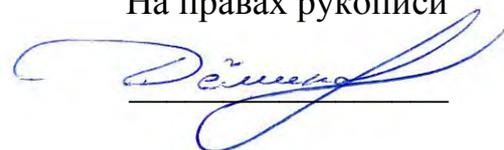


Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

На правах рукописи



Демина Варвара Анатольевна

**ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫХ НАПОЛНИТЕЛЕЙ НА
ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, КИНЕТИКУ
КРИСТАЛЛИЗАЦИИ И РАЗЛОЖЕНИЯ КОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ
ПОЛИЭФИРОВ**

Специальность 01.04.17 – Химическая физика, горение и взрыв, физика
экстремальных состояний вещества

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
д.х.н., проф., член-корр. РАН
Чвалун С.Н.

Москва, 2021 г.

Оглавление

| | |
|--|----|
| Введение..... | 4 |
| 1 Обзор литературы | 9 |
| 1.1 Материалы для инженерии костной ткани..... | 9 |
| 1.1.1 Биокерамика | 12 |
| 1.1.2 Полимеры..... | 15 |
| 1.1.3 Композиционные полимерные материалы..... | 20 |
| 1.2 Исследование кинетики кристаллизации | 33 |
| 1.2.1 Кристаллизация полимеров | 33 |
| 1.2.2 Кристаллическая структура полилактида | 37 |
| 1.2.3 Исследование процесса кристаллизации полилактида..... | 39 |
| 1.3. Деградация полимерных материалов..... | 48 |
| 2 Экспериментальная часть..... | 62 |
| 2.1 Объекты и материалы | 62 |
| 2.2. Методы исследования..... | 62 |
| 3 Разработка метода получения композиционного материала оптимального состава с высокими механическими свойствами..... | 70 |
| 3.1 Влияние условий смешения на степень диспергирования наполнителя | 70 |
| 3.2 Исследование кинетики кристаллизации композиционных материалов | 74 |
| 3.2.1 Время полукристаллизации | 75 |
| 3.2.2 Константа Аврами и экспонента Аврами..... | 79 |
| 3.3. Физико-механические характеристики полученных композитов..... | 82 |
| 3.4 Увеличение совместимости наполнителя и полимерной матрицы | 87 |

| | |
|--|-----|
| 4 Кинетика деградации полимерных материалов..... | 99 |
| 4.1 Визуализация процессов деградации <i>in vitro</i> | 99 |
| 4.2 Кинетические модели деградации..... | 111 |
| 5 Исследования <i>in vivo</i> биосовместимости и биоактивности | 117 |
| Выводы..... | 135 |
| Список использованных источников | 137 |

Введение

Материалы на основе биоразлагаемых полимеров более 50 лет применяются в медицине в качестве шовных материалов, изделий для ортопедии и травматологии, раневых покрытий и т.д. Они выполняют свою функцию в организме в течение определенного времени, а затем разлагаются на нетоксичные низкомолекулярные продукты, которые выводятся из организма естественным путем. Использование биоразлагаемых крепежных изделий в травматологии и ортопедии позволяет зафиксировать отломки кости в правильном положении, не допустить их смещения во время роста новой костной ткани, а после остеосинтеза изделия деградируют до простых метаболитов, не требуя повторного хирургического вмешательства для их извлечения.

Одним из наиболее популярных биоразлагаемых полимеров является полилактид – синтетический полиэфир, который способен гидролитически разлагаться с образованием естественного метаболита – молочной кислоты. Полилактид не вызывает отрицательных иммунных реакций, меняя молекулярную массу и состав полимера, его надмолекулярную организацию, можно варьировать сроки разложения. Существенным недостатком крепежных изделий из ПЛА является недостаточный уровень механических свойств, что существенно ограничивает их область применения переломами костей, не несущих больших механических нагрузок. Также существует вероятность возникновения воспалительных процессов из-за накопления кислых продуктов его деградации. Данные проблемы могут быть решены путем создания полимерных композиционных материалов с фосфатами кальция, являющимися основным минеральным компонентом кости. В зависимости от вида крепежного изделия материал должен обладать определенными физико-механическими характеристиками и сроками биоразложения, управлять которыми можно различными факторами, такими как форма, дисперсность, ориентация наполнителя, молекулярная масса полимерной матрицы, прочность границы

раздела наполнитель/матрица и т.д. Несмотря на заметные успехи в этой области, разработка новых эффективных подходов получения композитов на основе полилактида и кальцийфосфатных наполнителей с регулируемыми механическими характеристиками, скоростью биоразложения остается актуальной задачей и по сей день.

Цель работы

Основной целью представленной работы является разработка методов получения композиционных материалов на основе полилактида, его сополимеров и кальцийфосфатных наполнителей и установление связи между способом их получения, составом и теплофизическими и физико-механическими характеристиками, а также особенностями деградации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- Разработать методики получения композиционных материалов на основе полилактида, его сополимеров и кальцийфосфатных наполнителей;
- Исследовать влияние условий получения, состава композита на его надмолекулярную организацию, физико-механические характеристики и кинетику разложения полученных материалов;
- Провести *in vitro* и *in vivo* исследования биосовместимости и деградации разработанных материалов.

Научная новизна

- Разработана методика получения композиционных материалов на основе полилактида, его сополимеров и кальцийфосфатных наполнителей с равномерным распределением наполнителя на субмикронном уровне и высокими физико-механическими характеристиками композита.
- Разработаны новые подходы к модификации наполнителя для улучшения его совместимости с полимерной матрицей.

– Комплексный анализ влияния наполнителя на физико-механические характеристики композита позволил разделить вклады самого наполнителя и кристаллизующейся матрицы на конечные свойства материала.

– Показано влияние кальций фосфатов на кинетику кристаллизации полилактида.

– Впервые методом акустической микроскопии продемонстрировано симбатное изменение упругих свойств полиэфирной матрицы, ее микроструктуры, кристалличности, а также уменьшение молекулярной массы полимеров при деградации *in vitro*.

– Впервые проведен анализ биосовместимости и остеоинтеграции композиционных материалов, отличающихся составом полимерной матрицы, видом наполнителя и степенью наполнения при *in vivo* испытаниях в рамках одного эксперимента на крупных животных. Продемонстрирована возможность использования полученных материалов для изготовления различных крепежных изделий для травматологии.

Практическая значимость

Разработанные композиционные материалы были использованы для производства опытной партии крепежных изделий интерферентных винтов и пинов, обладающих улучшенными характеристиками по сравнению с коммерчески производимыми аналогами. Испытания данных изделий *in vitro* и *in vivo* показали, что композиционные материалы не вызывают отрицательной реакции окружающих тканей. Продемонстрирована перспективность использования полученных материалов для изготовления различных крепежных изделий для травматологии.

Достоверность результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается как использованием комплекса современных физических и физико-химических методов исследования,

так и применением современных методик анализа и обработки результатов измерений.

Положения, выносимые на защиту

1. Многостадийная методика получения композиционных материалов, обеспечивающая высокую дисперсию наполнителя и механическую прочность.
2. Влияние наполнителя на механические свойства и на надмолекулярную структуру композитов, а также на кинетику кристаллизации полилактида
3. Новый способ модификации гидроксиапатита раствором молочной кислоты
4. Особенности изменения молекулярных характеристик полиэфиров, их структуры и упругих свойств при деградации *in vitro*.
5. Биосовместимость полученных материалов на основе полиэфиров и кальцийфосфатных наполнителей в условиях *in vivo*.

Личный вклад автора

Научные результаты, обобщённые в научно-квалификационной работе Деминой В.А., получены ей самостоятельно либо при ее активном участии на базе лаборатории полимерных материалов Отдела нанобиоматериалов и структур Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт». Автором самостоятельно проведен сбор и анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой теме. В ходе изложенных в работе исследований автор участвовал в постановке задач исследований и выборе методов их решения; планировании и проведении экспериментов по разработке методики создания полимерных композиционных материалов, структурным, теплофизическим и механическим исследованиям материалов, а также по изучению деградации композитов. Демина В.А. приняла непосредственное участие в анализе, обработке, интерпретации полученных результатов и подготовке статей к публикации.

Апробация работы

Основные результаты научно-квалификационной работы были представлены на следующих конференциях: VI и VII Бакеевской Всероссийской с международным участием школе-конференции для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты», (г. Москва, 2016 г. и 2018 г.), Первом Российском кристаллографическом конгрессе (г. Москва, 2016 г.), 59ой научной конференции МФТИ (г. Москва, 2016 г.), XIV Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школе (г. Москва, 2016 г.), VII Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2017» (г. Москва, 2017г.)

Международном Симпозиуме «Современная химическая физика» (г. Туапсе, 2017 г., 2018 г. и 2019 г.), 83 Prague meeting on macromolecules “Polymers in medicine 2019” (г. Прага, 2019 г.).

Публикации

Основное содержание исследования представлено в 1 патенте и 5 статьях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, и в реферируемые базы данных Scopus и Web of Science.

Структура и объем работы

Диссертационная работа изложена на 149 страницах и содержит 57 рисунков, 16 таблиц и 173 источника литературы. Структура изложения включает введение, обзор литературы (глава 1), экспериментальную часть (глава 2), обсуждение результатов (главы 3,4 и 5), выводы и список использованных источников.

1 Обзор литературы

1.1 Материалы для инженерии костной ткани

Применение имплантатов является эффективным и наиболее распространенным инструментом для лечения повреждений костной ткани, вызванных травмой, мышечно-скелетными расстройствами, различными патологиями или хирургическим вмешательством. Для скрепления отломков костей при лечении переломов в основном используют фиксаторы на основе металлов (стали и сплавов титана), для восстановления костных дефектов – скаффолды из различных материалов синтетического и природного происхождения. Однако используемые материалы не лишены ряда серьезных недостатков. Основной недостаток металлических имплантатов – повторное хирургическое вмешательство для их удаления, которое необходимо для предотвращения долгосрочных осложнений, таких как боль, местное раздражение и деградация кости, вызванная эффектом «stress-shielding» [1]. Это явление заключается в адаптивном ремоделировании костной ткани, возникающем из-за разницы модулей упругости металла и нативной костной ткани, вследствие чего кость перестает нести механическую нагрузку и ее плотность уменьшается согласно закону Вольфа. Помимо этого, наличие металлического имплантата приводит к проблеме визуализации мягких тканей с помощью магнитно-резонансной томографии.

Возможное решение данной проблемы заключается в использовании биологических имплантатов, которыми являются алло- и аутографты. Аллографты – это термически обработанная ткань донора, а аутографты – ткань самого пациента. Применение первых несет риск инфицирования и возникновения иммунного ответа. Кроме того, число доноров очень ограничено. При использовании аутографтов возникает необходимость дополнительных хирургических вмешательств для извлечения здоровой кости, что невозможно в

случае обширных дефектов. Таким образом, существует острая необходимость создания синтетических имплантатов, которые должны обладать комплексом следующих свойств:

- биосовместимостью с тканью, т.е. не вызывать отторжения и воспаления как инородное тело [2,3];

- биоактивностью, т.е. проявлять остеокондуктивность (способность к адгезии и связыванию остеогенных клеток, поддержанию процессов пролиферации и дифференцировки клеток из окружающей живой ткани, с образованием непосредственной связи с костной тканью или быть постепенно замещаемым новообразующейся тканью) и остеоиндуктивность (способность индуцировать дифференцировку клеток в остеообразующие – хондроциты, остеобласты – из не костных тканей на его поверхности) [4];

- обладать механическими свойствами, соответствующими костной ткани, и сохранять их в течение определенного времени, иметь скорость деградации соответствующую скорости регенерации дефектной ткани [5];

- продукты деградации должны быть нетоксичными и не вызывать отрицательных иммунных реакций [6].

При разработке материалов для тканевой инженерии необходимо опираться в первую очередь на строение кости и ее химический состав. Основные компоненты кости – это фосфаты кальция (65 мас. %), коллаген (25 мас. %) и вода (10 мас. %). Кроме указанных веществ, присутствуют другие органические соединения и ионы в малых количествах. По структуре кость представляет собой природный композит [7].

Специфическое композиционное строение определяет высокую несущую способность костной ткани. Органическим компонентом кости является коллаген. Это спиральные полипептидные нити, стабилизированные водородными связями. Коллаген представлен в костной ткани волокнами длиной от 100 до 2000 нм [8]. Неорганический компонент кости составляют кристаллические и/или аморфные

фосфаты кальция, в частности гидроксиапатит с анионными и катионными замещениями [9]. Относительное соотношение кристаллической и аморфной фаз является переменной величиной. Размеры кристаллов биоапатита в кортикальной кости человека таковы: длина $\leq 200 \text{ \AA}$, ширина от 30 до 150 \AA , толщина до 16 \AA [10]. Состав минеральной составляющей постоянно изменяется, то есть в костных тканях организма человека непрерывно протекают процессы ремоделирования – удаления старой кости (резорбции), вслед за которой происходит формирование новой ткани [8].

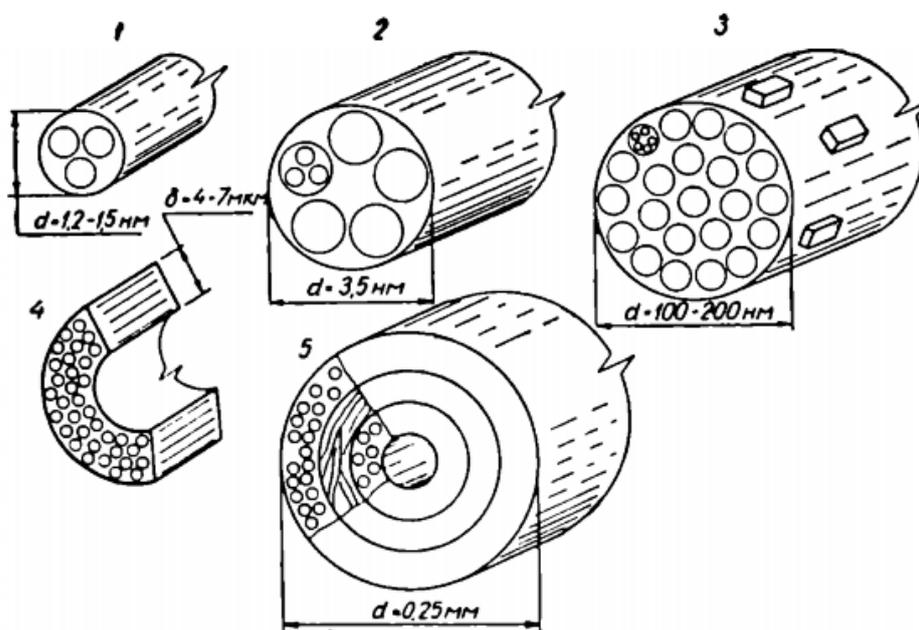


Рисунок 1.1 – Уровни организации костной ткани [11]

Компактную костную ткань следует рассматривать как материал с пятью структурными уровнями (рисунок 1.1) [11]. Первый структурный уровень состоит из макромолекул коллагена и неорганических кристаллов. Второй – составлен коллагеновыми микрофибриллами из пяти спирально расположенных коллагеновых молекул и неорганическими кристаллами гидроксиапатита. Диаметр микрофибрилл — 3,5 нм. Третий уровень составляют волокна, образованные микрофибриллами и связанными с ними стереохимическими связями кристаллами, при этом последние ориентированы вдоль продольной оси и расположены как внутри, так и снаружи микрофибрилл [11]. Четвертый

структурный уровень – это ламели толщиной от 4 до 12 мкм, состоящие из коллагеново-минеральных волокон. Структурная единица кости – остеон, включающий в себя систему костных трубок – пятый уровень костной ткани. Остеон состоит из концентрически расположенных ламелей, количество которых в остеооне меняется от 5 до 20, и образуются они вокруг кровеносных сосудов. Ламели соединяются между собой при помощи связующего вещества. Средний диаметр остеонов 150 мкм. Последние два уровня это уже самостоятельные конструкционные элементы кости, поэтому при рассмотрении плотной костной ткани как сплошной среды принимается третий структурный уровень как основной.

Таким образом, композитная многоступенчатая структура костной ткани обеспечивает ее высокую несущую способность. Медицинское изделие, предназначенное для имплантации в кость, должно соответствовать физико-механическим характеристикам натуральной костной ткани.

Для изготовления биоразлагаемых имплантатов были предложены различные материалы: фосфаты кальция, сплавы магния, биостекла, различные полимеры и их композиты [12–14]. Ниже рассмотрены некоторые из них.

1.1.1 Биокерамика

Биокерамику, используемую для инженерии костной ткани, можно разделить на биоинертную (оксид алюминия, диоксид циркония), саморассасывающуюся (трикальцийфосфат) или биологически активные (гидроксиапатит, биоактивные стекла и стеклокерамики) [15,16]. Из-за высокой прочности оксид алюминия и диоксид циркония используют для тазобедренных имплантатов [16]. Биологически активное стекло используют в качестве заменителей кости или покрытий, способствующих адгезии клеток. На особом месте стоит керамика на основе фосфатов кальция, которая является аналогом минеральному компоненту кости.

Ортофосфаты кальция применяются в восстановительной медицине более 50 лет. Однако улучшение их физико-механических и биохимических свойств до сих пор является актуальным. Условно ортофосфаты кальция делят на низко- и высокотемпературные. К первым относят синтезированные при относительно низкой температуре и не подверженные термообработке, например, аморфный кальцийфосфат, монокальциевый фосфат моногидрат. Ко вторым – кристаллические ортофосфаты кальция, прошедшие термическую обработку [17], такие как α - и β -трикальцийфосфат, гидроксиапатит (ГА), тетракальцийфосфат.

Резорбируемость ортофосфатов кальция зависит от их растворимости в водных средах. В физиологических условиях ($\text{pH} = 7$) растворимость ортофосфатов повышается в следующем ряду: гидроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 < \beta$ -трикальций фосфат $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 < \text{дикальцийфосфат ангидрат } \text{CaHPO}_4 < \text{дикальцийфосфат дигидрат } \text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} < \text{тетракальцийфосфат } \text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9 < \alpha$ -трикальцийфосфат $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 < \text{монокальцийфосфат моногидрат } \text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. При взаимодействии со средой, могут происходить фазовые превращения, что сказывается на резорбируемости материала [8]. Различные методы синтеза позволяют получать частицы с различной морфологией, стехиометрическим составом и степенью кристалличности [18].

Для костной инженерии перспективным материалом является гидроксиапатит (ГА). Существует три основных метода получения гидроксиапатита: осаждение из растворов («мокрый» метод), твердофазный синтез («сухой» метод) и гидротермальный синтез. Наиболее популярным является получение из водных растворов. Используя различные методы синтеза, можно получать порошок с различной морфологией, стехиометрическим составом и степенью кристалличности [18]. Кристаллическая структура ГА принадлежит к пространственной группе $\text{P6}_3/\text{m}$ в гексагональной системе с параметрами решетки $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ и $c = 6,881 \text{ \AA}$ (Рисунок 1.2). Структура поверхности существенно влияет на такие явления, как адсорбция, растворение,

ионный обмен [19]. Узлы OH^- располагаются на винтовых осях b_3 (гексагональная ось c) [20]. Структура гидроксиапатита сохраняется в достаточно широкой области нестехиометрических составов; ионы OH^- остаются стабильными в структуре ГА даже при высоких температурах, это делает возможным обжиг и спекание.

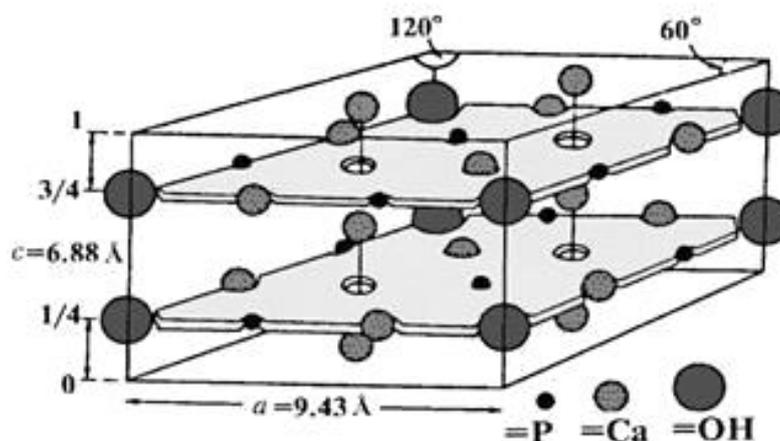


Рисунок 1.2 – Элементарная ячейка гидроксиапатита [21]

Введением различных анионных и катионных замещений, можно контролировать биологическое поведение гидроксиапатита. Присутствие марганца в кристаллической структуре ГА влияет на адгезию костных клеток [22]. Ионы цинка необходимы для синтеза коллагена и дифференцировки клеток, обладают антибактериальным эффектом, а серебро является иммуномодулирующим веществом [23]. Биологическая активность цинк-замещенного гидроксиапатита в 2 раза выше по сравнению с серебро-замещенным [24]. Введение карбонат-иона ускоряет биорезорбцию, но карбонат-замещенный ГА термически нестабилен, что ограничивает его область применения [25]. Благодаря повышению механических свойств, а также способности адсорбировать белки, необходимые для жизнедеятельности клеток, представляет интерес переход от микро- к наноструктурированной ГА-керамике [26].

Повысить резорбируемость гидроксиапатитовой керамики можно путем создания композита с более растворимым трикальций фосфатом (ТКФ). Это возможно сделать двумя способами: термическим разложением кальцийдефицитного апатита или методом шихты [27]. Изменением соотношения фаз ГА/ТКФ регулируется скорость деградации материала. Помимо этого, происходит минерализация по мере растворения трикальций фосфата [28]. Однако, из-за формирования новой фазы и испарения воды возможно уплотнение композита при разложении, следовательно, уменьшение прочности. Также при уплотнении композита увеличивается модуль упругости. При большой разности модулей упругости имплантата и натуральной кости имплантат подвергается большей нагрузке, вследствие чего кость растет неправильно.

Механические характеристики ГА-керамики сильно зависят от ее морфологии, например пористости и плотности. Пределы прочности при испытаниях на изгиб и сжатие для плотной керамики лежат в диапазонах 38-250 МПа и 120-150 МПа, соответственно [29]. Разброс значений связан с наличием примесей, остаточной микропористости, размером зерен керамики и т.д. Прочность увеличивается при увеличении соотношения Са/Р и достигает максимального значения при $\text{Са/Р} = 1,67$. Механические свойства пористой керамики сильно зависят от формы и концентрации пор. Прочность на сжатие варьируется в пределах от 2 до 100 МПа, а предел прочности на изгиб от 2 до 11 МПа [8].

Несмотря на обилие способов модификации керамики, не удалось достичь гибкости, эластичности и механической прочности, присущей костной ткани. Из-за хрупкости ортофосфаты кальция используются ограниченно – при лечении костей, не несущих большой физической нагрузки. Другим недостатком керамики является низкая резорбируемость.

1.1.2 Полимеры

Перспективными материалами для создания костных имплантатов являются синтетические и природные полимеры, характеризующиеся пластичностью, способностью к разложению и биосовместимостью. Наиболее распространенные биоразлагаемые полимеры, применяемые в травматологии и ортопедии, – полигликолид, полимолочная кислота, полилактид-со-гликолид, коллаген и хитозан [2,30–32]. Особое место среди материалов для биоматриц занимает коллаген. Этот фибриллярный белок – один из основных компонентов соединительной, костной и хрящевой тканей [33]. Недостатком коллагена является нерегулируемое время биodeградации и ограниченный период функционирования в условиях живого организма (не более месяца). Кроме того, поскольку коллаген является продуктом животного происхождения, то существует опасность инфицирования, а свойства материала во многом зависят от источника и могут быть непостоянными. Крайне ограничен и выбор методов, используемых для формования массивных изделий, поэтому из коллагена получают в основном различные пористые губки.

Синтетические же полимеры характеризуются воспроизводимой и контролируемой молекулярной структурой, которая не является иммуногенной [34]. Так полиметилметакрилат используют в качестве костного цемента при замене суставов – паста является связующим между металлическим протезом и трубчатой костью. Однако в процессе выделяется тепло, что может привести к некрозу окружающих тканей [35]. Полиуретаны, благодаря своей гемосовместимости, используют для изготовления имплантатов, контактирующих с кровью, а также для заполнения костных дефектов [36].

Широко распространенными синтетическими биоразлагаемыми полимерами являются поли(α -гидроксикислоты), такие как полилактид, полигликолид, и поли- ϵ -капролактон, а также их сополимеры [35,37]. Они одобрены FDA для использования в медицине. Некоторые характеристики используемых материалов приведены в таблице 1.1. Существуют два основных способа получения полиэфиров: поликонденсация и полимеризация с раскрытием

цикла. [38]. При прямой поликонденсации мономеров получают полиэфиры с низкой молекулярной массой, в то время как полимеризация с раскрытием цикла позволяет получить полимеры с высокими молекулярными массами и низкой полидисперсностью. Последний способ синтеза является контролируемым и предпочтительным для получения полиэфиров биомедицинского назначения. Следует отметить, что полимеризация циклических сложных эфиров очень чувствительна к присутствию воды, содержание которой в реакции необходимо строго контролировать, иначе характеристики полимера могут меняться от партии к партии.

Таблица 1.1 – Свойства материалов, используемых в тканевой инженерии [5,39–41]

| Материал | Модуль Юнга, ГПа | Прочность, МПа | Время деградации, мес. |
|---------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Кость кортикальная | 7-40 | 90-120 | - |
| Титановый сплав | 110-127 | 900 | - |
| Нержавеющая сталь | 180-205 | 500-1000 | - |
| Магний | 41-45 | 65-100 | < 12 |
| Гидроксиапатит | 80-110 | 500-1000 | > 24 |
| Поли(L-лактид) | 4,8 | 28 - 230 | 24 - 68 |
| Поли(D,L-лактид) | 1,9 | 29 - 150 | 12 - 16 |
| Полигликолид | 7 | 350 - 920 | 6 - 12 |
| Поли(ε-капролактон) | 0,4 | 23 | >24 |

| | | | |
|----------------------------------|---|---------|-------|
| Поли(L-лактид-со-гликолид) 85/15 | 2 | 41 - 55 | 5 - 6 |
| Поли(L-лактид-со-гликолид) 50/50 | 2 | 41 - 55 | 1 - 2 |
| Поли(D,L-лактид-со-гликолид) | 2 | 40-55 | 1-12 |

Благодаря высоким физико-механическим свойствам полигликолид используется для изготовления биоразлагаемых хирургических нитей. Недостатками данного полимера являются сложность переработки и высокая степень кристалличности, приводящая к хрупкости, поэтому чаще используют его сополимеры [35,42].

Особое место среди биоразлагаемых полимеров занимает полилактид – оптически активный полимер, стереохимическая структура которого может быть легко модифицирована за счет контролируемого изменения соотношения L- и D-изомеров (рисунок 1.3), с получением аморфного или высоко кристаллического полимера [43]. Впервые полилактид был получен в 1932 году американским химиком W. Carothers [44], а его использование в медицине начато уже в 1966 году [45]. Полилактид нетоксичен и в условиях организма разлагается до молочной кислоты путем гидролиза сложноэфирных связей. Затем молочная кислота выводится через цикл Кребса с образованием воды и углекислого газа. Скорость деградации зависит от размера и формы изделия, соотношения L- и D-стереоизомеров, молекулярной массы, надмолекулярной структуры, содержания низкомолекулярных примесей, а также внешних условий (рН, температура, ферменты). Полилактид является термопластом, отличающимся хорошей прочностью и высоким модулем упругости. Термодеструкция его происходит при температурах выше 200°C [46]. Получение полилактида возможно из возобновляемых растительных ресурсов, что является его большим достоинством [38]. Все это делает данный полимер столь популярным при

создании широкого спектра биомедицинских изделий, в том числе крепежных имплантатов и скаффолдов, используемых в ортопедии.

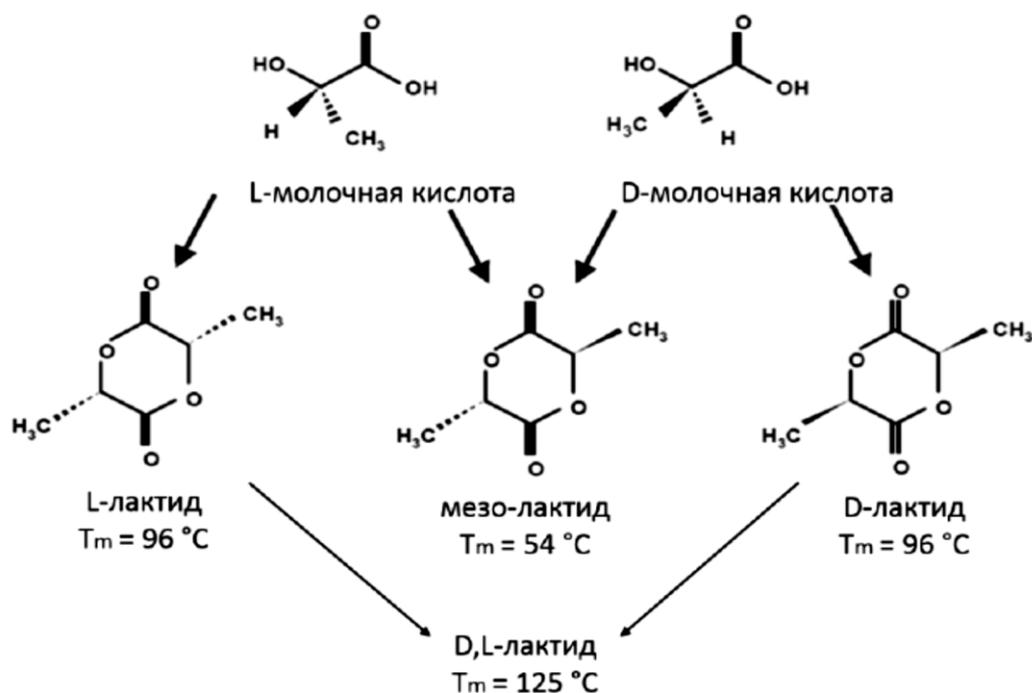


Рисунок 1.3 – Стереизомеры молочной кислоты и лактида [47]

Сополимеризация позволяет получить новый комплекс физико-механических и химических свойств, которым гомополимеры по отдельности не обладают. Сополимеры лактида и гликолида - биосовместимые и биоразлагаемые полимеры, нетоксичные, их физико-химические свойства преимущественно зависят от состава и молекулярной массы полимера (таблица 1.1). В отличие от высококристаллических гомополимеров лактида и гликолида, сополимеры содержащие более 30% гликолидных звеньев полностью аморфны, температура стеклования варьируется в пределах от 40 до 60°C, скорость деградации максимальна при соотношении звеньев лактид/гликолид 50:50. Изменяя соотношение полимерных звеньев, можно регулировать скорость разложения сополимера [48,49].

Недостатком полимерных крепежных изделий является недостаточно высокий (по сравнению с костью) модуль упругости, что существенно ограничивает их область применения переломами костей, несущими небольшие

механические нагрузки [50]. Данная проблема может быть решена путем создания полимерных композиционных материалов, содержащих функциональные наполнители.

1.1.3 Композиционные полимерные материалы

Главное препятствие в развитии тканевой инженерии состоит в том, что большинство материалов не обладают необходимым набором свойств, а именно достаточной механической прочностью, биоактивностью и способностью к биоразложению одновременно. Как правило, прочные материалы биоинертны, в то время как биологически активные и биоразлагаемые материалы обладают неоптимальными физико-механическими характеристиками [51,52]. Решением данной проблемы является создание полимерных композиционных материалов, сочетающих в себе биоразлагаемую полимерную матрицу и биоактивный функциональный наполнитель.

Известно, что даже небольшое количество частиц, хорошо диспергированных в полимерной матрице, может кардинально изменить физические свойства полученного композита [53,54]. Такие материалы могут сочетать в себе достоинства обоих компонентов [55]. Например, биоактивная керамика может усилить прочность полимерного каркаса и обеспечить улучшенные биологические свойства [52]. Кроме того, различные комбинации наполнителей и полимерных матриц могут быть использованы для создания материалов с ранее недостижимыми свойствами (Таблица 1.2).

Таблица 1.2 –Композиты, используемые для костной регенерации

| Материал | Метод получения | Примечания |
|-----------------------|------------------------|---|
| Коллаген I Нано-ГА | Электропрядение | Объединенная структура пор. Глутаральдегидом сшитый коллаген [56] |
| Поли(L-лактид) | Разделение фаз | Высокий модуль сжатия [57] |

| | | |
|---|----------------------|--|
| Нано-ГА | | |
| Коллаген Нано-ГА | Электропрядение | Увеличение минерализации <i>in vitro</i> и активности фосфата кальция [58] |
| Полиуретан Углеродные нанотрубки | Разделение фаз | Анизотропная пористая структура и наноразмерная текстура поверхности [59] |
| Полипропилен фумарат Одностенные углеродные трубки | Растворитель-полимер | Улучшенная механическая прочность благодаря нанонаполнителю [60] |
| Полипропилен фумарат Одностенные углеродные трубки | Выщелачивание | 100% взаимосвязанность, адгезия и пролиферация мезенхимальных стволовых клеток [61]. Стимулирование роста кости и выработки коллагена [62] |
| Поликапролактон Силикат кальция | Смешение растворов | CaSiO ₃ усиливает образование апатита <i>in vitro</i> [63] |
| Коллаген Кремнезем/силикат кальция | Золь-гель | Кремнезем улучшил свойства на сжатие и увеличил биоактивность [64,65] |
| Хитин Кремнезем | Биоминерализация | Хитин являлся матрицей для биоинтерализации [66] |
| Шелк паука Кремнезем | Окварцевание | Контролируемая структура и морфология каркаса [67] |
| PLLA Монтмориллонит | Смешение растворов | Монтмориллонит укрепил сеть и изменил скорость деградации [68] |
| Желатин-хитозан Монтмориллонит | Смешение растворов | Изменение скорости разложения, повышение адгезии клеток и пролиферации [69] |

| | | |
|------------------------|--------------------|--|
| PLA Монтмориллонит | Выщелачивание | Монтмориллонит улучшил свойства на сжатие [70] |
| PLLA Монтмориллонит | Смешение растворов | Монтмориллонит подавляет кристаллизацию полимера и улучшает механические свойства [71] |

Биоразлагаемые полимеры и биокерамика, обладающие способностью деградировать в естественных условиях, являются перспективными кандидатами для создания композитных каркасов, которые деградируют по мере формирования новой костной ткани. Наполнитель придает композиту жесткость и биологическую активность, которая не свойственна полимерам. Кроме того, буферный эффект, создаваемый наполнителем, помогает предотвратить образование неблагоприятной кислой среды и воспалений, возникающих вследствие накопления продуктов деградации полимера [72].

Плотность и некоторые другие характеристики композиционного материала описываются простым законом смесей:

$$X_c = X_m \varphi_m + X_f \varphi_f ,$$

где X – характеристика композита, φ – объемная доля компонента, а индексы c , m и f относятся к композиту, матрице и наполнителю соответственно.

Однако большинство свойств композита не подчиняются аддитивному закону из-за синергетического характера взаимодействия компонентов. Характеристики зависят от большого количества параметров, таких как форма, размер, характер распределения наполнителя, молекулярная масса матрицы, межфазное взаимодействие между наполнителем и матрицей и др. Из-за разницы в модулях упругости матрицы и наполнителя при деформации композита возникают перенапряжения на границе фаз. Чем больше размер частиц наполнителя, тем более высокое напряжение возникает в полимерной матрице около этих частиц, вследствие чего трещины возникают уже при небольших

нагрузках. В отличие от микроразмерных наполнителей диспергированные на наноразмерном уровне частицы имеют более высокую площадь поверхности и лучшее взаимодействие с полимерной матрицей, что приводит к увеличению механической прочности и жесткости композитов [73,74]. Таким образом, для упрочнения материала целесообразно использовать высокодисперсный наполнитель. Но необходимо учитывать, что при уменьшении размера частиц возрастает их склонность к агрегации. Ключевую роль играет морфология частиц. Малый диаметр и высокое характеристическое соотношение положительно отражаются на прочности композита [75].

Метод создания композиционного материала во многом определяет свойства будущего материала. Наиболее распространенными методами получения полимерных композиционных материалов являются смешение раствора полимера с наполнителем, смешение в расплаве и *in situ* полимеризация в присутствии наполнителя. При использовании первого метода зачастую сложно добиться хорошего диспергирования наполнителя. Для уменьшения размера агрегатов эффективно применение шаровых и бисерных мельниц, а также ультразвуковых диспергаторов. Недостатком растворного метода является необходимость удаления растворителя, что делает процесс получения композита длительным и дорогим. Поэтому данный способ используют только в случаях, когда растворитель необходим для придания определенных свойств композиту.

В работе [76] Heimbach В. с соавторами описывают многоступенчатый процесс изготовления композитов с прочностью на изгиб 187 МПа и модулем 9,2 ГПа. Сначала поверхность гидроксиапатита модифицировали четвертичной аммониевой солью, которая почти не токсична. Далее полилактидное волокно дважды покрывали суспензией гидроксиапатита в растворе поликапролактона в метилэтилкетоне и методом пултрузии получали пластины.

Популярным способом создания композиционного материала является полимеризация в присутствии наполнителя, так называемый метод *in situ*

полимеризации [77,78]. Например, данным способом получают синтетическую зубную эмаль, где в качестве наполнителя используют гидроксиапатит [79]. Основное преимущество данного метода состоит в обеспечении высокой степени гомогенности композита благодаря низкой вязкости мономера, однако существует высокая вероятность агрегации частиц. В работе [80] была проведена полимеризация лактонов в присутствии катализатора и гидроксиапатита ($\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5 = 1.32$), гидроксильные группы которого выступали в роли инициаторов. Гидроксиапатит демонстрировал низкую эффективность в качестве инициатора. При увеличении концентрации наполнения, степень полимеризации уменьшается более, чем в 2 раза. Для материалов биомедицинского назначения существуют строгие требования к содержанию остаточного катализатора, поэтому существенным недостатком метода *in situ* является необходимость его удаления после синтеза. Также ограничено содержание наполнителя в полученном композите, поскольку его ОН-группы в высокой концентрации препятствуют полимеризации лактида. В работе [81] смесь D,L-лактид и наногидроксиапатита плавил при 140 °С, затем добавляли катализатор (октоат олова) и проводили полимеризацию в течение 30 ч. Реакция не протекала уже при наполнении 4%.

Одним из перспективных способов, позволяющих создавать композиционные материалы даже из термодинамически несовместимых компонентов, является введение наполнителей в пористый материал, полученный деформированием по механизму крейзинга [82]. Наноструктурированный фибриллярно-пористый материал создается путем деформирования аморфных или частично кристаллических полимеров в жидкой адсорбционно активной среде. Первый метод введения наполнителя предполагает импрегнирование растворенного в среде вещества в образованные поры, происходящее непосредственно в процессе крейзинга. Второй метод заключается в синтезе наполнителя в порах полимера, предварительно деформированного по механизму крейзинга. Этот подход был успешно применен для создания нанокомпозитов на основе поли(L-лактида) и фосфатов кальция [83,84]. Пористые матрицы с

объемной пористостью 45 % получали на основе пленок полилактида, деформированных в смесях воды и этанола (содержание этанола до 75 вес.%). Исследование структуры полученных материалов методом рентгеновского рассеяния в малых углах показало, что на кривых рассеяния деформированных на 25-200% полимеров имеется максимум за счет регулярного расположения фибрилл в крейзах. Рассчитанное из положения максимума расстояние между центрами фибрилл составляет ~40 нм. Далее для синтеза различных форм фосфатов кальция в порах деформированной полилактидной пленки использовали реакцию обмена между водными растворами нитрата кальция и гидрофосфата аммония, применяя метод противоточной диффузии. С помощью рентгеновского анализа было показано, что основными продуктами реакции являются дигидрат гидрофосфата кальция и аморфизованный фосфат кальция - предшественник гидроксиапатита. Рассчитанный размер кристаллитов дигидрата гидрофосфата кальция в пленке полилактида составил ~30 нм, а содержание обеих форм фосфатов кальция – 30 вес.%. На микрофотографиях наблюдали достаточно плотное заполнение пористой структуры крейзов, формирование взаимопроникающей структуры наночастиц наполнителя и фибрилл крейзов. Проведенные в работе [85] биологические испытания композитов на основе поли(L-лактида), содержащего 11 вес.% дигидрата гидрофосфата кальция, показали низкую цитотоксичность и высокую биологическую активность материала по отношению к процессам пролиферации и дифференциации остеобластов. Таким образом, метод крейзинга является эффективным для получения биоразлагаемых полимерных нанокомпозитов, содержащих функциональные наполнители различной природы, в том числе с плохой термодинамической совместимостью с матрицей. Это преимущество является особенно актуальным при создании композитов на основе гидрофобного полилактида и гидрофильных фосфатов кальция. Морфологию композита и размер частиц наполнителя можно контролировать путем регулирования фибриллярно-пористой структуры полимерного материала.

