с исходными ПЛА и ПКЛ, при этом тангенс угла потерь не превышает 0,02 для композиций на основе ПЛА и 0,2 – для композиций на основе ПКЛ. Степень кристалличности для композиций ПЛА-ГА, по сравнению с показателем для ПЛА, увеличивается в 3 и 6 раз при повышении содержания ГА с 25 до 50% соответственно. Для композиции ПКЛ-ГА при 25% ГА степень кристалличности увеличивается в 2 раза по отношению к значению для ПКЛ. Это обусловлено тем, что частицы порошка ГА играют роль дополнительных центров кристаллизации. При этом статистически значимо снижается прочность композитов на разрыв. Композиты ПЛА, полученные методом 3D-печати, даже с низким (5%) содержанием ГА на 40% повышают результаты эктопического остеогенеза.

Заключение. Разработанные биоразлагаемые композиции имеют потенциал практического применения в приложении к биоинженерии костной ткани.

Ключевые слова: полилактид, поли(ε-капролактон), гидроксиапатит, компаундирование в расплаве, физико-механические свойства, эктопический остеогенез, *in vivo*.

Конфликт интересов. Авторы декларируют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование частично выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации по государственной поддержке ведущих научных школ Российской Федерации (грант № НШ-2495.2020.7).

✉ Лебедев Сергей Михайлович, e-mail: lsm70@mail.ru.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта, г. Калининград (протокол № 7 от 09.12.2015).

Для цитирования: Лебедев С.М., Чистохин Д.М., Щаденко С.В., Дзюман А.Н., Николаева О.О., Митриченко Д.В., Просолов А.Б., Хлусов И.А. Биоразлагаемые полимерные композиции с остеогенным потенциалом. *Бюллетень сибирской медицины*. 2020; 19 (4): 119–129. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-119-129>.

Biodegradable polymer composites with osteogenic potential

Lebedev S.M.¹, Chistokhin D.M.¹, Shchadenko S.V.¹, Dzuman A.N.², Nikolaeva O.O.³, Mitrichenko D.V.³, Prosolov A.B.³, Khlusov I.A.^{1, 2, 3, 4}

¹ National Research Tomsk Polytechnic University
30, Lenina Av., Tomsk, 634050, Russian Federation

² Siberian State Medical University
2, Moscow Tract, Tomsk, 634050, Russian Federation

³ SINTEL Research and Production Company
45, Gerzena Str., Tomsk, 634061, Russian Federation

⁴ Immanuel Kant Baltic Federal University
14, A. Nevskogo Str., Kaliningrad, 236041, Russian Federation

ABSTRACT

The aim is to study the basic physico-mechanical properties of hydroxyapatite (HA) composites (up to 25–50 wt%) with polylactide (PLA-HA) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL-HA) prepared by melt compounding, as well as the osteogenic potential of PLA-HA *in vivo*.

Materials and methods. All biodegradable polymer composites were prepared by hot melt compounding and studied by dielectric spectroscopy in frequency domain, optical microscopy, X-ray diffraction analysis and tensile tests. An ability of PLA-5 wt% HA composites prepared by 3D-printing to induce bone tissue growth *in vivo* was detected with the help of ectopic subcutaneous test in inbred mice.

Results. Values of the real part of complex permittivity of PLA-HA and PCL-HA composites are increased by 15–30% compared to those for initial PLA and PCL, while tand loss factor does not exceed 0.02 for PLA-based composites and 0.2 for PCL-based composites. The crystallinity degree of PLA-HA composites is increased by 3 and 6 times with an increase of HA content from 25 to 50 wt% respectively compared to the indicator for PLA. The crystallinity degree of PCL-HA composites with 25 wt% HA is increased by 2 times compared to the value for PCL. It is due to the fact that HA powder particles play the role of additional nucleation centers. For all this, mechanical strength of composites diminished statistically. Even lowest HA content (5 wt%) in PLA-HA composites prepared by 3D-printing increased the incidence of ectopic osteogenesis by 40%.

Conclusion. Designed biodegradable composites have a potential of practical use for bone tissue engineering.

Key words: poly(lactic acid), poly(ϵ -caprolactone), hydroxyapatite, melt compounding, physicochemical properties, ectopic osteogenesis, *in vivo*.

Conflict of interest. Authors declare no obvious or potential conflict of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was partially supported by the Council for Grants of the President of the Russian Federation for State Support of Leading Scientific Schools of the Russian Federation (Grant No. SSH-2495.2020.7).

Conformity to the principles of ethics. The study approved by the local ethics committee under Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad (Protocol No. 7 of 09.12.2015).

For citation: Lebedev S.M., Chistokhin D.M., Shchadenko S.V., Dzuman A.N., Nikolaeva O.O., Mitrichenko D.V., Prosolov A.B., Khlusov I.A. Biodegradable polymer composites with osteogenic potential. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2020; 19 (4): 119–129. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-119-129>.

ВВЕДЕНИЕ

Биоразлагаемые полимеры, такие как полилактид (ПЛА) и поли(ϵ -капролактон) (ПКЛ), широко применяются в области биомедицины в качестве полимерных каркасов (скаффолдов) для содействия росту тканей и клеток во время регенерации костной ткани, а также для доставки лекарственных препаратов, когда лекарства смешиваются с полимерной матрицей и постепенно высвобождаются по мере разложения биополимера в организме человека [1–8]. ПЛА и ПКЛ могут разрушаться микроорганизмами в условиях окружающей среды, кроме того, ПКЛ подвержен как щелочному, так и ферментативному гидролизу [9, 10].

Обычные однофазные полимерные материалы не всегда удовлетворяют основным требованиям регенеративной медицины, поэтому существует большая потребность в разработке многофазных композиций со свойствами, подобными свойствам натуральной кости. Например, полилактид обладает хорошей способностью к биологическому разложению, однако очень низкое удлинение при разрыве или изгибе и хрупкость ограничивают его применение. Поли(ϵ -капролактон) обладает более высоким удлинением при разрыве, в то время как скорость его разложения ниже, чем для ПЛА. Различные органические и неорганические наполнители используются для улучшения свойств биоразлагаемых композиций, таких как механические свойства, водопоглощение, скорость разложения и биосовместимость, что делает эти композиционные материалы пригодными для использования в области биомедицины. Углеродные нанотрубки и углеродные волокна (УВ), производные графита, графен, слоистые силикаты, порошки сегнетоэлектрической и пьезоэлектрической керамики, гидроксиапатит (ГА) и другие материалы часто применяются в качестве наполнителей с заданными свойствами в таких многофазных биоразлагаемых композициях [7, 11–18].

