

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ МЕТАЛЛУРГИИ И МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЯ
ИМ. А.А. БАЙКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



Гречишников (Форысенкова) Анна Александровна

**БИОСОВМЕСТИМЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ
АЛЬГИНАТ-ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОН-ФОСФАТЫ КАЛЬЦИЯ**

Специальность 2.6.14. – Технология силикатных и тугоплавких
неметаллических материалов

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
К.Х.Н., В.Н.С.
Фадеева Инна Вилоровна

Москва 2026 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список используемых сокращений и определений	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1.1. Строение костной ткани и подходы к ее восстановлению	14
1.2. Фосфаты кальция и материалы на их основе для восстановления костной ткани	17
1.3. Структура гидроксиапатита и карбонатгидроксиапатита	20
1.4. Полимеры для создания композиционных материалов	22
1.5. Способы получения композиционных материалов на основе полимеров с фосфатами кальция	25
1.5.1. Нетканые материалы, полученные электроспиннингом	26
1.5.2. 3D-печатные материалы.....	27
1.5.3. Мембраны	28
1.5.4. Пористые каркасы	29
1.5.5. Свойства альгината и материалов на их основе	30
1.5.6. Свойства поливинилпирролидона и материалы на его основе.....	32
Выводы по литературному обзору	35
2.1. Исходные материалы	37
2.2. Получение порошков гидроксиапатита, карбонатгидроксиапатита и композиционных материалов.....	37
2.2.1. Синтез гидроксиапатита и карбонатгидроксиапатита	37
2.2.2. Получение композита с гидроксиапатитом и карбонатгидроксиапатитом.....	38
2.2.3. Частичное сшивание композиционных материалов	39
2.3. Методы исследования.....	40
2.3.1. Рентгенофазовый анализ (РФА).....	40
2.3.2. ИК-спектроскопия	41
2.3.3. ЭПР-спектроскопия	41
2.3.4. ЯМР-спектроскопия	42
2.3.5. Реологические исследования.....	43
2.3.6. Измерение пористости	43
2.3.7. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).....	44
2.3.8. Измерение удельной поверхности методом БЭТ	44

2.3.9. Механические испытания	44
2.2.10. Термогравиметрический анализ.....	45
2.3.11. Измерение набухания	45
2.3.12. Оценка растворимости композитов	45
2.3.13. <i>In vitro</i> исследования цитотоксичности.....	45
2.2.14. <i>In vivo</i> исследования биodeградации материалов и оценка регенеративного потенциала материалов на мышинной модели	46
ГЛАВА 3. СОСТАВ И СТРУКТУРА ПОЛУЧЕННЫХ ФК И КОМПОЗИТОВ	49
3.1. Фазовый анализ синтезированных гидроксиапатита, карбонатгидроксиапатита и композитов	49
3.2. ЭПР-спектральные исследования композитов	53
3.4. Реологические свойства композиционных суспензий	56
3.5. ЯМР- и ЭПР- спектральные исследования сшивания альгината....	60
Выводы по главе 3.....	68
ГЛАВА 4. ПЛЕНОЧНЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ.....	69
4.1. Характеристики структуры композиционных пленок поливинилпирролидон–альгинат–карбонатгидроксиапатит	69
4.2. Механическая прочность композиционных пленок поливинилпирролидон-альгинат-карбонатгидроксиапатит	73
4.3. Термическое разложение композиционных пленок, частично сшитых ионами бивалентных металлов	77
Выводы по главе 4.....	79
ГЛАВА 5. ПОРИСТЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОН-АЛЬГИНАТ- КАРБОНАТГИДРОКСИАПАТИТ.....	80
5.1. Характеристики структуры объемных пористых композиционных материалов	80
5.2. Механические свойства объемных пористых композиционных материалов	82
Выводы по главе 5.....	84
ГЛАВА 6. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПОЗИТОВ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОН-АЛЬГИНАТ- КАРБОНАТГИДРОКСИАПАТИТ.....	85
6.1. Цитотоксичность и биосовместимость композитов <i>in vitro</i>	85

6.2. Биоактивность композитов <i>in vivo</i>	88
6.2.1. Гистологический анализ	88
6.2.2. Анализ экспрессии генов	89
Выводы по главе 6.....	93
ВЫВОДЫ	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	96
ПРИЛОЖЕНИЕ	112