Самым распространенным методом получения полимерных композиционных материалов на данный момент является смешение в расплаве – компаундирование. Наиболее универсальными приборами являются двухшнековые экструдеры. Разнообразие сменных элементов, однонаправленное и встречное вращение шнеков позволяют добиться эффективного смешения с полимерной матрицей наполнителей различной формы и плотности. Сложный характер движения материала в экструдере затрудняет теоретические расчеты параметров смешения. Под действием температуры и сдвиговых напряжений возникают неравномерное распределение внутренних напряжений и разрыв ковалентных связей, что может приводить к изменению молекулярно-массового распределения полимера, образованию разветвлений и т.д. Вторичные реакции сложно предсказать, так как их протекание зависит от большого количества факторов. Для разрушения агломератов наполнителя необходимо, чтобы сила вязкого трения, приложенная к его поверхности, была больше силы взаимодействия между частицами. При напряжении ниже критического напряжения сдвига диспергирования не происходит. В работе [86] показано, что процесс разрушения не случайный – сначала разрушаются большие агломераты, причем наибольшее разрушение происходит в начале процесса смешения, когда наполнитель контактирует с твердым еще не расплавленным полимером.

В работе [87] композиционный материал изготавливали смешением в двухшнековом экструдере в атмосфере аргона для предотвращения термоокислительной деструкции. Были получены композиты на основе двух видов полимерных матриц (поли-L-лактид и поли-L-лактид-со-гликолид) и трех видов наполнителей (гидроксиапатит с размером частиц 0-50 нм, гидроксиапатит с диаметром частиц 5 нм, а также трикальций фосфат с размером частиц 0-50 нм). Физико-механические испытания проводили на стренгах диаметром 2 мм, полученных экструзией. Введение наполнителя приводило к увеличению модуля упругости до 4,5 ГПа и снижению прочности при изгибе до 120 МПа. Добавление наноразмерных частиц оказывает более выраженный эффект на механические

свойства композита, но также способствует агрегации частиц, которая в свою очередь негативно отражается на механических свойствах. Следует отметить, что процесс ориентации полимерных цепей в процессе экструдирования стренгов не был рассмотрен.

Сарвестани и соавторы [88] изучали свойства композита из сополимера лактида и этиленгликоля, наполненного гидроксиапатитом. Наблюдалось увеличение модуля сдвига нанокompозита на 100 % при добавлении глутаминовой кислоты в качестве сшивающего агента. Вместе с тем, при добавлении глутаминовой кислоты к микрокомпозиту никаких значительных изменений механических свойств не наблюдалось. Это исследование показывает, что размер добавленных частиц играет важную роль в модуляции механических свойств.

Важным параметром является равномерность распределения наполнителя в матрице. Любые неоднородности композиционного материала снижают его прочность, т.к. она определяется самой слабой его частью, в которой начинается разрушение. Таким образом, композит должен быть гомогенным. Существуют различные методы оценки однородности композиционного материала. Один из них основан на предположении, что частицы наполнителя равного размера и матрица состоит из таких же частиц. Пусть число частиц наполнителя равно b , а N – общее число частиц, $q=b/N$ – объемная доля частиц дисперсной фазы. Тогда вероятность $P(b)$ нахождения b частиц дисперсной фазы в образце композита равно плотности биномиального распределения:

$$P(b) = \frac{N!}{b!(N-b)!} q^b (1-q)^{N-b}$$

Тогда теоретическая дисперсия распределения равна $S^2 = q(1-q)/N$, а экспериментальная дисперсия концентрации наполнителя в образцах определяется по формуле $s^2 = \frac{1}{M-1} \sum_{i=1}^M (x_i - x_{cp})^2$, где M – число образцов, x_i – концентрация частиц наполнителя в i -ой пробе, x_{cp} – средняя концентрация частиц

наполнителя для М образцов. Для определения качества смешения используется критерий

$$I^2 = S^2 / s^2,$$

где I – индекс смешения, I изменяет значения от 0 до 1, I = 1 означает идеально равномерное распределение компонентов.

Также качество смешения можно оценить коэффициентом неоднородности

$$K_c = \frac{100}{c_0} \sqrt{\frac{(c_i - c_0)^2 n_i}{n-1}},$$

где c_i и c_0 - концентрации наполнителя в i-ом образце и при идеальном смешении, n_i – число образцов с концентрацией c_i , n – общее число образцов. $K_c=0$ означает идеальное смешение.

Особое внимание следует уделить прочности границы раздела наполнитель/матрица. Адгезионная связь должна быть достаточно прочной для передачи нагрузок от матрицы к наполнителю и одновременно не излишне прочной, чтобы наполнитель не отслаивался от матрицы, что подавляет диссипацию энергии и приводит к хрупкости материала [24].

Межфазная связь может иметь различную природу [89]. На образование механической связи благоприятно влияет наличие неровностей на границе раздела, усадка матрицы. Электростатическая связь образуется при условии разноименного заряда поверхностей матрицы и наполнителя и эффективна на расстояниях порядка атомного радиуса. Сила химического взаимодействия зависит от количества и типа связей, образуемых между группами на поверхности наполнителя и соответствующими группами в матрице. Также важную роль играет взаимодиффузия наполнителя и матрицы, зависящая от температуры переработки.

Гидрофобный полилактид плохо смачивает гидрофильный гидроксиапатит. Увеличить смачиваемость можно путем повышения температуры при смешении

материала за счет снижением вязкости полимера. Допустимый диапазон увеличения температуры ограничен температурой деструкции полимера.

Другой подход связан с увеличением совместимости минерального наполнителя и органической матрицы. Например, в работе [77] поверхность частиц трикальций фосфата активировали разбавленным водным раствором фосфорной кислоты. В результате последующего смешения L-лактида и ϵ -капролактона с активированным ТКФ при 150°C (в отсутствие катализатора) наблюдалось образование олиголактонов. Анализ поверхности сколов с помощью сканирующей электронной микроскопии указал на сильное межфазное взаимодействие компонентов, по сравнению с композитами с немодифицированным трикальций фосфатом, хотя повышения механических свойств композитов на основе сополимера L-лактида с D-лактидом и модифицированного ТКФ не наблюдали.

В работе [90] для повышения механических свойств композитов гидроксиапатит/полилактид на поверхность фосфата прививали полилактид. Получали композит смешением модифицированного ГА с полилактидом. При низком содержании модифицированного гидроксиапатита (4%) нанокомпозит демонстрировал более высокие значения прочности на изгиб и ударной прочности. При более высоких содержаниях модифицированного гидроксиапатита (около 20 вес.%) значительно возрастал модуль упругости композита. Улучшенная биосовместимость материала наблюдалась благодаря частицам гидроксиапатита, которые облегчают адгезию и пролиферацию хондроцитов на пленке композиционного материала.

Для увеличения адгезии наполнителя к матрице иногда используют различные модификаторы. Так в [91] тетракальцийфосфат, получаемый высокотемпературной обработкой трикальцийфосфата [92], покрывали смесью N-(2-аминоэтил)-3-аминопропилтриметоксисилана с пиромеллитовым диангидридом, вследствие чего наблюдалось улучшение дисперсного

сказывается на физико-механических характеристиках получаемого композиционного материала.

Похожие результаты по модификации поверхности гидроксиапатита методом полимеризации L-лактида в присутствии катализатора октаноата олова были получены в [78] и [94]. При 10 вес.% наполнении поли(L-лактида) Hong с соавторами [78] получили увеличение прочности при разрыве от 55 до 60 МПа, а Li и соавторы [94] от 40 до 55 МПа. Молекулярные массы полилактида, используемого в работах, составляли 200 и 100 кДа, соответственно. Другие примеры модификации гидроксиапатита различными методами и физико-механические характеристики получаемых композитов приведены в таблице 1.3.

Таблица 1.3 – Сравнение способов модификации фосфатов кальция и характеристики полученных композитов

| Материал/Наполнитель | Метод модификации наполнителя | Основные характеристики |
|---|---|---|
| Поли(L-лактид)/ Гидроксиапатит | Переэтерификация олиголактида | Максимальный модуль Юнга 2,1 ГПа, прочность 68,7 МПа, степень наполнения 15 вес.% [95] |
| Поли(этиленгликоль-со-бутилентерефталат)/ Гидроксиапатит | Модификация полиакриловой кислотой 5 кДа | Прочность на разрыв до 75 МПа [96] |
| Поли(ε-капролактон)/ Гидроксиапатит | Модификация молочной кислотой, этиленгликолем, полимеризация ε-капролактона | Максимальная прочность при растяжении – 28,2 МПа при содержании наполнителя 10%, максимальное значение модуля Юнга 5,5 ГПа [97] |
| Поли(L-лактид)/ Гидроксиапатит | Модификация молочной кислотой в среде тетрагидрофурана | Композит получен методом смешения в экструдере. Прочность увеличивалась с 60 до 70 МПа при |

| | | |
|-----------------------------------|--|--|
| | при нагревании до 150 °С | наполнении 15 вес.% [98] |
| Поли(L-лактид)/ Гидроксиапатит | Полимеризации L-лактида в присутствии катализатора | Максимальная прочность при растяжении 75 МПа, при изгибе 125 МПа, ударная вязкость 4,5 кДж/м ² при наполнении 4 вес.%. Кристалличность матрицы увеличивалась с увеличением содержания наполнителя до 10%, а далее уменьшалась. Температуры стеклования и плавления не зависели от степени наполнения [90] |

В работе [99] проведена модификация порошка гидроксиапатита синтезированными олигомерами D-лактида с молекулярными массами 5, 10 и 20 кДа. Как предполагают авторы, при модификации длина цепей уменьшалась из-за разрыва сложноэфирных связей. Композиционный материал получали путем смешения в растворе поли(L-лактида) и полученных порошков. Модифицированный гидроксиапатит независимо от длины привитого олигомера был распределен в полимерной матрице более равномерно. При этом образовывался стереокомплекс между поли(L-лактидом) и привитым олиго(D-лактидом), что благоприятно сказывалось на физико-механических свойствах композита. Наибольшее увеличение прочности при растяжении было достигнуто при модификации олиголактидом молекулярной массы 20 кДа и составило более 70 МПа при содержании гидроксиапатита 10 вес.%.

Таким образом, свойства композиционных материалов определяются множеством различных факторов, таких как форма, дисперсность, ориентация наполнителя, молекулярная масса матрицы, прочность границы раздела наполнитель/матрица и т.д. Обилие этих факторов усложняет теоретические расчеты. Основопологающим из них является прочность межфазной границы. Существует множество способов усиления межфазной связи, основанных на

различных способах введения наполнителя в матрицу и использовании аппретов. Все модификаторы имеют те или иные недостатки, например, нестабильность полученного результата, низкая технологичность, токсичность и т.д. Несмотря на некоторые успехи в данной тематике, разработка опытно-промышленных подходов создания композиционных материалов на основе полилактида и кальцийфосфатных наполнителей остается актуальной задачей.

1.2 Исследование кинетики кристаллизации

При разработке полимерных материалов медицинского назначения ключевую роль играют их механические характеристики, сроки деградации и реакция окружающих тканей на имплантат, что во многом определяется надмолекулярной структурой полимера. При переработке материала скорость кристаллизации влияет на свойства конечного изделия. Процесс кристаллизации зависит от различных факторов, например, изменяя температуру кристаллизации можно ускорить или замедлить процесс. Наполнитель в композите может быть нуклеирующим агентом и влиять на скорость кристаллизации. Несмотря на то, что биоразлагаемые костные крепежные изделия последнего поколения изготавливают на основе полилактида и фосфатов кальция, изучению влияния типа неорганического наполнителя, его концентрации и температуры кристаллизации на процесс кристаллизации таких композитов посвящено сравнительно небольшое число работ.

1.2.1 Кристаллизация полимеров

Кристаллизация – это фазовый переход с образованием упорядоченной структуры (кристалла), который происходит при температурах ниже равновесной температуры плавления [100]. Полимеры могут быть как частично кристаллическими, так и полностью аморфными. Получить 100% кристаллический полимер крайне сложно в силу кинетических ограничений.

В процессе кристаллизации полимера выделяют три этапа. Первый этап – это зародышеобразование, первичная нуклеация. На этом этапе формируются центры кристаллизации (зародыши), процесс может происходить как гомогенно, так и гетерогенно. При гомогенном зародышеобразовании в расплаве флуктуационно образуются центры из нескольких параллельных сегментов цепей. Гетерогенная нуклеация происходит на границах полимер / наполнитель или полимер / примесь. Гетерогенная нуклеация встречается чаще. На следующем этапе кристаллизации происходит рост кристаллов, кристаллические ламели могут образовывать вторичные структуры, такие как сферолиты и дендриты [101]. Как правило, при понижении температуры скорость кристаллизации увеличивается из-за увеличения термодинамической движущей силы и достигает максимума при определенной температуре, а при дальнейшем охлаждении из-за уменьшения подвижности сегментов полимерных цепей скорость кристаллизации уменьшается. Третьим этапом является вторичная кристаллизация, при которой происходит совершенствование структуры кристаллов. Данный процесс может происходить параллельно с первичным ростом.

Кристаллизацию в общем виде можно описать уравнением Джонсона-Мелаврами-Колмогорова:

$$\Theta = e^{-Kt^n} \quad (1)$$

где Θ – количество незакристаллизовавшейся фазы, n – экспонента Аврами, K – константа Аврами. Экспонента Аврами – это некоторое целое число, которое зависит от типа зародышеобразования и геометрии роста кристалла. Константа Аврами характеризует скорость зародышеобразования и скорость роста кристалла. Данное уравнение выводится на основе более общей задачи теории вероятностей [102].

При выводе уравнения Аврами (1) для вычисления объема незакристаллизованной фазы используются некоторые упрощения, такие как неизменность общего объема, постоянство линейной скорости роста кристалла и

др. Данные упрощения не всегда выполняются в реальном процессе. Так при кристаллизации общий объём может изменяться, например, при кристаллизации полиэтилена изменяется его плотность [101]. Линейная скорость роста кристалла может быть изменяться из-за разности в лимитирующих факторах кристаллизации. Например, при росте кристаллов из расплава процесс переноса тепла через кристалл может являться определяющим скоростью кристаллизации лимитирующим процессом, а при кристаллизации из раствора таким процессом может быть диффузия кристаллизующихся молекул к поверхности кристалла.

Помимо этого кристаллы полимеров могут формировать разветвлённые структуры, как, например, полистирол, кристаллизующийся в спиральные структуры из плоских гексагональных ламелей, или полиэтилентерефталат, образующий различные формы: от плоских лент до веретеноподобных ламелей [101]. Еще одной причиной может быть наличие вторичной кристаллизации помимо первичной [103].

Несмотря на перечисленные недостатки, модель Авраами довольно точна. Она даёт базовые знания о механизме кристаллизации. Для получения информации о микроскопических механизмах роста кристаллов, необходима детальная информация о морфологии образца [100].

Физической моделью для описания процессов кристаллизации полимеров является модель Лауритцена-Хоффмана [104]. Данная модель учитывает наличие первичной и вторичной нуклеации. В зависимости от отношения скоростей роста (g) и скорости вторичной нуклеации (i) различают три режима кристаллизации.

В режиме I скорость роста кристалла много больше скорости вторичной нуклеации ($g \gg i$). Общий линейный рост в таком случае можно записать следующим образом

$$G = biL_p$$

А скорость нуклеации представляется в виде

$$G_{1,n} = e^{-K_g/T\Delta T}$$

$$K_g = \frac{4b\sigma_1\sigma_f T_m^0}{k\Delta h}$$

где σ_1 - свободная энергия боковой / ламельной поверхности на единицу площади, σ_f - свободная энергия поверхности сгиба на единицу площади, T_m^0 - равновесная температура плавления, k - постоянная Больцмана, Δh - изменение энтальпии плавления на единицу повторения при стандартной температуре.

В режиме I боковое зародышеобразование вдоль фронта доминирует при температурах, близких к температуре плавления, однако при более экстремальных температурах другие силы могут влиять на скорости нуклеации (например, диффузия).

В режиме II скорость роста кристалла меньше скорости вторичной нуклеации ($g \leq i$). Тогда, предполагая отсутствие зависимости скорости роста кристалла и скорости вторичной нуклеации от времени, линейную скорость роста и скорость зародышеобразования можно описать уравнениями

$$G_2 = b\sqrt{ig}$$

$$G_{2,n} = e^{-K'_g/T\Delta T}$$

$$K'_g = \frac{2b\sigma_1\sigma_f T_m^0}{k\Delta h}$$

Наконец, в режиме III скорость роста кристалла много меньше вторичной скорости нуклеации ($i \gg g$). Скорость роста описывается тем же уравнением, что и в режиме I

$$G_3 = biL_p = G_3^0 e^{-U^*/k(T-T_0)} e^{-K_g/T\Delta T}$$

где G_3^0 - префактором для режима III и может быть экспериментально определен путем применения графика Лауритцена-Хоффмана.

Измерение скорости роста сферолитов как правило проводят в изотермическом режиме, измеряя радиус сферолитов как функцию времени.

$$G = \frac{dr}{dt}$$

Используя модель Хоффмана-Лауритцена можно определить режим кристаллизации поли(L-лактида) [105].

1.2.2 Кристаллическая структура полилактида

Полилактид относится к семейству алифатических полиэфиров. Мономером полилактида является оптически активная молочная кислота, существующая в виде L- и D-изомеров. Изменяя стереохимический состав полилактида, можно получить аморфный или высококристаллический полимер [43]. Различают три кристаллические модификации полилактида, которые образуются при различных условиях кристаллизации так термических, так и механических.

Наиболее распространенной кристаллической модификацией полилактида является α -фаза. Она формируется в процессе холодной кристаллизации или при формовании из раствора при низких температурах формования и/или низких кратностях вытяжки. В первых работах по изучению кристаллической структуры полилактида предлагали 10_3 спиральную конформацию макромолекулы в кристалле α -фазы [106]. Позже Aleman с соавторами [107] предположили для α -фазы полилактида пространственную ячейку $P2_12_12_1$. В более поздней работе [108] предложили асимметричную спиральную структуру с небольшими отклонениями от спирали 10_3 и элементарную ячейку $P12_11$ с моноклинной симметрией (рисунок 1.5). Также некоторые исследования сообщают о наличии конформационно-неупорядоченной α' фазы [109].

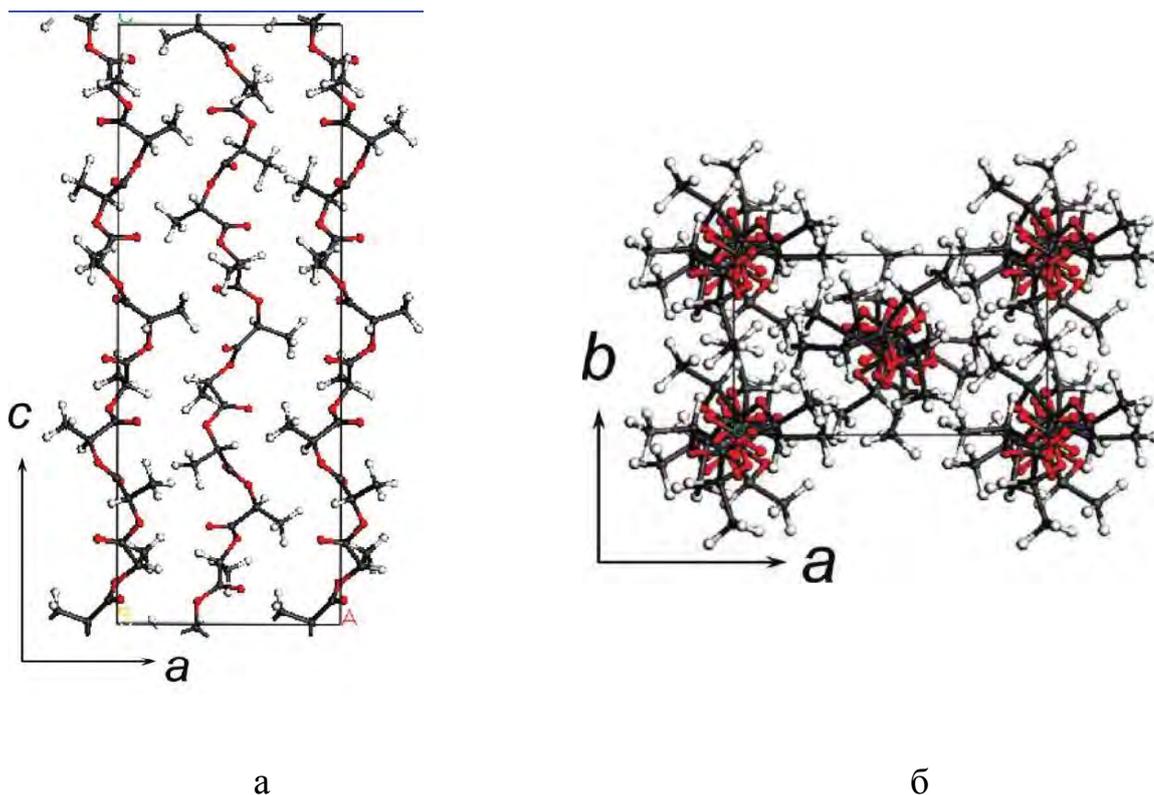


Рисунок 1.5 – Структура кристаллической решетки α -фазы поли(L-лактида) [108]

β -фаза полилактида образуется при механическом растяжении α -фазы или при высоких температурах формования из раствора и/или высоких кратностях вытяжки. Первые исследования предполагали у β -фазы орторомбическую элементарную ячейку с параметрами решетки $a = 1,031$ нм, $b = 1,821$ нм и $c = 0,900$ нм и конформацией цепи из левосторонних 3_1 спиралей [110]. Также орторомбическая элементарная ячейка с двумя параллельными цепями предложена в [111]. Исследования Cartier и соавторов полагают, что β -фаза является напряженной структурой из трех тройных спиралей в тригональной элементарной ячейке с параметрами a и b равными $1,052$ нм, а $c = 0,88$ нм, при этом соседние цепи могут иметь случайную ориентацию вверх-вниз [112]. В недавней работе 2017 года продемонстрировали, что элементарная ячейка β -фазы полилактида состоит из шести спиральных цепей конформации 3_1 , упакованных в

прямоугольную ячейку P_1 со сложным, но систематическим способом упаковки восходящих и нисходящих цепей (рисунок 1.6) [113].

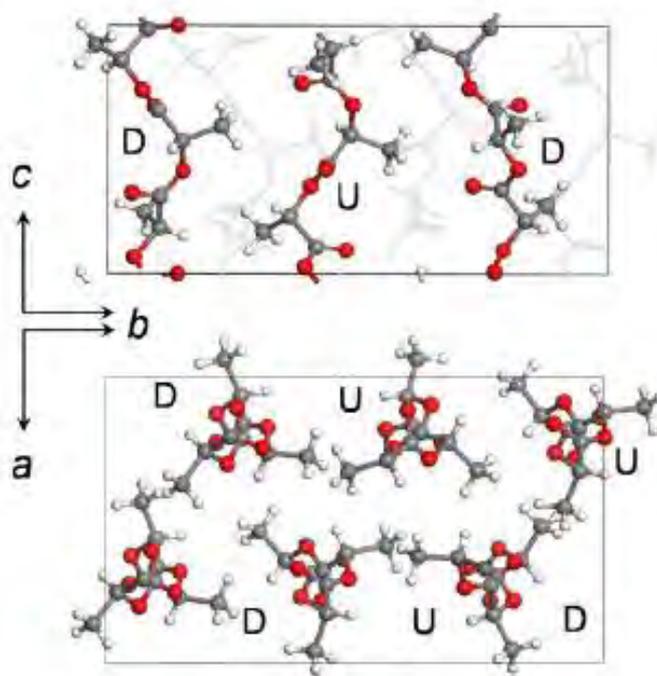


Рисунок 1.6 – Структура β -фазы поли(L-лактида) [113]

В специфических условиях получают γ -фазу полилактида. Она формируется при эпитаксиальной кристаллизации на субстрате и имеет две антипараллельные спирали, упакованные в ромбическую элементарную ячейку с параметрами $a = 0,995$ нм, $b = 0,625$ нм и $c = 0,88$ нм [112].

Как видно из обзора, кристаллическая структура полилактида все еще является предметом интенсивных научных исследований.

1.2.3 Исследование процесса кристаллизации полилактида

При исследовании процессов кристаллизации используют различные экспериментальные методы. Одним из распространенных методов исследования внутреннего строения материалов является рентгеноструктурный анализ.

Если неорганический компонент композита имеет слоистую структуру, то встраивание полимерной матрицы в эту структуру может ее разрушить, что хорошо видно на рентгенограммах [114]. Кристаллы монтмориллонита имеют

слоистую структуру с межплоскостным расстоянием до 2,2 нм. Этот минерал при смешении с поли(L-лактидом) оказывается равномерно распределен в полимерной матрице, а слоистая структура полностью разрушается. При температуре кристаллизации 130-140С полилактид образует малые кольцевые сферолиты в форме мальтийского креста. А при повышении температуры до 150-170С число образующихся кристаллитов уменьшается, и они становятся больше.

Метод большеугловой рентгеновской дифракции часто используется для определения степени кристалличности полимера. Используется соотношение:

$$W = \frac{I_c}{I_c + K_x I_a}$$

где I_c , I_a -интенсивность рассеяния от кристаллической и аморфной фаз соответственно, а K_x – калибровочная константа. Если образец обладает анизотропией, то должна быть получена дифракционная интенсивность в обратном пространстве [115].

В работе [116] исследовали механические свойства и кинетику неизотермической холодной кристаллизации композитов полилактида и титанатного связующего агента, обработанного карбонатом кальция (Т-СаСО₃) и трибутилцитратом (ТВС). Здесь анализ дифракционных пиков позволил определить принадлежность полилактида к α-ромбической кристаллической структуре в композите PLA/Т-СаСО₃. В ходе исследования показано, что как Т-СаСО₃, так и ТВС значительно уменьшают размер сферолита, но не изменяют кристаллическую структуру PLA; синергетический эффект ужесточения получается при комбинации двух наполнителей; добавление Т-СаСО₃ и ТВС увеличивают энергию активации неизотермической холодной кристаллизации, одновременно увеличивая и скорость кристаллизации.

В другой работе изучали кристаллическую структуру полилактида в композите с графеновыми нанолитами (GNS) методами большеугловой и малоугловой рентгеновской дифракции [117]. Было показано, что в

изотермически кристаллизованных образцах с уменьшением температуры кристаллизации доля α -формы уменьшалась, в то время как содержание α' -формы увеличивалось. При температуре кристаллизации 86°C наблюдали лишь α' -форму. Чтобы дополнительно исследовать влияние наполнителя на кристаллическую структуру полилактида, образцы ненаполненного PLLA и композита PLLA/GNS были изотермически кристаллизованы при 145°C с образованием α -формы полилактида. Во время процессов кристаллизации большие периоды L двух образцов уменьшались с увеличением времени изотермической кристаллизации и, наконец, достигали постоянных значений после завершения процессов кристаллизации. Было обнаружено, что значения L у композита намного меньше, чем у ненаполненного полимера, и кристаллизация полимера в композите происходит быстрее.

Изучение монокристаллов полимеров часто проводится методами электронной микроскопии и электронографии. Полезными дополнениями к ним служат фазово-контрастная оптическая микроскопия и метод малоугловой рентгеновской дифракции, но они зачастую не дают нужного разрешения. Из недостатков можно отметить, что при электронной микроскопии полимеров кристаллы готовят путем удаления растворителя и они не всегда имеют свою первоначальную форму [118].

Распространенным методом в изучении кристаллизации полимеров является поляризационная оптическая микроскопия (ПОМ). Оптические свойства анизотропных объектов проявляются по-разному в зависимости от ориентации этих объектов относительно направления наблюдения и плоскости поляризации падающего света. Наблюдение можно проводить как в проходящем, так и в отражённом свете. Схема поляризационного микроскопа приведена на рисунок 1.7.

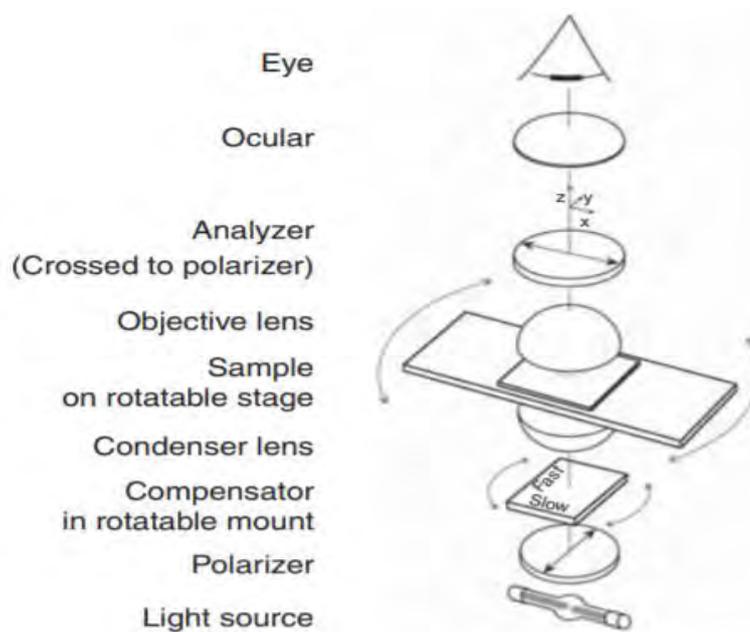


Рисунок 1.7 – Схема поляризационного микроскопа [119]

По результатам ПОМ, можно судить об основных оптических характеристиках анизотропных микрообъектов: количестве оптических осей и их ориентации, вращении плоскости поляризации, дихроизме и т.д. При оптической микроскопии в поляризованном свете сферолиты выглядят в виде кругов, на которых четко выделяются интерференционные картины в виде мальтийских крестов (Рисунок 1.8). Появление таких крестов свидетельствует о наличии сферической симметрии в расположении элементов, способных к проявлению эффекта двулучепреломления [120].

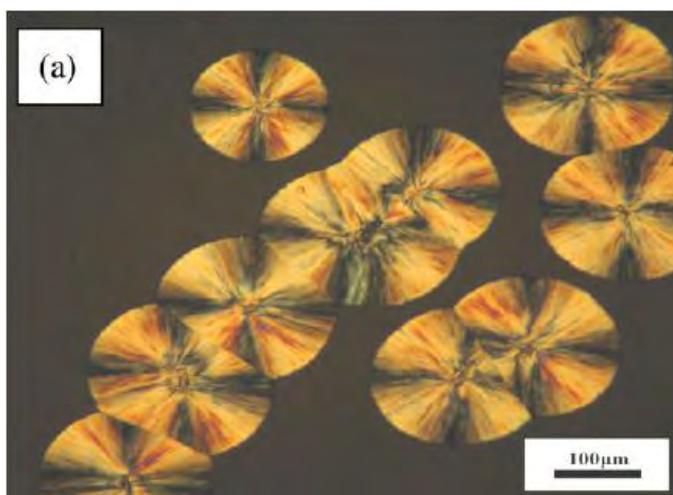


Рисунок 1.8 – Сферолиты в поляризационном микроскопе [121]

В другой работе [122] исследовали изотермическую кристаллизацию полилактида в композитах при различных степенях наполнения гидроскиапатитом. Авторы наблюдали радиальные полосы на сферолитах, отсутствующие у ненаполненного полилактида. Предполагают, что периодические полосы образуются при пластинчатом скручивании в радиальном направлении во время роста кристаллов.

Поскольку кристаллизация вещества неразрывно связана с тепловыми эффектами, основным методом при изучении кинетики кристаллизации является калориметрия. Для изучения процессов кристаллизации методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) обычно применяют две различные методики измерения: исследование изотермической и неизотермической кристаллизации. Изотермическая кристаллизация проводится при постоянной температуре, неизотермическая – при постоянной скорости изменения температуры (температурный скан). При любом подходе, первым этапом должно быть удаление термической истории образца. Как правило, образец нагревают до температуры градусов на 20 °С превышающей пик плавления, а затем поддерживают эту температуру 5-10 минут, чтобы плавление было полным [123]. Последующую изотермическую кристаллизацию образца, в зависимости от постановки эксперимента, исследуют либо при охлаждении из расплава (“melt-crystallization”), либо после быстрого охлаждения образца до температуры ниже температуры стеклования T_g , при последующем нагреве (“cold-crystallization”).

Метод кристаллизации из расплава был использован в работе по изучению влияния углеродных нанотрубок (CNT) на кристаллизацию поли(L-лактида) [121]. Сначала образцы выдерживали в печи при температуре 200 °С, чтобы избавиться от термической предистории, а затем их быстро перемещали в ячейку дифференциального сканирующего калориметра с поддерживающейся постоянной температурой кристаллизации. Перемещение расплавленного образца из печи в ячейку ДСК должно быть достаточно быстрым, чтобы образцы не

начали кристаллизоваться в процессе переноса. Анализ кинетики роста сферолитов с использованием теории вторичной нуклеации Лауритцена-Хоффмана позволил обнаружить, что присутствие CNT может расширить температурный диапазон режима кристаллизации III PLLA (см. раздел 1.2.1). Значение константы нуклеации (K_g) в режимах кристаллизации III и II PLLA увеличивается с увеличением содержания CNT. Соотношение K_g III / K_g II оказалось близко к теоретическому значению, но зависимость этой величины от содержания CNT не исследовали в данной работе. Анализ по модели Аврами также показал, что углеродные нанотрубки служат нуклеирующим агентом и ускоряют кристаллизацию PLLA.

Методом холодной кристаллизации изучали влияние на PLA различных пластификаторов [124]. Кристаллизацию, термические и механические свойства полилактида исследовали при добавлении 5% и 10% различных пластификаторов, таких как полиэтиленгликоль с молекулярной массой (ММ) 400 и 600 г/моль и монометиловый эфир полиэтиленгликоля с ММ 550 и 750 г/моль. С помощью быстрого охлаждения получали полностью аморфный PLA. Остановка нагревания после пика кристаллизации, но до начала плавления с последующим охлаждением до комнатной температуры позволяла получать частично кристаллические образцы PLA. Все типы использованных пластификаторов понизили температуру стеклования T_g и увеличили способность PLA к холодной кристаллизации. В то время как аморфный пластифицированный PLA мог деформироваться примерно на 550%, частично кристаллический PLA с тем же общим содержанием пластификатора проявлял меньшую способность к пластической деформации. Тем не менее, было достигнуто 20% удлинение на разрыв для полукристаллического PLA с 10% пластификатора.

При неизотермической кристаллизации могут возникать температурные градиенты внутри образца, между различными его областями, между образцом и печью и т.д. При изучении кристаллизации смеси изотактического полипропилена (iPP) с поли- α -пиненом (P α P) [125] в неизотермическом режиме были

изготовлены плёнки толщиной 150 мкм. Образцы нагревали до 200°C при скорости 30°C/мин и выдерживали при этой температуре 10 минут для полного плавления, а затем образец охлаждали до комнатной температуры при пяти различных скоростях охлаждения: 0,5, 1, 2, 4 и 8°C/мин. Кристаллизация смеси сильно зависит от скорости охлаждения, состава и характера распределения фаз. Для смесей, содержащих до 30% PαP, общая скорость неизотермической кристаллизации снижается по сравнению с чистым iPP. В смеси 50/50 наблюдается фазовое разделение на iPP-обогащенную и PαP-обогащенную фазы. Для этой смеси кристаллизация начинается при температуре выше, чем для чистого iPP или смесей с более низким содержанием PαP. Предполагается, что эффект разбавления PαP в iPP-обогащенной фазе уравнивается увеличением числа зародышей, происходящим в PαP-обогащенной фазе. PαP также влияет на морфологию сферолитов iPP, которые являются сферическими в чистом iPP и становятся более нерегулярными с увеличением содержания PαP. Концентрация и размер сферолитов iPP зависят от состава смеси и характера распределения компонентов.

При исследовании полимеров методом ДСК нередко можно наблюдать двойной пик плавления. Это хорошо видно в работе [126] при изучении изотермической кристаллизации ненаполненного стереокомплекса полилактида (scPLA) и нанокompозита с оксидом графена (scPLA/GNPO). Методами ДСК и рентгеноструктурного анализа было показано, что добавление 0,5% оксида графена увеличивает скорость кристаллизации полилактида, уменьшает время полукристаллизации на 2,7 минут для изотермической кристаллизации при 165 °C. В процессе изотермической кристаллизации образуются как стереокомплексные, так и гомохиральные кристаллы, в зависимости от температуры кристаллизации. Но когда эта температура достигает 160-165 °C, гомокристаллы перестают формироваться, и образуются только стереокомплексные.

Наличие двойного пика плавления часто может быть объяснено одной из двух причин. Первой причиной может быть существование фракций с различной молекулярной массой, тогда сначала плавится более низкомолекулярное соединение. Другой причиной может быть процесс рекристаллизации, когда во время сканирования происходит процесс формирования метастабильного кристаллического состояния с последующим повторным плавлением и рекристаллизацией.

Более детально изучить особенности кристаллизации можно методом ДСК в комплексе с другими методами термоанализа. Например, в работе [127] исследовали эффекта отжига на кристаллизацию полилактида. Оказалось, что в диапазоне температур отжига 100-140С было достаточно 10 минут, чтобы кристалличность достигла 40%. Динамический механический анализ (ДМА) показал, что аморфные образцы рекристаллизуются в процессе измерений, что порождает увеличение модуля накопления выше температуры стеклования. При высокой скорости нагрева становится возможным измерить ДМА-кривую аморфного PLA, чтобы проанализировать ее отличия от кривой частично кристаллического PLA. Экзотермический пик в температурном диапазоне 80-140С на кривой ДСК свидетельствует о протекании холодной кристаллизации в образце. Этот пик уменьшается с увеличением кристалличности, и исчезает для полностью отожженного образца.

Часто для анализа кинетики изотермической кристаллизации используют модель Аврами. В таблице 1.4 приведены значения экспоненты Аврами n , константы Аврами k и времени полукристаллизации $T_{1/2}$.

Таблица 1.4 – Кинетические параметры Аврами при изотермической кристаллизации полилактида. В скобках указаны теоретические (Т) и экспериментальные (Э) значения.

| Материал | Температура кристаллизации | n | k | T _{1/2} , мин |
|--|----------------------------|-------------------------|--|--|
| Поли(L-лактид) | 90-140°C [128] | 2,51-2,91 | 7,94*10 ⁻⁶ - 3,16*10 ⁻³ | 3,47-48,67 (Э) 3,42-49,87 (Т) |
| Поли(L-лактид) + 10 вес.% карбонатзамещенного гидроксиапатита | | 2,42-2,86 | 1,66*10 ⁻⁴ - 1,15*10 ⁻¹ | 2.10-18.35(Э) 2.07-18.45(Т) |
| Стереокмплес полилактида (стерео/гомокристаллы) | 120-165°C [126] | 1,97-2,05 /2,11-4,03 | 1,08*10 ⁻² - 1,42*10 ⁻¹ /2,72*10 ⁻⁴ -1,03*10 ⁻³ | 2,2-8,3(Т) 7,0-22,2(Т) |
| Стериокмплес полилактида + 0,5 вес.% нанопластинок оксида графена | | 1,9-2,27 /2,04-3.,44 | 2,68*10 ⁻² – 3,04*10 ⁻¹ /1,01*10 ⁻³ – 1,05*10 ⁻² | 0,8-5,5(Т) 2,1-24,6(Т) |
| Поли(лактид-со- гликолид) | 105-120°C | 2,69-2,8 | 9,18*10 ⁻⁵ - 2,96*10 ⁻⁴ | 17,9-27,56 (Т) |
| Поли(лактид-со- гликолид) + 4,5 вес.% наночастиц гидроксиапатита | | 2,69-2,9 | 3,85*10 ⁻⁴ - 1,82*10 ⁻³ | 8,66-14,24 (Т) |
| Поли(лактид-со- гликолид) + 4,5 вес.% вискеров гидроксиапатита | | 2,84-3,13 | 2,24*10 ⁻⁴ - 6,87*10 ⁻³ | 10,15- 16,83(Т) |
| Полилактид | 80-115°C | 3,01-4,31 | 1,97*10 ⁻⁷ - 1,27*10 ⁻⁴ | 9,0-33,1(Э) |

| | | | | |
|--|-------|-----------|--|----------------------------|
| | [129] | | | 9,0-33,0(Т) |
| Полилактид + 1 вес.% нанопроволок TiO ₂ (<i>in situ</i> полимеризация) | | 3,63-5,58 | 6,24*10 ⁻⁸ - 2,1*10 ⁻⁴ | 6,1-25,1(Э) 6,1-25,3(Т) |
| Полилактид + 1 вес.% нанопроволоки TiO ₂ (смешение в растворе) | | 3,02-4,7 | 7,37*10 ⁻⁷ - 4,26*10 ⁻⁴ | 9,8-23,1(Э) 9,8-23,2(Т) |

Изучение процесса кристаллизации полимера в присутствии наполнителя позволяет получить информацию о свойствах полученного композита. Композиты на основе поли(L-лактида) и фосфатов кальция активно используются в современной медицине. Несмотря на то, что структура и свойства полилактида исследованы довольно хорошо, кристаллизация этого полимера в присутствии фосфатов кальция мало изучена.