Так, в работах [19–21] авторы показали эффективность применения биокомпозиционного материала «Остеоматрикс», включающего природные гидроксиапатиты, аминокликаны и коллагены, для регенерации костной ткани. Дефекты в поврежденных костях заполнялись биокомпозиционным материалом «Остеоматрикс» в виде порошка, гранул или блоков, что позволило существенно сократить срок формирования новой костной ткани у пациентов.

Многочисленные авторы показали, что добавление ГА в матрицы ПЛА или ПКЛ может улучшать как биосовместимость, так и механические свойства полимер-керамических композиций, поскольку ги-

дроксиапатит обладает наиболее сходным химическим составом с костной тканью человека [1, 22–32]. Так, Ж. Акиндо и соавт. [23] установили, что добавление ГА в ПЛА позволяет обеспечить лучшее приращение клеток и пролиферацию к матрице ПЛА. Добавление модификаторов в композиции ПЛА-ГА приводит к увеличению ударной прочности, прочности при растяжении и изгибе при их содержании в композициях около 5%.

Ж. Руссиас и соавт. [28] наблюдали, что композиции на основе ПЛА, наполненные мелкозернистым порошком (средний размер частиц 5 мкм) или более крупными нитевидными кристаллами (длиной 25–30 мкм и диаметром 5 мкм) гидроксиапатита с содержанием керамики около 70–85%, можно использовать для изготовления скаффолдов с механическими свойствами, близкими к свойствам кости человека.

С. Чжан и соавт. [31] показали, что композиции ПЛА-ГА улучшают межфазную адгезию и прочность на изгиб. Кроме того, эти композиции пригодны для переработки методом 3D-печати [30, 31]. Л. Шен и соавт. [32] сообщили, что биокомпозиции на основе ПЛА, наполненные ГА и углеродным волокном (ПЛА-ГА-УВ), были изготовлены из препрега ПЛА-ГА-УВ методом горячего прессования. Препрег ПЛА-ГА-УВ изготавливался путем смешения компонентов в растворе. Авторы обнаружили, что биокомпозиции обладают превосходными механическими свойствами, например, прочность на изгиб, модуль изгиба и прочность при сдвиге достигают 430 МПа, 22 ГПа, 212 МПа соответственно. Поглощение воды биокомпозициями ПЛА-ГА-УВ увеличилось на 5%, тогда как скорость потери массы составила всего 1,6%. После разложения в лабораторных условиях в течение 3 мес значение pH фосфатного буферного раствора уменьшается менее чем на 1/10. Это указывает на то, что ГА нейтрализует кислоту, образующуюся при разложении ПЛА в результате гидролиза, что предотвращает ее вредное воздействие на организм. С. Парк и соавт. [33], Ж. Ким и соавт. [34], В. Джанг и соавт. [35] установили, что композиции ПКЛ-ГА могут также успешно применяться для изготовления биоразлагаемых скаффолдов и имплантатов для инженерии костей с помощью 3D-печати.

Однако абсолютное большинство композиций ПЛА-ГА и ПКЛ-ГА изготавливалось методом смешения в растворе, но даже для этих композиций исследования основных свойств носят эпизодический характер.

Целью данной работы было исследование основных физико-механических свойств композитов

ПЛА-ГА и ПКЛ-ГА, полученных методом смешения в расплаве, а также остеогенного потенциала ПЛА-ГА композитов *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоразлагаемые полилактид (ПЛА, Ingeo 4043D, NatureWorks LLC, США) и поли(ϵ -капролактон) (ПКЛ, Sigma-Aldrich, США) были использованы в данной работе в качестве полимерных матриц. Порошок гидроксиапатита, полученный механохимическим способом [36] и предоставленный ООО «НПК «Синтел» (г. Томск, Россия), применялся в качестве наполнителя. Все материалы перед применением не подвергались дополнительной обработке. Содержание наполнителя в полимерных

композициях изменялось от 0 до 50%. Композиции были получены путем смешения в расплаве в измерительном смесителе 50 ЕНТ (Brabender, Германия). Длительность смешения и температура переработки составляли 10 мин и 190–210 °С для композиций на основе ПЛА, и 80–100 °С – для композиций на основе ПКЛ соответственно. Скорость вращающихся в противоположных направлениях ножей смесителя изменялась от 30 до 90 об./мин, как показано на рис. 1. Наполнитель постепенно вводился в расплав полимера, при этом смешение производилось до тех пор, пока наполнитель не был равномерно распределен в полимерной матрице. После изготовления все композиции гранулировались с помощью гранулятора (Brabender, Германия).

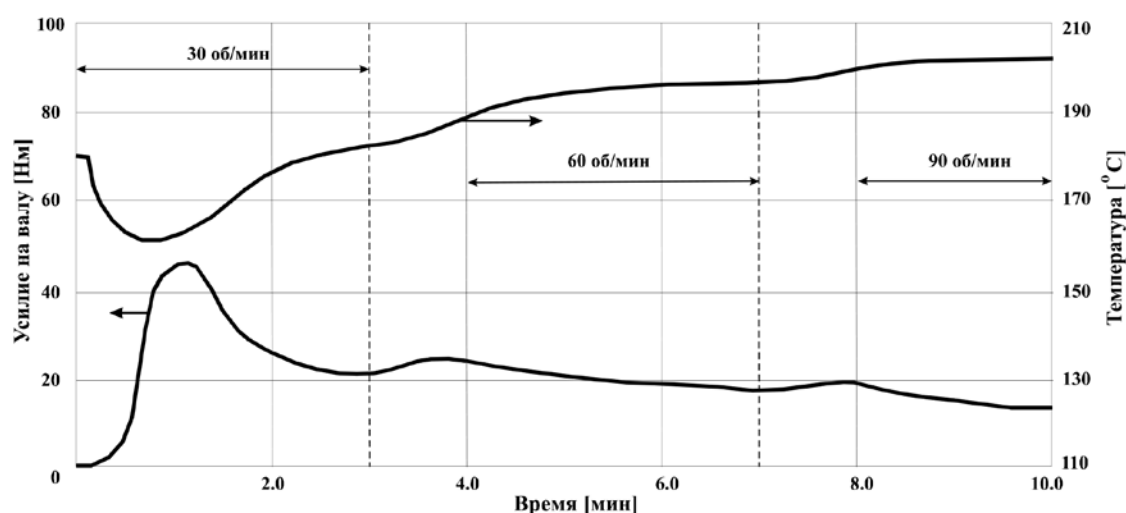


Рис. 1. Временные диаграммы температуры расплава и усилия на валу смесителя для композиции ПЛА-ГА

Для изготовления образцов с размерами $65 \times 85 \times (0,05-1,0)$ мм методом горячего прессования пресс-формы, заполненные гранулами композиций, помещали в вакуумную печь, нагретую до 200 °С (для композиций на основе ПЛА) и до 100 °С (для композиций на основе ПКЛ) на 3 ч. После этого пресс-формы помещались в гидравлический пресс, где выдерживались под давлением 20 МПа в течение 20 мин. Затем пресс-формы охлаждали со скоростью охлаждения 4 °С/мин до температуры окружающей среды под давлением на воздухе.