Список используемых сокращений и определений

АФК – аморфный фосфат кальция

ГА – гидроксиапатит

ДКФД – дикальцийфосфат дигидрат

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

КГА – карбонатгидроксиапатит

МКФМ – монокальциевый фосфат моногидрат

ОКФ – октакальций фосфат

ПА – полвинилпирролидон–альгинат

ПАК – поливинилпирролидон–альгинат–карбонатгидроксиапатит

ПВП – поливинилпирролидон

ПВС – поливиниловый спирт

РФА – рентгенофазовый анализ

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

СКПЗ – ствольные клетки пульпы зуба

ТГА – термогравиметрический анализ

ТКФ – трикальцийфосфат

ТТКФ – тетракальцийфосфат

ФК – фосфаты кальция

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Биоабсорбция – растворение твердых полимерных материалов в жидких средах организма без расщепления полимерной цепи или снижения молекулярной массы;

Биодеградация – способность материала к разложению при контакте с живыми клетками и тканями организма;

Остеокондуктивность – способность материала поддерживать жизнедеятельность остеобразующих клеток и образование новой костной ткани;

Остеоиндуктивность – способность материала вызывать эктопическое (вне кости) формирование костной ткани *de novo*;

Фибрин – белок, образующий основу сгустка крови;

Фибриноген – белок-предшественник фибрина;

Фибринолиз – процесс растворения тромбов и сгустков крови, неотъемлемая часть процесса свертывания крови;

Экспрессия генов – процесс, в ходе которого наследственная информация от гена (последовательности нуклеиновых кислот ДНК) преобразуется в функциональный продукт – РНК или белок.

ВВЕДЕНИЕ

В ортопедии и травматологии наряду с консервативным лечением широко применяются импланты на основе биоинертных материалов: металлических сплавов, керамики из диоксида циркония и алюминия, а также полимеров (полиметилметакрилат, политетрафторэтилен и др.) [1]. Однако данные материалы имеют ряд серьезных недостатков, связанных с дегенерацией прилежащих тканей, отторжением импланта и невозможностью восстановить повреждения сложной конфигурации без удаления окружающей здоровой костной ткани [2]. Особенно остро данные проблемы стоят при лечении детей и пожилых людей.

Последние десятилетия активно исследуются и разрабатываются замещающие материалы на основе фосфатов кальция (ФК) исходя из их подобия минеральному компоненту костной ткани [3]. Это один из принципов регенеративной медицины, которая предполагает восстановление поврежденных тканей не только трансплантацией стволовых клеток, но и созданием определенных естественных условий для заживления тканей [4, 5]. В данном контексте разработано множество ФК керамик и цементов, способностью подвергаться биорезорбции – распаду под действием клеточных ферментов, а также остеоиндуктивными свойствами, т.е. способностью запускать процесс пролиферации клеток и образования костной ткани [3, 4, 5, 6].

Однако ФК керамика и цементы имеют ряд недостатков, связанных со скоростью резорбции, механической прочностью, а также локализацией, формой, степенью тяжести заполняемого дефекта. Геометрический фактор [7] является серьезным препятствием для применения керамических материалов, поскольку отсутствие полного пространственного совпадения импланта и окружающих тканей приводит к разрастанию фиброзной ткани, смещению импланта и недостаточной передаче механической нагрузки [8].

Данная проблема может быть решена применением материалов с вязкоупругими свойствами, которые позволяют адаптировать имплант под форму дефекта [9]. В области биорезорбируемых материалов с ФК таковыми являются композиционные материалы на основе биосовместимых полимеров.

Для таких материалов рассматриваются как биосовместимые синтетические полимеры, так и биополимеры (белки, полисахариды и др. природные полимеры) [10]. Поскольку речь идет о биорезорбируемых материалах, то подходящие полимеры должны биоабсорбироваться в организме или расщепляться специальными ферментами [11]. Биоабсорбции подвергаются такие полимеры, как поливиниловый спирт (ПВС), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливинилпирролидон (ПВП), метилцеллюлоза (МЦ), альгинат натрия, хитозан. Такие полимеры, как гиалуроновая кислота, производные молочной кислоты расщепляются ферментами.

Гидрофильные полимеры, растворимые или набухающие в воде, позволяют получать из них два вида имплантов, востребованных в хирургии костной ткани: мембраны (пленки) для изоляции дефекта от окружающих мягких тканей и объемные пористые импланты для непосредственного заполнения объемного дефекта [12, 13]. Полимерные гели хорошо смешиваются с порошками ФК, такие композиционные материалы сохраняют свои вязкоупругие свойства, что позволяет приспособлять их к форме дефекта, а их структура приближена к структуре костной ткани [13].