1.3. Деградация полимерных материалов

В настоящее время биоразлагаемые полимерные материалы вызывают все больший интерес в различных сферах деятельности человека. Создание упаковочных материалов, разлагающихся без вреда для окружающей среды по истечению срока эксплуатации, является очень актуальной задачей сегодня. Роспотребнадзор планирует сократить, а в дальнейшем и полностью запретить, продажу одноразовых пластиковых пакетов, что поможет снизить негативное воздействие на окружающую среду. Другой крупной областью применения биоразлагаемых полимерных материалов является создание медицинских изделий временного назначения. Такие материалы функционируют в организме в течении определенного срока, после чего разлагаются без вреда для организма. Скорость разложения имплантата, используемого в регенеративной медицине, должна быть близка к скорости роста новой ткани. Кинетику биоразложения полимеров сложно прогнозировать с высокой точностью из-за обилия факторов, влияющих

на нее. Изучение процессов деградации полимеров и композитов на их основе поможет более точно выбирать материалы, в зависимости от области их применения и задач.

Существует множество полимеров, применимых в данных областях, например, поливиниловый спирт, полигликолид, поликапролактон и др. Особое место среди них занимает полилактид, получаемый из таких возобновляемых источников, как крахмал и сахарный тростник. Благодаря своим свойствам, полилактид и композиты на его основе могут быть использованы в биомедицинских целях. В первую очередь, композит, наполненный гидроксиапатитом, применяется в травматологии в качестве крепежных изделий для фиксации поврежденной кости или имплантатов для дальнейшего восстановления недостающего участка кости.

Химический гидролиз является основным механизмом деградации полиэфиров (Рисунок 1.9) [130]. Деградация полимерного композиционного материала может происходить двумя путями: на поверхности (эрозия) либо во всем объеме имплантата [131]. В первом случае деградации подвергается только область, доступная для проникновения воды, так называемый диффузионно-кинетический слой. Поверхностная эрозия протекает слой за слоем и образец «истончается» по мере деградации, а молекулярная масса полимера при этом остается неизменной. Эрозия по поверхности является наиболее распространенным путем деградации. Вторым случаем встречается у материалов, легко набухающих в биологических средах, когда скорость диффузии жидкостей в имплантант больше скорости образования водорастворимых продуктов деградации полимера. Форма и размер имплантата остаются неизменными, в то время как молекулярная масса полимера уменьшается.

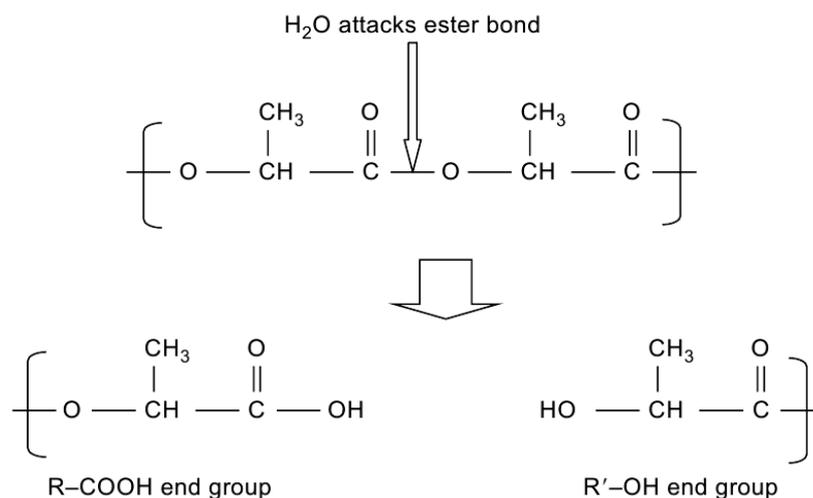


Рисунок 1.9 – Гидролиз сложноэфирной связи полилактида [132]

Ранее полагали, что многие синтетические полимеры, в том числе полилактид, деградируют исключительно за счет гидролиза, но было доказано, что в деградации принимают участие и ферменты, например, протеиназы [133,134]. Ферменты – это полипептиды с молекулярной массой от нескольких тысяч до нескольких миллионов г/моль, поэтому высокомолекулярные ферменты не могут проникать в имплантат и ферментативное разрушение происходит постепенно от поверхности внутрь материала. Ферментативный гидролиз активнее в природных полимерах, чем в синтетических [131]. Введение в полимер фрагмента, чувствительного к определенному ферменту, позволяет добиться селективности ферментативной деградации [135].

На скорость разложения влияют различные параметры [136,137]. Важную роль играет температура стеклования полимера. Например, Y. Tokiwa с соавторами в своей работе [138] показали, что липаза Rh. Delemar активнее гидролизует полиэфиры с более низкой температурой стеклования. Помимо этого, сложноэфирная связь между различными мономерами обладает различной чувствительностью к гидролизу, так поликапролактон деградирует значительно медленнее, чем полилактид (см. таблицу 1.1). Диффузия воды и низкомолекулярных продуктов деградации легче проходит в аморфных

полимерах, чем в частично кристаллических [139]. Ключевым параметром является молекулярная масса полимера, ведь чем длиннее полимерная цепь, тем больше сложноэфирных связей требуется разорвать, поэтому время разложения низкомолекулярных полимеров меньше, чем высокомолекулярных [138].

Гидролиз сложноэфирной связи полимера может протекать на концах цепи или в случайном месте (Рисунок 1.10). На основании литературных данных Gleadall и соавторами [140] пришли к выводу, что деградация биоразлагаемых полимеров представляет собой комбинацию случайных и концевых разрывов цепи. Только концевые разрывы не объясняют быстрого снижения молекулярной массы. В то время как только случайные не всегда могут объяснить наблюдаемую потерю веса образца. Концы цепи более восприимчивы к расщеплению, что приводит к образованию мономеров, вымывание которых уменьшает вес имплантата. А снижение молекулярной массы является следствием случайных разрывов полимерной цепи.

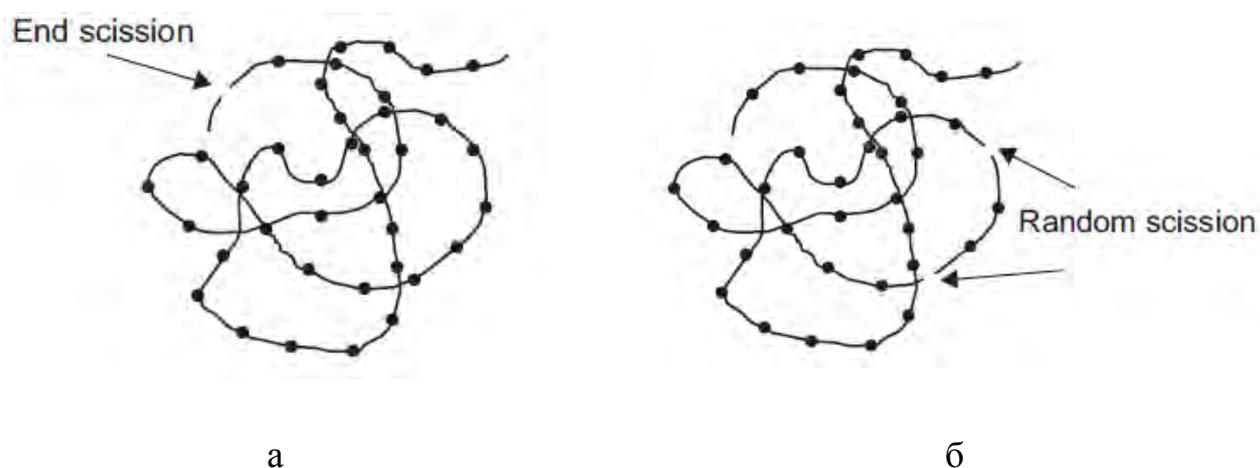


Рисунок 1.10 – Разрыв сложноэфирной связи (черные точки) на концах цепи (а) и в случайном месте (б) [132]

Чтобы объяснить эффект разрыва сложноэфирной связи на концах цепи, Gleadall и соавторы [140] использовали отдельные уравнения для скорости разрыва в случайном месте

$$\frac{dR_{rs}}{dt} = k_{r1}C_e + k'_{r2}C_eC_{H^+}$$

и скорости конечного разрыва

$$\frac{dR_{es}}{dt} = k_{e1}C_{end} + k'_{e2}C_{end}C_{H^+}$$

где C_e , C_{end} и C_{H^+} обозначают концентрации сложноэфирных связей, концов цепи и ионов H^+ , соответственно, а k_* - соответствующие константы реакции.

Используя эти два уравнения, изменение среднечисленной молекулярной массы можно представить следующим образом

$$\bar{M}_n = \frac{M_n}{M_{n0}} = \frac{1}{1 + N_{dp0}(\bar{R}_{rs} + \bar{R}_{es})}$$

где N_{dp0} – начальная степень полимеризации (среднее количество сложноэфирных звеньев на полимерную цепь).

При деградации полилактида и полигликолида может происходить автокаталитическое ускорение, ведь продуктами их деградации являются кислоты [141]. Данное явление особенно выражено в крупных имплантатах толщиной несколько миллиметров ввиду накопления продуктов деградации в глубине изделия.

Изменение со временем среднечисловой и средневесовой молекулярной массы при деградации объемно разлагающихся полимеров могут быть выражены формулой [142]:

$$\log M = \log M_0 - kt,$$

где M_0 и M – молекулярные массы до начала разложения и во время, соответственно; k – кажущаяся константа скорости разложения, которая может

быть определена экспериментально, t – время разложения. Несмотря на монотонное уменьшение молекулярной массы разлагающихся полимеров со временем, экспериментально выявлялось, что модуль упругости материала увеличивается на ранних стадиях деградации, далее наступает фаза плато с дальнейшим резким снижением [142]. Считается, что такое поведение является результатом усадки полимера, происходящей в начале разложения, что приводит к возрастанию модуля упругости. Снижение модуля на поздних стадиях разложения является прямым результатом значительного уменьшения молекулярной массы полимерных цепей [143].

Игнорируя диффузию из образца коротких полимерных цепей, основное уравнение деградации аморфного полиэфира может быть записано в виде:

$$\frac{d\bar{R}_s}{dt} = (1 - \alpha \bar{R}_s^\beta) \left[k_1 + \bar{k}_2 (N_{dp0}^{-1} + \bar{R}_s)^n \right]$$

где \bar{R}_s - общее количество разрывов цепи на единицу объема, нормированное на начальное количество сложноэфирных единиц всех цепей на единицу объема, α и β – эмпирические параметры для производства коротких цепей, N_{dp0} – начальная степень полимеризации (среднее количество сложноэфирных звеньев на полимерную цепь). На ранних стадиях деградации данное уравнение при отсутствии катализа можно представить следующим образом

$$M_n = \frac{M_{n0}}{1 + k_1 N_{dp0} t},$$

а в случае автокаталитического ускорения

$$M_n = \frac{M_{n0}}{\left(1 + (1/2) N_{dp0}^{1/2} \bar{k}_2 t\right)^2},$$

где M_n и M_{n0} – среднечисловые молекулярные массы.

Следует отметить, что при выводе данного уравнения все сложноэфирные связи считаются одинаково подверженными гидролизу. Диффузия коротких цепей полимера из образца снижает концентрацию карбоксильных концевых групп внутри имплантата и, как следствие, замедляет скорость его разложения.

При деградации частично кристаллических полимеров степень кристалличности может увеличиваться [144]. Разрыв сложноэфирной связи происходит преимущественно в аморфной фазе, обеспечивая дополнительную подвижность полимерных цепей для кристаллизации. Данный эффект известен как кристаллизация, вызванная разрывом цепи. При этом изменение среднечисленной молекулярной массы может описано уравнением

$$M_n = \frac{(C_{e0} + \omega X_{c0}) M_{unit}}{N_{chain0} + R_s}$$

Где C_{e0} - первоначальное количество сложноэфирных звеньев длинных цепей в аморфной фазе на единицу объема полукристаллического полимера, X_{c0} - начальная объемная степень кристалличности, ω - количество сложноэфирных звеньев в единице объема кристаллической фазы, M_{unit} - масса повторяющегося звена полимерной цепи, N_{chain0} - исходное количество всех полимерных цепей в единице объема, R_s - количество разрывов цепи на единицу объема.

Исследования *in vitro* в солевом растворе Хенкса на протяжении 1, 10 и 20 дней высоконаполненных композитов на основе поли(L-лактида) показали, что деградация происходит быстрее при большем содержании гидроксиапатита [145]. За 20 дней деградации прочность на изгиб уменьшалась с 130 МПа до 70 МПа у 70%-ного композита, что ниже прочности нативной костной ткани.

В настоящее время неинвазивную визуализацию объемной микроструктуры в полимерах можно осуществить только двумя методами: рентгеноструктурным анализом и ультразвуковым методом исследования. При изучении деградации

полимеров особый интерес представляют ультразвуковые методы благодаря хорошей чувствительности к воздушным пустотам и неоднородностям, которые являются типичными образованиями деградации полимера. Они практически прозрачны для рентгеновского излучения. Ультразвуковые методы исследования позволяют определить такие характеристики полимера, как температура стеклования полимера, механические и вязкоупругие свойства, кристалличность и ориентация [146], путем как количественной (измерения скорости звука, затухания, амплитуды обратно рассеянных сигналов и т.д.), так и качественной (акустическая визуализация внутренней структуры) оценки образцов. Этот неразрушающий метод позволяет наблюдать за процессом разложения одного и того же образца. Однако немного работ посвящено ультразвуковым исследованиям биоразлагаемых полимеров [147–151] и систематические данные для упругих свойств и изменений внутренней микроструктуры с высоким разрешением, полученных на одних образцах полимера в течение всего периода деградации практически отсутствуют.

Любое хирургическое вмешательство, в том числе и имплантация биоразлагаемого изделия, приводит к воспалительному процессу, активирующему деятельность ферментов и клеток, таких как макрофаги и гигантские клетки инородного тела, стремящихся резорбировать имплантант [131]. Молодые клетки новой растущей ткани образуют соединительнотканную капсулу вокруг имплантата, в случае низкой способности к деградации последнего, организм стремится изолировать инородное тело и толщина капсулы увеличивается. Место введения имплантата играет важную роль, так как от этого зависит количество и состав выделяемых ферментов и клеток. Смоделировать реакцию живого организма на инородное тело в экспериментах *in vitro* не представляется возможным. Только исследования *in vivo* могут дать ответ на вопрос «Какими свойствами должен обладать материал для тканевой инженерии?».

В ряде работ было отмечено преимущество нанокompозитных материалов перед микрокомпозитными. В работе [152] авторы наблюдали значительное

увеличение адсорбции белка и адгезии остеобластов на нанокерамических материалах по сравнению с микроразмерными. Схожие результаты наблюдал Вэй с соавторами [57]. Было показано, что при использовании наночастиц в композите поли(L-лактид)/гидроксиапатит улучшается адгезия белка по сравнению с микрокомпозитом. В другом исследовании показано, что форма частиц наполнителя играет немаловажную роль, так наностержни гидроксиапатита имеют большую биологическую активность из-за схожести с нативной костной тканью [153]. Армирование наноразмерными аморфными кальций фосфатами поли(лактида-со-гликолида) благоприятно сказывается на скорости биоразложения и механические свойствах [154].

В некоторых работах показано, что биосовместимость микро- и нанокомпозитов примерно одинакова. Композиционный материал из полилактида и микросфер трикальций фосфата (около 100 мкм) продемонстрировал улучшенную биосовместимость и хорошо взаимосвязанную пористую структуру, которая облегчала врастание ткани [155]. Полученные биоактивность и гидрофильность были повышены до уровней, сопоставимых с уровнями композита полимолочной кислоты, содержащего порошок трикальций фосфата. Исследования *in vitro* методом ускоренного 30-дневного теста выявили успешное образование открытой пористой структуры с 98%-ной взаимосвязью. Остеоинтеграция также оценивалась *in vivo* с использованием модели бедренного дефекта кролика. После 16 недель имплантации отношение контакта кости с имплантатом композита микросферы полимолочной кислоты и трикальцийфосфата было улучшено благодаря врастанию ткани через поры, образованные вблизи поверхности.

На кинетику биодеградаци и остеоинтеграцию оказывают влияние не только химический состав и физико-механические свойства имплантата, но и его структура, форма и размер [156]. Поэтому исследование биодеградаци скаффолдов является необходимой стадией разработки изделий для тканевой инженерии.

Матрицы для замещения дефектов тканей должны быть пористыми со связанной системой пор для обеспечения клеточной инфильтрации, транспортировки питательных веществ и удаления метаболитов [157,158]. Методом электроформования Вегунопал и соавторы [159] изготовили пористый волокнистый каркас из коллагена и наногидроксиапатита, обладающий остеобластной адгезией и пролиферативной активностью. Считается, что для прорастания тканей и сосудов размер пор должен быть более 300 мкм, а размер соединяющих пор более 100 мкм [160].

В работе [161] изучали влияние наполнителя на остеоинтеграцию винтов из чистого поли(L-лактида) и композитов с 25 вес.% гидроксиапатита. Исследования проводили на овцах. Каждому животному в берцовую кость было имплантировано по 2 винта из композитного материала или ненаполненного полимера. Исследования проводили через 6 и 12 месяцев. Воспалительная реакция была меньше выражена при использовании композиционных винтов благодаря наличию гидроксиапатита, нейтрализующего образующуюся при деградации полимера кислую среду (Рисунок 1.11). Прирост новой костной ткани был больше на обоих сроках исследования в случае имплантации композиционных винтов.

а



б

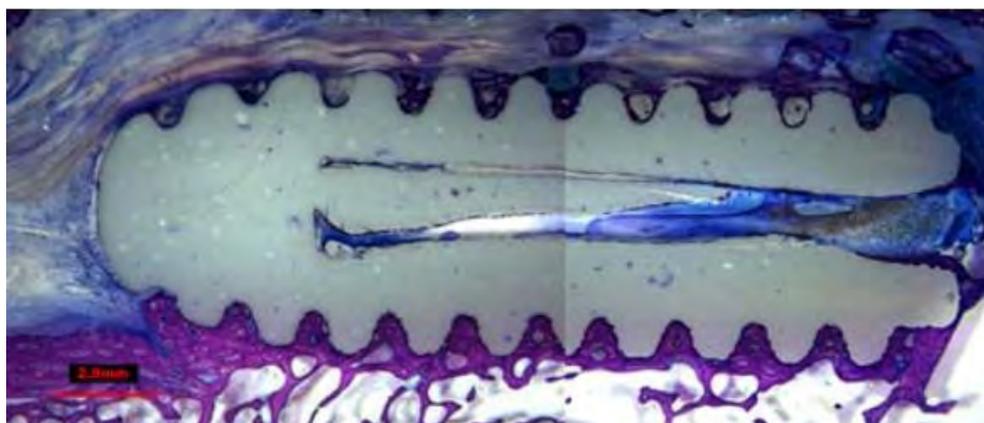


Рисунок 1.11 – Винты через 12 месяцев после имплантации из ненаполненного полилактида, где фиброзная ткань занимает канавки резьбы винта (а) и из композиционного материала с гидроксиапатитом (б), где новая кость присутствует в каждой винтовой резьбе как рядом с костным туннелем, так и с сухожилием. Сухожилие надколенника находится вверху изображения, а коленный сустав - слева. [161]

Bennett S.M. и соавторы [162] сравнивали деградацию *in vivo* композитов на основе сополимера D,L-лактида и гликолида составом 50/50, наполненных микро- и наноразмерным трикальций фосфатом. Композиты изготавливали методом смешения в растворе, степень наполнения достигала 30 вес.%. Исследования проводили на овцах из-за их сходства с людьми по структуре костей и суставов, а также регенерации костной ткани [163]. Пины длиной 12 мм и шириной 6 мм имплантировали в дистальный мыщелок бедренной кости на 6, 12, 18, 24 недели. Достоверность результатов обеспечивалась статистикой по 6 пинов на каждый

срок разложения. Рост кости происходил с одинаковой скоростью как для композита, так и для ненаполненного полимера. Скорость деградации *in vivo* в нанокompозите ниже, чем в микрокомпозите, что более точно соответствует скорости роста новой кости. Возможно, это связано с тем, что нанокompозит набухает меньше, чем микрокомпозит, как было показано в аналогичных исследованиях *in vitro* [164]. Отметим, что в течение первых 6 недель скорость деградации *in vivo* соответствует скорости деградации *in vitro*, но отстает при больших сроках.

В работе [165] проводили тест на остеоинтеграцию имплантатов через 8 недель после введения в бедренную кость минипига методом выдавливания конических образцов из отверстий (Рисунок 1.12). Объектом исследования выступал композиционный материал на основе поли(L-лактида-со-гликолида), наполненный микро- и наноразмерным трикальций фосфатом. Степень наполнения составляла 16 вес.% в обоих случаях. Для сравнения использовали титановый сплав и ненаполненный полимер. Имплантаты, изготовленные из наноструктурированного композита PLGA / β -TCP, не продемонстрировали улучшенной остеоинтеграции по сравнению с имплантатами, изготовленными из микроструктурного композита PLGA / β -TCP. Проведенные испытания показали, что сила выдавливания композитных образцов составила 35-60% от титанового имплантата. В то же время сила выталкивания образца из ненаполненного сополимера составила лишь 16-40% от титанового. По данным компьютерной микротомографии и гистологии имплантат не повлиял на структуру новой кости, окружающей имплантат.

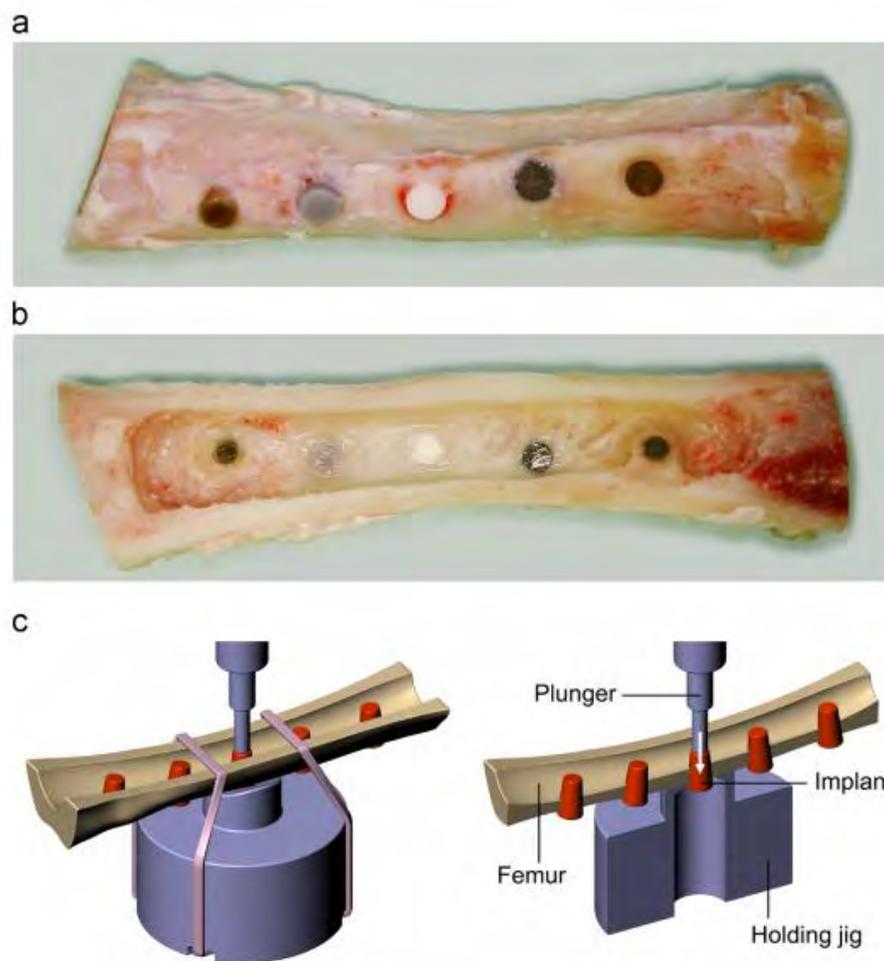


Рисунок 1.12 – Испытания на выдавливание конических имплантатов. Передне-задний (а) и задне-передний (б) виды передней коры бедренной кости бедра, подготовленной для испытаний на выталкивание. Схематическое изображение испытания на выдавливание (с) работе [165]

Механизм деградации полимерного материала определяется большим количеством различных факторов и на данный момент существует значительная неопределенность при сопоставлении скорости деградации материала с этими переменными, что делает практически невозможным теоретические расчеты. Испытание различных материалов и вариантов конструкции биоразлагаемых имплантатов в экспериментах *in vitro* и *in vivo* является длительным и трудоемким процессом. Исследования *in vitro* дают базовые знания основных принципов деградации, на которых основывается дизайн имплантата. Однако природа деградации имплантата *in vivo* все еще не до конца ясна. Разнообразие материалов

и отсутствие единой системы постановки экспериментов затрудняют сопоставление полученных данных. Ожидается, что экспериментальные исследования будут продолжать играть доминирующую роль в обозримом будущем.

Формулировка задачи

Несмотря на прогресс последних лет в данной тематике, поиск опытно-промышленных подходов производства биоразлагаемых композиционных материалов и изделий на их основе для травматологии и ортопедии с регулируемыми свойствами и временем деградации актуально и по сей день. Для этого необходимо исследовать влияние условий получения, состава композита на надмолекулярную организацию полимерной матрицы, физико-механические характеристики и кинетику разложения полученных материалов. Основной целью представленной работы является разработка методов получения композиционных материалов на основе полилактида, его сополимеров и кальцийфосфатных наполнителей и установление связи между способом получения, составом, их теплофизическими и физико-механическими характеристиками, а также особенностями деградации.

2 Экспериментальная часть

2.1 Объекты и материалы

Полимеры

Для исследований были выбраны следующие полиэфиры: поли(L-лактид) 4032D (PLLA) фирмы NatureWorks, поли(ε-капролактон) (PCL) фирмы SigmaAldrich, поли(D,L-лактид) (PDLLA) и сополимер L-лактида и ε-капролактона составом 75:25, синтезированные в лаборатории полимерных материалов НИЦ «Курчатовский институт». Методики синтеза последних изложены в статьях [166] и [167], соответственно.

Наполнитель

В качестве наполнителя для композиционного материала на основании литературного обзора были выбраны гидроксипатит (ГА), предоставленный институтом металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова, а также трикальций фосфат (ТКФ) фирмы AppliChem Panreac (ITW Companies).

2.2. Методы исследования

Смешение композита

Смешение композиционного материала производилось на двушнековом экструдере Haake MiniLab II. В данной работе в качестве варьируемых параметров были выбраны время смешения (20-300 с), вид наполнителя и способ его модификации, степень наполнения матрицы (1,5-20%вес), температура смешения (190-230°C). Постоянными являлись скорость вращения шнеков равная 100 об/мин и состав полимерной матрицы.

Физико-механические исследования

Механическое поведение образцов при растяжении изучали на разрывной машине Instron 5965 при 22⁰С со скоростью деформации 1мм/мин, размеры

рабочей части лопатки, полученной методом горячего прессования, составляли 10×3,2×0,23 мм. Испытания на трехточечный изгиб выполняли на машине Instron 5982 при температуре 25⁰С со скоростью шага 1мм/мин, расстояние между опорами 20 мм, толщина и ширина отлитой на литьевом прессе пластины составляла 0,95 и 9,9 мм, соответственно.

Сканирующая электронная микроскопия

Микроструктуру композитов изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием аппарата Versa 3D DualBeam (FEI, США) в режимах низкого и высокого вакуума. Изображения были получены в режиме вторичных электронов с ускоряющим напряжением 2 кВ и 5 кВ. Поперечные сечения готовили путем замораживания образцов в жидком азоте с последующим сколом. Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы Image Pro Plus 4.1. Дальнейшие расчеты были сделаны с помощью программного обеспечения Origin Pro 8. Гистограммы распределения размеров были получены, по меньшей мере, из 500 частиц.

Морфологию композитов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для получения изображений использовали сканирующий электронный микроскоп высокого разрешения с автоэмиссионным катодом JSM 7500F (JEOL, Япония). Изображения были получены в режиме низкоэнергетических вторичных электронов, поскольку этот режим давал самое высокое разрешение (при энергии первичного пучка 5 кэВ разрешение составляло 1,5 нм). Для устранения последствий зарядки, а также разрушения объектов (полимерных нитей) под воздействием электронного луча использовались следующие методологические подходы. СЭМ-исследования проводились при слабом токе электронного зонда (3×10^{-11} А), что обеспечивалось наличием полевого эмиссионного катода с холодным полевым излучением. Металлическая пленка платины толщиной около 5 нм была нанесена на поверхность объектов магнетронным распылением.

Дифференциальная сканирующая калориметрия

Исследование теплофизических свойств полученных композиционных материалов проводили на калориметре Perkin Elmer DSC 8500, для калибровки использовали индиевый стандарт. Термограммы получали в динамическом режиме, для этого образец расплавляли со скоростью 20 °С/мин от 25 °С до 190 °С, выдерживали 2 мин при 190 °С, затем охлаждали до 25 °С со скоростью 1 °С/мин, для обеспечения термической стабильности выдерживали 1 мин при 25 °С, далее производили второй нагрев до 190 °С со скоростью 5 °С/мин.

Гельпроникающая хроматография

В работе использовался хроматографический комплекс Knauer (Германия), с детектором светорассеяния, колонкой Phenogel, наполненный полистирол-дивинилбензолными микросферами с диаметром пор 10мкм, в качестве подвижной фазы использовали тетрагидрофуран. Температура эксперимента составляла 40°С, расход элюента 1 мл/мин. Колонку калибровали по полистирольным стандартам. Для обработки результатов использовали программу Claritychrom.

Рентгеноструктурный анализ

Структуру образцов исследовали методом рентгеновского анализа в больших и малых углах на станции ДИКСИ Курчатовского специализированного источника синхротронного излучения. Источником является поворотный магнит 1,7 Тл, длина волны 1,62 Å. Горизонтальная фокусировка пучка осуществляется изогнутым монохроматором Ge(111), вертикальная – зеркалами полного внешнего отражения. Использовался CCD-детектор MarCCD 165 (Rayonix) Image plate (200×250 мм) со считывателем общего пользования BAS-5000 (Fujifilm).

Динамическое светорассеяние

Использовали лазерный анализатор Malvern Mastersizer 2000 (Великобритания). В основе метода лежит лазерная дифракция частиц. Измерения

образцов проводили в водной среде. К небольшому количеству порошка (образца) добавляли 10 мл воды, оставляли перемешиваться на 30 минут на магнитной мешалке. Полученную суспензию переносили в кюветное отделение модуля диспергирования объемом 800 мл, заполненное водой. Далее включали перемешивающее устройство (200 об/мин) и запускали программное обеспечение. Прибор сам оценивал необходимую концентрацию для определения необходимой статистической картины, если концентрация слишком высока, то требуется добавить воды, а если наоборот, то добавить образца. Прибор определяет три среднеобъемных диаметра $d(0,1)$, $d(0,5)$, $d(0,9)$ - средний диаметр 10 %, 50 % и 90 % частиц. Использовали $d(0,5)$.

Инфракрасная спектроскопия

Инфракрасную спектроскопию выполняли на ИК Фурье-спектрометре Thermo Scientific с Nicolet iS5 с использованием приставки НПВО iD5 ATR. Регистрацию проводили в области 550–4000 см⁻¹.

Исследования деградации *in vitro*

Для исследований деградации *in vitro* изготавливали пленки толщиной 400 мкм методом горячего прессования при температурах 190 °С, 150 °С, 180 °С и 80 °С для поли(L, L-лактида), поли(D, L-лактида), поли(L-лактид-со-ε-капролактона) и поли(ε-капролактона), соответственно. Аморфные образцы получали методом закалки в водяной бане. Кристаллический поли(L, L-лактид) получали отжигом аморфных пленок в вакуумном шкафу в течение 1 ч при 120 °С. Степень кристалличности образцов из поли (L, L-лактида) составляет 40% по данным ДСК. Гидролиз проводили в течении 6 месяцев в воде при температуре 37 °С.

Акустическая микроскопия

Исследование микроструктуры композитов и изучение локальных упругих свойств проводили методом импульсной акустической микроскопии на микроскопе SIAM, разработанном в лаборатории акустической микроскопии

ИБХФ РАН [168]. В основе метода лежит применение ультракоротких зондирующих импульсов сфокусированного ультразвука. Зондирующий пучок, частично отражаясь от поверхности образца, проникает вглубь объекта, взаимодействует с элементами внутренней структуры (дефекты, поры, частицы и конгломераты допирующих элементов и т.д.), и дном объекта. Отраженный сигнал принимается тем же акустическим объективом. Приятый сигнал представляется в виде эхоимпульсов, разделенных по времени. Исходя из расстояния между эхоимпульсами и толщины образца, рассчитываются значения скорости распространения продольной и поперечной звуковой волны в материале. Исследования образцов проводились с помощью акустической линзы с рабочей частотой 100 МГц, с угловой апертурой 11°, ширина зондирующего импульса 40 нс.

Исследования деградации *in vivo*

Для исследования *in vivo* была изготовлена большая партия интерферентных винтов (всего 225 штук) из различных полимеров и композитов, отличающихся составом полимерной матрицы, видом наполнителя и степенью наполнения (до 20 вес.%). На первом этапе методом литья под давлением изготавливали цилиндрические заготовки длиной 6 см и диаметром 5 мм, затем обрабатывали их на гравировально-фрезерном станке для получения канюлированного винта диаметром 4 мм и длиной 15 мм, шаг резьбы 1,71 мм (Рисунок 2.1). Стерилизацию проводили гамма-облучением, доза 25 кГр.

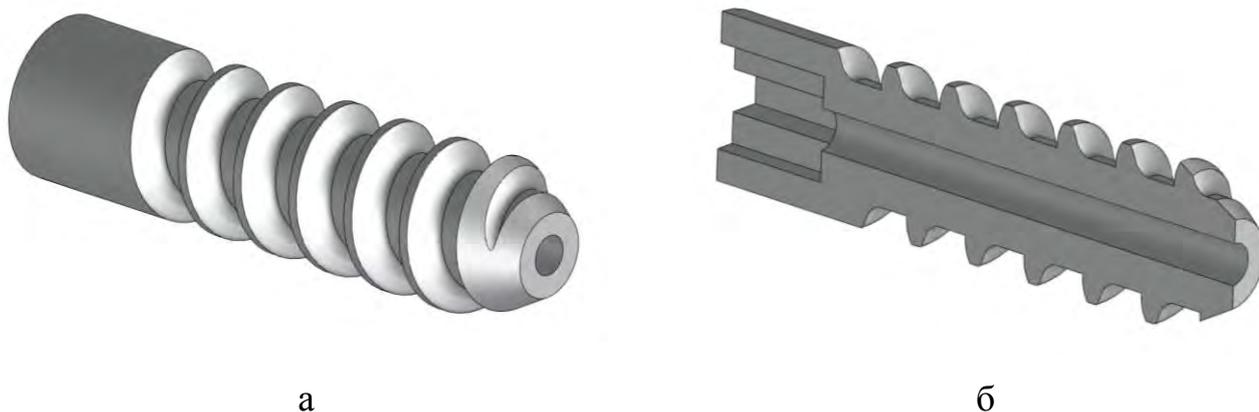


Рисунок 2.1 – Твердотельная модель канюлированного винта: общий вид (а) и продольный разрез (б)

Объектом исследований были овцы в возрасте 8 месяцев. Винты внедряли в метаэпифизарную зону проксимальной части большеберцовой и лучевой костей. Сначала сверлом 3,5 мм высверливается отверстие, далее 4 мм метчиком нарезается резьба и с помощью специально разработанной отвертки вкручивали винт. Исследования проводили на 3 сроках деградации - 3, 6 и 12 месяцев, по 5 винтов на каждый срок каждой серии, итого 15 винтов одного материала.

Животные имели свободный доступ к пище и воде, соответствующие нормативам ГОСТа. Работа выполнена согласно этическим принципам, установленным Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), а также приказу Минздравсоцразвития РФ №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование одобрено Этическим комитетом Российского научного центра «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова.

После вывода животного из эксперимента вырезали проксимальную часть кости, далее с помощью компьютерной томографии устанавливали более локально место имплантации винта, вырезали костный блок для гистологических исследований.

Компьютерная томография

Сканирование исследуемых объектов проходило на базе Ресурсного центра ядерно-физических методов исследований с использованием рентгеновского излучения на 40-срезовом ПЭТ-КТ томографе Siemens Biograph mCT40s. Для всех образцов сканирование проводилось в трёх режимах с напряжением и током на рентгеновской трубке: 140 кВ и 120 А; 100 кВ и 70 А; 80 кВ и 20 А. По результатам сканирования самыми оптимальными параметрами сканирования оказались 140 кВ и 120 А. Пространственное разрешение КТ-изображений объектов по результатам сканирования составляет 0,6мм*0,5мм*0,5мм (размер вокселя). Дополнительно было использовано два режима реконструкции изображений, различающихся по чувствительности контрастирования к костным и мягким тканям.

Гистологические исследования

В процессе пробоподготовки материала для патоморфологического исследования, после формалиновой фиксации фрагменты костей помещали на 60 минут в хлороформ для растворения имплантированных в них полимерных винтов. В дальнейшем образцы костных блоков, полученные через 3 и 6 месяцев после имплантации винтов, подвергались декальцинированию в растворе «Decalcifying Solution-Lite» (Sigma, D0818). Фрагменты костной ткани через 1 год после имплантации винтов декальцинировали в растворе этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). После отмычки образцов от декальцинирующих растворов выполнялась стандартная гистологическая проводка материала на карусельном гистопроцессоре с последующим заключением в парафиновую среду «Гистомикс» (БиоВитрум).

Для гистологических исследований срезы толщиной 5-7 мкм, полученные на микротоме Leica RM2235, после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином. Для изучения структур соединительной ткани препараты окрашивали по Массону с анилиновым синим (БиоВитрум).

Для иммуноокрашивания пролиферирующих клеток на серийных срезах использовали моноклональные мышиные антитела к ядерному антигену пролиферирующих клеток – PCNA (клон PC10, DAKO, 1:400) и набор для выявления мышиных первичных антител (EnVision+System-HRP, DAKO). Субстратную пероксидазу выявляли с использованием диаминобензидина (ДАБ – меченые ядра окрашены в коричневый цвет) (Liquid DAB+, DAKO) или аминоэтилкарбазола (АЭК – меченые ядра окрашены в красный цвет) (AEC+, DAKO). Для визуализации не меченых ядер препараты докрашивали гематоксилином.