Измерения действительной части ϵ' комплексной диэлектрической проницаемости $\epsilon^*(f) = \epsilon'(f) - \epsilon''(f)$ и тангенса угла диэлектрических потерь $\text{tg} \delta = \epsilon''(f)/\epsilon'(f)$, где ϵ'' – мнимая составляющая комплексной диэлектрической проницаемости; $\delta = (90^\circ - \varphi)$ – угол потерь; и φ – фазовый угол между напряжением и током, проводились

с помощью метода диэлектрической спектроскопии в частотном ходе при напряжении переменного тока 3 В в диапазоне частот $1-10^5$ Гц с помощью измерительного комплекса Solartron Analytical (Великобритания). Для всех образцов производилось от семи до десяти измерений на декаду во всем исследованном диапазоне частот. Для каждого материала измерялось не менее трех образцов.

Морфология разработанных композиций, форма и размеры частиц порошка наполнителя исследовались с помощью оптической микроскопии. Толщина образцов для исследования полимерных композиций составляла 50 мкм.

Исследование кристаллической структуры полимерных матриц и композиций проводилось методом широкоугольной дифракции рентгеновских лучей (XRD) с помощью дифрактометра Shimadzu XRD-7000 (Германия), CuK_α -излучение $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ при

ускоряющем напряжении на рентгеновской трубке 40 кВ и токе 30 мА в диапазоне углов $2\theta = 5-90^\circ$.

Механические свойства разработанных полимерных композиций были изучены с помощью универсальной разрывной машины Instron 3345 (США). Для всех испытанных образцов из экспериментально полученных кривых «напряжение – деформация» были определены значения модуля упругости, удлинения при разрыве и прочности при разрыве.

Для тестирования биоинженерного потенциала трехмерные композиты ПЛА (95%) + ГА (5%) получены в виде дисков толщиной 1,2 мм и диаметром 11 мм методом компьютерного проектирования в программной среде Blender открытым исходным кодом и последующего послойного наплавления нитей (диаметр 1,75 мм) при помощи 3D-принтера CreatBot Duo (CreatBot 3D Printer, КНР), как описано ранее [37]. В качестве контроля служили матрицы из 100% ПЛА. Одна из поверхностей образцов была текстурирована бороздками шириной 0,3–0,5 мм для улучшения адгезии костного мозга к поверхности образцов.

Одним из современных способов определения остеогенных свойств материалов и изделий служит эктопический (гетеротопический) подкожный тест на животных, позволяющий оценить *in vivo* индукцию дифференцировки мезенхимных стволовых клеток в остеобласты [38].

Эксперименты выполнены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755). Животные содержались согласно РД-АПК 3.10.07.02-09. Снабжение лабораторных животных питьевой водой производилось из водопровода, качество воды соответствовало СанПиН 2.1.4.1074-01. Животные содержались при искусственном и естественном освещении в соответствии с требованиями СНиП 23.05-95.

Линейным мышам BALB/c через срединный разрез формировали доступ в подмышечную область живота, куда подкожно вводили по 1 имплантату с нанесенным в асептических условиях *in vitro* столбиком сингенного костного мозга, предварительно взятого из бедренной кости, как описано ранее [39]. Костный мозг взрослого организма является центральным пулом и источником мезенхимных стволовых клеток (МСК) [40].

Через 40 сут животных умерщвляли посредством CO_2 -асфиксии, оценивали состояние тканей вокруг имплантатов, имплантаты извлекали вместе с комплексом мягких тканей (тканевыми пластинками) на «рабочей» (текстурированной) поверхности об-

разцов, использовали стандартную гистологическую технику тонких срезов фиксированных тканевых пластинок и их окраски гематоксилином-эозином [39]. В контрольной и подопытной группах тестировали по шесть имплантатов. Позитивным результатом считали формирование в составе тканевой пластинки кости и (или) костной ткани с костным мозгом.

Вычисляли способность имплантатов индуцировать рост костной ткани как процент тестируемых образцов, способствующих индукции роста костной ткани (ИКТ) с костным мозгом или без него в составе тканевой пластинки, от общего числа имплантированных образцов по формуле ИКТ (%) = $[N2/N1] \times 100\%$, где $N1$ – число имплантированных образцов; $N2$ – число образцов, на которых выявлен рост костной ткани.

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программы Statistica для Windows 13.3. Нормальность распределения показателей проверяли с помощью закона Колмогорова – Смирнова. Рассчитывали параметры распределений: выборочное среднее и ошибку среднего ($M \pm m$), медиану и интерквартильный размах $Me (Q_1-Q_3)$. Для оценки статистической значимости различий, в случае несоответствия распределения данных нормальному закону распределения, применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты диэлектрической спектроскопии в частотном ходе представлены на рис. 2. Видно, что частотные зависимости $\epsilon'(f)$ для полимерных композиций имеют типичный характер: $\epsilon'(f)$ монотонно уменьшается с частотой как для полимерных матриц, так и для композиций на их основе. При наполнении ПЛА порошком ГА диэлектрическая проницаемость композиции ПЛА + 25% ГА увеличивается на 12–15% по сравнению с исходным ПЛА во всем исследованном диапазоне частот за счет более высокой диэлектрической проницаемости наполнителя, которая составляет около 4–9 [41]. Для композиции ПЛА + 50% ГА увеличение диэлектрической проницаемости составляет 23–32% по сравнению с исходным ПЛА. Увеличение диэлектрической проницаемости композиции ПКЛ + 25% ГА составляет 1–4% по сравнению с исходным ПКЛ. Значения тангенса угла диэлектрических потерь $\text{tg}\delta(f)$ в исследованном диапазоне частот для композиций на основе ПЛА не превышают 0,02, а для композиции ПКЛ + 25% ГА – 0,2 относительные единицы.

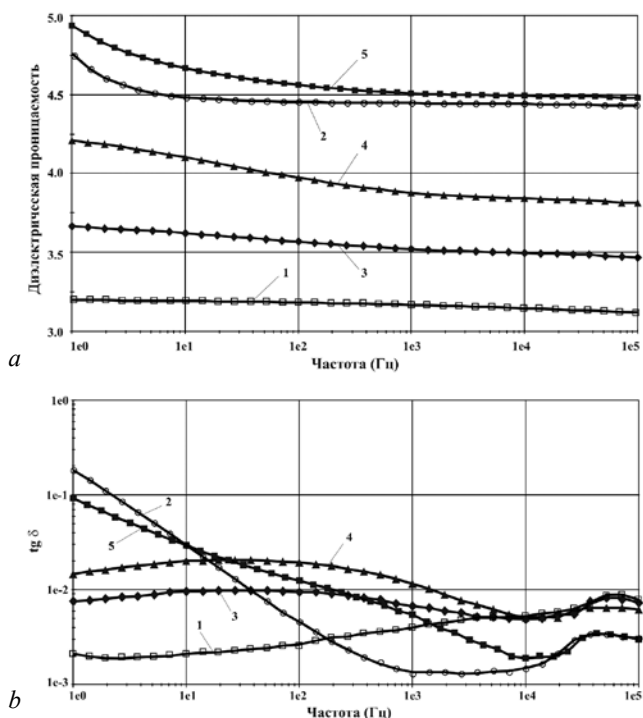


Рис. 2. Частотные зависимости действительной составляющей комплексной диэлектрической проницаемости (относительные единицы) (a) и $\text{tg} \delta$ (b) для: 1 – ПЛА; 2 – ПКЛ; 3 – ПЛА + 25% ГА; 4 – ПЛА + 50% ГА; 5 – ПКЛ + 25% ГА

Результаты оптической микроскопии приведены на рис. 3. Частицы наполнителя образуют агломераты размером около 100 мкм, которые видны как для исходного порошка ГА (рис. 3, a), так и для композиции с содержанием наполнителя 25% (рис. 3, b). Видно, что частицы наполнителя достаточно равномерно распределены в полимерной матрице. Снижение среднего размера агломератов наполнителя для композиции с 50% ГА (рис. 3, c) по сравнению с композицией ПЛА + 25% ГА объясняется разрушением агломератов порошка наполнителя во время компаундирования за счет увеличения жесткости композиции.

На рис. 4 показаны результаты исследования рентгеновской дифракции (XRD-анализ) полимерных матриц ПЛА и ПКЛ и композиций на их основе. На рентгенограмме исходного ПЛА наблюдается широкий дифракционный максимум около $2\theta \approx 16,2^\circ$, возникающий за счет отражения от кристаллографических плоскостей (200) или (110) (рис. 4, a). Пики, наблюдаемые при $26,12; 29,16; 32; 40; 46,9$ и $49,7^\circ$ для композиций ПЛА-ГА, являются характеристическими пиками ГА (рис. 4, b, c) за счет отражения от кристаллографических плоскостей (002), (210), (211), (310), (222) и (213).

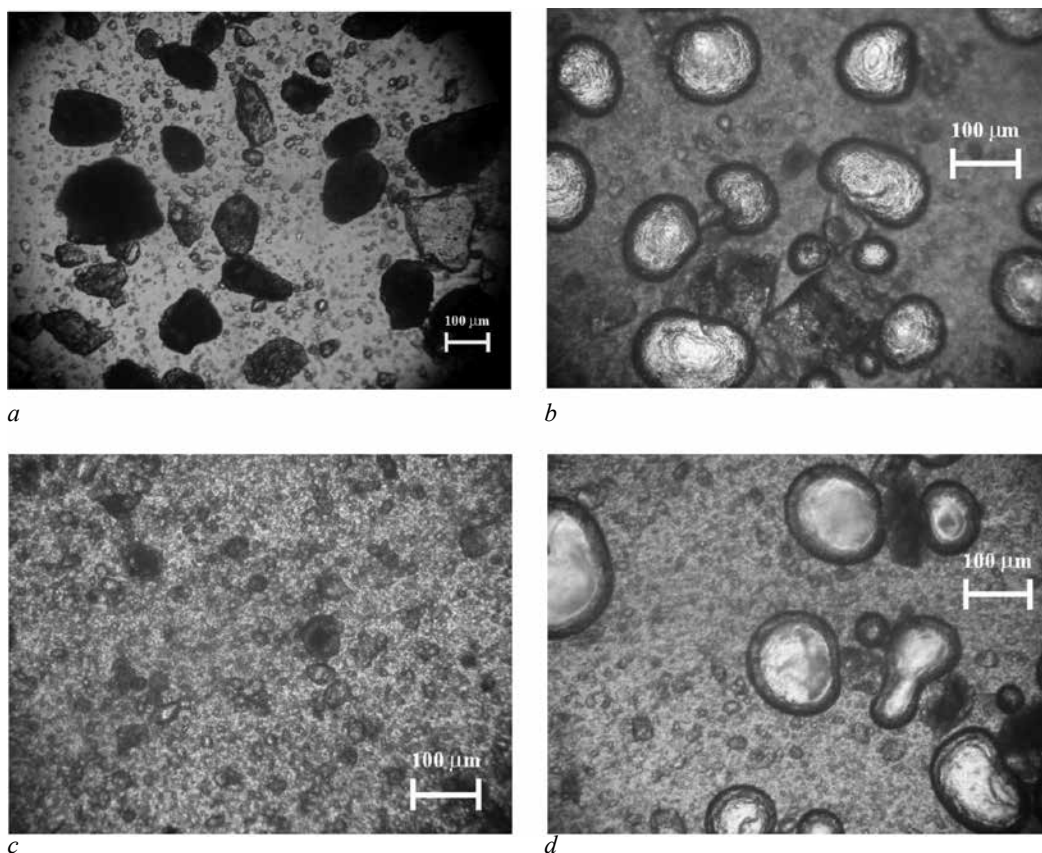


Рис. 3. Микрофотографии порошка ГА (a) и композиций ПЛА-ГА с 25% ГА (b); с 50% ГА (c); композиции ПКЛ-ГА с 25% ГА (d)