Сканированные изображения препаратов с оптическим разрешением не менее 4,000 dpi получали на цифровом сканере «Nikon Super Coolscan 8000 ED» (масштабная линия на сканах = 1 мм). Гистологические препараты изучали под микроскопами Olympus CX41 (Япония) и Leica DM 1000 (Германия) с микрофотосъемкой на цифровую камеру Leica ICC50 HD (Германия). Патоморфологический анализ выполнен с учетом критериев вариантов нормы и патологии.

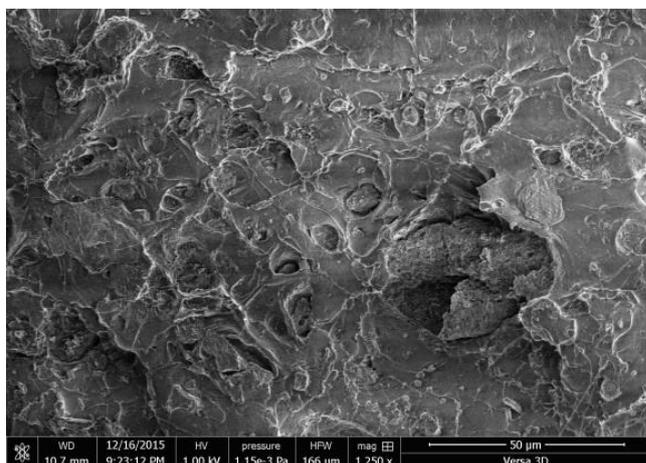
3 Разработка метода получения композиционного материала оптимального состава с высокими механическими свойствами

Как было показано в литературном обзоре, полимерные композиты с кальцийфосфатными наполнителями привлекают особое внимание в качестве перспективных материалов для различных медицинских применений. Основной проблемой большинства подобных композитов является незначительное повышение их физико-механических характеристик, что обусловлено различными причинами, главными из которых являются недостаточная степень диспергирования наполнителя в матрице, связанная со склонностью наноразмерного наполнителя к агрегации, а также слабая адгезия между полимером и кальцийфосфатом. Решение данной проблемы возможно двумя различными способами: путем поиска эффективного метода введения наполнителя в матрицу и увеличения сродства между полимерной матрицей и неорганическим наполнителем. Данная глава посвящена разработке метода смешения композиционного материала с высокой степенью диспергирования наполнителя.

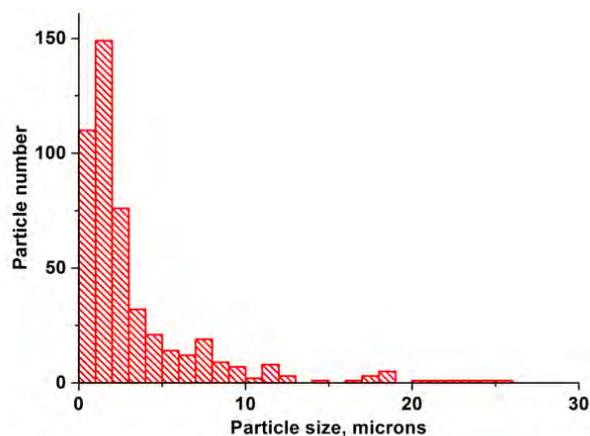
3.1 Влияние условий смешения на степень диспергирования наполнителя

Характер распределения фосфата кальция в полилактидной матрице и обусловленные этим механические и теплофизические характеристики композита зависят от способа получения материала. Смешение в расплаве в двухшнековом экструдере широко используется для создания композитов благодаря своей простоте и доступности. Равномерное распределение наполнителя в полимерной матрице может быть достигнуто путем изменения параметров смешения, например, скорости вращения шнеков, температуры и времени перемешивания.

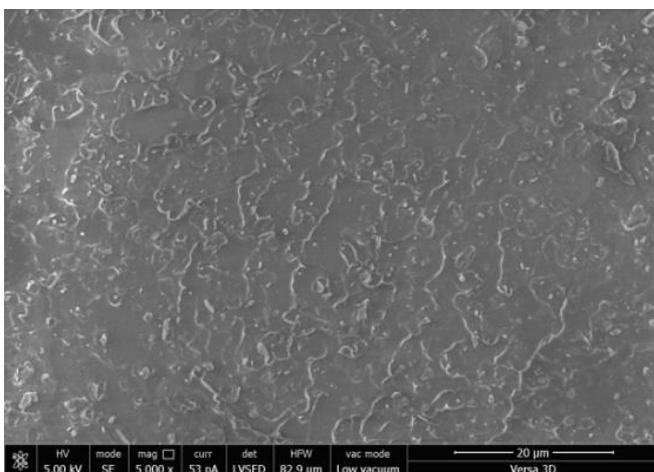
При циклическом непрерывном смешивании поли(L-лактида) и гидроксиапатита в течение 5 минут в композиционном материале наблюдали агрегаты диаметром до 40 мкм и воздушные полости вокруг частиц наполнителя (рисунок 3.1а и 3.1б). Повышение температуры компаундирования и напряжения сдвига не оказало существенного влияния на морфологию композита.



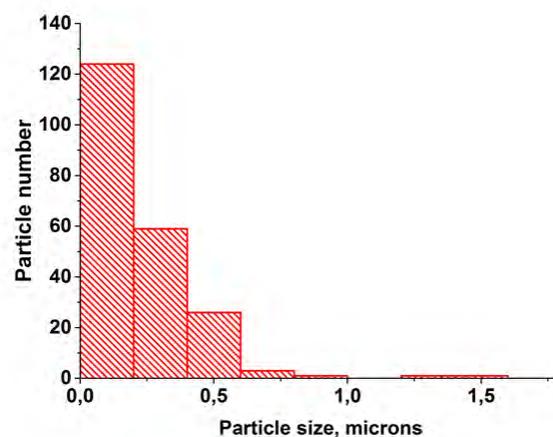
а



б



в



г

Рисунок 3.1 – СЭМ изображение и распределение частиц по размерам композита поли (L-лактид) / гидроксиапатит (5 вес.%), полученного методом циклического непрерывного смешивания (а, б) и трехстадийного смешивания (в, г).

Для улучшения качества перемешивания композиционного материала была изменена методика смешения на многостадийную. Опудренные гранулы полимера загружали в экструдер и перемешиваются в течение 20 секунд. После этого полученный стренг измельчали, подавали в экструдер и снова смешивали, данную процедуру повторяли несколько раз. Влияние количества стадий компаундирования на однородность композита изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии сколов полученных материалов. Было обнаружено, что трехстадийное смешивание приводило к разрушению агрегатов частиц (рисунок 3.1в и 3.1г). Средний диаметр наполнителя в 5 вес.% композите уменьшился до 0,29 мкм, тогда как для циклического непрерывного смешивания он составил 1,78 мкм. Этот эффект можно объяснить тем, что дезагрегация наполнителя происходит в основном в зоне подачи экструдера при взаимодействии наполнителя с твердым полимером [86].

Дальнейшее увеличение количества стадий смешения не приводит к улучшению распределения наполнителя в матрице как в случае 5 вес.%, так и 20 вес.% композитов. В то же время наблюдалось снижение молекулярной массы полимера (таблица 3.1), что могло привести к потере механических свойств. Важно подчеркнуть, что как и циклическое непрерывное смешение, так и трехстадийное приводило к одинаковой потере средневесовой молекулярной массы (до 146 кДа), однако индекс полидисперсности (PDI) был ниже для трехстадийного смешивания.

Таблица 3.1 – Влияние параметров компаундирования на молекулярную массу и распределение наполнителя в композитах полилактид / гидроксиапатит

| Образец | M_w , кДа | PDI | Композит с 5 вес.% содержанием гидроксиапатита | | Композит с 20 вес.% содержанием гидроксиапатита | |
|------------------------------|----------------|------|--|--------------------------------|---|--------------------------------|
| | | | Средний размер частиц наполнителя, мкм | Стандартное отклонение, мкм | Средний размер частиц наполнителя, мкм | Стандартное отклонение, мкм |
| Исходный поли(L-лактид) | 199 | 1,20 | - | - | - | - |
| Циклическое смешение | 146 | 1,52 | 1,78 | 1,39 | 1,48 | 1,20 |
| Одностадийное смешение | 173 | 1,25 | 0,69 | 1,49 | 0,45 | 0,55 |
| Двустадийное смешение | 162 | 1,26 | 0,48 | 0,50 | 0,39 | 0,46 |
| Трехстадийное смешение | 146 | 1,29 | 0,29 | 0,28 | 0,27 | 0,22 |
| Четырехстадийное смешение | 146 | 1,46 | 0,30 | 0,34 | 0,28 | 0,22 |
| Пятистадийное смешение | 135 | 1,55 | 0,29 | 0,30 | 0,27 | 0,24 |

Улучшение распределения наполнителя в полимерной матрице привело к значительному увеличению прочности на изгиб и модуля упругости композитов, полученных трехстадийным способом, по сравнению с циклическим смешением (таблица 3.2). Аналогичные результаты наблюдались и при других концентрациях наполнителя.

Таблица 3.2 – Механические свойства композитов PLLA / гидроксиапатит (5 вес.%), полученных методами циклического непрерывного смешения и многостадийного

| Метод смешения | Модуль при изгибе, ГПа | Прочность при изгибе, МПа |
|------------------|------------------------|---------------------------|
| Циклическое | 4,3±0,2 | 104±4 |
| Одностадийное | 5,8±0,1 | 130±2 |
| Двухстадийное | 6,1±0,3 | 138±4 |
| Трехстадийное | 6,1±0,2 | 138±4 |
| Четырехстадийное | 5,9±0,3 | 133±8 |
| Пятистадийное | 6,1±0,1 | 138±1 |

Таким образом, было установлено, что оптимальным режимом смешения является трехстадийный метод, который обеспечивает высокую однородность и улучшенные механические характеристики композитов. Важно подчеркнуть, что такие улучшенные механические характеристики были достигнуты без какой-либо модификации поверхности наполнителя.

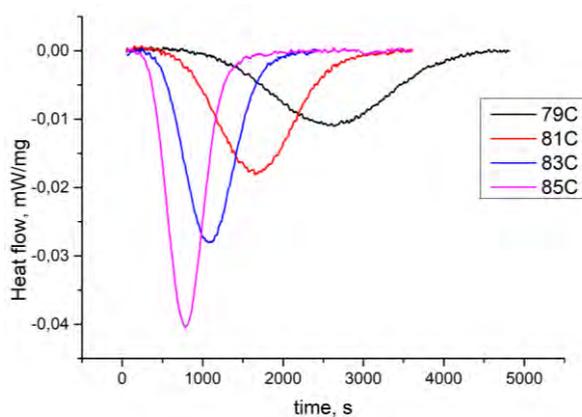
3.2 Исследование кинетики кристаллизации композиционных материалов

Наблюдаемое увеличение механических свойств можно объяснить не только введением жесткого наполнителя, но также увеличением кристалличности полимерной матрицы, а также и изменением взаимодействия матрицы и наполнителя, что определяется как природой наполнителя, так и его содержанием. Поэтому важно отдельно изучить влияние наполнителя на кинетику кристаллизации и кристаллическую структуру полимерной матрицы.

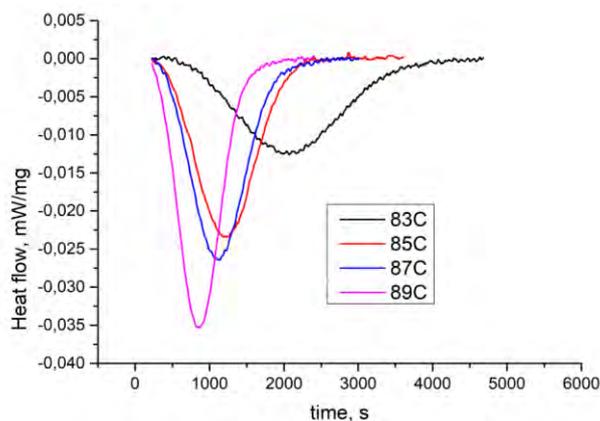
Кинетику кристаллизации исследовали методом дифференциальной сканирующей калориметрии в изотермическом режиме. Для удаления термической истории образца осуществили первый нагрев от 0 °С до 190 °С при скорости нагрева 20 град/мин, после чего образец держали 2 минуты при температуре 190 °С. Далее выполняли баллистическое охлаждение для получения аморфного образца, после этого разогревали образец до выбранной температуры и проводили изотермическую кристаллизацию. Выбор диапазона температур кристаллизации связан с особенностями процесса. При изотермической кристаллизации верхняя граница температурного диапазона определяется возможностью зарегистрировать начало пика кристаллизации, когда полимер начинает кристаллизоваться быстрее, чем прибор выходит на стационарный режим. Нижний предел определяется соотношением сигнал/шум калориметра. Таким образом, для композитов, наполненных гидроксиапатитом, были выбраны температуры для изотермической кристаллизации 79 °С, 81 °С, 83 °С, 85 °С, а для композитов с трикальций фосфатом: 83 °С, 85 °С, 87 °С, 89 °С. Следует отметить, что кристаллизация ненаполненного полилактида в данном температурном диапазоне не наблюдается.

3.2.1 Время полукристаллизации

Были измерены изотермы кристаллизации композитов с различным содержанием наполнителей. В качестве примера на рисунке 3.2 представлены изотермы для образцов с 5 вес.% гидроксиапатита и трикальций фосфата. Для определения времени полукристаллизации строили интегральные кривые, которые получали интегрированием изотерм кристаллизации в пересчете на долю полимера. Полученные значения времени полукристаллизации $t_{1/2}$ в зависимости от температуры представлены на рисунке 3.3.

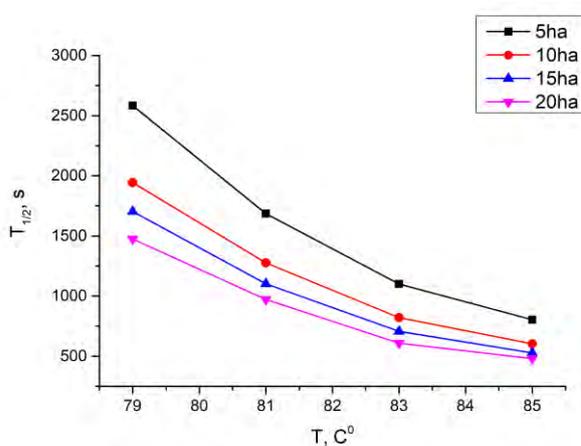


а

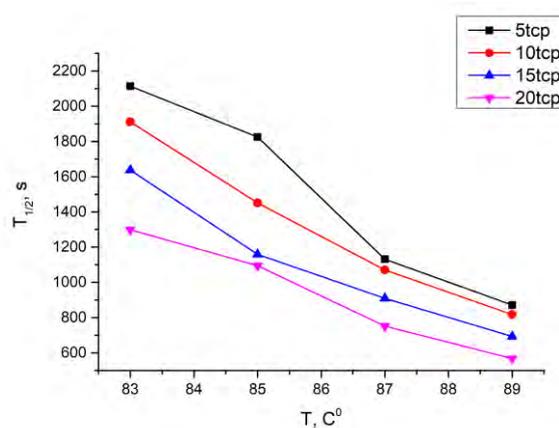


б

Рисунок 3.2 – Изотермы кристаллизации композитов, наполненных 5 вес.% гидроксиапатита (а) и трикальций фосфата(б)



а



б

Рисунок 3.3 – Зависимость времени полукристаллизации $t_{1/2}$ от температуры T для композитов, наполненных гидроксиапатитом (а) и трикальций фосфатом (б). Степень наполнения композитов (5, 10, 15, 20 вес.%) указана на легенде

Независимо от типа наполнителя и степени наполнения в исследуемом температурном диапазоне время полукристаллизации уменьшается в несколько раз с увеличением температуры изотермической кристаллизации. При этом уменьшение времени полукристаллизации наблюдается также при увеличении степени наполнения композита от 5 до 20 вес.% как в случае гидроксиапатита, так и трикальций фосфата, что можно объяснить нуклеирующим эффектом обоих наполнителей.

При одинаковых температурах изотермической кристаллизации (83 °С и 85 °С) и равных степенях наполнения время полукристаллизации полилактида в композитах с гидроксиапатитом меньше, чем в композитах с трикальцийфосфатом. Данное различие может быть объяснено различной морфологией частиц наполнителей. На микрофотографиях (рисунок 3.4) видно, что отдельные частицы гидроксиапатита имеют сферическую форму диаметром 100-200 нм, в то время как частицы трикальцийфосфата вытянуты с соотношением сторон 3: 1 и длиной 160-200 нм.

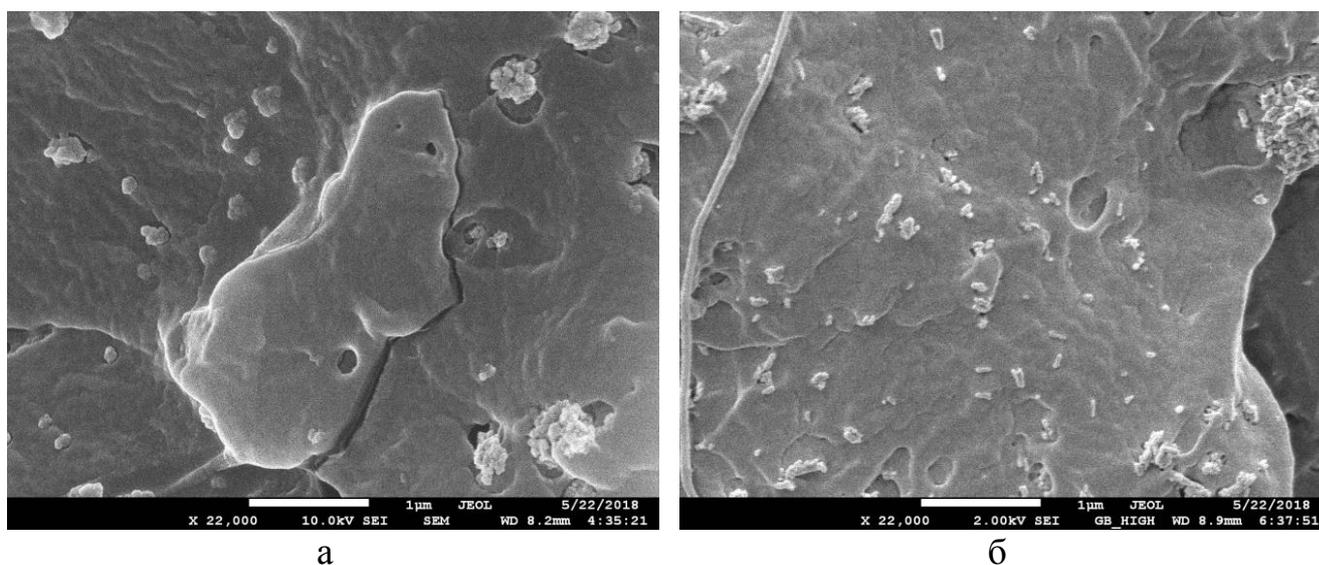


Рисунок 3.4 - Микрофотографии композитов PLLA с 5 вес.% ГА (а) и 5вес.% ТКФ (б). Отдельные частицы гидроксиапатита имеют сферическую форму диаметром 100-200 нм, в то время как частицы трикальцийфосфата вытянуты с соотношением сторон 3: 1 и длиной 160-200 нм.

Для определения степени кристалличности после изотермической кристаллизации образцы охлаждали до комнатной температуры и нагревали до 200 °С при скорости нагрева 20 °С мин⁻¹. На термограммах всех образцов (рисунок 3.5а) наблюдается небольшой экзотермический эффект около 152 °С с последующим эндотермическим эффектом, связанным с плавлением кристаллической фазы полилактида. Вероятно, экзоэффект соответствует рекристаллизации дефектной α' -фазы PLLA, хотя в некоторых работах его относят к фазовому переходу α' в α [169,170].

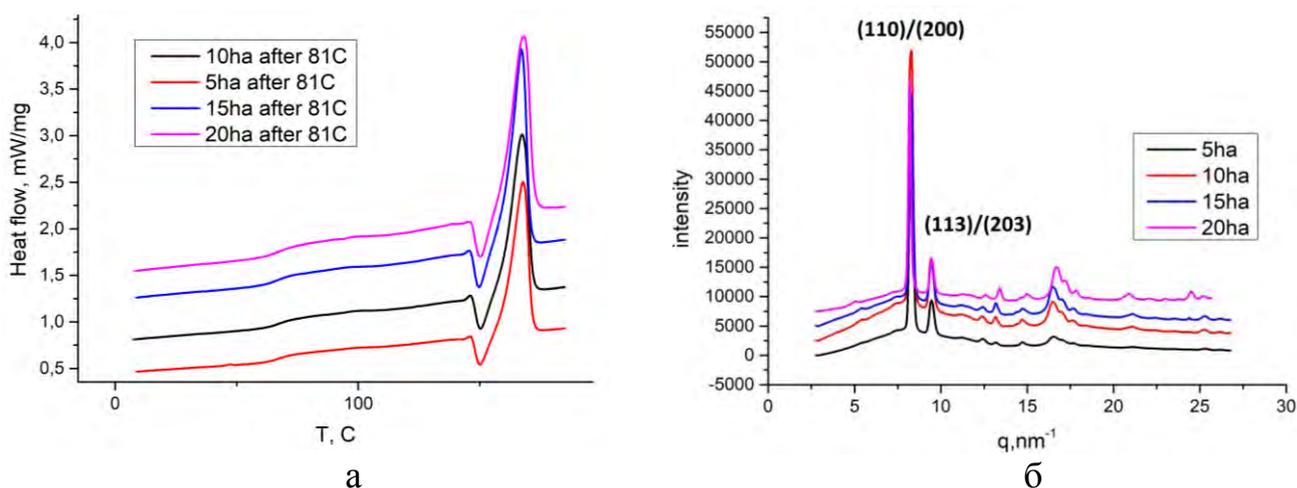


Рисунок 3.5 – Термограммы ДСК (а) и рентгенограммы (б) композитов, наполненных 5-20 вес.% гидроксиапатита

Значения степени кристалличности α , представленные в таблице 3.3, вычисляли по формуле:

$$\alpha = \Delta H_m / \Delta H_{m100\%},$$

где энтальпии плавления ΔH_m являются результатом вычитания экзотермического эффекта из эндотермического эффекта плавления, отнормированного на содержание полимера. Энтальпия плавления 100%-кристаллического полилактида принимали равной $\Delta H_{m100\%} = 93$ Дж/г [171]. Кристалличность составляет около 40% для всех образцов, таким образом, наполнитель не препятствует кристаллизации даже при содержании 20 вес.%.

Таблица 3.3 – Степень кристалличности полилактида в составе композитных материалов, определенная из значений энтальпии плавления

| Образец | Кристалличность по данным ДСК, % |
|---------|----------------------------------|
| 5ГА | 38±3 |
| 10ГА | 38±3 |
| 15ГА | 39±3 |
| 20ГА | 38±3 |
| 5ТКФ | 36±3 |

| | |
|-------|------|
| 10ТКФ | 37±3 |
| 15ТКФ | 39±3 |
| 20ТКФ | 38±3 |

3.2.2 Константа Аврами и экспонента Аврами

Как было показано выше, для понимания механизма кристаллизации важно знать экспоненту Аврами, которая характеризует тип зародышеобразования и геометрию роста кристалла, и константу скорости Аврами – температурный параметр, отражающий скорость роста кристалла. Для определения кинетических параметров k и n , первоначально необходимо рассчитать относительную кристалличность композита. Зависимость этой величины от времени соответствует нормированной интегральной кривой (Рисунок 3.6).

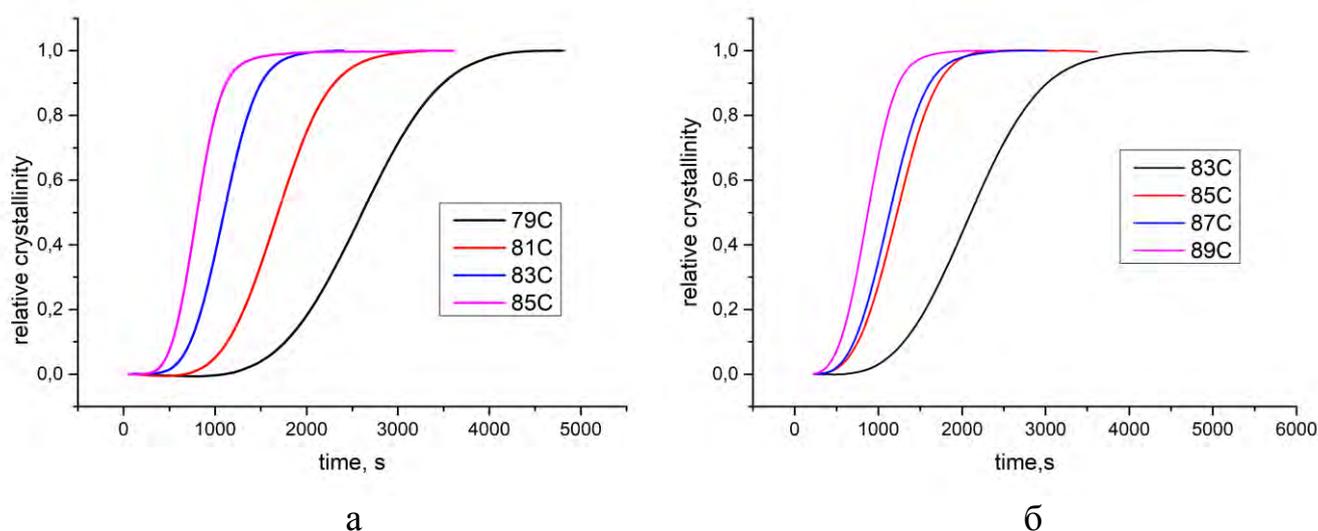


Рисунок 3.6 – Интегральные кривые кристаллизации композитов, содержащих 5 вес.% гидроксиапатита (а) и трикальций фосфата (б)

Чтобы определить значения параметров уравнения Аврами n и k , уравнение Аврами можно представить в следующем виде:

$$\ln(-\ln(1 - X_t)) = \ln k + n \ln t$$

где X_t – функция относительной кристалличности образца. Построение графика в координатах $\ln(-\ln(1 - X_t))$ от $\ln t$ дает прямую с углом наклона n .

Значение k определяется как точка пересечения прямой с осью Y . На рисунке 3.7 показана зависимость между $\ln(-\ln(1 - X_t))$ и $\ln t$ для композитов, содержащих 10 вес.% гидроксиапатита и 10 вес.% трикальций фосфата, при температурах изотермической кристаллизации в соответствии с выбранным диапазоном.

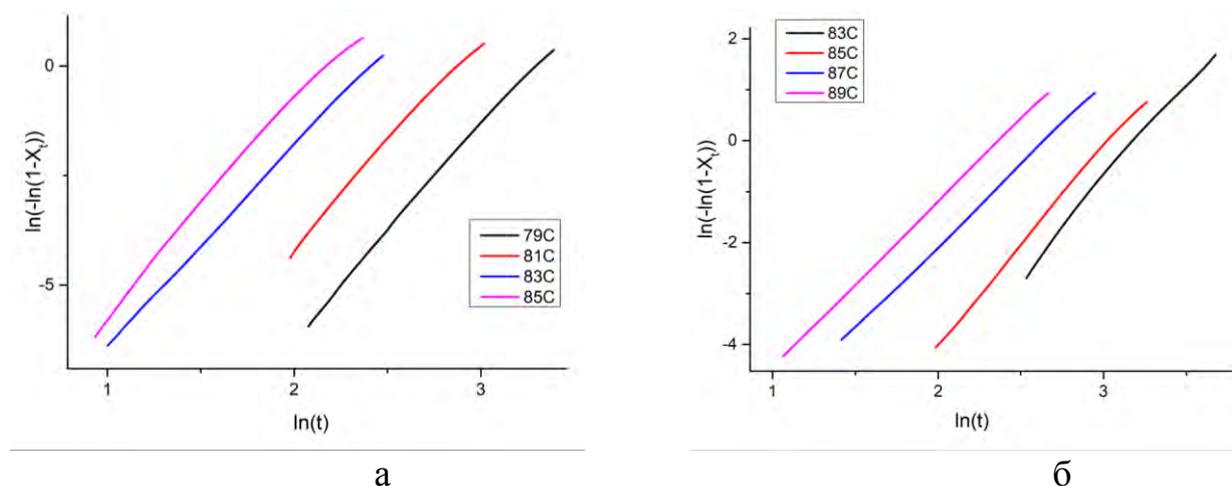


Рисунок 3.7 – Графики в координатах Аврами изотермической кристаллизации полилактида в композитах, наполненных 10 вес.% гидроксиапатита (а) и 10 вес.% трикальций фосфата (б)

Из линейного приближения экспериментальных кривых, были получены значения $\ln k$ и n для всех образцов (Таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Значения логарифма константы скорости кристаллизации k и показателя Аврами n для композиционных материалов, наполненных гидроксиапатитом и трикальций фосфатом

| Наполнитель | Температура кристаллизации | Степень наполнения | | | | | | | |
|-------------|----------------------------|--------------------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|-----|
| | | 5% | | 10% | | 15% | | 20% | |
| | | $\ln k$ | n | $\ln k$ | n | $\ln k$ | n | $\ln k$ | n |
| ГА | 79 °C | -14 | 3,1 | -13 | 3,2 | -11 | 3,2 | -10 | 3,8 |
| | 81 °C | -14 | 3,6 | -12 | 2,9 | -10 | 3,2 | -7 | 3,2 |
| | 83 °C | -12 | 3,2 | -11 | 3,5 | -10 | 3,4 | -6 | 3,6 |

| | | | | | | | | | |
|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 85 °С | -11 | 3,7 | -10 | 3,3 | -9 | 3,0 | -7 | 2,9 |
| ТКФ | 83 °С | -12 | 2,9 | -12 | 2,7 | -11 | 3,1 | -11 | 3,2 |
| | 85 °С | -11 | 2,7 | -11 | 2,9 | -10 | 3,1 | -10 | 3,0 |
| | 87 °С | -11 | 3,3 | -10 | 3,3 | -10 | 2,9 | -9 | 2,7 |
| | 89 °С | -10 | 3,3 | -10 | 3,1 | -9 | 3,3 | -9 | 3,2 |

Параметр n характеризует тип зародышеобразования и размерность растущих кристаллов. На значения n влияют различные факторы, такие как механизм зародышеобразования, плотность зародышеобразования, форма роста кристаллов, ограничение образования кристаллов из-за окружающих наполнителей. Как в случае наполнения композита трикальций фосфатом, так и в случае наполнения гидроксиапатитом значения параметра n лежат в диапазоне от 3 до 4 без явной зависимости от температуры или степени наполнения, что хорошо соответствует модели гетерофазного зародышеобразования и трехмерному линейному росту

Константа скорости k определяется балансом двух факторов: скорости зародышеобразования и скорости роста кристаллов. Первая увеличивается с переохлаждением, а вторая уменьшается. Для всех композитов значение $\ln k$ увеличивается с ростом температуры, что отвечает росту скорости кристаллизации. При этом для фиксированной температуры значение $\ln k$ увеличивается с ростом доли неорганического наполнителя в полимерной матрице, что также указывает на нуклеирующий эффект этого наполнителя. Исключение составляет только композит с 20 вес.%-содержанием гидроксиапатита, что связано с его высокой скоростью кристаллизации при которой сложно зарегистрировать начало пика кристаллизации. Значения кинетического параметра k варьируются в диапазоне от $8,3 \cdot 10^{-7}$ до $2,5 \cdot 10^{-3}$. В работе [128] рассматривают схожий композит на основе поли(L-лактида), наполненный карбонатзамещённым гидроксиапатитом. Значения k лежат в

диапазоне от $7.94 \cdot 10^{-6}$ до $3.16 \cdot 10^{-3}$, однако исследования проводились в другом температурном диапазоне.

Можно сделать вывод, что добавление гидроксиапатита ускоряет кристаллизацию PLLA сильнее, чем добавление трикальцийфосфата, и увеличение содержания наполнителя с 5 до 20 вес.% ускоряет кристаллизацию из-за увеличения числа зародышей кристаллизации. Разница в кинетике кристаллизации имеет решающее значение и должна учитываться при приготовлении композитов PLLA с различными наполнителями и концентрациями.

3.3. Физико-механические характеристики полученных композитов

Важнейшим параметром при создании композиционного материала является оптимальная степень наполнения полимерной матрицы. При уменьшении размера частиц наполнителя увеличивается его удельная площадь поверхности, и существенные изменения механических свойств композита могут наблюдаться при меньших степенях наполнения [89]. Учитывая склонность нанодисперсного гидроксиапатита к агрегации, создание композиционного материала со степенью наполнения более 20 вес.% является сложной задачей.

Для изучения эффекта наполнения и оптимизации содержания наполнителя были получены композиты с концентрацией 1,5; 5; 10 и 20 вес.%. Из рисунка 3.8 видно, что модуль изгиба увеличивается от $3,8 \pm 0,1$ ГПа для ненаполненного PLLA до $6,3 \pm 0,6$ ГПа для композита с 20 вес.% гидроксиапатита. Прочность на изгиб имеет максимум 141 ± 6 МПа при содержании наполнителя 5 вес.%. Противоположный эффект наблюдался в аналогичном исследовании Ferri с соавторами [173]. Было обнаружено снижение прочности на изгиб с 108 МПа для чистого PLLA до 90 МПа для композита PLLA-5%HA, в то время как модуль увеличился с 3,3 ГПа только до 3,6 ГПа. Снижение прочности, вероятно, связано с образованием полостей и агрегатов, что характерно для одностадийного

смешивания. Таким образом, предлагаемая многостадийная методика является более эффективным способом смешения, обеспечивающим значительное увеличение как прочности, так и модуля при содержании наполнителя всего 5 мас.%.

Как было показано в разделе 3.2, наполнитель обладает сильным нуклеирующим эффектом. Приготовление полностью аморфных композитных образцов было невозможно из-за высокой скорости кристаллизации. Даже закалка в воду со льдом не подавляла кристаллизацию матрицы в композитах с высокой концентрацией наполнителя. Кристалличность увеличивается при увеличении содержания наполнителя (таблица 3.5). Можно отметить, что значения кристалличности, измеренные методами ДСК и РСА, близки друг к другу. Таким образом, увеличение модуля может быть вызвано как введением жесткого наполнителя, так и увеличением степени кристалличности полимерной матрицы. Дополнительные исследования были проведены для разделения этих двух эффектов.

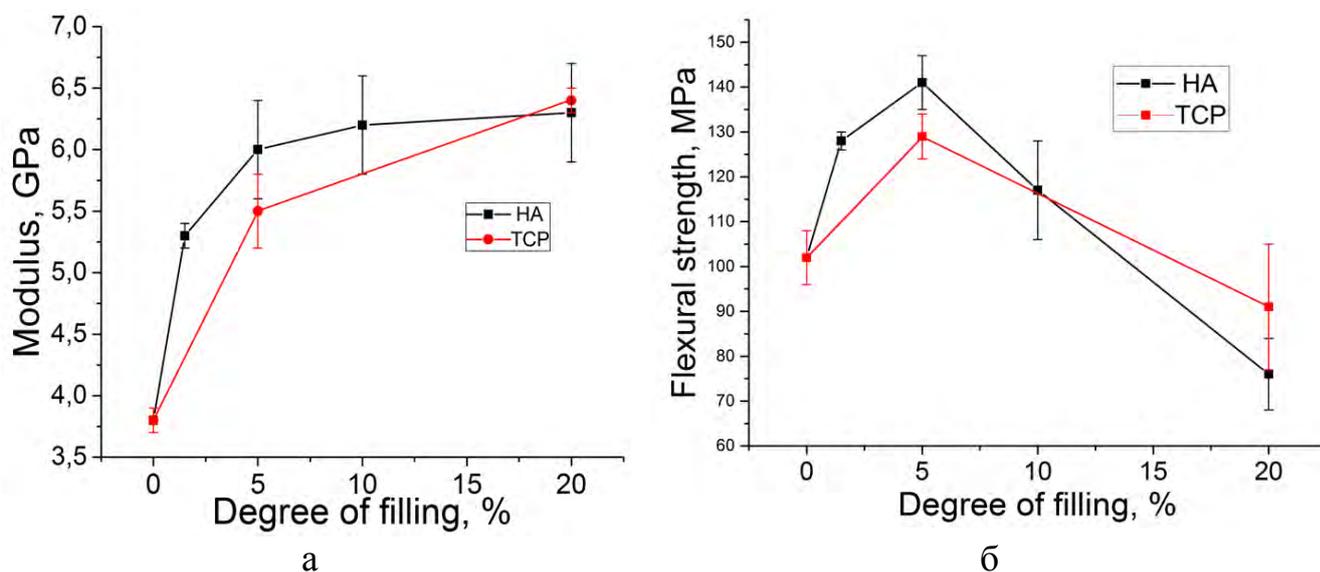


Рисунок 3.8 – Влияние степени наполнения композиционного материала на модуль (а) и прочность при испытаниях на изгиб (б) композитов PLLA / HA и PLLA / TCP.

Таблица 3.5 – Степень кристалличности полученных образцов из композиционных материалов с различной степенью наполнения

| Образец | Кристалличность (ДСК), % | Кристалличность (РСА), % |
|------------|--------------------------|--------------------------|
| PLLA | < 5 | < 3 |
| PLLA-1.5HA | 15 | 10 |
| PLLA-5HA | 25 | 23 |
| PLLA-10HA | 32 | 31 |
| PLLA-20HA | 20 | 23 |
| PLLA-5TCP | 10 | 8 |
| PLLA-20TCP | 6 | 7 |

Для получения образцов с одинаковой кристалличностью их отжигали при 140°C в течение одного часа в вакуумном шкафу. Степень кристалличности $\alpha = 40 \pm 3\%$ была достигнута независимо от концентрации и типа наполнителя. Как показано в таблице 3.6, модуль изгиба отожженных образцов увеличивается с увеличением содержания наполнителя. Например, модуль чистого полилактида составляет $6,0 \pm 0,1$ ГПа, а для композита с 20 вес.% гидроксиапатита равен $7,0 \pm 0,1$ ГПа. Поскольку кристалличность образцов одинакова, этот эффект напрямую связан с введением жесткого наполнителя. Прочность на изгиб демонстрирует тенденцию к увеличению при добавлении 5 вес.% гидроксиапатита или трикальцийфосфата. Увеличение содержания наполнителя до 20 вес.% приводит к повышению хрупкости образцов, что сопровождается снижением прочности. Таким образом, установлено, что для образцов с максимальной кристалличностью вклад наполнителя в увеличение модуля упругости при изгибе составляет 0,3-1 ГПа в зависимости от содержания и типа наполнителя.

Таблица 3.6 – Механические характеристики отожженных образцов с одинаковой кристалличностью полимерной матрицы и различным содержанием наполнителя (степень кристалличности $40 \pm 3\%$)

| Образец | Модуль при изгибе, ГПа | Прочность при изгибе, МПа | Деформация, % |
|------------|------------------------|---------------------------|---------------|
| PLLA | $6,0 \pm 0,1$ | 134 ± 10 | $2,9 \pm 0,4$ |
| PLLA-5HA | $6,3 \pm 0,1$ | 140 ± 3 | $3,5 \pm 0,3$ |
| PLLA-20HA | $7,0 \pm 0,1$ | 92 ± 4 | $1,5 \pm 0,1$ |
| PLLA-5TCP | $6,3 \pm 0,6$ | 144 ± 8 | $4,3 \pm 0,2$ |
| PLLA-20TCP | $6,8 \pm 0,1$ | 111 ± 6 | $2,0 \pm 0,2$ |

Тем не менее было важно изучить, отличается ли эффект наполнителя для образцов с более низкими значениями кристалличности. Путем отжига в течение разного времени были получены образцы ненаполненного PLLA с различной степенью кристалличности. Механические свойства этих образцов представлены на рисунке 3.9. Как модуль, так и прочность на изгиб значительно возрастают с увеличением степени кристалличности.