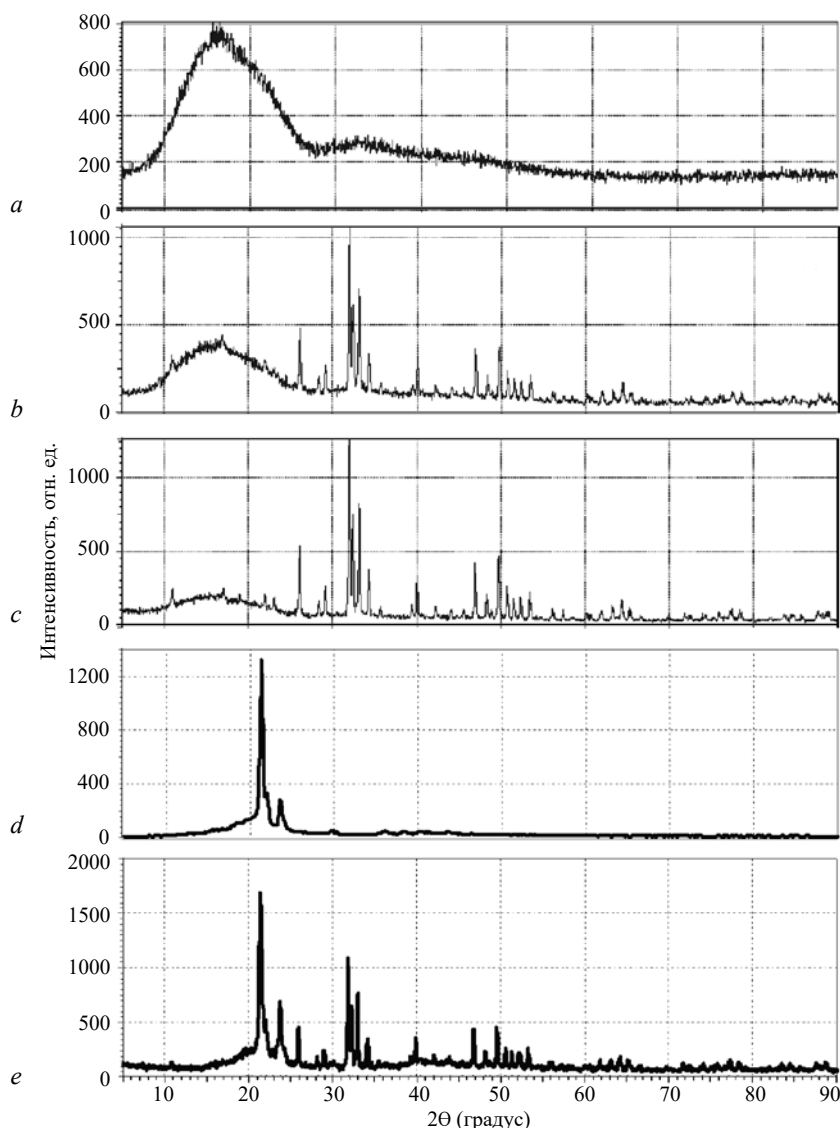


Рис. 4. Рентгенограммы для исходного ПЛА (a); композиций ПЛА-ГА: с 25% ГА (b); с 50% ГА (c); исходного ПКЛ (d); композиции ПКЛ-ГА с 25% ГА (e)

На рентгенограмме исходного ПКЛ (рис. 4, d) наблюдаются два резких пика при $2\theta \approx 21,4^\circ$ и $23,7^\circ$, которые соответствуют отражениям от кристаллографических плоскостей (110) и (200) ПКЛ. Пики при $26,12^\circ$; $29,16^\circ$; 32° ; 40° ; $46,9^\circ$ и $49,7^\circ$ для композиции ПКЛ-ГА обусловлены наличием ГА (рис. 4, d), как и для композиций ПЛА-ГА.

По результатам XRD-анализа была определена степень кристалличности применяемых полимерных матриц и полимерных композиций на их основе, результаты этих исследований приведены в табл. 1.

Установлено, что степень кристалличности композиций ПЛА-ГА, по сравнению с исходным ПЛА, увеличивается в 3 и 6 раз для композиций ПЛА + 25% ГА и ПЛА + 50% ГА соответственно. Степень кристалличности композиции ПКЛ + 25% ГА увеличилась в 2 раза по сравнению с исходным ПКЛ.

Увеличение степени кристалличности полимерных композиций обусловлено тем, что при наполнении полимерных матриц порошком ГА частицы наполнителя играют роль дополнительных центров кристаллизации в композициях.

На рис. 5 приведены результаты испытаний образцов на растяжение. Видно, что добавление ГА в ПЛА приводит к уменьшению удлинения и прочности при разрыве, и только для модуля Юнга наблюдается тенденция к росту при увеличении содержания ГА.

Для композиций на основе ПКЛ изменения механических свойств аналогичны, однако значения модуля упругости и прочности при разрыве существенно ниже по сравнению с полученными для композиций на основе ПЛА, в то время как удлинение для композиций на основе ПЛА пренебрежимо мало по сравнению с композициями на основе ПКЛ.

Таблица 1

Степень кристалличности полимерных матриц и композиций, $M \pm m$					
Материал	ПЛА	ПЛА + 25% ГА	ПЛА + 50% ГА	ПКЛ	ПКЛ + 25% ГА
Степень кристалличности, %	11,6 ± 0,35	37,9 ± 1,14	71,45 ± 2,14	34,7 ± 1,04	75,53 ± 2,27