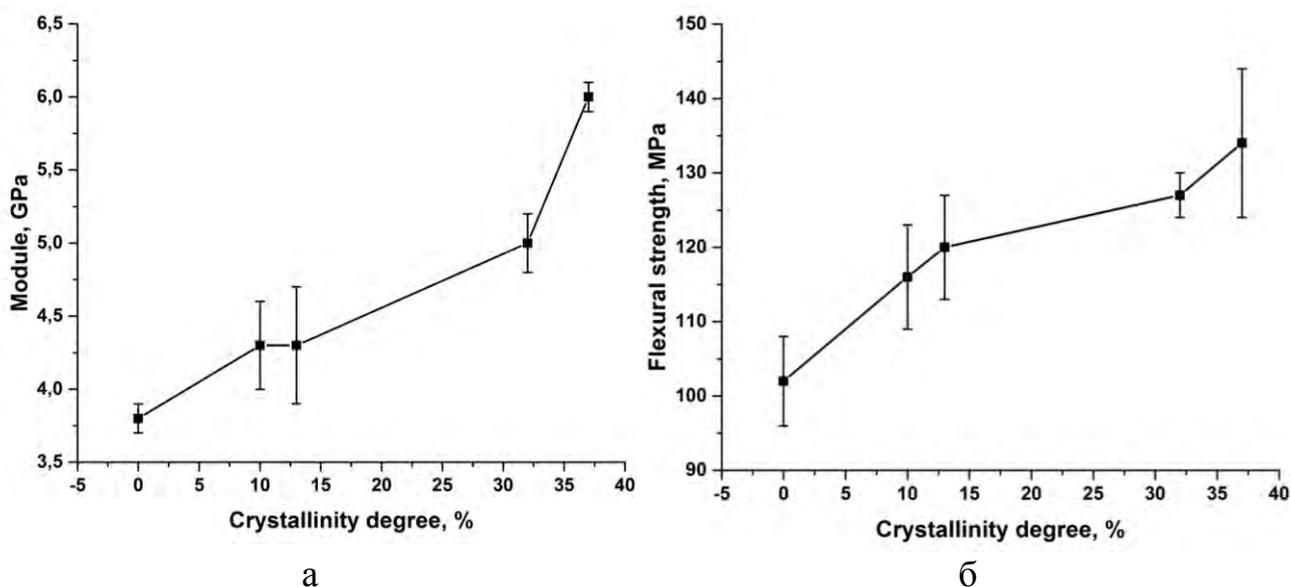


Рисунок 3.9 – Влияние кристалличности ненаполненного поли (L-лактида) на модуль упругости (а) и прочность на изгиб (б)

Сопоставляя механические свойства композитов и ненаполненного PLLA с близкой кристалличностью, не трудно видеть, что для образцов с 12% кристалличностью введение 1,5 вес.% гидроксиапатита приводит к увеличению модуля с $4,3 \pm 0,4$ ГПа только до $5,3 \pm 0,1$ ГПа. Максимальная прочность на изгиб, равная 141 ± 6 МПа была достигнута при 5 вес.% содержании гидроксиапатита, степень кристалличности $\alpha = 24\%$, в то время как для ненаполненного PLLA с той же степенью кристалличности она составляла приблизительно 125 МПа. Таким образом, можно сделать вывод, что увеличение механических характеристик обусловлено не только введением жесткого наполнителя, но и увеличением степени кристалличности полимерной матрицы.

Изученное влияние наполнителей и кристалличности на механические свойства композита позволяет создавать биоразлагаемые материалы с заданными свойствами. Идеальный имплантат для фиксации кости должен иметь механические свойства, равные характеристикам нативной костной ткани. Металлические крепежные изделия с гораздо более высоким модулем упругости часто являются причиной остеолита. При этом низкий модуль может привести к ненадежной фиксации костных отломков. Для оценки верхнего предела

требуемого модуля и прочности были измерены механические характеристики кортикальной кости бедра свиньи и голени коровы (Рисунок 3.10).

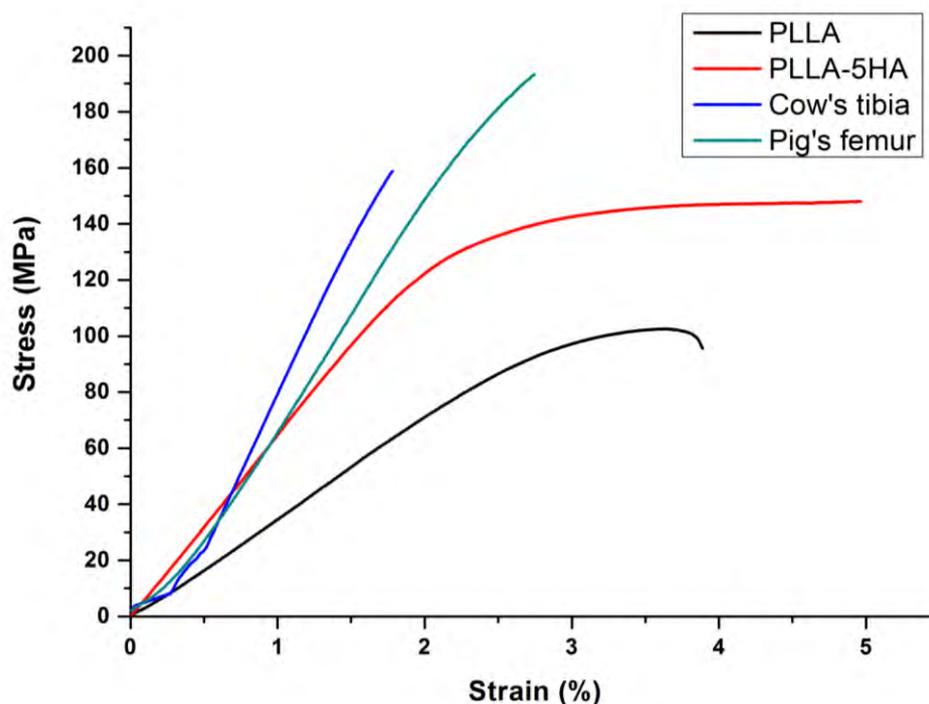


Рисунок 3.10 - Кривые деформации полилактида, композита с 5% гидроксиапатита и кортикальной кости бедра свиньи и голени коровы

Как можно видеть, композитный материал PLLA-5HA, содержащий 5 вес.% гидроксиапатита, демонстрирует модуль, подобный кортикальной ткани и немного более низкую прочность. Все же эти характеристики намного выше, чем в ненаполненном поли(L-лактиде). Дальнейшее увеличение прочности композита может быть достигнуто путем увеличения адгезионной связи наполнитель-полимер и ориентации полимера в процессе изготовления имплантата.

3.4 Увеличение совместимости наполнителя и полимерной матрицы

Как физико-механические свойства, так и способность к биоразложению композиционного материала во многом определяются характером распределения наполнителя в полимерной матрице. Различные методы синтеза фосфатов кальция

позволяют получить наноразмерные частицы. Однако сохранение высокой дисперсности наполнителя при получении композиционного материала является весьма трудной задачей из-за склонности наночастиц к образованию агрегатов, что негативно сказывается на прочностных характеристиках композита. Различие природы гидрофильного гидроксиапатита и гидрофобного полилактида также способствует агрегации частиц наполнителя. Увеличить смачиваемость наполнителя полимерной матрицей возможно путем повышения температуры смешения. Данный способ ограничен температурой деструкции полимера. Другой способ состоит в увеличении сродства наполнителя к полимерной матрице путем модификации поверхности наполнителя. При этом адгезионная связь должна быть достаточно прочной для передачи нагрузок от матрицы к наполнителю и одновременно не излишне прочной, чтобы наполнитель не отслаивался от матрицы, что подавляет диссипацию энергии и приводит к хрупкости материала [24]. В литературном обзоре показано, что существующие способы модификации имеют ряд недостатков, основными из которых являются низкая технологичность, а также использование токсичных катализаторов, которые необходимо будет удалять в случае биомедицинского применения материала.

Как видно из анализа литературы, диспергирование наполнителя при модификации крайне важно для предотвращения агрегации частиц [58]. Нами в качестве дисперсионной среды были использованы вода, ацетон, хлороформ и этанол. К порошку гидроксиапатита массой 0,3 г добавляли 50 мл растворителя и перемешивали магнитной мешалкой. Быстрее всего гидроксиапатит выпал в осадок из взвеси в хлороформе и в воде, однако во всех образцах визуально наблюдались крупные агрегаты частичек гидроксиапатита. Было выдвинуто предположение, что возможно перемешивания на магнитной мешалке недостаточно для разрушения агрегатов гидроксиапатита.

Для лучшего диспергирования наполнителя полученную взвесь подвергали воздействию ультразвука с помощью ультразвукового щупа на протяжении 10 мин, затем наблюдали за скоростью седиментации гидроксиапатита. Как и в

предыдущем опыте наименее стабильными оказались взвеси гидроксиапатит-хлороформ и гидроксиапатит-вода, частицы гидроксиапатита выпадали в осадок практически мгновенно и взвеси становились почти прозрачными с редкими крупными агрегатами частиц гидроксиапатита. Для количественной оценки качества дисперсионной среды измеряли массу выпавшего осадка через сутки (Таблица 3.7). Меньшая скорость седиментации частиц наблюдалась во взвесах в ацетоне и в этаноле, растворы долгое время оставались мутными. Однако спустя 24 часа количество осадка в ацетоне увеличилось, а в этаноле осталось практически неизменным.

Таблица 3.7 – Сравнение различных дисперсионных сред гидроксиапатита

| Дисперсионная среда | Доля выпавшего осадка через сутки, % | Цвет супернатанта |
|---------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Этанол | 27 | С опалесценцией |
| Ацетон | 75 | Молочный |
| Хлороформ | 86 | Почти прозрачный (мгновенно) |
| Вода | 85 | Почти прозрачный (мгновенно) |

Порошок гидроксиапатита, диспергированный в этаноле, высушивали в вакуумном шкафу в течение суток при комнатной температуре для удаления этанола. Порошковое светорассеяние исходного гидроксиапатита и диспергированного в этаноле, показало, что частицы последнего имеют меньший размер по сравнению с частицами исходного. Среднеобъемный диаметр 50% частиц уменьшился при этом с 9,2 мкм до 4,7 мкм. Таким образом, в качестве диспергирующей среды был выбран этанол.

Модификацию гидроксиапатита проводили 10-50 % растворами молочной кислоты в этаноле (Таблица 3.8). Агрегаты частиц разбивали с помощью ультразвукового щупа в течение 10 минут.

Таблица 3.8 – Образцы модифицированного гидроксиапатита

| Образец | Гидроксиапатит,г | Этанол, мл | Молочная кислота, мл |
|---------|------------------|------------|----------------------|
| ГА-МК0 | 5 | 50 | – |
| ГА-МК10 | 5 | 45 | 5 |
| ГА-МК20 | 5 | 40 | 10 |
| ГА-МК30 | 5 | 35 | 15 |
| ГА-МК50 | 5 | 25 | 25 |

Для удаления непрореагировавшей молочной кислоты, полученный гидроксиапатит центрифугировали в течение 15 мин в ультрацентрифуге при перегрузке 80 000 g. После центрифугирования удаляли супернатант и добавляли равное количество этанола. Процесс повторяли 6-8 раз, добиваясь степени разбавления не менее 6000 раз. Отсутствие молочной кислоты в супернатанте подтверждали с помощью ИК-спектроскопии по уменьшению интенсивности полос колебаний карбонильных групп молочной кислоты ($1740-1720\text{ см}^{-1}$) и гидроксильных групп ($1140-1120\text{ см}^{-1}$) (Рисунок 3.11). После того как в ИК-спектре супернатанта оставались только пики этанола, полученный осадок высушивали в вакуумном шкафу в течение суток при комнатной температуре для удаления оставшегося этанола.

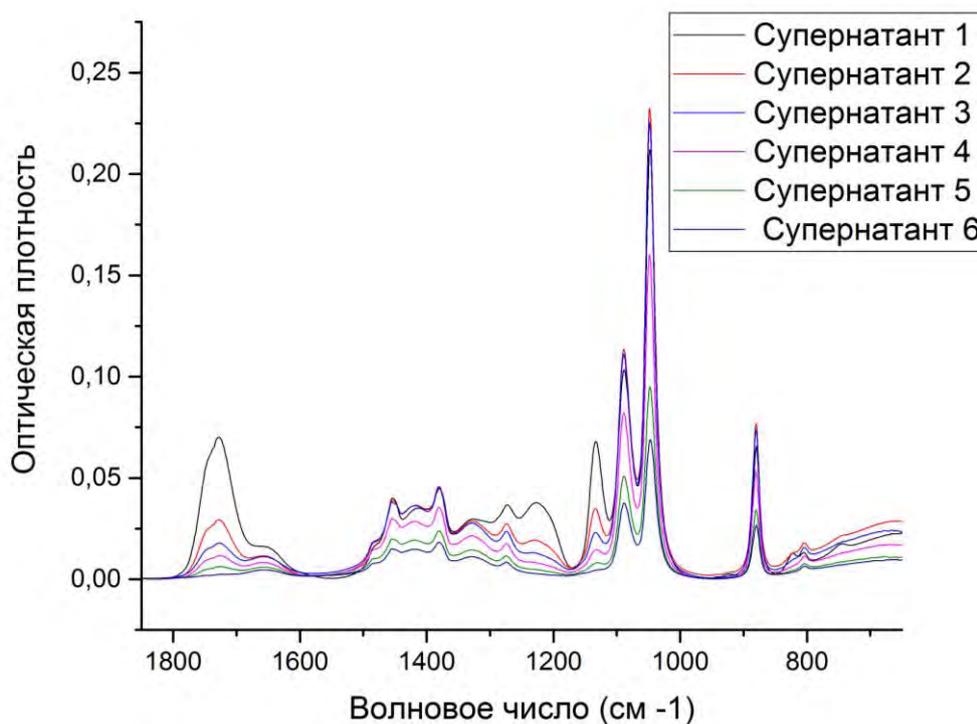


Рисунок 3.11 – Изменение ИК-спектров супернатантов при увеличении количества центрифугирований

Для качественного обнаружения наличия прививки молочной кислоты изучали ИК-спектры полученных порошков (Рисунок 3.12). На всех спектрах наблюдаются полосы, характерные для фосфатов кальция, такие как деформационные колебания ($550\text{--}605\text{ см}^{-1}$) и валентные ($960\text{--}1200\text{ см}^{-1}$) колебания фосфатных групп. Слабые полосы в области $1550\text{--}1600\text{ см}^{-1}$ характерны для колебаний карбоксилат-ионов --COO^- . В модифицированном 50% раствором молочной кислоты гидроксиапатите отмечены полосы в области $2750\text{--}2900\text{ см}^{-1}$, относящиеся к валентным колебаниям метильных групп (C–H) [59], а также полоса при $800\text{--}900\text{ см}^{-1}$, относящаяся к PO_4^{3-} . Полосы в диапазоне $3500\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ относятся к гидроксильной группе, содержащейся в молочной кислоте.

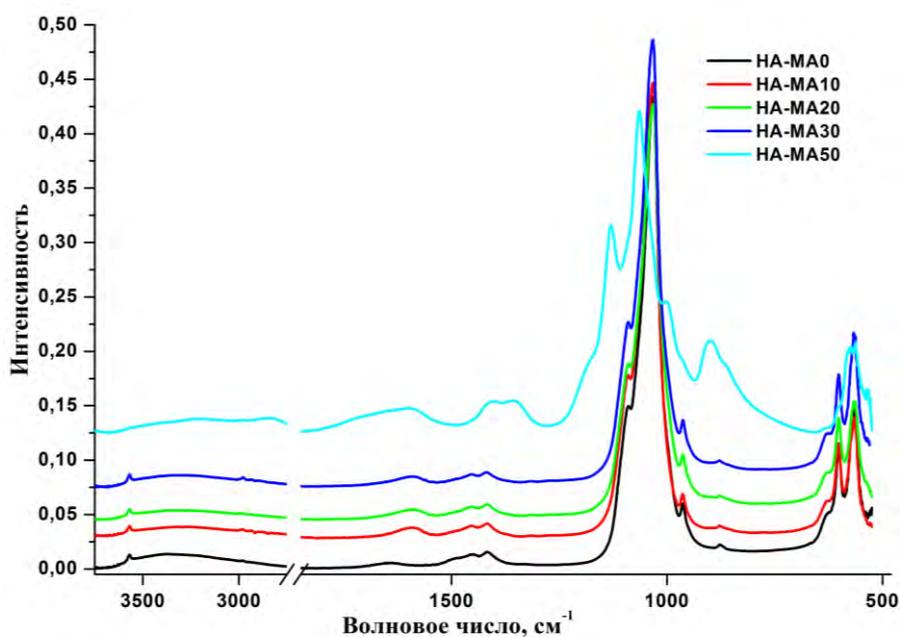


Рисунок 3.12 – ИК-спектры исходного гидроксиапатита (HA-MA0) и гидроксиапатитов, модифицированных 10-50% растворами молочной кислоты в этаноле

Уменьшение интенсивности колебаний в диапазоне $1450-1400\text{ см}^{-1}$, относящихся к группе $-\text{OH}$ гидроксиапатита, свидетельствует о том, что поверхностное взаимодействие гидроксиапатита с молочной кислотой происходит по гидроксильной группе. Полосы в диапазоне $1650-1550\text{ см}^{-1}$ свидетельствуют о присутствии карбоксилат-ионов в образце. Поскольку вся несвязанная молочная кислота была удалена, то можно сделать заключение о наличии привитой молочной кислоты.

На основании вышесказанного можно предположить реакцию взаимодействия, представленную на рисунке 3.13.

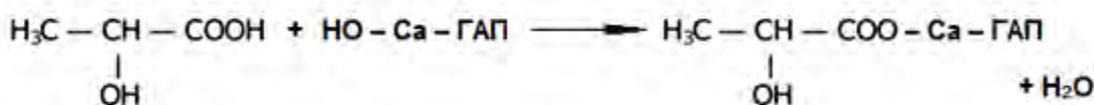


Рисунок 3.13 – Реакция взаимодействия гидроксиапатита с молочной кислотой [59].

Для подтверждения данной реакции проводили рентгеноструктурный анализ. Образцы, модифицированные 10, 20 и 30% раствором молочной кислоты, полностью соответствуют структуре гидроксиапатита (Рисунок 3.14), тем самым подтверждая реакцию на рисунке 3.13.

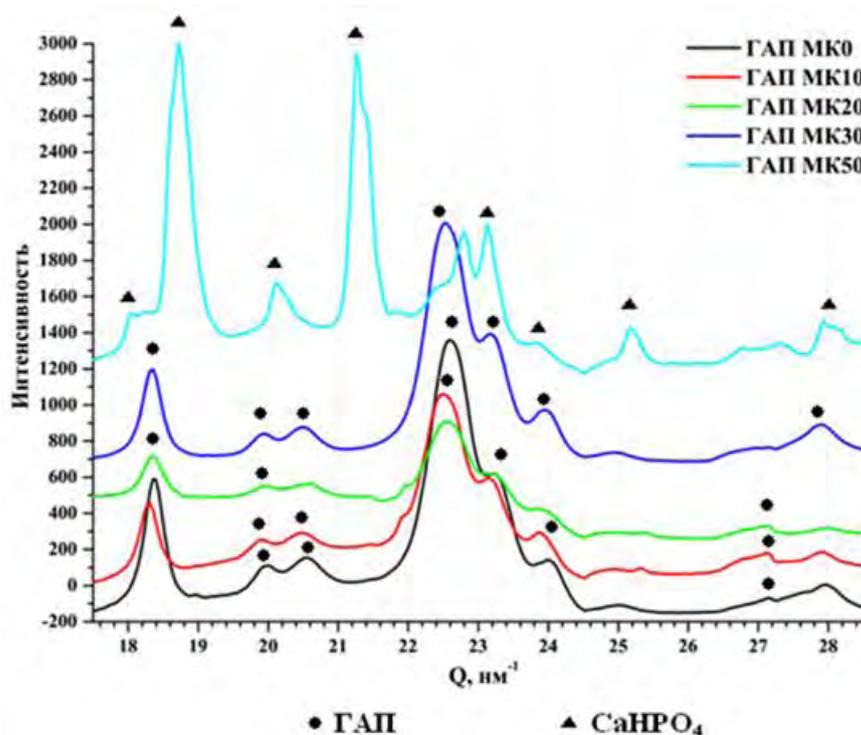


Рисунок 3.14 – Кривые распределения интенсивности рентгеновского рассеяния модифицированных порошков гидроксиапатита

В образце ГАП-МК50, модифицированном 50% раствором молочной кислоты, произошли структурные изменения. Пики на рентгенограмме соответствуют гидрофосфату кальция [60]. На основании полученных данных можно записать реакцию образования лактата кальция и гидрофосфата кальция в процессе модификации образца ГАП-МК50 (Рисунок 3.15). Пик, относящийся к лактату кальция, находится в области 15 нм^{-1} , поэтому на рентгенограмме не виден.

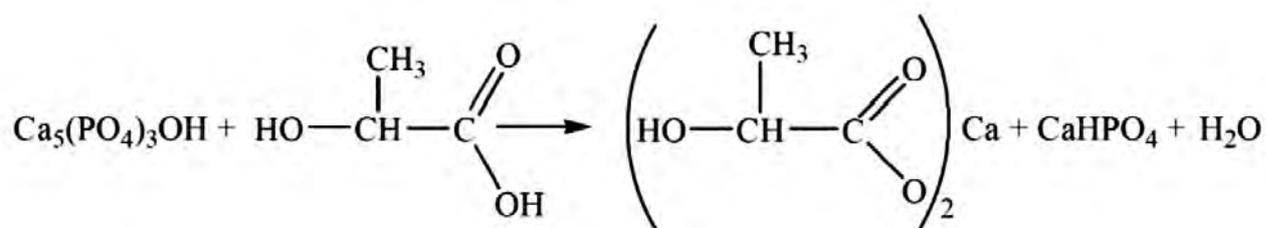


Рисунок 3.15 – Реакция взаимодействия гидроксиапатита и молочной кислоты с образованием гидрофосфата [59]

Количество прореагировавшей молочной кислоты определяли с помощью термогравиметрического анализа (Рисунок 3.16). Для предотвращения артефактов, связанных с изменением массы образца вследствие уноса порошка гидроксиапатита потоком аргона, измерения проводили в алюминиевых чашках. На всех образцах наблюдается потеря воды при нагревании до 200 °С. Наибольшая степень прививки за вычетом 2 вес.% сорбированной воды равная 3 вес.% достигнута в образце, модифицированном 30% раствором молочной кислоты, а в порошках, модифицированных 10% и 20% растворами, количество молочной кислоты одинаковое и равно 2,5%, однако в образце ГА-МК10 немного меньше сорбированной воды. На ИК-спектрах модифицированных порошков после термогравиметрического анализа отсутствуют полосы в диапазоне 1650-1550 см⁻¹, спектры идентичны спектрам исходного гидроксиапатита. Тем самым подтверждается, что вся привитая молочная кислота была удалена. Иная ситуация наблюдается в образце ГАП-МК50, в котором наблюдается потеря 0,5% сорбированной воды при нагревании до 200 °С. Дальнейшее уменьшение массы на 8,5% происходит из-за деструкции лактата кальция.

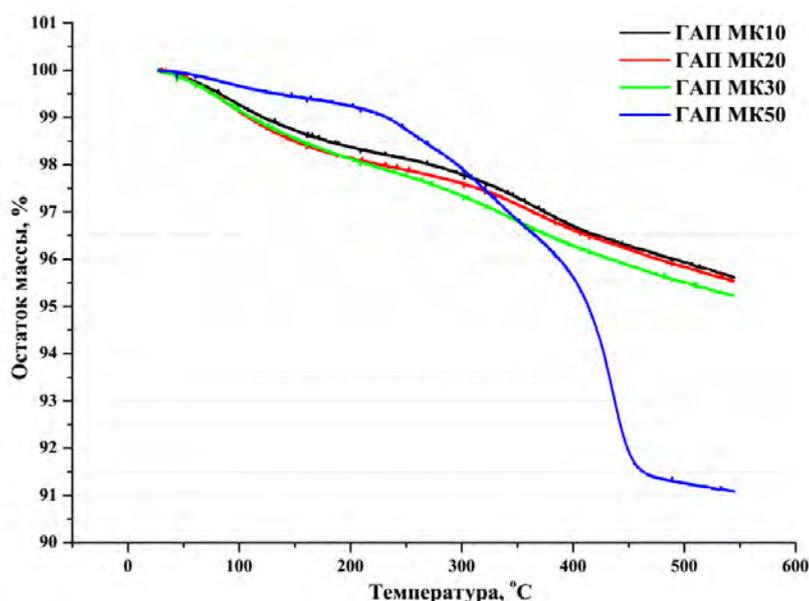


Рисунок 3.16 – Кривые термогравиметрического анализа порошков гидроксиапатита, модифицированных молочной кислотой

Таким образом, проведена модификация порошка гидроксиапатита раствором молочной кислоты в спирте. Максимальное количество привитой молочной кислоты составило 3 вес.% в образце, модифицированном 30% раствором молочной кислоты. При модификации 50% раствором кислоты происходят структурные изменения с образованием гидрофосфата кальция и лактата кальция, что подтверждено данными рентгеноструктурного анализа и ИК-спектроскопии.

Используя полученные модифицированные наполнители, были изготовлены композиционные материалы на основе поли(L-лактида) методом смешения в экструдере со степенями наполнения 5, 10, 15 и 20 вес.%. Среднеобъемный диаметр 50% частиц гидроксиапатита ГА-МК0, диспергированного в этаноле, уменьшается с 9,2 мкм до 4,7 мкм по сравнению с исходным немодифицированным гидроксиапатитом. Сравнение физико-механических характеристик композиционных материалов, наполненных данными двумя порошками, показало улучшение характеристик композита при уменьшении размера частиц наполнителя. Прочность на изгиб при 20 вес.% наполнении увеличилась с 63 МПа для композита PLLA-ГА-МК до 115 МПа для PLLA-ГА-

МК0 (Рисунок 3.17). Также наблюдается увеличение модуля при изгибе и предельная деформация.

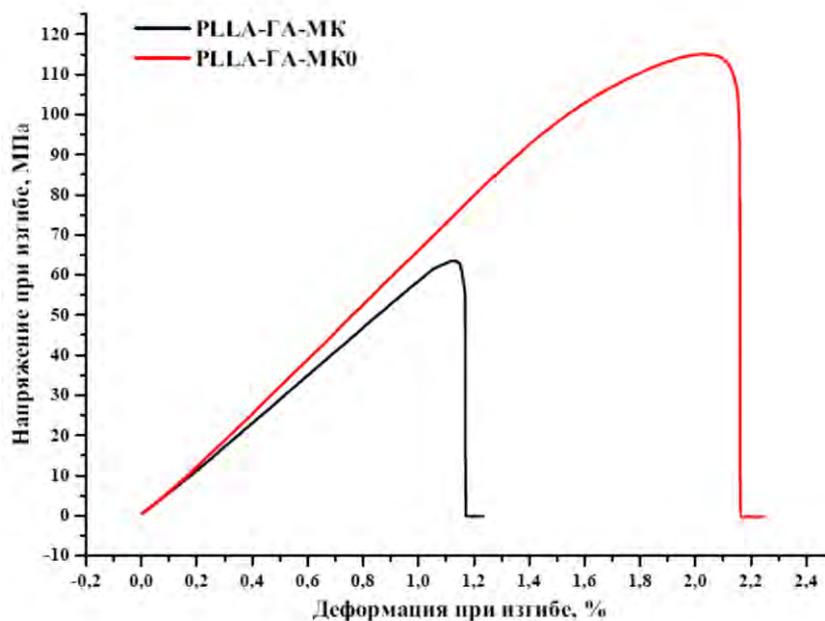


Рисунок 3.17 – Кривые напряжение/деформация 20 вес.% композитов, наполненных гидроксиапатитом и модифицированным гидроксиапатитом, диспергирование в этаноле

Из результатов термогравиметрического анализа видно, что степень прививки молочной кислоты в образцах, модифицированных 10% и 20% растворами молочной кислоты, одинакова и равна 2,5%, в то время как у гидроксиапатита, модифицированного 30% раствором молочной кислоты, степень прививки молочной кислоты выше и составляет 3%. Композиты, наполненные модифицированными порошками ГА-МК10 и ГА-МК20, продемонстрировали одинаковое увеличение механических свойств, поэтому на рисунке представлены только композиты с порошками ГА-МК10 и ГА-МК30, чтобы не загромождать рисунок.

Физико-механические исследования показали, что модуль при изгибе и модуль Юнга при растяжении у всех образцов повышались с увеличением содержания жесткого наполнителя (Рисунок 3.18а, в). Модуль Юнга композитов, наполненных модифицированным порошком гидроксиапатита, выше, чем у

композитов, наполненных гидроксиапатитом, диспергированным в этаноле, при этом модуль достигает максимального значения у композита PLLA-ГА-МК10 с содержанием наполнителя 20 вес.% и равен $2,03 \pm 0,06$ ГПа. Тогда как у композита, наполненного немодифицированным диспергированным гидроксиапатитом, модуль Юнга составляет $1,78 \pm 0,07$ ГПа. Наибольшее увеличение модуля при изгибе наблюдается у композита PLLA-ГА-МК30 и достигает значения $7,53 \pm 0,13$ ГПа при 20 вес.% наполнения, в то время как у композита, наполненного немодифицированным диспергированным гидроксиапатитом, модуль составляет всего $6,84 \pm 0,07$ ГПа. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что на модуль Юнга и модуль при изгибе модификация гидроксиапатита молочной кислотой повлияла положительно, что свидетельствует об улучшенной адгезии полимера к модифицированному наполнителю.

Прочность всех композитов при изгибе увеличивалась и достигала максимальных значений 132 ± 3 МПа при степени наполнения 15 вес.% модифицированным гидроксиапатитом, однако при дальнейшем увеличении содержания наполнителя прочность всех образцов снижалась (Рисунок 3.18б). Наличие привитой молочной кислоты не привело к увеличению прочности при растяжении (Рисунок 3.18г). Деформация при растяжении и при изгибе снижалась с увеличением содержания наполнителя, композиционный материал становился более хрупким.

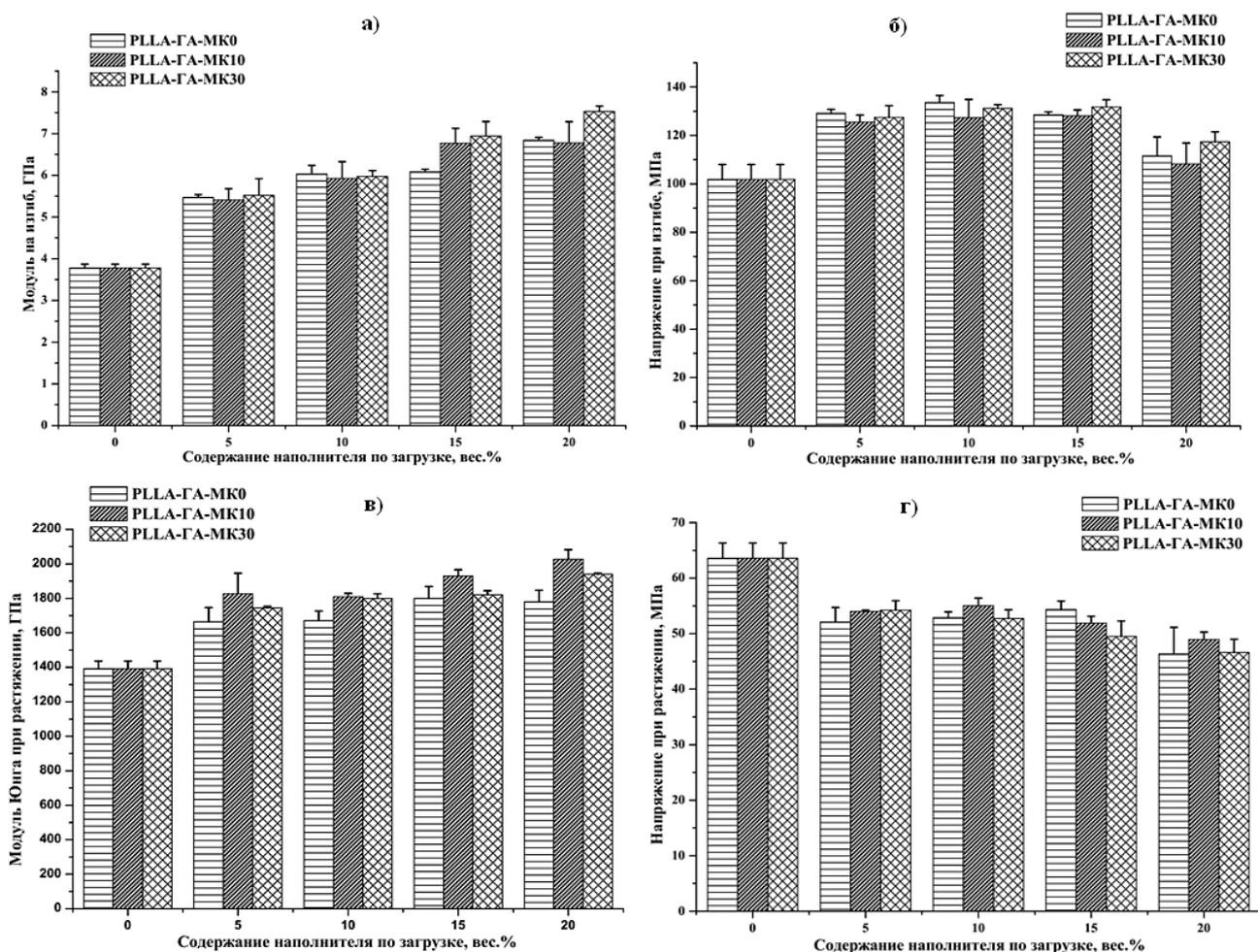


Рисунок 3.18 – Прочность и модуль при испытаниях на изгиб и растяжение композиционных материалов, наполненных исходным и модифицированными порошками гидроксиапатита

Таким образом, анализ физико-механических свойств композитов показал, что прививка молочной кислоты на гидроксиапатит приводит к увеличению модуля как при изгибе, так и при растяжении от $6,84 \pm 0,07$ ГПа до $7,53 \pm 0,13$ ГПа и от $1,78 \pm 0,07$ ГПа до $2,03 \pm 0,06$ ГПа при 20 вес.% наполнении, соответственно. Полученные данные свидетельствует об улучшенной адгезии гидрофобного полимера к гидрофильному наполнителю, однако данного улучшения адгезии недостаточно для увеличения прочности при изгибе и разрыве.

4 Кинетика деградации полимерных материалов

4.1 Визуализация процессов деградации *in vitro*

Несмотря на активные исследования последних лет, биоразложение полимеров остается трудно прогнозируемым. Изучение процессов деградации полимеров и композитов на их основе позволит создавать материалы с контролируемыми сроками разложения. Исследования *in vitro* дают базовые знания основных принципов деградации, на которых основывается дизайн имплантата. Обычно деградация полимеров и соответствующие структурные изменения во время исследований *in vitro* и *in vivo* очень похожи, но из-за присутствия ферментов и воспаления может наблюдаться некоторое ускорение деградации *in vivo*. Другим фактором, влияющим на процесс разложения, является рН окружающей среды, так как кислотные и щелочные значения ускоряют гидролиз. Однако химический гидролиз является основным механизмом деградации полиэфиров, так что можно ожидать, что структурные изменения, наблюдаемые *in vitro*, будут аналогичны изменениям *in vivo*.

Были исследованы процессы деградации образцов полимеров и сополимеров L, L-лактида, D, L-лактида и ϵ -капролактона в водной среде при температуре 37°C в течение 6 месяцев. Наряду с изучением изменений в молекулярной структуре указанных полимеров для контроля кинетики деградации *in vitro* был использован оригинальный метод высокочастотной акустической микроскопии, что позволяло решать две задачи: объемную визуализацию структуры полимера и контроль за упругими характеристиками материала при гидротермальном старении. Отображение внутренней микроструктуры полимеров и их трансформация в течение инкубационного периода были достигнуты благодаря высокой чувствительности высокочастотного ультразвука к воздушным пустотам и неоднородностям, возникающим в условиях гидролиза. В то же время способ обеспечивает визуализацию полимеров в воде, что устраняет любые

эффекты, связанные с сушкой и повторной набуханием образцов во время, например, рентгеновской компьютерной томографии. Информация, полученная с помощью визуализации, является абсолютно новой и в сочетании с обычными методами определения характеристик полимеров позволяет отображать процессы разложения полимеров. Другая важная задача для ультразвуковых методов - измерение упругих свойств материалов. В этой работе демонстрируется возможность оценки как продольной, так и поперечной скоростей звука. Значения скорости звука являются отличительными характеристиками упругого поведения материала и в сочетании с его плотностью используются для расчета модулей упругости.

Поли(L-лактид)

Необратимые изменения в образцах как аморфного, так и кристаллического PLLA происходят в течение длительного времени гидролиза (более 5 месяцев). В течение 6 месяцев наблюдалось плавное снижение молекулярной массы от 200 кДа до 80 кДа при постоянной полидисперсности (Рисунок 4.2а). Плотность образцов также практически не изменялась. Упругие свойства образцов сохраняются в течение наблюдаемого периода деградации. Как аморфные, так и высококристаллические образцы PLLA характеризуются скоростью продольной волны 2,28 км/с и поперечной волной 1,18-1,19 км/с, которые не изменялись за 6 месяцев гидролиза (Таблица 4.1). Однако были обнаружены изменения в акустических изображениях микроструктуры.

Таблица 4.1 – Изменения скорости продольных C_L и поперечных C_T звуковых волн в полимерах при химическом гидролизе.

| Недели | <i>PLLAa</i> | | <i>PLLAcr</i> | | <i>PDLLA</i> | | <i>PLCL</i> | <i>PCL</i> |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | C_L , км/с | C_T , км/с | C_L , км/с | C_T , км/с | C_L , км/с | C_T , км/с | C_L , км/с | C_L , км/с |
| 0 | 2,28 | 1,19 | 2,28 | 1,19 | 2,22 | 1,15 | 2,11 | 1,90 |
| 2 | | | | | 2,22 | 1,15 | 2,11 | 1,90 |
| 4 | | | | | 2,21 | 1,15 | 2,14 | 1,91 |
| 6 | | | | | 2,21 | 1,14 | 2,15 | 1,92 |
| 8 | | | | | 2,20 | 1,14 | 2,17 | 1,98 |
| 10 | | | | | 2,20 | 1,14 | 2,17 | 2,00 |
| 12 | | | | | 2,19 | 1,14 | 2,16- 2,17 | 2,01 |
| 14 | | | | | 2,14 | 1,10 | 2,16- 2,17 | 2,02 |
| 17 | | | | | 2,11 | 1,07 | 2,15- 2,17 | 2,03 |
| 19 | | | | | 2,09 | 1,05 | 2,15- 2,17 | 2,03 |
| 25 | | | | | 2,05 | 1,02 | 2,00- 2,17 | 2,03 |

На акустических изображениях аморфного PLLA на однородном фоне наблюдается несколько появление пустот микронного размера (Рисунок 4.1). На 19 неделе количество пустот в объеме образца стало значительным. В дальнейшем (25 неделя) наблюдалось увеличение размера и количества полостей.

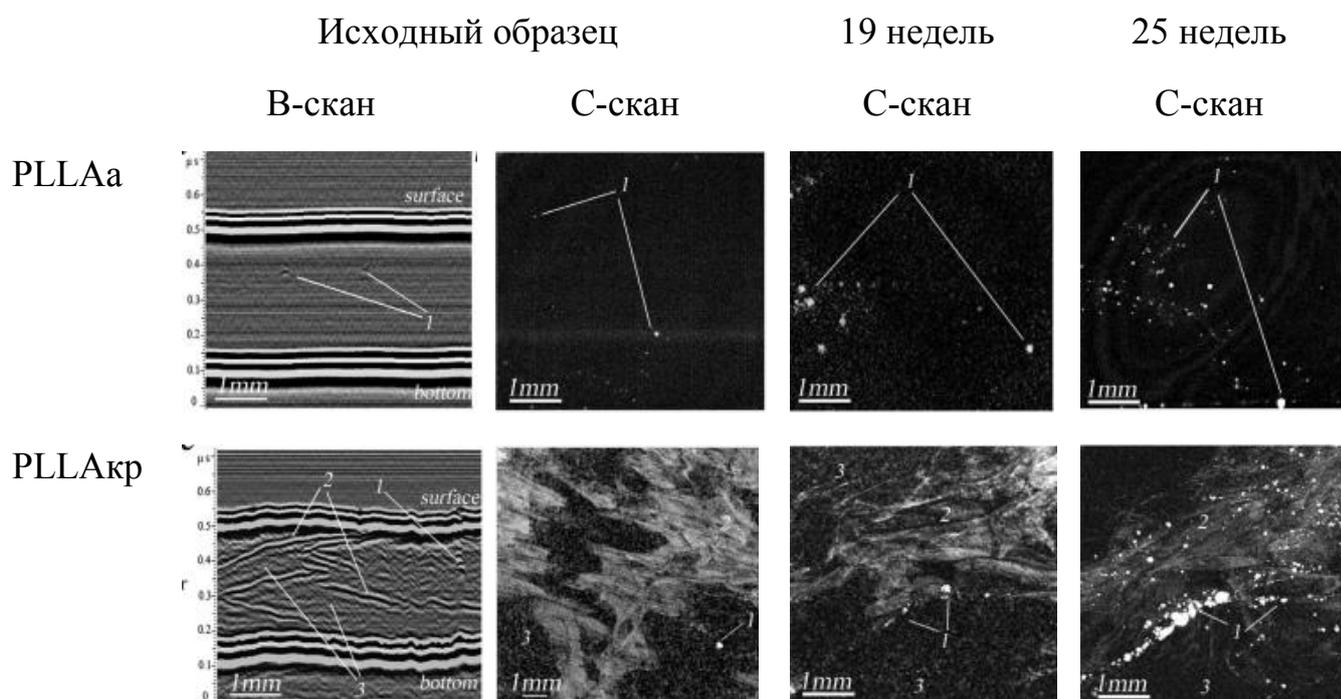


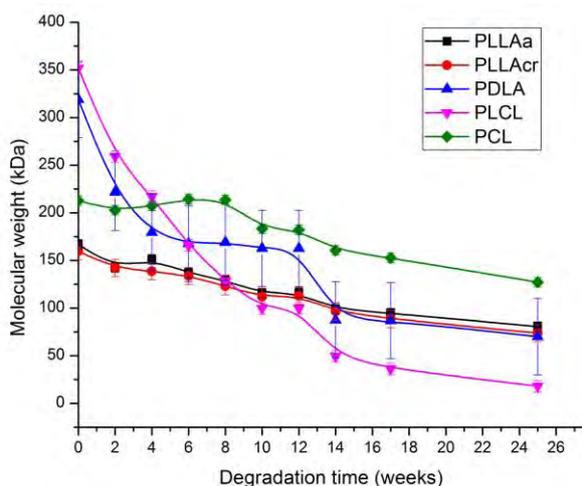
Рисунок 4.1 – Изменения внутренней структуры аморфного и кристаллического поли(L-лактида) при химическом гидролизе. С-сканы были получены в средней части образца на глубине 220 мкм. Рабочая частота 200 МГц. Поле зрения 5x5 мм. 1- пустоты; 2- - полосы сдвига; 3- кристаллические области.

Образец PLLAкр характеризуется более яркой микроструктурой на акустических изображениях (Рисунок 4.1). При прохождении через объем образца сфокусированный луч отражается и рассеивается от областей с различными локальными плотностями и упругими характеристиками: кристаллические области и полосы сдвига. Эти элементы, а также искажение поверхностей, вызванное усадкой образца при отжиге, отчетливо видно на В-скане. Плотные области, содержащие кристаллическую фазу, (степень кристалличности PLLAкр составляла 40% по данным ДСК) могут достигать размера нескольких микрон или десятой доли микрона. В результате при взаимодействии сфокусированного ультразвукового пучка с такими элементами возникает рассеянное ими вторичное излучение. Амплитуды эхо-сигналов от кристаллических конгломератов имеют небольшие значения. Эти области отображаются на изображениях в виде небольших серых пятен, размер которых определяется диаметром фокального пятна (20-45 мкм). Акустические изображения предоставляют информацию о

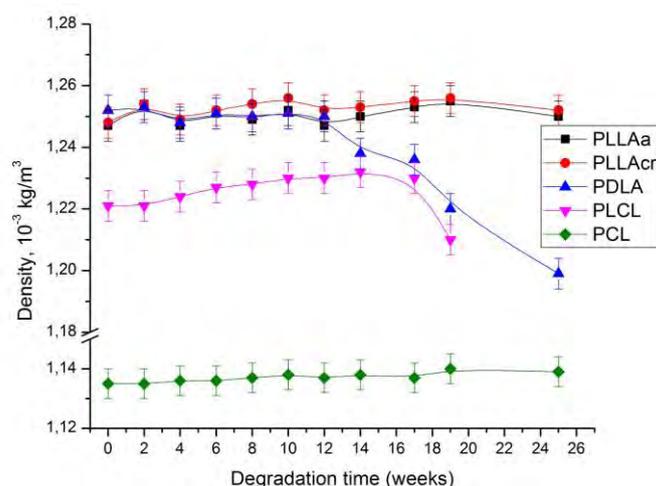
наличии и распределении кристаллических областей по объему образца, но не об их реальном размере. Сдвиговая полоса, возникающая по толщине пленки, отображается на С-скане как расширенные яркие области. Сдвиговые полосы уменьшаются в размере со временем гидролиза. Акустические изображения демонстрируют, что образец PLLAcг не изменялся в течение 5 месяцев эксперимента до появления пустот в объеме образца, сопровождаемого уменьшением площадей полосы сдвига. Следует отметить, что после 6 месяцев деградации появляется несколько микрополостей вместо или вблизи мест расположения полос сдвига. Такие изменения в микроструктуре демонстрируют, что разрушение полимера происходит вдоль полос сдвига и может быть потенциальным индикатором будущего снижения упругих свойств и прочности полимера.

Поли(D,L-лактид)

Образцы PDLLA имеют аморфную структуру, и в результате акустические изображения в исходном состоянии аналогичны изображениям образца PLLAa, который включает несколько ярких пустот на темном фоне. Высокая скорость деградации PDLLA приводит к быстрому снижению молекулярной массы и появлению пустот в объеме (Рисунок 4.2а). Зарождение и рост внутренних неоднородностей наблюдались через 4 недели и сопровождались уменьшением средне-весовой молекулярной массы до 125 кДа и снижением значений скорости звука (Таблица 4.1).



а



б

Рисунок 4.2 – Изменение молекулярной массы (а) и плотности(б) полиэфиров при деградации

Значительное снижение значений для скоростей звука: C_L с 2,20-2,19 до 2,14 км/с и C_T с 1,14 до 1,10 км/с произошло в течение 10-14 недель, когда интенсивно росли внутренние пустоты на акустических изображениях (Рисунок 4.3). Это может быть связано со снижением молекулярной массы до 80 кДа и вымыванием продуктов разложения с низкой молекулярной массой. Также уменьшилась плотность полимера, что связано с образованием закрытых микропор внутри образца (Рисунок 4.2б).

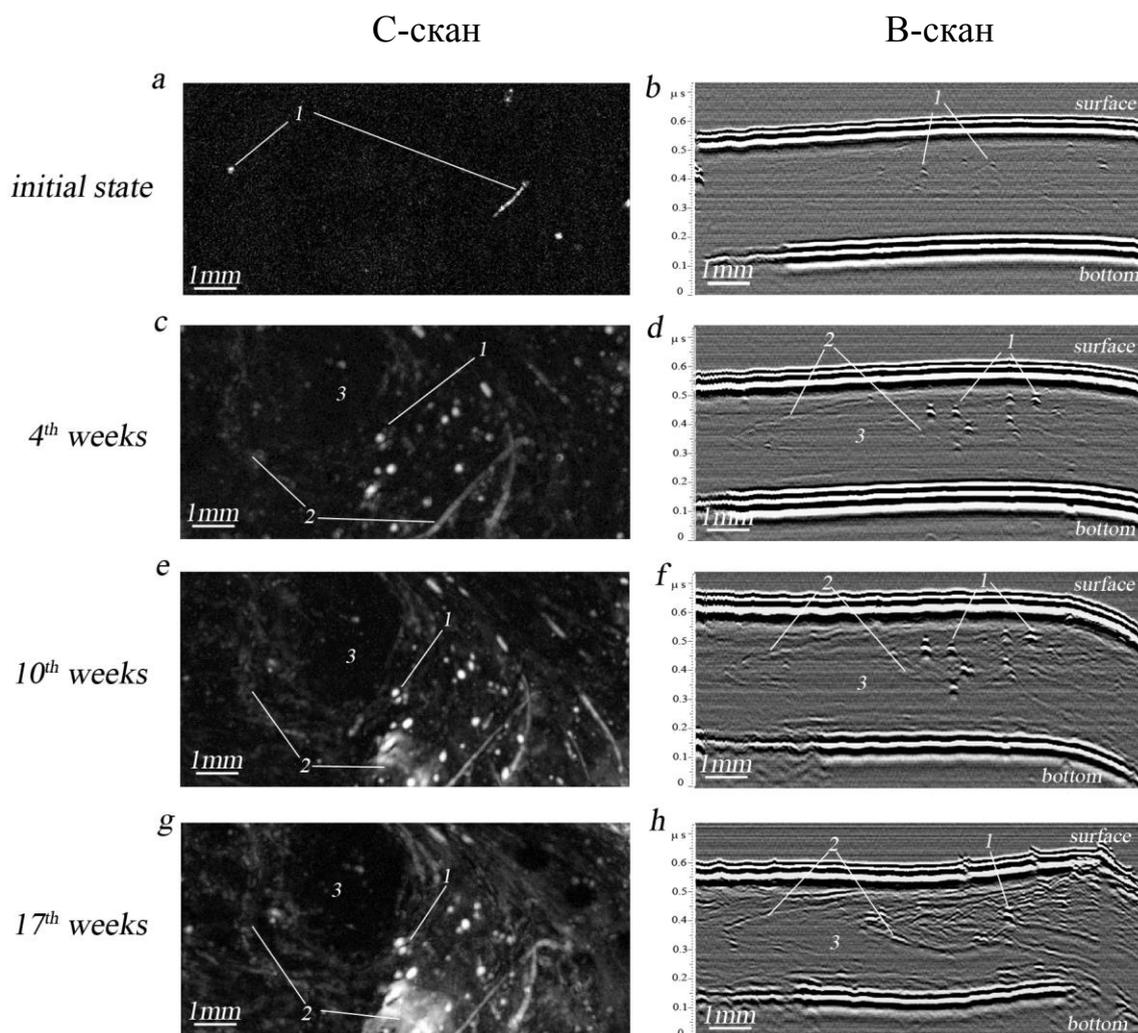


Рисунок 4.3 – Изменения внутренней структуры поли(D,L-лактида) при гидролизе. С-сканы получены на глубине 200 мкм. Поле зрения 5x10 мм. 1 - пустоты; 2 - расширенные внутренние неоднородности; 3 - области с минимальными изменениями.

Было обнаружено, что процесс деградации в образце PDLLA при длительном гидролизе является неоднородным, при этом наблюдаются вариации молекулярной массы по объему образца. Изображения на 17-й неделе (Рисунок 4.3) демонстрируют области с минимальными изменениями, отображаемые на С-скане темным цветом, окруженные областями с несколькими яркими элементами. Темные области характеризуется однородной микроструктурой и упругими свойствами, аналогичными исходному состоянию (C_L составляет 2,20 км/с и C_T равна 1,14 км/с). В то же время другая зона

характеризуется более низким значением скорости распространения звука (C_L составляет 2,11 км/с, а C_T - 1,07 км/с). Распределение поврежденных и неизменных областей по толщине образца отчетливо видно на В-скане (Рисунок 4.3).

Сополимер лактида и капролактона

Акустические изображения оптически прозрачного сополимера PLCL представляют собой сложную микроструктуру (рис. 28а, б). Элементы на изображении были сформированы ультразвуковым отражением на внутренних границах, которые могут соответствовать полосам сдвига и микрофазно разделенным фазам поли-L-лактида и капролактона. Акустические изображения показывают, что эти границы раздела имеют ориентацию, направленную от поверхностей к центру образца (Рис. 28б). Форма и размер таких внутренних областей отображались акустической линзой с частотой 200 МГц (рис. 28в). Игольчатые участки имеют длину 1-2 мм и диаметр 100-200 мкм.

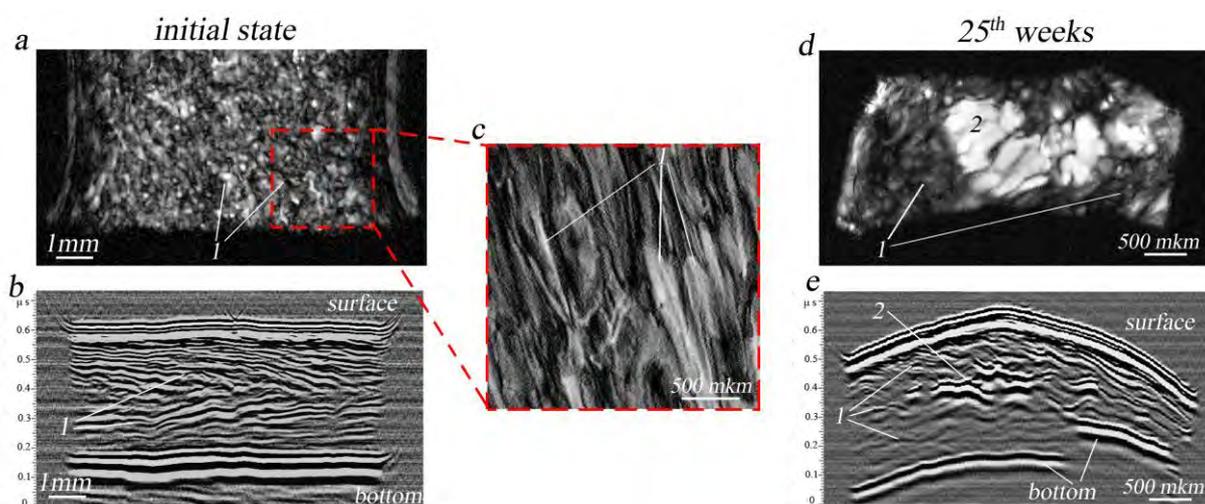


Рисунок 4.4 – Акустические изображения внутренней микроструктуры образца PLCL в исходном состоянии (а), (b) и на 25-й неделе деградации (d), (e).

Изображения были получены на глубине 200 мкм линзой с частотой 100 МГц. 1- внутренние границы раздела фаз микрофазного распределения или сдвига; 2- внутренние полости. Форма и размер микрофазного распределения на глубине ~

200 мкм были идентифицированы в С-скане (с), полученном с помощью акустической линзы с частотой 200 МГц.

Сравнение акустических изображений на разных этапах процесса деградации затруднено из-за сложной пространственной организации. Однако мы определили изменения упругих свойств полимера: увеличение C_L с 2,11 до 2,17 км/с в течение 8-10 недель гидролиза. Такие изменения можно объяснить увеличением кристалличности полилактидных сегментов в сополимере из-за низкотемпературного отжига во время инкубации при 37°C. Температура стеклования T_g PLCL в сухом состоянии составляет 41°C, тогда как после поглощения воды, действующей как пластификатор, наблюдается снижение T_g на 10-15°C. Длительная инкубация при 37°C привела к кристаллизации блоков L-лактида в аморфном сополимере через 8 недель. Рост кристалличности составил с 0% до 50% по данным ДСК (Рисунок 4.5а), и до 54% по данным рентгеноструктурного анализа (Рисунок 4.5б). На кривой ДСК для исходного образца (Рисунок 4.5а) виден высокий экзотермический эффект в диапазоне 80–120°C, соответствующий кристаллизации полимерных цепей. Тепловой эффект кристаллизации был равен теплоте плавления при 160°C, что указывает на низкое значение кристалличности. Результаты рентгеноструктурного анализа также подтверждают аморфное состояние в начале эксперимента. После инкубации в течение 8 недель экзотермический эффект не наблюдался, поскольку была достигнута высокая степень кристалличности. Пластификация L-лактида ϵ -капролактоном приводит к более высокой степени кристалличности поли(L-лактида) в сополимере (~50%), чем в гомополимере (~40%). Образование альфа-фазы полилактида через 25 недель подтвердилось данными большеугловой рентгеновской дифракции (Рисунок 4.5б).

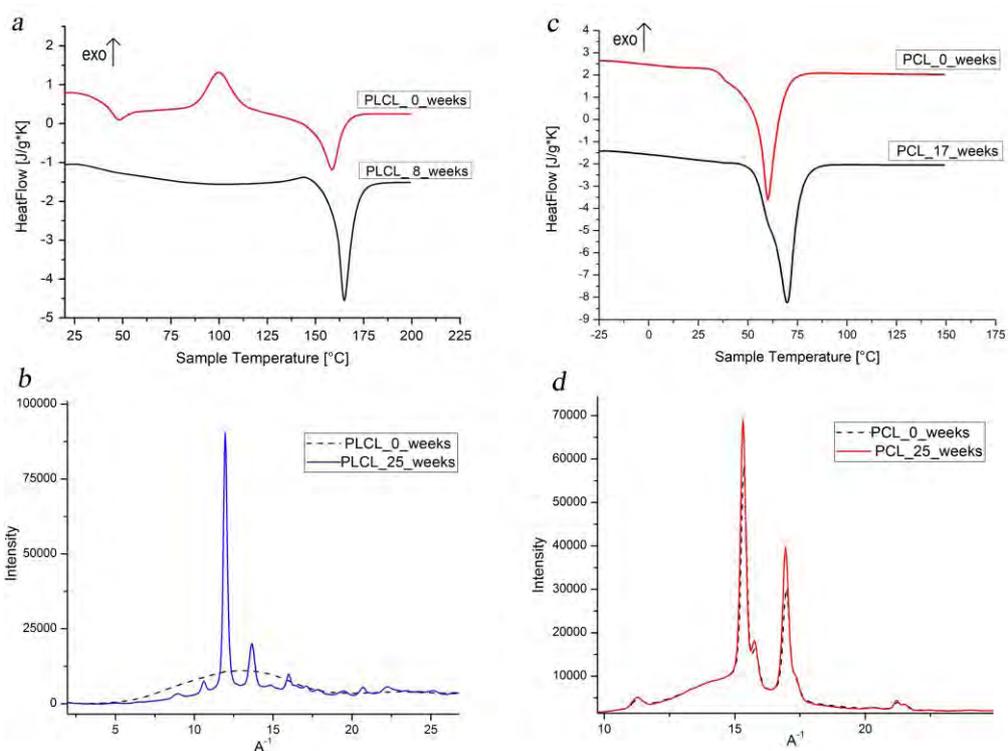


Рисунок 4.5 – Термограммы нагревания (а, с) и большеугловые дифрактограммы (b, d) образцов PLCL и PCL в исходном состоянии и после 8, 17 и 25 недель деградации, соответственно.

Дальнейшая деградация сопровождалась локальным снижением скорости звука до 2,00 км/с, что коррелировало со значительным падением молекулярной массы (Рисунок 4.2а). При деградации сополимера кривые молекулярно-массового распределения заметно смещались в область низких масс, вид кривых не менялся, а полидисперсность уменьшалась (Рисунок 4.6). Гидролиз приводит к появлению внутренних полостей в объеме образца, что ведет к уменьшению плотности (Рисунок 4.2б), после 25 недель деградации пленка разрушалась на мелкие кусочки.

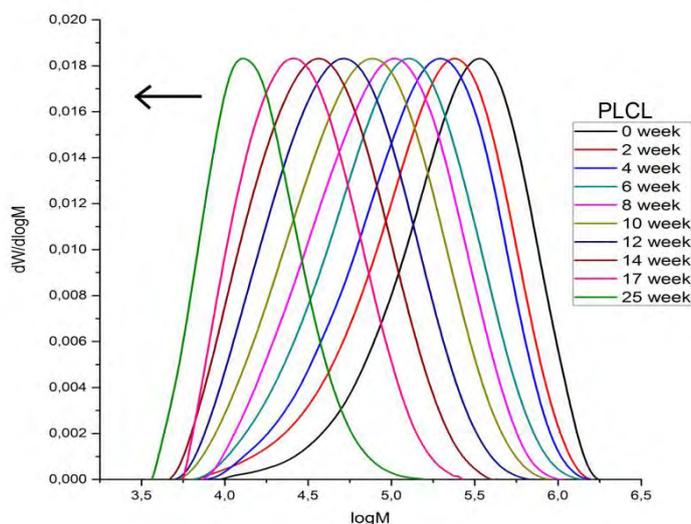


Рисунок 4.6 – Изменение молекулярно-массового распределения сополимера лактида и капролактона в процессе деградации

Поликапролактон

На акустических изображениях пленок PCL наблюдается однородная микроструктура с несколькими внутренними границами раздела макроскопического масштаба (Рисунок 4.7). Эти границы раздела могли появиться в результате сплавления полимерных гранул при формовании пленки. Послойные изображения внутренней микроструктуры, полученные на разных глубинах, показывают, что полосы сдвига имеют разные наклоны. Они имеют небольшой угол вблизи поверхностей, которые образуют протяженные яркие участки на С-скане. Границы становятся более вертикальными ближе к центру, когда полосы сдвига от противоположных поверхностей соединены; на средней глубине границы отображаются на изображениях в виде резких линий. Разделение объема образца на субмиллиметровые области, очерченные этими границами, не влияет на распределение упругих свойств, что соответствует гладкой нижней линии в В-скане.

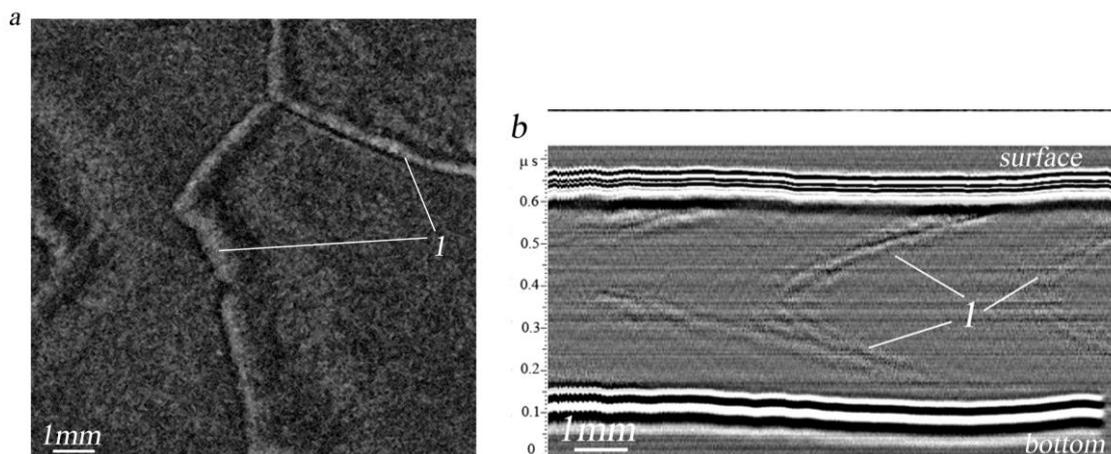


Рисунок 4.7 – Акустические изображения внутренней микроструктуры образца PCL. (а) –С-сканы, полученные на глубине 200 мкм, 1 – границы плавления гранул, (б) - В-сканирование в центральной позиции образца. Микроструктура образца PCL стабильна на протяжении всего эксперимента, 1- полосы сдвига.

Кристалличность пленок из PCL на начальной стадии составила 50% по данным ДСК. Микроструктура остается неизменной в течение наблюдаемого периода деградации 6 месяцев. Однако мы определили непрерывный рост значений скорости звука с 1,90 до 2,03 км/с. Низкая температура стеклования полимера (-60 °С) и длительный эксперимент приводят к довольно быстрому отжигу, который приводит к совершенству кристаллитов. Рост скорости звука наблюдали в течение 8 недель гидролиза. Пик упругих свойств был достигнут на 17-й неделе гидролиза (Таблица 4.1). Рекристаллизация и рост кристалличности образцов в процессе гидролиза были подтверждены с помощью ДСК (Рисунок 4.5b) и дифракции рентгеновских лучей (Рисунок 4.5d). Кривые ДСК показывают сдвиг положения максимума пика плавления от 56 до 67°С, сопровождаемый его сужением. Анализ дифрактограмм (Рисунок 4.5d) показывает небольшой рост интенсивности рефлексов, их сужение и небольшое смещение в сторону больших углов.

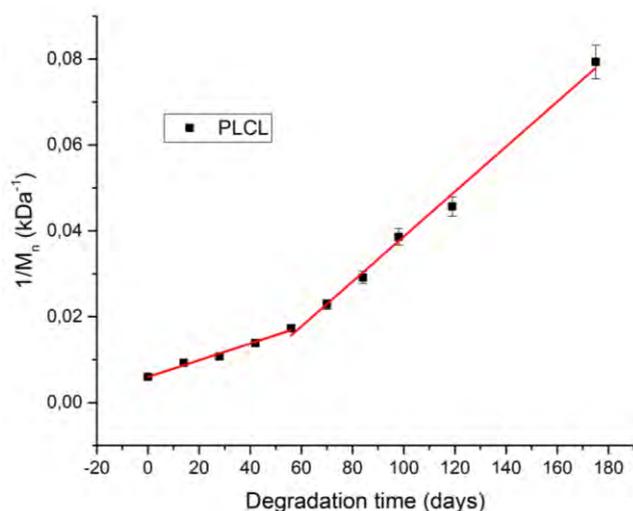
Таким образом, предложенный высокочастотный ультразвуковой подход был применен для изучения изменений микроструктуры и упругих свойств в объеме полимеров на ранних стадиях гидролиза. Полученные результаты

показали зависимость изменений микроструктуры образцов, локальных упругих свойств и механизма деградации от их предыстории. Полосы сдвига являются концентратором напряжений, которые наблюдаются только в полимерах с кристаллической или упорядоченной фазой и могут оказывать влияние на скорость гидролиза и механизмы процесса разложения.

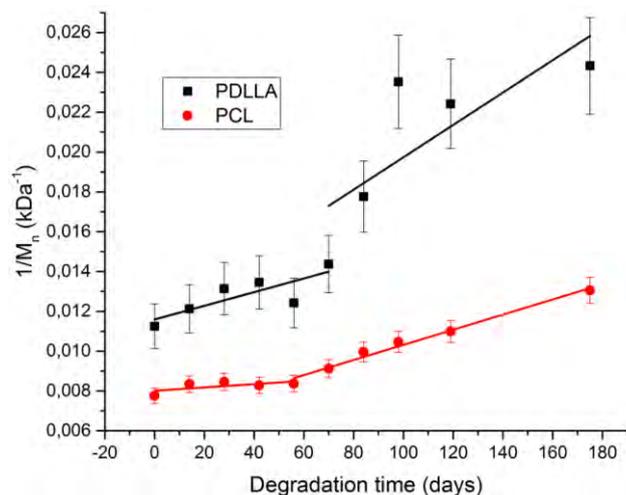
4.2 Кинетические модели деградации

При создании изделий для травматологии и ортопедии изменение молекулярной массы во время деградации играет ключевую роль. Существует два важных временных события. Первое – это время, в течение которого разлагаемый имплантат должен выполнять свои механические функции (функциональное время), второе – это общее время, которое устройства проводят в организме от имплантации до исчезновения (время исчезновения). Было показано, что для выполнения роли несущего ортопедического имплантата, молекулярная масса поли(L-лактида) должна быть не менее с 100 кДа [174,175].

Скорость гидролиза полимеров можно охарактеризовать скоростью расхода реагентов либо скоростью образования продуктов реакции. Продуктами гидролиза являются новообразованные концы цепи, концентрация которых в любой момент времени пропорциональна $1/N$, где N - количество повторяющихся звеньев цепи. Таким образом, зависимость обратной величины среднечисленной молекулярной массы полимера $1/M_n$ от времени разложения характеризует процесс образования продуктов разложения. Как видно из рисунка 4.8 для образцов из поли(D,L-лактида), поликапролактона и сополимера L-лактида и капролактона наблюдается увеличение скорости гидролиза спустя 2 месяца деградации. При гидролизе сложных полиэфиров образуются кислые продукты (-COOH) на концах цепи. Эти продукты могут дополнительно ускорять реакцию.



а



б

Рисунок 4.8 – Зависимость обратной величины среднечисленной молекулярной массы сополимера лактида и капролактона (а), а также поли(D,L-лактида) и поликапролактона (б) от времени разложения

Образцы как аморфного, так и кристаллического полилактида напротив демонстрируют линейную зависимость величины $1/M_n$ от времени разложения на всем исследуемом периоде (Рисунок 4.9), что соотносится с литературными данными. Так Луи с соавторами наблюдали ускорение скорости гидролиза статистического сополимера поли(L-лактид-со-L,D-лактид) (70/30) только через 250 дней деградации при 37 °С [176]. В другой работе [177] скорость гидролиза поли(L-лактида) имеет S-образную зависимость от времени. Она увеличивалась спустя 30-40 дней разложения при 50 °С, однако через 80–100 дней скорость постепенно замедляется.

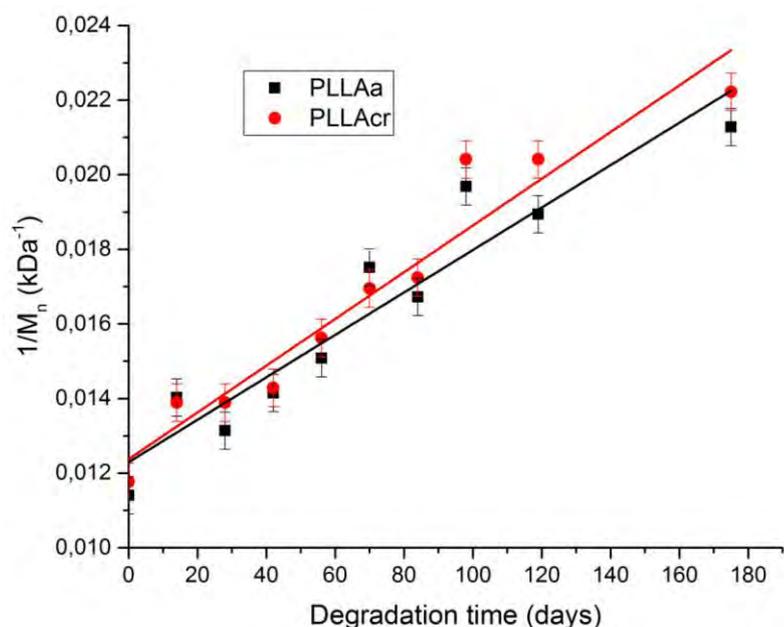


Рисунок 4.9 – Зависимость обратной величины среднечисленной молекулярной массы полимера от времени разложения

Согласно теории Питта существует линейная зависимость между логарифмом молекулярной массы полимера и временем разложения [178]. Теория Питта не учитывает влияние процессов переноса в полимерах на разложение. Следовательно, ее нельзя использовать для таких явлений как эрозия поверхности. Продукты разложения, образующиеся во время гидролиза, остаются в объеме полимера до тех пор, пока их молярная масса превышает 1000 г/моль и они не растворимы в воде.

Кажущуюся константу скорости разложения k при деградации объемно разлагающихся полиэфиров можно определить из формулы:

$$\log M = \log M_0 - kt,$$

где M_0 и M - молекулярные массы до начала разложения и во время, соответственно. Полученные значения приведены в таблице 4.2.

Таблица 4.2 – Рассчитанные значения кажущейся константы скорости разложения полиэфиров при экспериментах *in vitro*

| Полимер | Кажущаяся константа скорости разложения, *10 ⁻³ день ⁻¹ |
|---------|---|
| PLLAa | 1,6±0,3 |
| PLLAcr | 1,6±0,2 |
| PDLLA | 2,3±0,3 |
| PLCL | 6,4±0,4 |
| PCL | 1,3±0,2 |

Как видно из таблицы, наибольшей скоростью разложения обладает сополимер лактида и капролактона. Быстрое уменьшение молекулярной массы говорит о преимущественно статистическом разрыве полимерной цепи (Рисунок 4.6). Скорости разложения поликапролактона, а также аморфного и кристаллического полилактида близки. При этом как в случае аморфного, так и в случае высоко кристаллического полилактида наблюдается монотонное снижение молекулярной массы во время всего исследуемого периода деградации (Рисунок 4.10), полидисперсность остается неизменной вплоть до 14 недели гидролиза, а затем начинает уменьшаться с 1,9 для исходного образца до 1,7 на 25 неделе деградации. Отсутствие различий в изменении молекулярной массы обоих образцов полилактида можно объяснить малыми временами гидролиза. Как сообщает Бесликас с соавторами [177], гидролиз сложноэфирных связей PLA начинается гомогенно до тех пор, пока не образуются растворимые олигомеры. Хёглунд и соавторы обнаружили, что ненаполненный полилактид образует водорастворимые олигомеры после 28 дней гидролиза при 60 °С и после 133 дней гидролиза при 37 °С [179], что коррелирует с нашими данными.

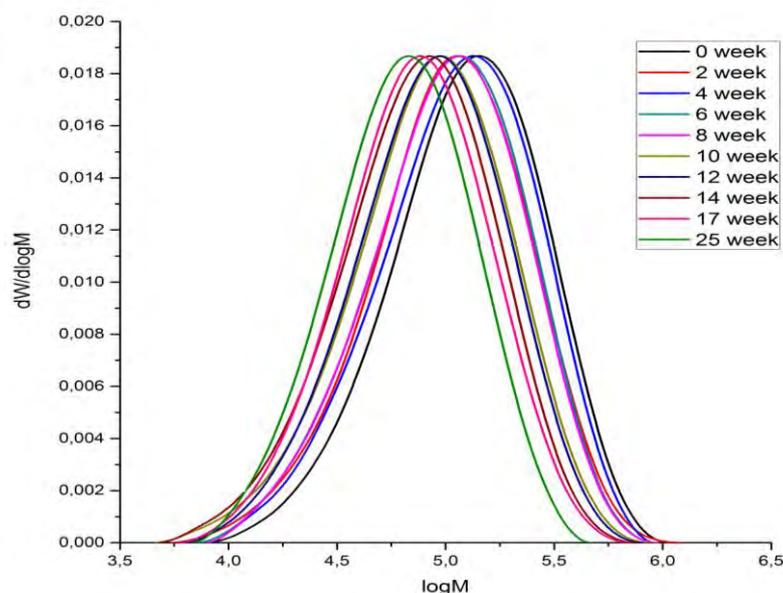


Рисунок 4.10 – Изменение молекулярно-массового распределения аморфного поли(L-лактида) в процессе деградации

Лю, Спарер и Унтерекер предложили модель деградации по механизму второго порядка [180]. При этом выделяют три фазы разложения. Во время первой фазы полимер насыщается водой, на второй фазе происходит гидролиз, но низкомолекулярные продукты остаются внутри образца. Когда гидролиз достигает третьей фазы, низкомолекулярные продукты начинают растворяться в воде. Начальная молекулярная масса не оказывает значительного влияния на скорость разложения фазы 2, но будет влиять на продолжительность всех фаз эрозии. Зависимость обратного числа связей в цепи полимера N как функции времени t описывается следующим уравнением

$$\frac{1}{N(t)} = k_2 \cdot C_s \cdot (t - t_i)$$

где C_s – растворимость воды в полимере (константа), t_i – эффективное время индукции объемной эрозии, если разрыв связи происходит намного медленнее чем процесс насыщения, то t_i – время, за которое полимер насыщается водой (фаза 1). Это уравнение не учитывает гидролиз, происходящий во время фазы 1, а при начале фазы 3 перестает быть применимым. Учитывая

вышесказанное, данная модель применима для трех исследуемых образцов, а именно полилактида и поликапролактона (Рисунок 4.11).

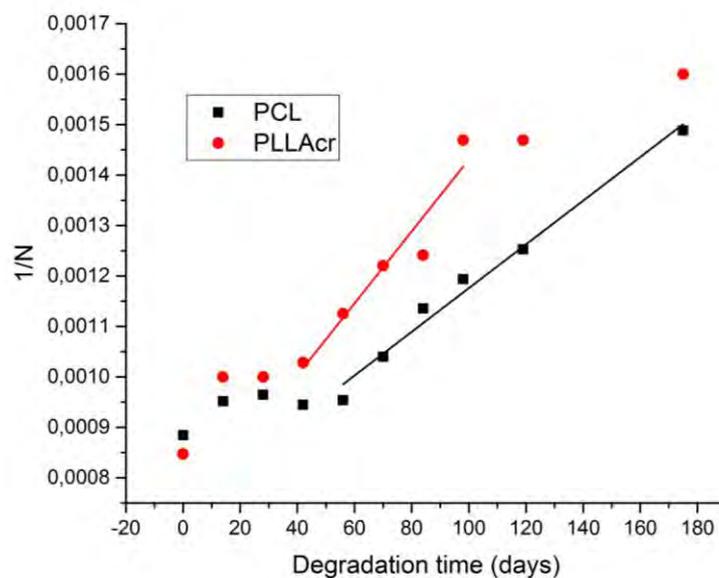


Рисунок 4.11 – Зависимость обратного числа связей в цепи полимера $1/N$ от времени деградации t

Эффективное время объемной индукции больше в случае поликапролактона и равно 14 дням, у полилактида как аморфного, так и кристаллического данное время равно 5 дням. Это различие объясняется большей гидрофобностью поликапролактона. Принимая сорбцию воды равными 0,4% и 0,2% для полилактида и поликапролактона соответственно [181], получим значения констант скорости реакции $1,8 \cdot 10^{-3}$ день⁻¹ и $2,2 \cdot 10^{-3}$ день⁻¹.

Таким образом, применение моделей деградации к исследуемым материалам позволило наблюдать автокаталитическое ускорение через 2 месяца гидролиза образцов поли(D,L-лактида), поликапролактона и сополимера L-лактида и капролактона. При этом наибольшей скоростью разложения обладает сополимер L-лактида и капролактона, быстрое уменьшение молекулярной массы которого свидетельствует о преимущественно статистическом разрыве полимерной цепи. Образцы аморфного и кристаллического полилактида имеют одинаковые скорости разложения и изменения молекулярной массы, что объясняет малыми временами гидролиза.

5 Исследования *in vivo* биосовместимости и биоактивности

Любое хирургическое вмешательство, в том числе и имплантация биоразлагаемого изделия, приводит к воспалительному процессу, активирующему деятельность ферментов и клеток, стремящихся резорбировать имплантант. Такими клетками являются макрофаги и гигантские клетки инородного тела. При этом место введения имплантата играет важную роль, так как от этого зависит количество и состав выделяемых ферментов и клеток. Смоделировать реакцию живого организма на инородное тело в экспериментах *in vitro* не представляется возможным. Только исследования *in vivo* могут дать ответ на вопрос «Какими свойствами должен обладать материал для тканевой инженерии?».

Исследования биосовместимости проводили на 15 видах материала, различающихся составом полимерной матрицы, видом наполнителя и степенью наполнения (Таблица 5.1). Из данных материалов методом литья под давлением изготавливали цилиндрические заготовки длиной 6 см и диаметром 5 мм, затем обрабатывали их на гравировально-фрезерном станке для получения канюлированного винта диаметром 4 мм и длиной 15 мм, шаг резьбы 1,71 мм (Рисунок 5.1). Данные изделия являются аналогами интерферентных винтов, используемых в травматологии и ортопедии при разрыве связок. Стерилизацию изделий проводили гамма-облучением, доза 25 кГр.



Рисунок 5.1 – Фотографии винтов и инструмента для вкручивания, длина винта 15 мм, диаметр 4 мм

Объектом исследований были овцы в возрасте 8 месяцев и в количестве 60 голов. Животные имели свободный доступ к пище и воде, соответствующие нормативам ГОСТа. В метаэпифизарной зоне проксимальной части большеберцовой и лучевой костей проделывали отверстие, нарезали резьбу мечиком и внедряли винты. Исследования проводили на 3 сроках деградации - 3, 6 и 12 месяцев. Для получения статистически достоверных данных внедряли по 5 винтов на каждый срок каждой серии, итого 15 винтов одного материала. Всего было изучено поведение 225 винтов.