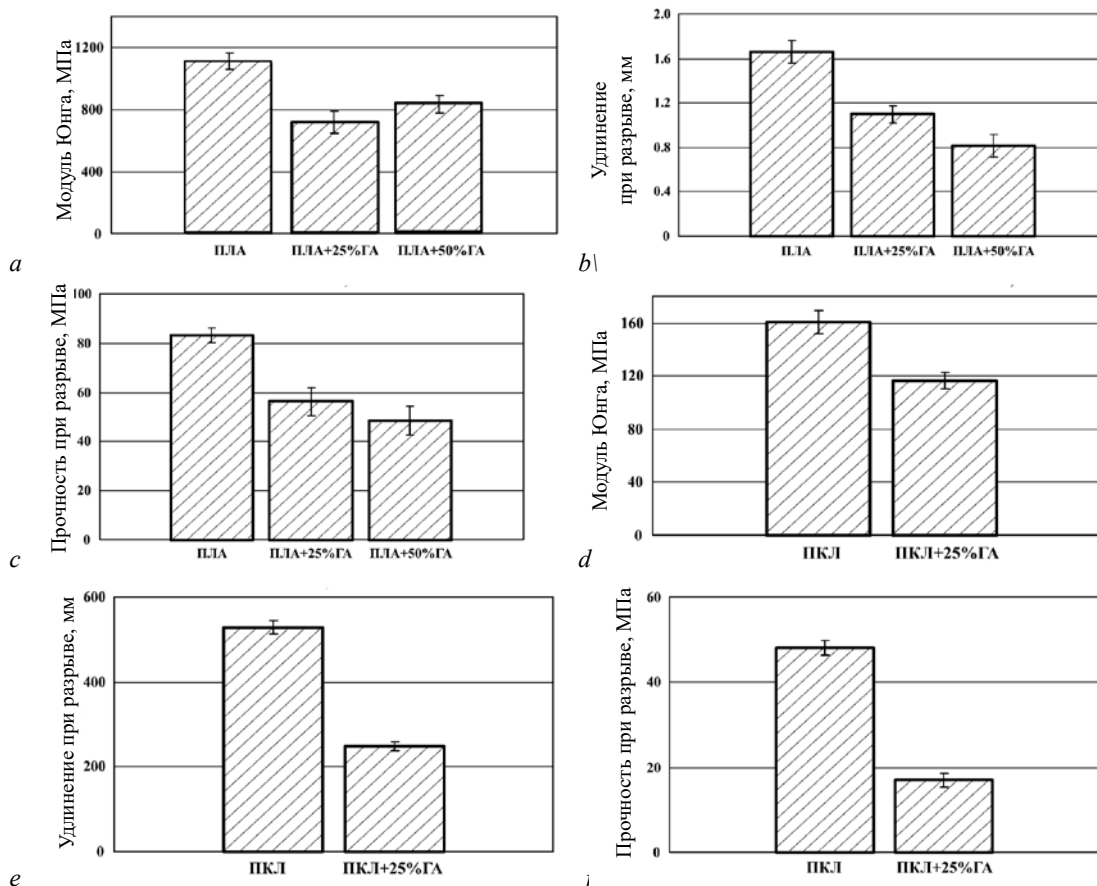


Рис. 5. Результаты механических испытаний для композиций на основе ПЛА (a–c) и ПКЛ (d–f): a и d – модуль Юнга; b и e – удлинение при разрыве; c и f – прочность при разрыве

В настоящее время все большее применение в приложении к тканевой биоинженерии находят биodeградируемые полимеры и их композиции. Имплантаты из ПЛА являются одними из наиболее востребованных изделий в клинической практике. ПЛА-изделия расщепляются и замещаются костной тканью, по данным разных авторов, не ранее чем 7 лет после имплантации [42], что может приводить к осложнениям в виде воспалительной реакции на инородное тело [43]. В связи с этим разработка и биомедицинское тестирование новых технологий изготовления и модификации композитов (со)полимеров и ГА с контролируемой биodeградацией являются весьма актуальными. Однако при высоких содержаниях ГА потенциальное усиление остеогенных свойств композитов [44] нивелируется реальным снижением их биомеханических свойств (см. рис. 5).

При подкожной имплантации тестируемые материалы испытывают биомеханическую нагрузку

(ударную, на сдавливание и боковое смещение), что приближает моделируемые *in vivo* условия к костной имплантации. При подкожном тестировании композитов ПЛА с низким содержанием ГА (5%) через 40 сут не отмечалось макроскопических признаков разрушения имплантатов и воспалительной реакции, в частности выраженной гиперемии реципиентного ложа, наличия экссудата. Диски были окружены тонкой (менее 50 мкм) соединительнотканной капсулой, фиксирующей их в боковом подкожном кармане.

ПЛА и его композит способствовали продвижению (кондукции) по поверхности тестируемых образцов тканей, формирующихся подкожно из костного мозга, что было зафиксировано по более чем 3-кратному увеличению площади тканевых пластинок (табл. 2). Гистологическая оценка тканевых пластинок показала ИКТ: 20% в случае ПЛА образцов и 60% в случае композитных скаффолдов ПЛА + 5% ГА (см. табл. 2).

Влияние образцов на геометрические и гистологические характеристики тканей, выросших из костного мозга при подкожном эктопическом тесте на мышах BALB/c, Me (Q_1-Q_3)					
Тестируемая группа образцов, $n = 6$	Частота образования тканевой пластинки, %	ИКТ, %	Площадь, костного мозга, мм ² (исходный уровень до имплантации)	Свойства тканевой пластинки (после имплантации)	
				Площадь, % от площади костного мозга	Гистологический состав
ПЛА	100	20	3,54 (3,49–3,72)	306 (217–504)	Кость с костным мозгом (1 случай); соединительная и жировая ткани (4 случая)
ПЛА + 5% ГА	100	60	4,53 (3,89–4,87)	382 (327–443)	Грубоволокнистая кость (2 случая); кость с костным мозгом (1 случай); соединительная ткань (2 случая)

Примечание. Число использованных образцов в каждой группе – n .

На гистологических срезах выявлены грубоволокнистая костная ткань, а также система «кость/костный мозг», формирующиеся *de novo* посредством *in situ* ремоделирования костного мозга, нанесенного *in vitro* (рис. 6). Эктопическая метаплазия сингенно-

го костного мозга протекает через активацию пула МСК донора, дифференцирующихся в предшественники и потомки хондро-, остеобластогенеза, и стволовых кроветворных клеток реципиента, репопулирующих участки имплантации [45].

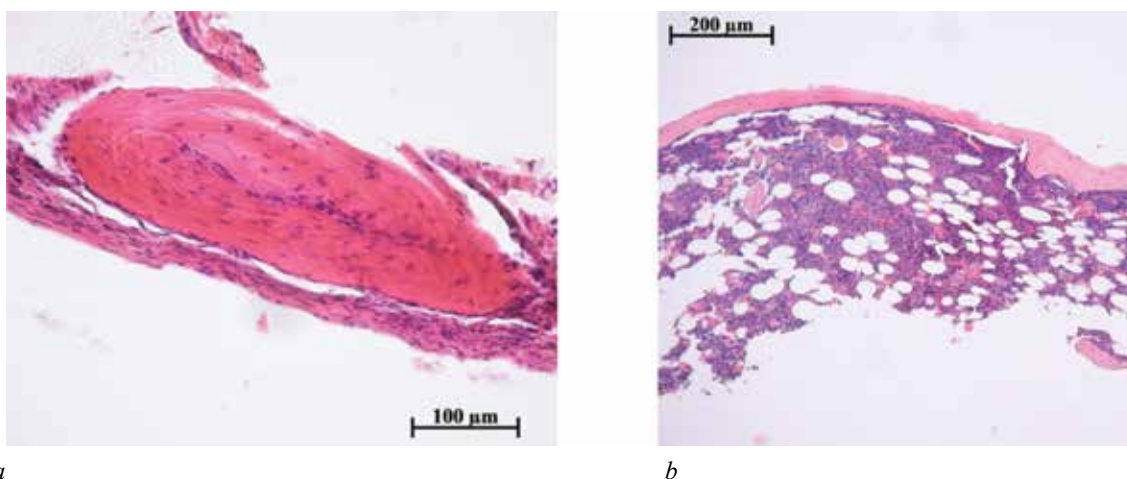


Рис. 6. Примеры позитивных результатов гистологических срезов тканевых пластинок, выросших на ПЛА и ПЛА + 5% ГА образцах после 40-суточной подкожной имплантации: *a* – костная ткань; *b* – костная ткань с костным мозгом. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$ (*a*) и $\times 100$ (*b*)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены биоразлагаемые полимерные композиции на основе ПЛА и ПКЛ, наполненные ГА методом смешения в расплаве, позволяющим ввести в полимерные матрицы до 25–50% ГА. Частицы ГА и их агломераты с диаметром до 100 мкм равномерно распределяются по объему матрицы, повышая степень поляризации поверхности и кристалличность композитов. Как следствие высокой кристалличности, с увеличением степени наполнения снижается механическая прочность композитов. Разработанные биоразлагаемые композиции имеют потенциал практического применения в различных направлениях регенеративной медицины. В приложении к биоинженерии костной ткани, композиты ПЛА, полученные методом 3D-печати, даже с низким (5%)

содержанием ГА на 40% повышают результаты эктопического остеогенеза, что позволяет считать МСК клеточной мишенью их биологической активности.