Таблица 5.1 – Композиционные материалы, исследованные *in vivo*

| Серия | Образец | Полимерная матрица | Вид наполнителя | Степень наполнения, вес. % |
|-------|------------|-------------------------|-------------------|----------------------------|
| 1 | PLLAa | Поли(L-лактид) аморфный | - | - |
| 2 | PLLA-5TCP | Поли(L-лактид) | Трикальций фосфат | 5 |
| 3 | PLLA-5HA | Поли(L-лактид) | Гидроксиапатит | 5 |
| 4 | PLLA-20TCP | Поли(L-лактид) | Трикальций фосфат | 20 |

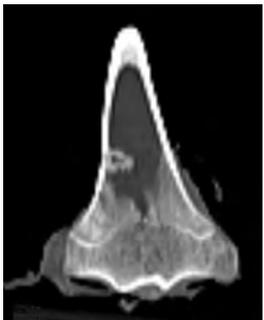
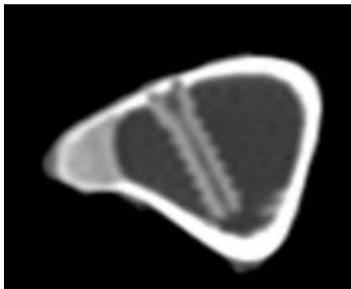
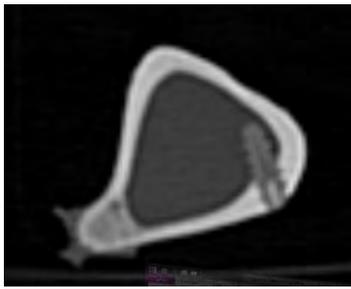
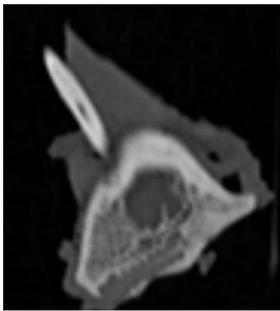
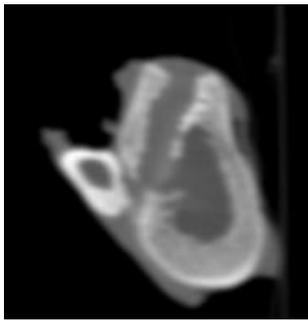
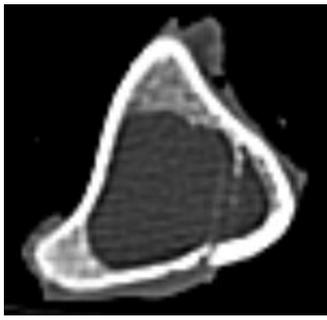
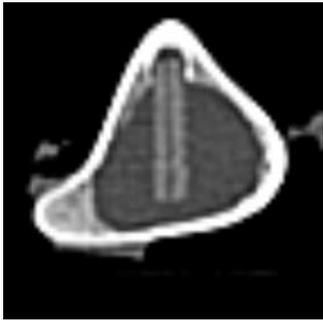
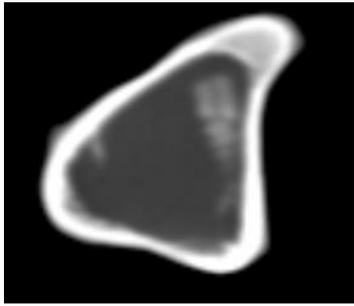
| | | | | |
|----|-------------|-----------------------------------|----------------------|----|
| 5 | PLLA-20HA | Поли(L-лактид) | Гидроксиапатит | 20 |
| 6 | PLLAcr | Поли(L-лактид) кристаллический | - | - |
| 7 | PLLAcr-5HA | Поли(L-лактид) кристаллический | Гидроксиапатит | 5 |
| 8 | PLLAcr-20HA | Поли(L-лактид) кристаллический | Гидроксиапатит | 20 |
| 9 | PDLLA | Поли(D,L-лактид) | - | - |
| 10 | PDLLA-5TCP | Поли(D,L-лактид) | Трикальций фосфат | 5 |
| 11 | PDLLA-5HA | Поли(D,L-лактид) | Гидроксиапатит | 5 |
| 12 | PDLLA-20TCP | Поли(D,L-лактид) | Трикальций фосфат | 20 |
| 13 | PDLLA-20HA | Поли(D,L-лактид) | Гидроксиапатит | 20 |
| 14 | PLGA | Поли(L-лактид-со- гликолид) | - | - |
| 15 | PLGA-20HA | Поли(L-лактид-со- гликолид) | Гидроксиапатит | 20 |

После вывода животного из эксперимента вырезали проксимальные части большеберцовой и лучевой костей, далее степень деградации изучали с помощью компьютерной томографии, устанавливали более локально место имплантации винта и вырезали костный блок для гистологических исследований.

Все винты на основе как аморфного, так и высоко кристаллического поли(L - лактида) были хорошо различимы на компьютерной томографии вплоть до профиля резьбы даже спустя год после имплантации. В то время как у винтов на основе поли(D,L-лактида) и сополимера L-лактида с гликолидом уже спустя 6 месяцев резьба была сильно сглажена, а через 12 месяцев изделия были слабо

различимы на компьютерной томографии либо их не удавалось обнаружить вовсе (Таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Компьютерная томография винтов при деградации, характерные изменения

| Материал | Срок деградации | | |
|------------------------------------|---|--|---|
| | 3 месяца | 6 месяцев | 12 месяцев |
| Винты на основе PLLA (Серии 1-8) |  |  |  |
| Винты на основе PDLLA (Серии 9-13) |  |  |  |
| Винты на основе PLGA (Серии 14-15) |  |  |  |

Далее рассмотрим наиболее репрезентативные случаи. Так, например, у винтов из поли(L-лактида) на компьютерной томографии через 3 месяца после оперативного вмешательства канал импланта визуализируется в проксимальном метаэпифизе лучевой кости (Рисунок 5.2а). Периферические отделы канала с

краевым остеосклерозом, наружное отверстие частично закрыто формирующейся кортикальной пластинкой. В просвете костномозгового канала хорошо дифференцируется плотный цилиндрический стержень (винт) с хорошо прослеживаемой резьбой. Остеосклероз отмечен преимущественно вблизи входа в канал. Канюля равномерно гиподенсивная. Признаков резорбции материала импланта не отмечено. Через 6 месяцев после имплантации канал импланта визуализируется в эпифизе большой берцовой кости субкортикально (Рисунок 5.2б). Края канала с отчетливой резьбой, несколько сглажены, с выраженным краевым остеосклерозом преимущественно вблизи входа в канал (формирование кортикального вещества). Имплант равномерно гиперденсный. В просвете канала фрагментарно прослеживается гиперденсный стержень. Вход в канал частично закрыт сформированным корковым веществом. Достоверных признаков резорбции не выявлено. В просвете канюли у входа в канал – гиперденсное содержимое (признаки прорастания костной ткани). Через 1 год после оперативного вмешательства определяется канал импланта в субкортикальных отделах эпифиза плечевой кости (Рисунок 5.2в). Вещество импланта минимально гиперденсно относительно содержимого костно-мозгового канала. Резьба прослеживается хорошо, отмечен умеренно выраженный краевой остеосклероз. В центральных отделах определяется гиперденсивная линейная зона (вероятнее, вследствие прорастания костной ткани в канюлю). Оценка резорбции затруднена. Вход в канал полностью закрыт сформированной кортикальной пластинкой.

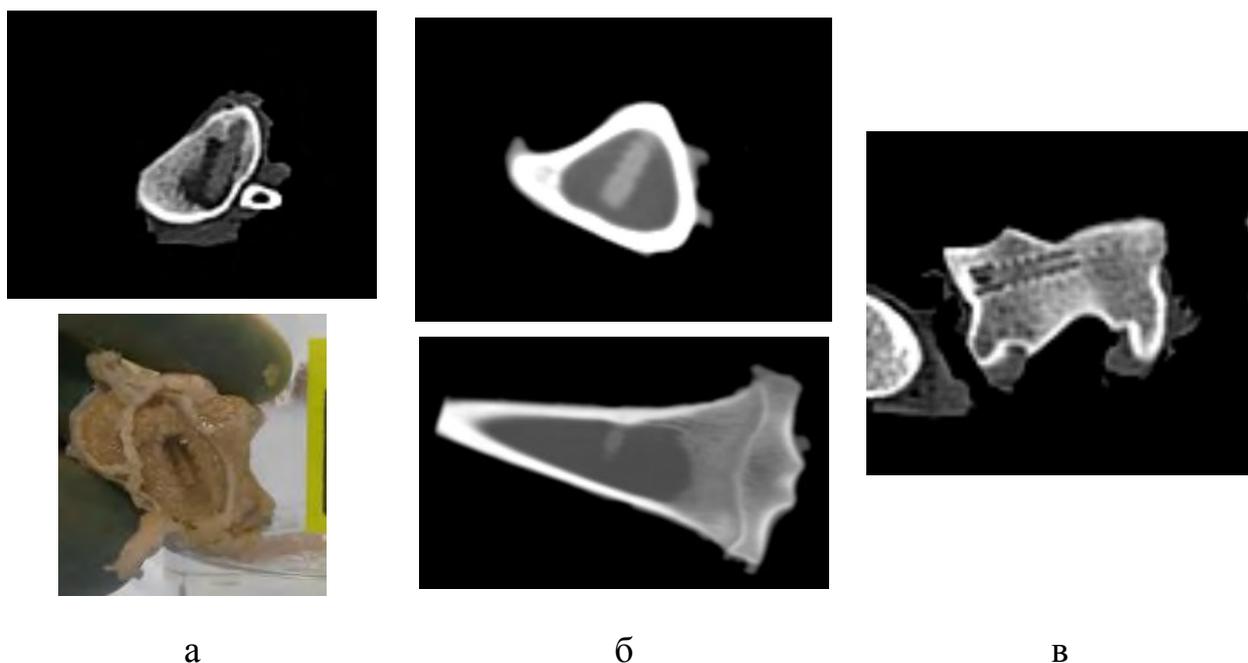


Рисунок 5.2 – Компьютерная томография и фотографии костных блоков с винтами из ненаполненного поли(L-лактида) через 3 (а), 6 (б) и 12 (в) месяцев после имплантации

В отличие от винтов на основе поли(L-лактида), характеризующихся частично кристаллической структурой, материалы на основе поли(D,L-лактида) являются аморфными, что значительно облегчает диффузию воды. У винтов из ненаполненного поли(D,L-лактида) через 3 месяца канал импланта определяется в эпифизе левой лучевой кости (Рисунок 5.3а). Резьба канала прослеживается, сглажена. Определяются локальные участки минимально выраженного краевого остеосклероза. Материал импланта гиперденсный относительно костно-мозгового канала, визуализируемые контуры ровные, слегка нечеткие (минимальные признаки резорбции). Канюля не определяется. Вход в канал прослеживается, определяются признаки его закрытия за счет формирования кортикального слоя по периферии. Через 6 месяцев канал импланта определяется в эпифизе левой лучевой кости (Рисунок 5.3б). Резьба канала сглажена, деформирована, прослеживается фрагментарно. Определяются локальные участки умеренно выраженного остеосклероза. Материал импланта слабо гиперденсный относительно костно-мозгового канала, визуализируемые контуры с признаками

резорбции. Канюля не определяется. Вход в канал импланта закрыт сформированным кортикальным слоем. Через 12 месяцев канал импланта определяется в проксимальных отделах диафиза большеберцовой кости. Резьба канала выражено сглажена, деформирована, прослеживается фрагментарно (Рисунок 5.3в). Фрагментарно определяется сформированное костное вещество по краям канала. Материал импланта изоденсивен содержимому костно-мозговому каналу (признаки тотальной резорбции). Канюля не определяется. Вход в канал импланта субтотально закрыт сформированным кортикальным веществом.



Рисунок 5.3 – Компьютерная томография костных блоков с винтами из ненаполненного поли(D,L-лактида) через 3 (а), 6 (б) и 12 (в) месяцев после имплантации

Гистологические исследования показали, что через три месяца после введения винтов из ненаполненного поли(D,L-лактида) по периметру имплантационного канала обнаруживалось разрастание пролиферирующих фибробластов с большим количеством новообразованных сосудов, за которыми наблюдалась область фиброцитов с новообразованной зоной гиалинового хряща (Рисунок 5.4-5.6).

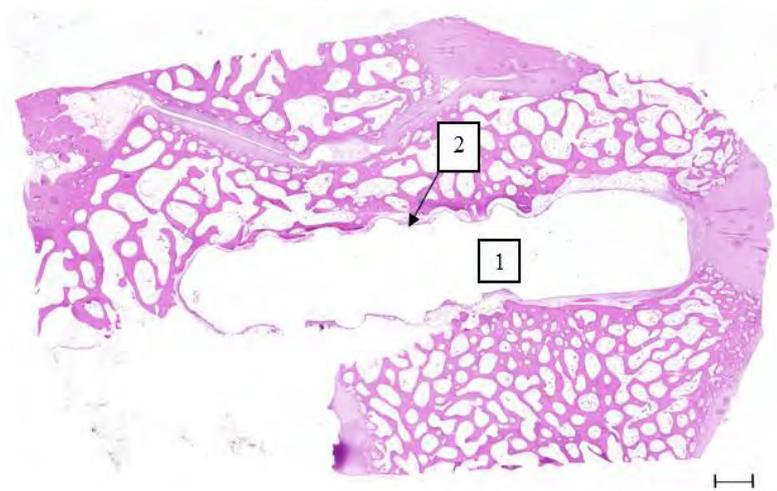


Рисунок 5.4 – Сканированный гистологический срез. Имплантационный канал (1), соединительная ткань (2). Гематоксилин и эозин. Длина линии – 1 мм.

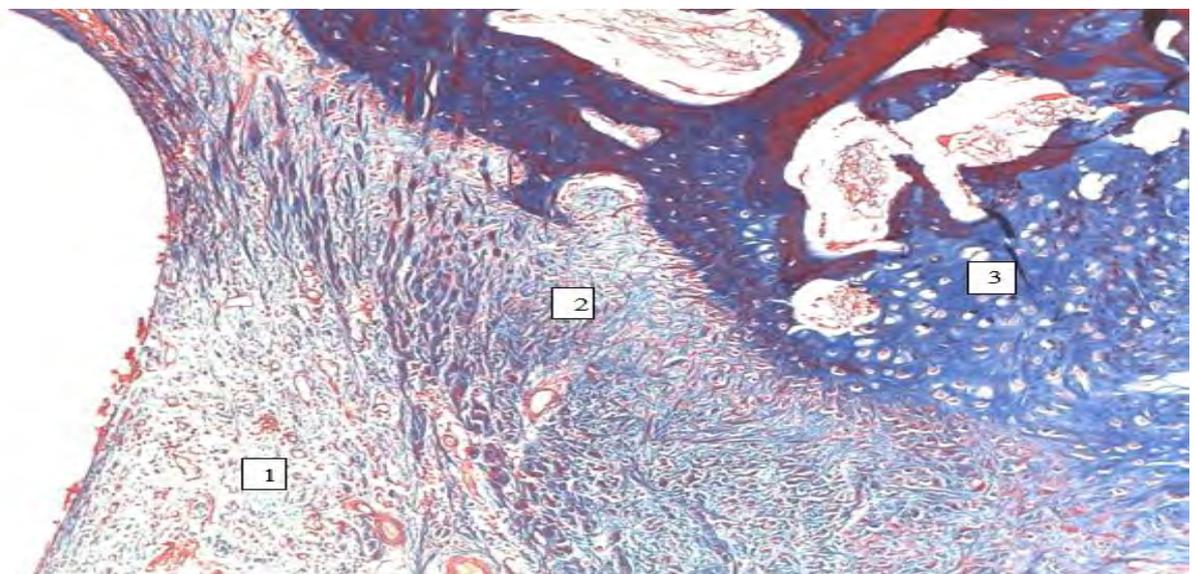


Рисунок 5.5 – Микропрепарат костной ткани. Рыхлая соединительная ткань с новообразованными сосудами (1) на границе имплантационного канала, плотная соединительная ткань окрашенная в ярко синий цвет, формирование гиалинового хряща (3). Окрашивание по Массону. Ув. 125

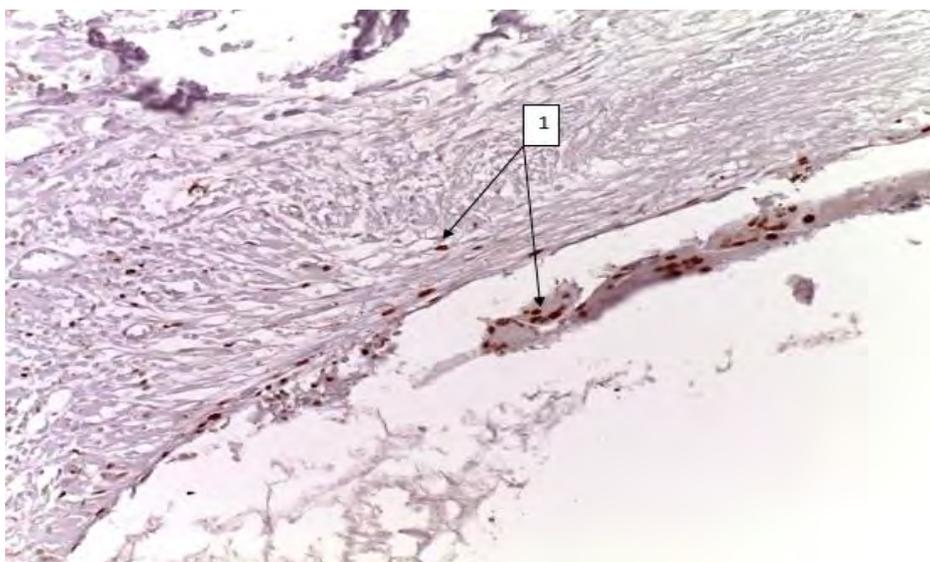


Рисунок 5.6 – Микропрепарат костной ткани. Проллиферативная активность клеток в рыхлой соединительной ткани на границе с имплантом (1).

Иммуногистохимия с PCNA. ДАБ. Ув. 250

Через 6 месяцев после оперативного вмешательства при микроскопическом исследовании костная ткань характеризовалась наличием фрагмента импланта в полости канала и формированием костных пластинок, состоящих из костных трабекул, в толще которых наблюдались остециты, а по периферии активные остеобласты. В зоне резорбции импланта были выявлены диффузно и хаотично расположенные остеокласты. Минимально выраженная инфильтрация полиморфно-ядерными лейкоцитами, лимфоцитами. На границе с материалом биодеградирующего импланта наблюдалось разрастание соединительной ткани с пролиферирующими остеобластами и большим количеством новообразованных сосудов (Рисунок 5.7-5.9).

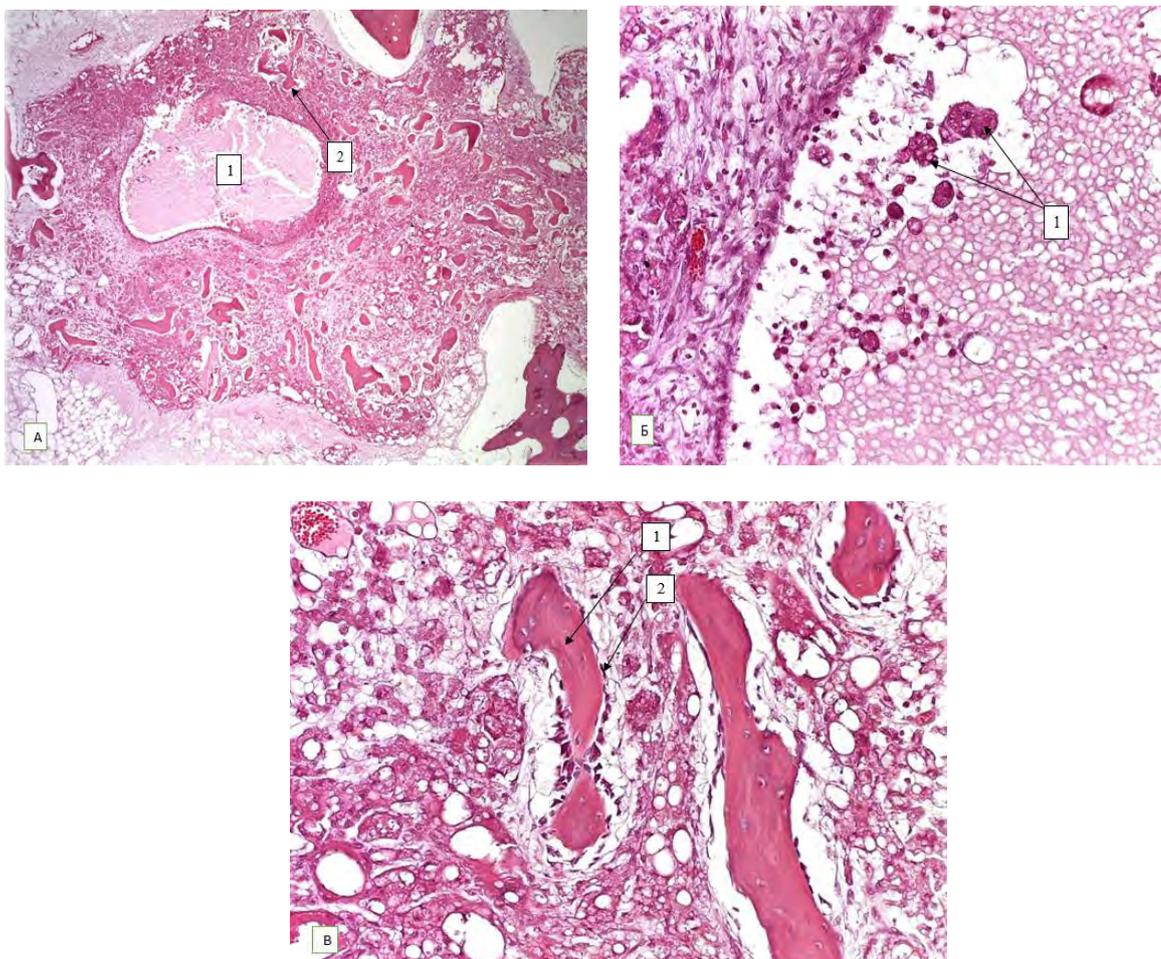


Рисунок 5.7 – Микропрепарат костной ткани. А – остаток импланта (1), костная трабекула (2) в полости канала; Б – детали. Элиминация материала импланта макрофагами (1); В – детали. Костные пластинки (1) с остеобластами (2) в полости импланта. Гематоксилин и эозин. А – Ув. 15; Б, В – Ув. 125.

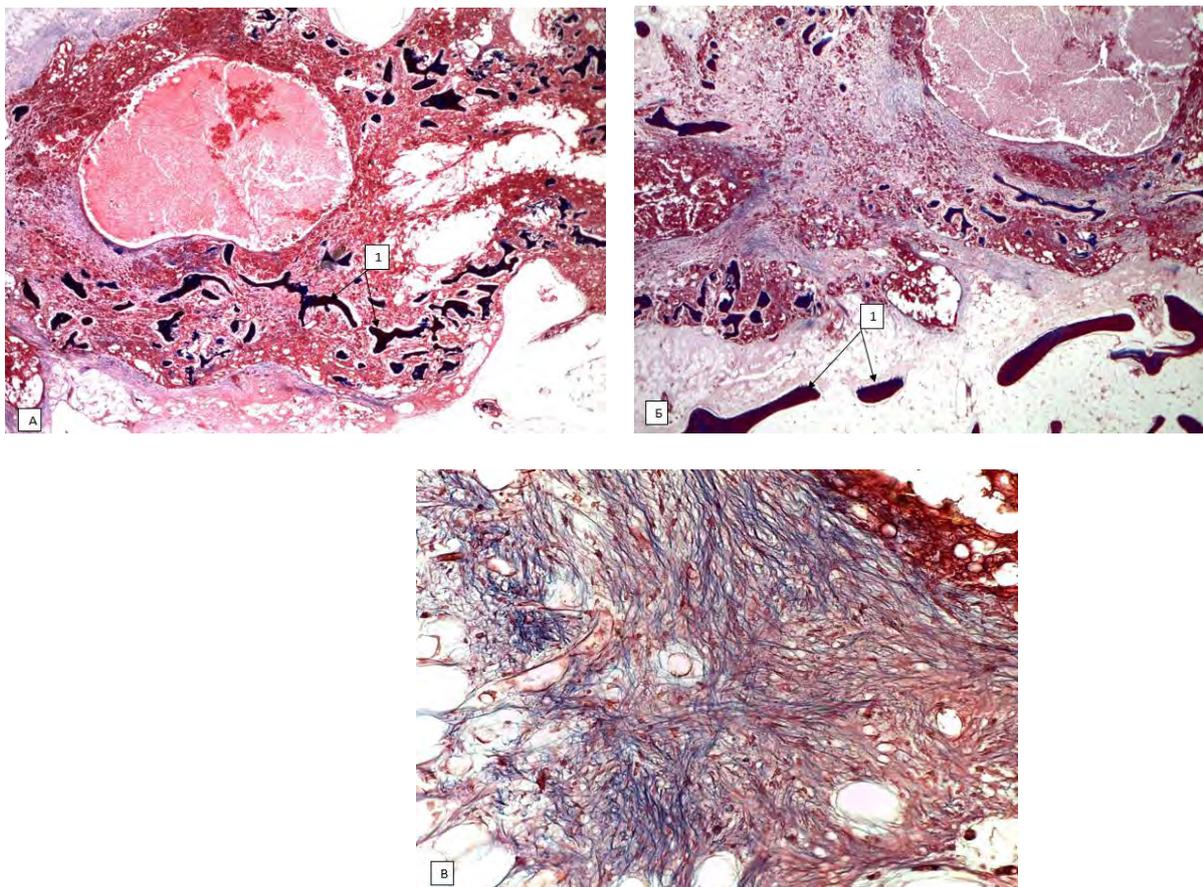


Рисунок 5.8 – Микропрепарат костной ткани. А, Б – костные пластинки (1) в полости импланта; В – Разрастание соединительной ткани синего цвета, сосуды красно-коричневого цвета. Окрашивание по Массону. А, Б – Ув. 15; В - Ув. 125.

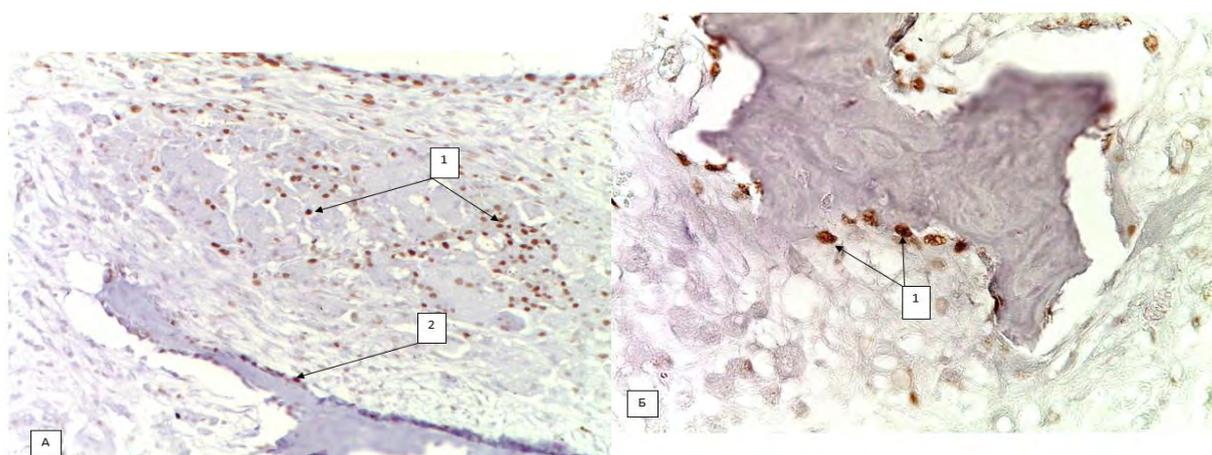


Рисунок 5.9 – Микропрепарат костной ткани. А – пролиферативная активность клеток соединительной ткани в зоне имплантационного канала (1), активные остеобласты (2); Б – пролиферативная активность остеобластов (1) на границе

формирующихся костных пластинок в зоне импланта. Иммуногистохимия с PCNA. ДАБ. А – Ув. 125; Б – Ув. 250.

Также наблюдались участки, в которых контуры канала были выстланы костными пластинками и тяжами гиалинового хряща, а в просвете наблюдалась обильная васкуляризация с элементами соединительной ткани (Рисунок 5.10).

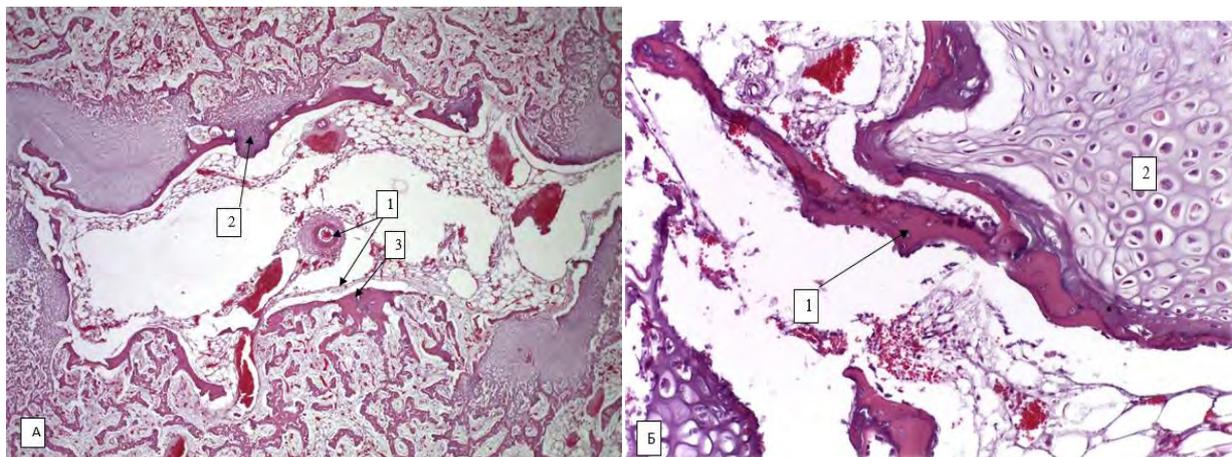


Рисунок 5.10 – Микропрепараты костной ткани. А – соединительная ткань с сосудами (1), гиалиновая хрящевая ткань (2), костные пластины (3); Б – костная пластина с остеобластами (1); пузырьчатый хрящ (2). Гематоксилин и эозин. А – Ув. 15; Б – Ув. 125.

Согласно полученным результатам, через три месяца после введения винтов из поли(D,L-лактида) овцам второй опытной группы в зонах имплантации отмечалось разрастание молодого, волокнистого соединительнотканного компонента с активными фибробластами, появление новообразованных капиллярных сетей и более крупных тонкостенных кровеносных сосудов. Наблюдались участки новообразованного гиалинового хряща. Данные признаки свидетельствуют о реинтеграции. Через шесть месяцев после операции отмечены явные признаки прямого остеогенеза. Наличие остеокластов, характеризуют элиминацию материала импланта. Другие изменения в области деградируемого импланта в виде формирования костно-пузырчатых хрящевых пластин с пролиферирующими остеобластами, свидетельствуют об активно протекающем непрямом остеогенезе. В области имплантационного канала наблюдалось

большое количество новообразованных сосудов, пролиферирующих фибробластов, которые являются проводником для дальнейшего остеогенеза.

При разработке имплантатов из быстро деградирующих материалов важно контролировать возможное накопление кислых низкомолекулярных продуктов деструкции, которые могут вызвать воспаление. Известно, что фосфаты кальция обладают буферным эффектом и нейтрализуют рН среды, минимизируя таким образом вероятность воспаления.

При микроскопическом исследовании зон имплантации винтов из композиционного материала на основе поли(D,L-лактида) с 5 вес.% трикальций фосфата через 3 месяца после оперативного вмешательства полость канала была выстлана тонкой прослойкой волокнистой соединительной ткани, в структурах которой имелись молодые сосуды с PCNA-положительными ядрами эндотелия. В основании, центрально расположенного, стержня, также, располагались многочисленные кровеносные сосуды (Рисунок 5.11-5.13).

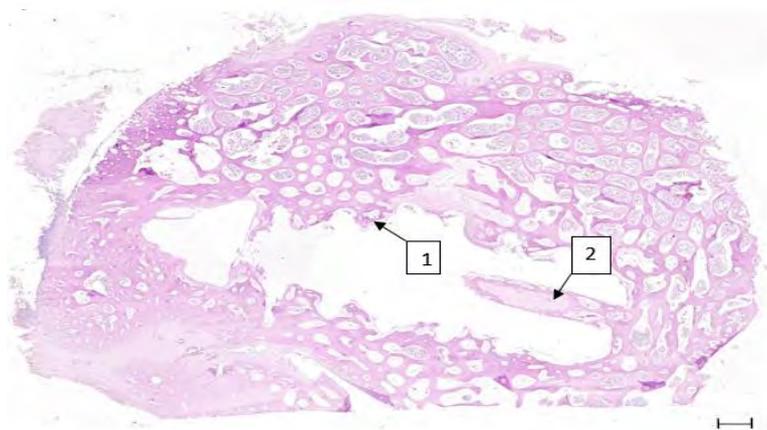


Рисунок 5.11 – Сканированный гистологический срез. Граница имплантационного канала (1), соединительнотканый стержень (2). Гематоксилин и эозин. Длина линии – 1 мм.

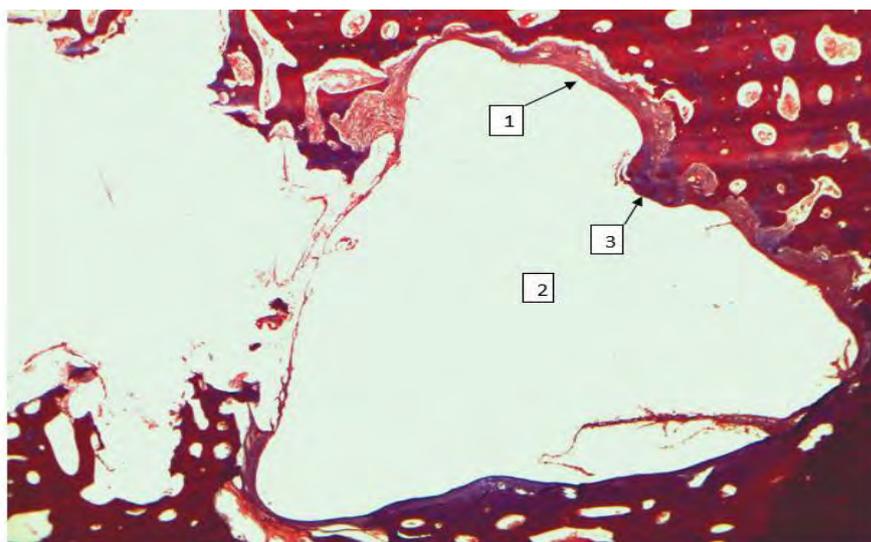


Рисунок 5.12 – Микропрепарат костной ткани. Соединительнотканная капсула (1), полость канала (2), гиалиновая хрящевая ткань (3). Окрашивание по Массону. А – Ув. 25.

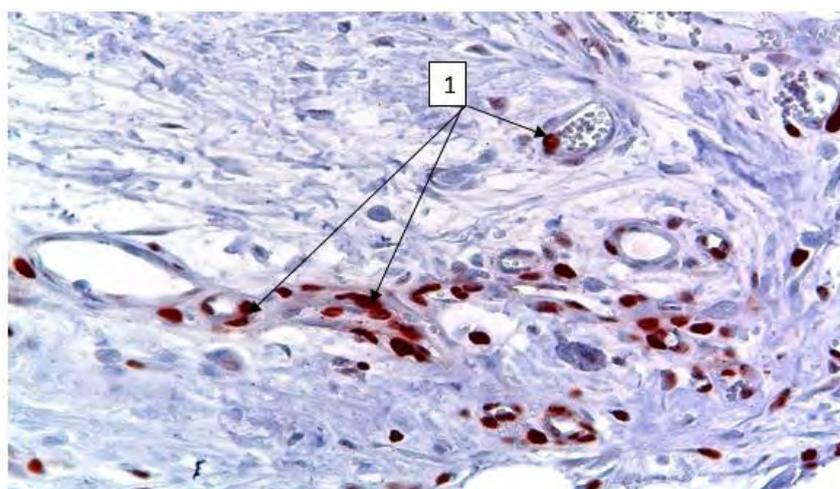


Рисунок 5.13 – Область соединительнотканной капсулы на границе канала. Проллиферативная активность эндотелиоцитов (1). Иммуногистохимия с PCNA. АЭЖ. А – Ув. 400.

Через 6 месяцев после оперативного вмешательства при микроскопическом исследовании, костная ткань характеризовалась наличием имплантационной полости с центральным стержнем, состоящего из соединительной ткани и остатков биodeградирующего импланта. По периметру имплантационного канала

выявлялась тонкая соединительнотканная капсула, местами утолщенная (Рисунок 5.14).

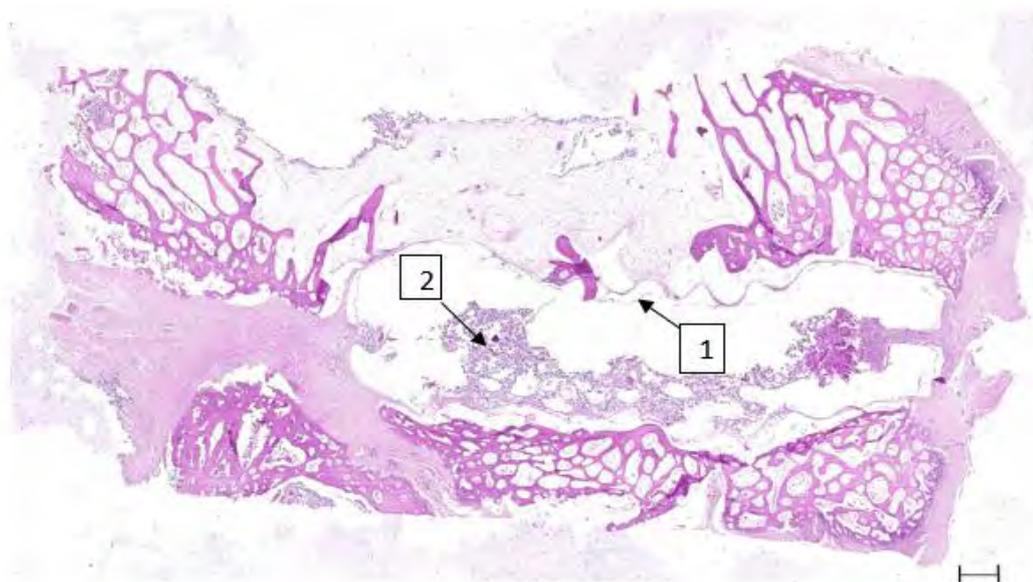


Рисунок 5.14 – Сканированный гистологический срез. Граница имплантационного канала (1), соединительнотканый стержень (2). Гематоксилин и эозин. Длина линии – 1 мм.

Согласно полученным результатам, через три месяца после введения винтов из поли(D,L-лактида) и трикальций фосфата с 5 вес.% концентрацией, овцы четвертой опытной группы, в зонах имплантации характеризовались разрастанием молодого, волокнистого соединительнотканного компонента, с активно пролиферирующими эндотелиоцитами, данная морфологическая картина является проводником для дальнейшего остеогенеза. Также, наблюдались многочисленные участки новообразованных костных балок с гиалиновой хрящевой тканью, что характеризует протекающую реинтеграцию. Через шесть месяцев после операции в зонах имплантации наблюдалось дальнейшее заполнение имплантационного канала соединительнотканым стержнем, с остатками биodeградирующего импланта. Канал был ограничен тонкой прослойкой соединительной ткани. Данные изменения являются одним из маркёров процессов ремоделирования окружающей ткани.

Через 3 месяца после имплантации винтов из композиционного материала на основе поли(L-лактида), наполненного 5 вес.% ТКФ, по периметру имплантационного канала происходит локальное, минимально выраженное разрастание соединительной ткани, по периферии находятся костные пластинки (Рисунок 5.15). Имеются полости с новообразованными сосудами, а также формирующиеся костные пластинки.