ЛИТЕРАТУРА

- Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000; 21 (24): 2529–2543. DOI: 10.1016/S0142-9612(00)00121-6.
- Murariu M., Dubois P. PLA composites: from production to properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016; 107: 17–46. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.003.
- Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260: 920–926. DOI: 10.1126/science.8493529.
- Gupta A.P., Kumar V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – polylactide: a critique. *Europ. Polym. J.* 2007; 43 (10): 4053–4074. DOI: 10.1016/J.EURPOLYM.2007.06.045.

5. Jorge P., Domingos M., Gloria A., Ciurana J. BioCell printing: Integrated automated assembly system for tissue engineering constructs. *CIRP Annals – Manufacturing Technology*. 2011; 60 (1): 271–274. DOI: 10.1016/J.CIRP.2011.03.116.
6. Elzubair A., Elias C.N., Suarez J.C.M., Lopes H.P., Vieira M.V.B. The physical characterization of a thermoplastic polymer for endodontic obturation. *J. Dent.* 2006; 34 (10): 784–789. DOI: 10.1016/j.jdent.2006.03.002.
7. Hutmacher D.W., Schantz T., Zein I., Ng K.W., Teoh S.H., Tan K.C. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 55(2): 203–216. DOI: 10.1002/1097-4636(200105)55:2<203::aid-jbm1007>3.0.co;2-7.
8. Rohner D., Hutmacher D.W., Cheng T.K., Oberholzer M., Hammer B. *In vivo* efficacy of bone-marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.* 2003; 66B (2): 574–580. DOI: 10.1002/jbm.b.10037.
9. Tay F.R., Pashley D.H., Williams M.C., Raina R., Loushine R.J., Weller R.N. et al. Susceptibility of a polycaprolactone-based root canal filling material to degradation. I. Alkaline hydrolysis. *J. Endodontics*. 2005; 31 (8): 593–598. DOI: 10.1097/01.don.0000152301.72828.61.
10. Chan-Chan L.H., Solis-Correa R., Vargas-Coronado R.F., Cervantes-Uc J.M., Cauch-Rodríguez J.V., Quintana P., Bartolo-Pérez P. Degradation studies on segmented polyurethanes prepared with HMDI, PCL and different chain extenders. *Acta Biomaterialia*. 2010; 6 (6): 2035–2044. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.12.010.
11. Mitchell C.A., Krishnamoorti R. Dispersion of single-walled carbon nanotubes in poly(ϵ -caprolactone). *Macromolecules*. 2007; 40 (5): 1538–1545. DOI: 10.1021/ma0616054.
12. Raquez J.-M., Habibi Y., Murariu M., Dubois P. Polylactide (PLA)-based nanocomposites. *Prog. Polym. Sci.* 2013; 38 (10–11): 1504–1542. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.014.
13. Ray S.S., Bousmina M. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: in green the 21st century materials word. *Prog. Mater. Sci.* 2005; 50: 962–1079. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2005.05.002.
14. Murariu M., Paint Y., Murariu O., Raquez J.-M., Bonnaud L., Dubois P. Current progress in the production of PLA–ZnO nanocomposites: Beneficial effects of chain extender addition on key properties. *J. Appl. Polym. Sci.* 2015; 132: 42480. DOI: 10.1002/app.42480.
15. Murariu M., Dechief A.L., Bonnaud L., Paint Y., Gallos A., Fontaine G., et al. The production and properties of polylactide composites filled with expanded graphite. *Polym. Degrad. Stab.* 2010; 95: 889–900. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2009.12.019.
16. Li S.H., Liu Q., Wijn J.R., Zhou B.L., Groot K. In vitro calcium phosphate formation on a natural composite material, bamboo. *Biomaterials*. 1997; 18 (5): 389–395. DOI: 10.1016/S0142-9612(96)00122-6.
17. Morvan J., Buyuktanir E., West J.L., Jáklí A. Highly piezoelectric biocompatible and soft composite fibers. *Appl. Phys. Lett.* 2012; 100 (6). DOI: 10.1063/1.3683482.
18. Lebedev S.M., Amitov E.T., Mikutskiy E.A. Biodegradable electrically conductive polycaprolactone-based composites filled with carbon nanotubes. *Russian Phys. J.* 2020; 62 (10): 1753–1762. DOI: 10.1007/s11182-020-01903-0.
19. Лекишвили М.В., Балберкин А.В., Васильев М.Г., Колондаев А.Ф., Баранецкий А.Л., Буклемишев Ю.В. Первый опыт применения в клинике костной патологии биокомпозиционного материала «Остеоматрикс». *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. 2002; 4: 80–83.
20. Иванов С.Ю., Бизяев Н.Ф., Ломакин М.В., Панин А.М. Клинические результаты использования различных костнопластических материалов при синус-лифтинге. *Новое в стоматологии*. 1999; 5: 51–54.
21. Аглуллин И.П., Сафин И.Р. Остеопластика в лечении пациентов с дефектами костной ткани. *Поволжский онкологический вестник*. 2012; 1: 42–44.
22. Gonçalves E.M., Oliveira F.J., Silva R.F., Neto M.A., Fernandes M.H., Amaral M. et al. Three-dimensional printed PCL-hydroxyapatite scaffolds filled with CNTs for bone cell growth stimulation. *J. Biomed. Mater. Res. Part: B*. 2016; 104 (6): 1210–1219. DOI: 10.1002/jbm.b.33432.
23. Akindoyo J.O., Beg M.D.H., Ghazali S., Alam A.K.M.M., Heim H.P., Feldmann M. Synergized poly(lactic acid)-hydroxyapatite composites: Biocompatibility study. *J. Appl. Polym. Sci.* 2019. DOI: 10.1002/app.47400.
24. Akindoyo J.O., Beg M.D.H., Ghazali S., Heim H.P., Feldmann M. Impact modified PLA-hydroxyapatite composites – thermo-mechanical properties. *Comp. Part A: App. Sci. Manufact.* 2018; 107: 326–333. DOI: 10.1016/j.compositesa.2018.01.017.
25. Šupová M. Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009; 20 (6): 1201–1213. DOI: 10.1007/s10856-009-3696-2.
26. Mao D., Li Q., Bai N., Dong H., Li D. Porous stable poly(lactic acid)/ethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffolds prepared by a combined method for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*. 2018; 180: 104–111. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.10.031.
27. Alizadeh-Osgouei M., Li Y., Wen C. A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications. *Bioactive Mater.* 2019; 4 (1): 22–36. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2018.11.003.
28. Russias J., Saiz E., Nalla R.K., Gryn K., Ritchie R.O., and Tomsia A.P. Fabrication and mechanical properties of PLA/HA composites: a study *in vitro* degradation. *Mater. Sci. Eng. C: Biomim. Supramol. Syst.* 2006; 26 (8): 1289–1295. DOI: 10.1016/j.msec.2005.08.004.
29. Ferri J.M., Jorda J., Montanes N., Fenollar O., and Balart R. Manufacturing and characterization of poly(lactic acid) composites with hydroxyapatite. *J. Thermoplast. Comp. Mater.* 2017; 31 (7): 865–881. DOI: 10.1177/0892705717729014.
30. Zhang H., Mao X., Du Z., Jiang W., Han X., Zhao D. et al. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2016; 17 (1). DOI: 10.1080/14686996.2016.1145532.

31. Zhang S.M., Liu J., Zhou W., Cheng L., Guo X.D. Interfacial fabrication and property of hydroxyapatite/poly lactide resorbable bone fixation composites. *Curr. Appl. Phys.* 2005; 5 (5): 516–518. DOI: 10.1016/j.cap.2005.01.023.
32. Shen L., Yang H., Ying J., Qiao F., Peng M. Preparation and mechanical properties of carbon fiber reinforced hydroxyapatite/poly lactide biocomposites. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009; 20 (11): 2259–2265. DOI: 10.1007/s10856-009-3785-2.
33. 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 (4): 505–513. DOI: 10.1007/s00449-010-0499-2.
34. Kim J.Y., Lee T.-J., Cho D.-W., Kim B.-S. Solid free-form fabrication-based PCL/HA scaffolds fabricated with a multi-head deposition system for bone tissue engineering. *J. Biomater. Sci.* 2010; 21 (6–7): 951–962. DOI: 10.1163/156856209X458380.
35. Jiang W., Shi J., Li W., Sun K. Morphology, wettability, and mechanical properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite scaffolds with interconnected pore structures fabricated by a mini-deposition system. *Polym. Eng. Sci.* 2012; 52: 2396–2402. DOI: 10.1002/pen.23193.
36. Chaikina M.V., Uvarov N.F., Ulihin A.S., Khlusov I.A. Mechanochemical synthesis of nanosized functional materials with the apatite-type structure. *Problems of Materials Science.* 2008; 54 (2): 219–232.
37. Дружинина Т.В., Талалаев С.Я., Закиров Н.П., Щаденко С.В., Хабибулин Ш.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С. Клеточные реакции на трехмерные матриксы из полимолочной кислоты и гидроксиапатита, полученные методом 3D-печати. *Бюллетень сибирской медицины.* 2016; 15 (5): 16–29.
38. Scott M.A., Levi B., Askarinam A., Nguyen A., Rackohn T., Ting K., Soo C., James A.W. Brief review of models of ectopic bone formation. *Stem Cells Dev.* 2012; 21 (5): 655–668. DOI: 10.1089/scd.2011.0517.
39. Bolbasov E.N., Popkov A.V., Popkov D.A., Gorbach E.N., Khlusov I.A., Golovkin A.S., Sinev A., Bouznic V.M., Tverdokhlebov S.I., Anissimov Y.G. Osteoinductive composite coatings for flexible intramedullary nails. *Mater. Sci. Eng. C.* 2017; 75: 207–220. DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.073.
40. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 1991; 9 (5): 641–50. DOI: 10.1002/jor.1100090504.
41. Silva C.C., Almeida A.F.L., De Oliveira R.S., Pinheiro A.G., Góes J.C., Sombra A.S.B. Dielectric permittivity and loss of hydroxyapatite screen-printed thick films. *J. Mater. Sci.* 2003; 38: 3713–3720. DOI: 10.1023/A:1025963728858.
42. Jukkala-Partio K., Laitinen O., Vasenius J., Partio E.K., Toivonen T., Tervahartiala P., Kinnunen J., Rokkanen P. Healing of subcapital femoral osteotomies fixed with self-reinforced poly-L lactide screws. An experimental long-term study in sheep. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 2002; 122 (6): 360–364. DOI: 10.1007/s00402-001-0379-y.
43. Bostman O.M., Pihlajamaki H.K. Late foreign-body reaction to an intraosseous bioabsorbable polylactic acid screw. A case report. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 1998; 80 (12): 1791–1794. DOI: 10.2106/00004623-199812000-00010.
44. Zhang R., Ma P. X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 45 (4): 285–293. DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(19990615)45:4<285::aid-jbm2>3.0.co;2-2.
45. Фриденштейн А.Я., Лурья Е.А. Клеточные основы кровяного микроокружения. М.: Медицина, 1980: 216.

Вклад авторов

Лебедев С.М., Хлусов И.А., Щаденко С.В. – концепция и дизайн исследования. Лебедев С.М., Чистохин Д.М., Дзюман А.Н., Хлусов И.А., Щаденко С.В. – проведение исследования. Николаева О.О., Митриченко Д.В., Просолов А.Б. – сбор, перевод и обработка материала. Лебедев С.М., Хлусов И.А. – написание текста.

Сведения об авторах

Лебедев Сергей Михайлович, д-р техн. наук, вед. науч. сотрудник, НИ ТПУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-3367-1244.

Чистохин Дмитрий Михайлович, инженер, НИ ТПУ, г. Томск.

Щаденко Сергей Владимирович, инженер, Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ, г. Томск.

Дзюман Анна Николаевна, канд. мед. наук, доцент, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ, г. Томск. ORCID 0000-0002-0795-0987.

Николаева Ольга Олеговна, начальник производственного участка, НПК «Синтел», г. Томск.

Митриченко Дмитрий Владимирович, директор, НПК «Синтел», г. Томск.

Просолов Александр Борисович, зам. директора по научной работе, НПК «Синтел», г. Томск.

Хлусов Игорь Альбертович, д-р мед. наук, профессор, кафедра морфологии и общей патологии, СибГМУ; Исследовательская школа химических и биомедицинских технологий, НИ ТПУ; науч. сотрудник, НПК «Синтел», г. Томск; гл. науч. сотрудник, БФУ им. И. Канта, г. Калининград. ORCID 0000-0003-3465-8452.

(✉) **Лебедев Сергей Михайлович**, e-mail: lsm70@mail.ru.

Поступила в редакцию 28.02.2020

Подписана в печать 30.04.2020