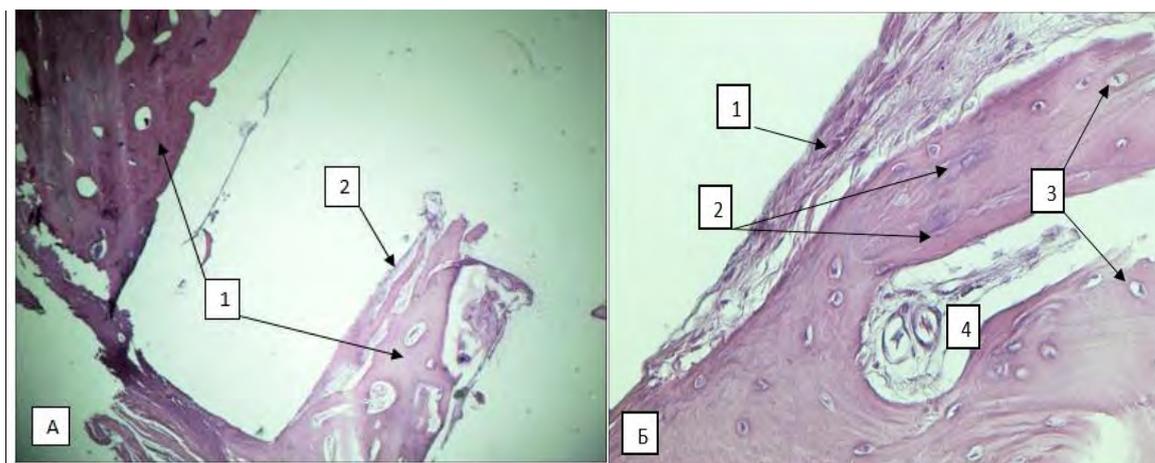


Рисунок 5.15 – Микропрепарат костной ткани через 3 месяца после имплантации.

А - Область имплантационного канала. Костные пластины (1), рыхлая волокнистая соединительная ткань (2); Б – детали. Рыхлая волокнистая соединительная ткань (1), данная область напоминает минерализацию межклеточного вещества гиалинового хряща в костной пластинки (2), набухшие, вакуолизированные, пузырчатой формы хондроциты (3), полость с новообразованными сосудами (4). Гематоксилин и эозин. А – Ув. 40; Б – Ув. 100.

Через 1 год после имплантации винтов выраженных морфологических признаков их биодеструкции не обнаружено (Рисунок 5.16). По периферии имплантационного канала, как правило, формировалась лишь тонкая соединительнотканная капсула. В отдельных участках были видны тонкие прослойки жировой ткани, немногочисленные макрофаги и фрагменты частично деградируемого импланта. В более широких прослойках соединительной ткани в основании каналов визуализировались небольшие фрагменты материала импланта, рассасываемые многоядерными макрофагами.

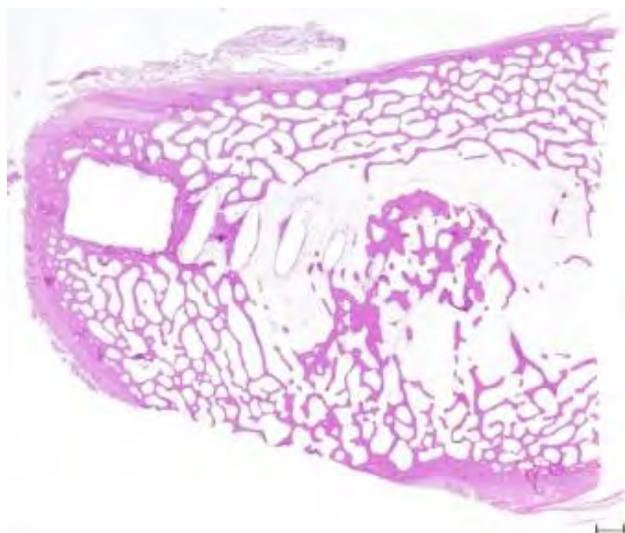


Рисунок 5.16 – Сканированный гистологический срез винта из композиционного материала на основе поли(L-лактида), наполненного 5 вес.% ТКФ в костной ткани через 1 год после имплантации. Гематоксилин и эозин. Длина масштабной линии – 1 мм.

Таким образом, полученные данные через три месяца после оперативного вмешательства, у животных с внедренными винтами из поли(L-лактида) и 5 вес.% трикальция фосфата в область имплантационного канала, характеризуются разрастанием молодого, волокнистого соединительнотканного компонента и новообразованных кровеносных сосудов. Через шесть месяцев наблюдалась реинтеграция костной ткани. В просвете имплантационного канала находились сформированные костные трабекулы с единичными очагами минерализации межклеточного вещества. Также наблюдалось разрастание грануляционной ткани с пролиферацией мноморфных клеток, что дает возможность предположить о протекающем гемопоэзе. Через 12 месяцев наблюдалась остеоиндукция - заполнение имплантационных каналов элементами жировой ткани и гемопоэтическими клетками, полностью сформированные костные трабекулы. Наблюдался фиброзно-костный контакт, что характерно для фиброостеоинтеграции. Лимфоцитарная и нейтрофильная инфильтрация отсутствовала. Данные изменения говорят о ремоделировании окружающей костной ткани.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что биоразлагаемые импланты всех групп обладают выраженной биосовместимостью, так как воспалительная реакция окружающих тканей была минимально выражена через 3 и 6 месяцев и полностью отсутствовала через год после имплантации винтов. Винты на основе поли(D,L-лактида) и сополимера L-лактида с гликолидом деградируют значительно быстрее винтов на основе поли(L-лактида). Процессы остеоиндукции присутствовали во всех случаях посредством вторичного остеогенеза, как например в случае винтов из поли(D,L-лактида), либо благодаря комбинации первичного и вторичного остеогенеза, как в случае винтов из композиционного материала на основе поли(L-лактида), наполненного 5 вес.% трикальций фосфата. Наблюдается фиброостеоинтеграция либо остеоинтеграция, что позволяет характеризовать данные материалы как биоинертные, относящиеся к оптимальным вариантам интеграции, для успешной имплантации внутрикостных биоразлагаемых винтов. Результаты позволяют рекомендовать данные композиционные материалы со свойствами биорезорбции для использования в травматолого-ортопедической практике в качестве материала для изготовления различных крепежных имплантов для остеосинтеза и сухожильных пластик, а также с целью замещения дефектов костных тканей и оптимизации процесса остеоиндукции.

Выводы

1. Разработана методика получения композиционных материалов на основе сополимеров лактида и фосфатов кальция, обеспечивающая равномерное распределение наполнителя на субмикронном уровне и механические свойства, соответствующие нативной костной ткани.

2. Исследование кинетики кристаллизации полимерной матрицы методом дифференциальной сканирующей калориметрии показало, что КФ наполнители обладают значительным нуклеирующим эффектом, и увеличение содержания наполнителя с 5 до 20 вес.% ускоряет кристаллизацию, причем гидроксиапатит - в большей степени, чем трикальций фосфат.

3. Комплексно изучено влияние наполнителя на механические свойства и на надмолекулярную структуру. Показано, что максимальная прочность на изгиб (141 МПа) достигается при введении 5 вес.% гидроксиапатита, а модуль упругости при 20 вес.% (6,3 ГПа). Для ненаполненного полилактида эти значения составляют 102 МПа и 3,8 ГПа соответственно. Установлено, что увеличение механических характеристик обусловлено не только введением жесткого наполнителя, но и увеличением степени кристалличности полимерной матрицы.

4. Проведена модификация порошка гидроксиапатита раствором молочной кислоты в спирте. Максимальное количество привитой молочной кислоты составило 3 вес.% в образце, модифицированном 30% раствором молочной кислоты. Прививка молочной кислоты на гидроксиапатите приводит к увеличению модуля композита на изгиб и при растяжении от $6,84 \pm 0,07$ ГПа до $7,53 \pm 0,13$ ГПа и от $1,78 \pm 0,07$ ГПа до $2,03 \pm 0,06$ ГПа при 20 вес.% наполнения, соответственно.

5. Изучена эволюция структуры и упругих свойств полимеров на основе L, L-лактида, D, L-лактида и ϵ -капролактона при деградации *in vitro* с помощью высокочастотной импульсной акустической микроскопии. Показано, что

уменьшение молекулярной массы сопровождается формированием пустот в материале. Применение кинетических моделей деградации позволило наблюдать автокаталитическое ускорение через 2 месяца гидролиза образцов поли(D,L-лактида), поликапролактона и сополимера L-лактида и капролактона. При этом наибольшей скоростью разложения обладает сополимер L-лактида и капролактона, быстрое уменьшение молекулярной массы которого свидетельствует о преимущественно статистическом разрыве полимерной цепи.

6. Испытания изделий *in vivo* на показали, что биоразлагаемые имплантаты всех групп обладают выраженной биосовместимостью. Винты на основе поли(D,L-лактида) и сополимера L-лактида с гликолидом деградируют значительно быстрее винтов на основе поли(L-лактида). Процессы остеоиндукции присутствовали во всех случаях. Так вторичный остеогенез наблюдается случае поли(D,L-лактида), а, например, в случае винтов из композиционного материала на основе поли(L-лактида), наполненного 5 вес.% трикальций фосфата, происходит комбинация первичного и вторичного остеогенеза. Продемонстрирована перспективность использования полученных материалов для изготовления различных крепежных изделий для травматологии.

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.х.н., проф., член.-корр. РАН Чвалуну Сергею Николаевичу за помощь на всех этапах работы, а также своим коллегам, без которых эта работа не состоялась бы: Крашенинникову С.В. за проведение физико-механических испытаний, Бузину А.И. и Дмитрякову П.В. за помощь в исследовании теплофизических свойств, Морокову Е.С. за изучение деградации пленок *in vitro* методом импульсной акустической микроскопии, Малахову С.Н. за проведение исследований методом инфракрасной спектроскопии, Бакирову А.В. за помощь в проведении рентгеноструктурных исследований; Садовской Н.В. и Камышинскому Р.С. за выполнение исследований электронной микроскопии, Гончарову Н.Г. и Гончарову Е.Н. за проведение исследований *in vivo*, а также Стрельцову Д.Р., Богдановой О.В., Малаховой Ю.В., Седушу Н.Г. и Полякову Д.К. за плодотворные дискуссии по результатам исследований.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ridzwan M.I.Z. et al. Problem of Stress Shielding and Improvement to the Hip Implant Designs: A Review // *J. Med. Sci.* 2007. Vol. 7, № 3. P. 460–467.
2. Burg K.J., Porter S., Kellam J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. // *Biomaterials.* 2000. Vol. 21, № 23. P. 2347–2359.
3. Jones J.R. Observing cell response to biomaterials // *Mater. Today.* 2006. Vol. 9, № 12. P. 34–43.
4. Cancedda R. et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone // *Matrix Biol.* 2003. Vol. 22, № 1. P. 81–91.
5. Middleton J.C., Tipton A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. // *Biomaterials.* 2000. Vol. 21, № 23. P. 2335–2346.
6. Agrawal C.M., Ray R.B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2001. Vol. 55, № 2. P. 141–150.
7. Путляев В.И. Современные биокерамические материалы // *Соросовский образовательный журнал.* 2004. Vol. 8, № 1.
8. Баринов С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. Москва: Наука, 2005. 204 p.
9. Silva G.A. et al. Materials in particulate form for tissue engineering. 2. Applications in bone // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007. Vol. 1, № 2. P. 97–109.
10. Suvorova E.I., Petrenko P.P., Buffat P.A. Scanning and Transmission Electron Microscopy for Evaluation of Order/Disorder in Bone Structure // *Scanning.* 2007. Vol. 29, № 4. P. 162–170.
11. Кнетс И.В. РАЗРУШЕНИЕ КОМПАКТНОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ // *МЕХАНИКА КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ.* 1979. Vol. 2. P. 338—343.
12. Böhner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements // *Injury.* 2000. Vol. 31. P. D37–D47.
13. Gogolewski S. Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery // *Injury.* 2000. Vol. 31. P. D28–D32.
14. Staiger M.P. et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review // *Biomaterials.* 2006. Vol. 27, № 9. P. 1728–1734.
15. El-Ghannam A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. // *Expert Rev. Med. Devices.* 2005. Vol. 2, № 1. P. 87–101.
16. Yoshikawa H., Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. // *J. Artif. Organs.* 2005. Vol. 8, № 3. P. 131–136.
17. Cölfen H. Biomineralization: A crystal-clear view // *Nat. Mater.* 2010. Vol. 9, № 12. P. 960–961.

18. Рассказова Л. А. Технология получения магний- и кремний-модифицированных гидроксиапатитов и биорезорбируемых композиционных материалов с использованием полимеров молочной кислоты. 2015. 137 p.
19. Takafumi Kanazawa. Inorganic Phosphate Materials (Materials Science Monographs). 1989. 288 p.
20. Hughes J.M., Rakovan J. The Crystal Structure of Apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{OH}, \text{Cl})$ // Rev. Mineral. Geochemistry. 2002. Vol. 48, № 1. P. 1–12.
21. Xiao L. et al. Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications // Biomedical Science, Engineering and Technology. InTech, 2012.
22. Paluszkiwicz C. et al. Synthesis, structural properties and thermal stability of Mn-doped hydroxyapatite // J. Mol. Struct. 2010. Vol. 976, № 1–3. P. 301–309.
23. Фадеева И.В. et al. Цинк и серебросодержащие гидроксиапатиты : 2012. P. 780–783.
24. Matthews F.L., Rawlings R.D. Composite Materials: Engineering and Science. 1999. 408 p.
25. Choi S. et al. Chemical and physical properties of carbonated hydroxyapatite affect breast cancer cell behavior // Acta Biomater. 2015. Vol. 24. P. 333–342.
26. Kalita S.J., Bhardwaj A., Bhatt H.A. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering // Mater. Sci. Eng. C. 2007. Vol. 27, № 3. P. 441–449.
27. Raynaud S. et al. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders // Biomaterials. 2002. Vol. 23, № 4. P. 1065–1072.
28. LeGeros R.Z. et al. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2003. Vol. 14, № 3. P. 201–209.
29. Suchanek W., Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants // J. Mater. Res. 1998. Vol. 13, № 01. P. 94–117.
30. Engelberg I., Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study // Biomaterials. 1991. Vol. 12, № 3. P. 292–304.
31. Laurencin C.T. et al. Tissue engineering: orthopedic applications. // Annu. Rev. Biomed. Eng. 1999. Vol. 1. P. 19–46.
32. Agrawal C.M., Ray R.B. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. // J. Biomed. Mater. Res. 2001. Vol. 55, № 2. P. 141–150.
33. Martin R.B. Bone as a Ceramic Composite Material // Mater. Sci. Forum. 1999. Vol. 293. P. 5–16.

34. Eglin D., Alini M. Degradable polymeric materials for osteosynthesis: Tutorial // *Eur. Cells Mater.* 2008. Vol. 16. P. 80–91.
35. Хенч Л. Л. Д.Д.Р. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей: монография. 2007. 304 p.
36. Gogolewski S., Gorna K. Biodegradable polyurethane cancellous bone graft substitutes in the treatment of iliac crest defects // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2007. Vol. 80A, № 1. P. 94–101.
37. Tereshchenko V. et al. Materials and Methods of Bone Tissue Engineering // *Hir. pozvonočnika.* 2016. Vol. 13, № 1. P. 72–81.
38. Zhang C. Biodegradable Polyesters: Synthesis, Properties, Applications // *Biodegrad. Polyesters.* 2015. P. 1–24.
39. Bozentka D.J. Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility // *J. Hand Surg. Am.* 1993. Vol. 18, № 6. P. 1130.
40. Wu S. et al. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering // *Mater. Sci. Eng. R Reports.* 2014. Vol. 80. P. 1–36.
41. Garg P. et al. Bioabsorbable Implant Materials: A Review // *J Adv Med Dent Scie.* 2013. Vol. 1, № 2. P. 83–85.
42. Yôzô Chatani Kazuaki Suehiro Yasuo Ôkita Hiroyuki Tadokoro Kiyoshi Chujo. Structural studies of polyesters. I. Crystal structure of polyglycolide // *Macromolecular.* 1968. Vol. 113, № 1. P. 215–229.
43. Lasprilla A.J.R. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review // *Biotechnol. Adv.* 2012. Vol. 30, № 1. P. 321–328.
44. Carothers W.H., Dorough G.L., Natta F.J. van. Studies of polymerization and ring formation. x. the reversible polymerization of six-membered cyclic esters // *J. Am. Chem. Soc.* 1932. Vol. 54, № 2. P. 761–772.
45. KULKARNI R.K. Polylactic Acid for Surgical Implants // *Arch. Surg.* 1966. Vol. 93, № 5. P. 839.
46. Donald Garlotta. A Literature Review of Poly(Lactic Acid) // *Journal Polym. Environ.* 2002. Vol. 9, № 2. P. 63–84.
47. Kalb B., Pennings A.J. General crystallization behaviour of poly(l-lactic acid) // *Polymer (Guildf).* 1980. Vol. 21, № 6. P. 607–612.
48. Hassan K.S. Autogenous bone graft combined with polylactic polyglycolic acid polymer for treatment of dehiscence around immediate dental implants. // *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2009. Vol. 108, № 5. P. e19-25.
49. Athanasiou K. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers // *Biomaterials.* 1996. Vol. 17, № 2. P. 93–102.

50. Агаджанян В.В. et al. Биодegradируемые Импланты В Ортопедии И Травматологии. Наш Первый Опыт // Политравма. 2016. № 4. P. 85–93.
51. Hench L.L., Polak J.M. Third-generation biomedical materials. // Science. 2002. Vol. 295, № 5557. P. 1014–1017.
52. Rezwani K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. // Biomaterials. 2006. Vol. 27, № 18. P. 3413–3431.
53. Giannelis E.P. Polymer Layered Silicate Nanocomposites // Adv. Mater. 1996. Vol. 8, № 1. P. 29–35.
54. Paul D.R., Robeson L.M. Polymer nanotechnology: Nanocomposites // Polymer (Guildf). 2008. Vol. 49, № 15. P. 3187–3204.
55. Wu C.-J. et al. Development of Biomedical Polymer-Silicate Nanocomposites: A Materials Science Perspective // Materials (Basel). 2010. Vol. 3, № 5. P. 2986–3005.
56. Thomas V. et al. Nanostructured biocomposite scaffolds based on collagen coelectrospun with nanohydroxyapatite. // Biomacromolecules. 2007. Vol. 8, № 2. P. 631–637.
57. Wei G., Ma P.X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. // Biomaterials. 2004. Vol. 25, № 19. P. 4749–4757.
58. Venugopal J. et al. Biocomposite nanofibres and osteoblasts for bone tissue engineering // Nanotechnology. 2007. Vol. 18, № 5. P. 055101.
59. Jell G. et al. Carbon nanotube-enhanced polyurethane scaffolds fabricated by thermally induced phase separation // J. Mater. Chem. 2008. Vol. 18, № 16. P. 1865.
60. Shi X. et al. Injectable nanocomposites of single-walled carbon nanotubes and biodegradable polymers for bone tissue engineering. // Biomacromolecules. 2006. Vol. 7, № 7. P. 2237–2242.
61. Shi X. et al. Fabrication of porous ultra-short single-walled carbon nanotube nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. // Biomaterials. 2007. Vol. 28, № 28. P. 4078–4090.
62. Sitharaman B. et al. In vivo biocompatibility of ultra-short single-walled carbon nanotube/biodegradable polymer nanocomposites for bone tissue engineering. // Bone. 2008. Vol. 43, № 2. P. 362–370.
63. Kotela I. et al. Polymer nanocomposites for bone tissue substitutes // Ceram. Int. 2009. Vol. 35, № 6. P. 2475–2480.
64. Heinemann S. et al. A Novel Biomimetic Hybrid Material Made of Silicified Collagen: Perspectives for Bone Replacement // Adv. Eng. Mater. 2007. Vol. 9, №

12. P. 1061–1068.
65. Heinemann S. et al. Bioactive silica-collagen composite xerogels modified by calcium phosphate phases with adjustable mechanical properties for bone replacement. // *Acta Biomater.* 2009. Vol. 5, № 6. P. 1979–1990.
 66. Ehrlich H. et al. Nanostructural Organization of Naturally Occurring Composites—Part I: Silica-Collagen-Based Biocomposites // *J. Nanomater.* 2008. Vol. 2008. P. 1–8.
 67. Wong Po Foo C. et al. Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103, № 25. P. 9428–9433.
 68. Lee J.H. et al. Thermal and mechanical characteristics of poly(L-lactic acid) nanocomposite scaffold. // *Biomaterials.* 2003. Vol. 24, № 16. P. 2773–2778.
 69. Zhuang H. et al. In vitro biodegradation and biocompatibility of gelatin/montmorillonite-chitosan intercalated nanocomposite. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007. Vol. 18, № 5. P. 951–957.
 70. Ozkoc G., Kemaloglu S., Quaedflieg M. Production of poly(lactic acid)/organoclay nanocomposite scaffolds by microcompounding and polymer/particle leaching // *Polym. Compos.* 2009. P. NA-NA.
 71. Krikorian V., Pochan D.J. Poly (L -Lactic Acid)/ Layered Silicate Nanocomposite : Fabrication , Characterization , and Properties. 2003. № 13. P. 4317–4324.
 72. Allo B. a et al. Bioactive and biodegradable nanocomposites and hybrid biomaterials for bone regeneration. // *J. Funct. Biomater.* 2012. Vol. 3, № 2. P. 432–463.
 73. Jo J.-H. et al. In vitro/in vivo biocompatibility and mechanical properties of bioactive glass nanofiber and poly(epsilon-caprolactone) composite materials. // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2009. Vol. 91, № 1. P. 213–220.
 74. Cho J., Joshi M.S., Sun C.T. Effect of inclusion size on mechanical properties of polymeric composites with micro and nano particles // *Compos. Sci. Technol.* 2006. Vol. 66, № 13. P. 1941–1952.
 75. Roeder R.K., Sproul M.M., Turner C.H. Hydroxyapatite whiskers provide improved mechanical properties in reinforced polymer composites. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2003. Vol. 67, № 3. P. 801–812.
 76. Heimbach B. et al. Effect of hydroxyapatite concentration on high-modulus composite for biodegradable bone-fixation devices // *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 2017. Vol. 105, № 7. P. 1963–1971.
 77. Kunze C. et al. Surface modification of tricalcium phosphate for improvement of the interfacial compatibility with biodegradable polymers // *Biomaterials.* 2003.

Vol. 24, № 6. P. 967–974.

78. Hong Z. et al. Grafting polymerization of l-lactide on the surface of hydroxyapatite nano-crystals // *Polymer (Guildf)*. 2004. Vol. 45, № 19. P. 6699–6706.
79. Atsuta M., Turner D.T. Optimum strength of composites of ceramic particles in poly(methyl methacrylate) // *Polym. Compos.* 1982. Vol. 3, № 2. P. 83–87.
80. Helwig E. et al. Ring-opening polymerization of lactones in the presence of hydroxyapatite // *Biomaterials*. 2001. Vol. 22, № 19. P. 2695–2702.
81. Ren J. et al. Poly (D,L-lactide)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering and biocompatibility evaluation // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008. Vol. 19, № 3. P. 1075–1082.
82. Волынский А.Л., Бакеев Н.Ф. Роль поверхностных явлений в структурно-механической поведении твердых полимеров. Физматлит, 2013.
83. Трофимчук Е.С. et al. Нанокompозиты на основе пористого полилактида, полученного по механизму крейзинга в водно-этанольных растворах, и фосфатов кальция // *Высокомолекулярные соединения А*. 2018. Vol. 60, № 8. P. 3–12.
84. Trofimchuk E.S. et al. Porous polylactide prepared by the delocalized crazing as a template for nanocomposite materials // *Mendeleev Commun.* 2020. Vol. 30, № 2. P. 171–173.
85. Fadeeva I. V et al. Novel approach to obtain composite poly-L-lactide based films blended with starch and calcium phosphates and their bioactive properties // *Biomed. Phys. Eng. Express*. 2015. Vol. 1, № 4. P. 045011.
86. Fisa B., Sanschagrin B., Favis B. Mechanical degradation of mica during processing with polypropylene // *Polym. Compos.* 1984. Vol. 5, № 4. P. 264–276.
87. Damadzadeh B. et al. Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-l-lactic acid and poly-l-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010. Vol. 21, № 9. P. 2523–2531.
88. Sarvestani A.S., He X., Jabbari E. Osteonectin-derived peptide increases the modulus of a bone-mimetic nanocomposite. // *Eur. Biophys. J.* 2008. Vol. 37, № 2. P. 229–234.
89. Баженов С.Л. et al. Полимерные композиционные материалы. Прочность и технологии. Долгопрудный: Издательский Дом “Интеллект,” 2010. 347 p.
90. HONG Z. et al. Nano-composite of poly(-lactide) and surface grafted hydroxyapatite: Mechanical properties and biocompatibility // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26, № 32. P. 6296–6304.
91. Dong Q. et al. A new bioactive polylactide-based composite with high mechanical

- strength // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 2014. Vol. 457. P. 256–262.
92. Takagi S., Chow L.C., Ishikawa K. Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements // *Biomaterials.* 1998. Vol. 19, № 17. P. 1593–1599.
 93. Wang J. et al. Fabrication and characterization of composites composed of a bioresorbable polyester matrix and surface modified calcium carbonate whisker for bone regeneration // *Polym. Adv. Technol.* 2017. Vol. 28, № 12. P. 1892–1901.
 94. Li J., X.L.Lu, Zheng Y.F. Effect of surface modified hydroxyapatite on the tensile property improvement of HA/PLA composite // *Appl. Surf. Sci.* 2008. Vol. 255, № 2. P. 494–497.
 95. Qiu X. et al. Surface-modified hydroxyapatite linked by L-lactic acid oligomer in the absence of catalyst // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* 2005. Vol. 43, № 21. P. 5177–5185.
 96. Liu, Q., De Wijn, J.R., Bakker, D., and Van Blitterswijk C.A. Surface modification of hydroxyapatite to introduce interfacial bonding with polyactive™ 70/30 in a biodegradable composite // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1996. P. 551–557.
 97. Lee H.J. et al. Modification of Hydroxyapatite Nanosurfaces for Enhanced Colloidal Stability and Improved Interfacial Adhesion in Nanocomposites // *Chem. Mater.* 2006. Vol. 18, № 21. P. 5111–5118.
 98. Qiu X. et al. Hydroxyapatite Surface Modified by L-Lactic Acid and Its Subsequent Grafting Polymerization of L-Lactide // *Biomacromolecules.* 2005. Vol. 6, № 3. P. 1193–1199.
 99. Huang G. et al. Poly(L-lactide) nanocomposites containing poly(D-lactide) grafted nanohydroxyapatite with improved interfacial adhesion via stereocomplexation // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2018. Vol. 78. P. 10–19.
 100. Вундерлих Б. Физика макромолекул. Том 2. Зарождение, рост и отжиг кристаллов. Издательство Мир. Москва., 1979.
 101. Вундерлих Б. Физика макромолекул. Том 1. Кристаллическая структура, морфология, дефекты. Издательство Мир. Москва., 1976. 624 p.
 102. А. Н. Колмогоров. К статистической теории кристаллизации металлов // *Изв. АН СССР. Сер. матем.* 1937. Vol. 1, № 3. P. 355–359.
 103. Rybnikar F. Mechanism of secondary crystallization in polymers // *J. Polym. Sci. Part A Gen. Pap.* 1963. Vol. 1, № 6. P. 2031–2038.
 104. Hoffman J.D. Regime III crystallization in melt-crystallized polymers: The variable cluster model of chain folding // *Polymer (Guildf).* 1983. Vol. 24, № 1. P. 3–26.

105. Di Lorenzo M.L. Determination of spherulite growth rates of poly(l-lactic acid) using combined isothermal and non-isothermal procedures // *Polymer (Guildf)*. 2001. Vol. 42, № 23. P. 9441–9446.
106. De Santis P., Kovacs A.J. Molecular conformation of poly(S-lactic acid) // *Biopolymers*. 1968. Vol. 6, № 3. P. 299–306.
107. Alemán C., Lotz B., Puiggali J. Crystal Structure of the α -Form of Poly(L-lactide) // *Macromolecules*. 2001. Vol. 34, № 14. P. 4795–4801.
108. Wasanasuk K. et al. Crystal Structure Analysis of Poly(l -lactic Acid) α Form On the basis of the 2-Dimensional Wide-Angle Synchrotron X-ray and Neutron Diffraction Measurements // *Macromolecules*. 2011. Vol. 44, № 16. P. 6441–6452.
109. Zhang J. et al. Confirmation of Disorder α Form of Poly(L-lactic acid) by the X-ray Fiber Pattern and Polarized IR/Raman Spectra Measured for Uniaxially-Oriented Samples // *Macromol. Symp*. 2006. Vol. 242, № 1. P. 274–278.
110. Hoogsteen W. et al. Crystal structure, conformation and morphology of solution-spun poly(L-lactide) fibers // *Macromolecules*. 1990. Vol. 23, № 2. P. 634–642.
111. Brizzolara D. et al. Novel materials through stereocomplexation // *J. Comput. Mater. Des*. 1996. Vol. 3, № 1–3. P. 341–350.
112. Cartier L. et al. Epitaxial crystallization and crystalline polymorphism of polylactides // *Polymer (Guildf)*. 2000. Vol. 41, № 25. P. 8909–8919.
113. Wang H., Zhang J., Tashiro K. Phase Transition Mechanism of Poly(l -lactic acid) among the α , δ , and β Forms on the Basis of the Reinvestigated Crystal Structure of the β Form // *Macromolecules*. 2017. Vol. 50, № 8. P. 3285–3300.
114. Huang S.-M. et al. Crystallization behavior of poly(L-lactic acid)/montmorillonite nanocomposites // *J. Appl. Polym. Sci*. 2010. P. NA-NA.
115. Mo Z., Zhang H. The Degree of Crystallinity in Polymers by Wide-Angle X-Ray Diffraction (Waxd) // *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev*. 1995. Vol. 35, № 4. P. 555–580.
116. Shi N., Dou Q. Crystallization behavior, morphology, and mechanical properties of poly(lactic acid)/tributyl citrate/treated calcium carbonate composites // *Polym. Compos*. 2014. Vol. 35, № 8. P. 1570–1582.
117. Li J. et al. Crystalline structures and crystallization behaviors of poly(l -lactide) in poly(l -lactide)/graphene nanosheet composites // *Polym. Chem*. 2015. Vol. 6, № 21. P. 3988–4002.
118. Пентин Ю. Физика и химия твёрдого состояния органических соединений. Издательство Мир. Москва., 1987.
119. Oldenbourg R. Polarized Light Microscopy: Principles and Practice // *Cold Spring Harb. Protoc*. 2013. Vol. 2013, № 11. P. pdb.top078600-pdb.top078600.

120. Тадмор З., Гогос К. Теоретические основы переработки полимеров. М.: Химия, 1984. 632 p.
121. Shieh Y.-T. et al. Crystallization kinetics study of poly(L-lactic acid)/carbon nanotubes nanocomposites // *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 2010. Vol. 48, № 9. P. 983–989.
122. Wei J. et al. Isothermal crystallization behavior and unique banded spherulites of hydroxyapatite/poly(L-lactide) nanocomposites // *Chinese J. Polym. Sci.* 2010. Vol. 28, № 4. P. 499–507.
123. Vyazovkin S. et al. ICTAC Kinetics Committee recommendations for collecting experimental thermal analysis data for kinetic computations // *Thermochim. Acta.* 2014. Vol. 590. P. 1–23.
124. Kulinski Z., Piorkowska E. Crystallization, structure and properties of plasticized poly(l-lactide) // *Polymer (Guildf).* 2005. Vol. 46, № 23. P. 10290–10300.
125. Di Lorenzo M.L., Cimmino S., Silvestre C. Nonisothermal crystallization of isotactic polypropylene blended with poly(?-pinene). I. Bulk crystallization // *J. Appl. Polym. Sci.* 2001. Vol. 82, № 2. P. 358–367.
126. Souza D.H.S., Santoro P. V., Dias M.L. Isothermal Crystallization Kinetics of Poly(lactic acid) Stereocomplex/Graphene Nanocomposites // *Mater. Res.* 2018. Vol. 21, № 1.
127. Tabi T. et al. Crystalline structure of annealed polylactic acid and its relation to processing // *Express Polym. Lett.* 2010. Vol. 4, № 10. P. 659–668.
128. Zhou W.Y. et al. Crystallization kinetics of poly(L-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres // *J. Appl. Polym. Sci.* 2009. Vol. 113, № 6. P. 4100–4115.
129. Li Y. et al. Isothermal crystallization and melting behaviors of bionanocomposites from poly(lactic acid) and TiO₂ nanowires // *J. Appl. Polym. Sci.* 2012. Vol. 124, № 4. P. 2968–2977.
130. Li S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids // *J. Biomed. Mater. Res.* 1999. Vol. 48, № 3. P. 342–353.
131. Shtilman M.I. Biodegradation of Polymers // *J. Sib. Fed. Univ. Biol.* 2015. Vol. 8, № 2. P. 113–130.
132. Pan J. Modelling Degradation of Bioresorbable. 2015.
133. Williams D.F. Enzymic Hydrolysis of Polylactic Acid // *Eng. Med.* 1981. Vol. 10, № 1. P. 5–7.
134. Gu J.-D. et al. Microbiological Degradation of Polymeric Materials // *Uhlig's Corrosion Handbook.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. P. 421–438.
135. Rockwood D.N. et al. Characterization of biodegradable polyurethane microfibers

- for tissue engineering // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2007. Vol. 18, № 6. P. 743–758.
136. Li S., Garreau H., Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 3 Influence of the morphology of poly(l-lactic acid) // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1990. Vol. 1, № 4. P. 198–206.
 137. Vert M. Aliphatic Polyesters: Great Degradable Polymers That Cannot Do Everything // *Biomacromolecules*. 2005. Vol. 6, № 2. P. 538–546.
 138. TOKIWA Y., SUZUKI T. Hydrolysis of polyesters by lipases // *Nature*. 1977. Vol. 270, № 5632. P. 76–78.
 139. Tokiwa Y., Calabia B.P. Review Degradation of microbial polyesters // *Biotechnol. Lett.* 2004. Vol. 26, № 15. P. 1181–1189.
 140. Gleadall A. et al. Degradation mechanisms of bioresorbable polyesters. Part 1. Effects of random scission, end scission and autocatalysis // *Acta Biomater.* 2014. Vol. 10, № 5. P. 2223–2232.
 141. Cha Y., Pitt C.G. The acceleration of degradation-controlled drug delivery from polyester microspheres // *J. Control. Release*. 1989. Vol. 8, № 3. P. 259–265.
 142. Wu L., Ding J. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(d,l-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering // *Biomaterials*. 2004. Vol. 25, № 27. P. 5821–5830.
 143. Lin C.-C., Anseth K.S. The Biodegradation of Biodegradable Polymeric Biomaterials // *Biomaterials Science*. Elsevier, 2013. P. 716–728.
 144. Tsuji H., Muramatsu H. Blends of aliphatic polyesters: V non-enzymatic and enzymatic hydrolysis of blends from hydrophobic poly(l-lactide) and hydrophilic poly(vinyl alcohol) // *Polym. Degrad. Stab.* 2001. Vol. 71, № 3. P. 403–413.
 145. Russias J. et al. Fabrication and mechanical properties of PLA/HA composites: A study of in vitro degradation // *Mater. Sci. Eng. C*. 2006. Vol. 26, № 8. P. 1289–1295.
 146. Perepechko I. ACOUSTIC METHODS OF INVESTIGATING POLYMERS. Mir Publishers, Moscow, 1975.
 147. Wu H. Monitoring the degradation process of biopolymers by ultrasonic longitudinal wave pulse-echo technique // *Biomaterials*. 2003. Vol. 24, № 22. P. 3871–3876.
 148. Park D.W. et al. In vivo monitoring of structural and mechanical changes of tissue scaffolds by multi-modality imaging // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35, № 27. P. 7851–7859.
 149. Ruland A. et al. Quantitative ultrasound imaging of cell-laden hydrogels and printed constructs // *Acta Biomater.* 2019. Vol. 91. P. 173–185.

150. Morokov E.S. et al. Structural and mechanical properties of PLA-hydroxyapatite composites studied by the scanning impulse acoustic microscopy. 2018. P. 020138.
151. Hong X. et al. Multimode ultrasound viscoelastography for three-dimensional interrogation of microscale mechanical properties in heterogeneous biomaterials // *Biomaterials*. 2018. Vol. 178. P. 11–22.
152. Webster T.J. et al. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. Vol. 51, № 3. P. 475–483.
153. Mohandes F., Salavati-Niasari M. Influence of morphology on the in vitro bioactivity of hydroxyapatite nanostructures prepared by precipitation method // *New J. Chem.* 2014. Vol. 38, № 9. P. 4501.
154. Loher S. et al. Improved degradation and bioactivity of amorphous aerosol derived tricalcium phosphate nanoparticles in poly (lactide-co-glycolide). Vol. 2054.
155. Shin D.Y. et al. In vitro and in vivo evaluation of polylactic acid-based composite with tricalcium phosphate microsphere for enhanced biodegradability and osseointegration // *J. Biomater. Appl.* 2018. Vol. 32, № 10. P. 1360–1370.
156. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage // *Biomaterials*. 2000. Vol. 21, № 24. P. 2529–2543.
157. O'Brien F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering // *Mater. Today*. 2011. Vol. 14, № 3. P. 88–95.
158. Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations // *Eur. Spine J.* 2008. Vol. 17, № S4. P. 467–479.
159. Venugopal J. et al. Mineralization of osteoblasts with electrospun collagen/hydroxyapatite nanofibers. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2008. Vol. 19, № 5. P. 2039–2046.
160. Habibovic P. et al. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26, № 17. P. 3565–3575.
161. Hunt J.A., Callaghan J.T. Polymer-hydroxyapatite composite versus polymer interference screws in anterior cruciate ligament reconstruction in a large animal model // *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 2008. Vol. 16, № 7. P. 655–660.
162. Bennett S.M. et al. The effect of particle size on the in vivo degradation of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/ α -tricalcium phosphate micro- and nanocomposites // *Acta Biomater.* 2016. Vol. 45. P. 340–348.
163. Nuss K.M. et al. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones // *BMC Musculoskelet. Disord.* 2006. Vol. 7, № 1. P. 67.
164. Yang Z., Best S.M., Cameron R.E. The Influence of $\hat{\pm}$ -Tricalcium Phosphate

- Nanoparticles and Microparticles on the Degradation of Poly(D,L-lactide-co-glycolide) // *Adv. Mater.* 2009. Vol. 21, № 38–39. P. 3900–3904.
165. Kulkova J. et al. Osteointegration of PLGA implants with nanostructured or microsized β -TCP particles in a minipig model // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2014. Vol. 40. P. 190–200.
 166. Sedush N.G., Strelkov Y.Y., Chvalun S.N. Kinetic investigation of the polymerization of D,L-lactide and glycolide via differential scanning calorimetry // *Polym. Sci. Ser. B.* 2014. Vol. 56, № 1. P. 35–40.
 167. Morokov E.S. et al. Noninvasive high-frequency acoustic microscopy for 3D visualization of microstructure and estimation of elastic properties during hydrolytic degradation of lactide and ϵ -caprolactone polymers // *Acta Biomater.* 2020.
 168. Морокков Е.С. et al. Применение импульсной акустической микроскопии для исследования плотных керамик на основе ZrO₂. 2014.
 169. Androsch R., Zhuravlev E., Schick C. Solid-state reorganization, melting and melt-recrystallization of conformationally disordered crystals (α' -phase) of poly (l-lactic acid) // *Polymer (Guildf)*. 2014. Vol. 55, № 19. P. 4932–4941.
 170. Zhang J. et al. Disorder-to-Order Phase Transition and Multiple Melting Behavior of Poly(L-lactide) Investigated by Simultaneous Measurements of WAXD and DSC // *Macromolecules*. 2008. Vol. 41, № 4. P. 1352–1357.
 171. Fischer E.W., Sterzel H.J., Wegner G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions // *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polym.* 1973. Vol. 251, № 11. P. 980–990.
 172. Supaphol P. Application of the Avrami, Tobin, Malkin, and Urbanovici–Segal macrokinetic models to isothermal crystallization of syndiotactic polypropylene // *Thermochim. Acta*. 2001. Vol. 370, № 1–2. P. 37–48.
 173. Ferri J. et al. Manufacturing and characterization of poly(lactic acid) composites with hydroxyapatite // *J. Thermoplast. Compos. Mater.* 2018. Vol. 31, № 7. P. 865–881.