Недостатком водорастворимых полимеров и композитов на их основе является непредсказуемая скорость биоабсорбции или разложения ферментами и низкая механическая прочность [11]. Для большинства упомянутых полимеров эти недостатки практически нельзя устранить. Может быть проведено химическое сшивание специальными агентами, например, глутаровым альдегидом, но вместе с увеличением прочности, теряется способность к биоабсорбции и биодеградации [14].

Тем не менее регулировать эти свойства возможно: альгинат натрия, природный полисахарид, обладает уникальным свойством сшиваться катионами поливалентных металлов с образованием малорастворимых или нерастворимых сшитых материалов [15]. Подбором сшивающего иона, условий сшивания возможно регулировать плотность и степень сшивки, а значит – механическую прочность и скорость биодеградации [16]. Однако такие материалы на основе

сшитого альгината являются достаточно жесткими и обладают низкой адгезией к клеткам и тканям [17]. При операциях на мягких тканях это свойство полезно, поскольку препятствует образованию рубцов, но для замещения костной ткани необходима улучшенная адгезия, которая достигается введением ФК.

Снизить жесткость альгинатных материалов возможно сочетанием с другими полимерами, обладающими иными характеристиками химической и молекулярной структуры и вытекающими из этого физическими и механическими характеристиками. Привлекательным выглядит ПВП, нейтрально-заряженный кристаллический полимер, хорошо растворимый в воде и смешиваемый с другими полимерами. Его присутствие в смеси с альгинатом позволит дополнительно регулировать степень сшивки альгината.

Исследование и разработка композиционных материалов, сочетающих в себе разные полимеры и ФК является актуальной задачей. Настоящая работа сосредоточена на исследовании влияния полимеров (альгината и ПВП) на поведение друг друга, взаимодействий полимеров и наполнителя из КГА, физико-химических, механических и биологических свойств, обусловленных системным эффектом всех компонентов.

Таким образом, **целью** работы являлась разработка композиционных материалов на основе поливинилпирролидон–альгинат натрия (в соотношениях 1:1, 2:1, 1:2) с карбонатгидроксиапатитом (5–50 мас.%) – для применения в медицине. Для достижения цели были решены следующие **задачи**:

1. Получение порошка карбонатгидроксиапатита осаждением из водных растворов; приготовление полимерных растворов альгината и поливинилпирролидона, как отдельно, так и их смесей с соотношением 1:1, 1:2, 2:1; приготовление композиционных суспензий с наполнителем карбонатгидроксиапатитом в количестве 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мас.% от массы полимеров; получение пленок и объемных пористых материалов;
2. Исследование фазового и химического состава компонентов и самих композиционных материалов; изучение влияния состава полимерных композиционных суспензий на их кажущуюся вязкость;

3. Исследование механизмов сшивания альгината ионами Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , и Mn^{2+} ; изучение прочности и термической стабильности сшитых материалов альгинат, поливинилпирролидон–альгинат и поливинилпирролидон–альгинат–карбонатгидроксиапатит;
4. Изучение влияния компонентного состава (содержание поливинилпирролидона и карбонатгидроксиапатита) и сшивания ионами Ca^{2+} на микроструктуру, пористость, поведение при растяжении и сжатии, набухание и растворение в водной среде пленочных и объемных материалов;
5. Оценка биологических свойств материалов поливинилпирролидон–альгинат, в том числе сшитых ионами Ca^{2+} , и композитов поливинилпирролидон–альгинат–карбонатгидроксиапатит *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

1. Установлена немонотонная зависимость реологических и структурных характеристик композитных суспензий на основе альгината, поливинилпирролидона и карбонатгидроксиапатита для последующего изготовления изделий для направленной регенерации тканей: с ростом содержания карбонатгидроксиапатита от 10 до 30 мас. % кажущаяся вязкость таких псевдопластичных суспензий уменьшается от 1271 до 756 мПа·с (при скорости сдвига 13 c^{-1}), а при 50 мас.% карбонатгидроксиапатита возрастает до 1267 мПа·с. Эта зависимость коррелирует с изменением параметров пористости объемных пористых композитов: при содержании карбонатгидроксиапатита 10 мас.% объемная пористость составляет 85 об.%, а средний размер пор – 320 мкм, при содержании 30 мас.% – 71 об.% и 170 мкм, а при содержании 50 мас.% – 84 об.% и 300 мкм.
2. Раскрыты механизмы сшивания альгината ионами двухвалентных металлов (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) методами ЯМР- и ЭПР-спектроскопии: ионы Ca^{2+} координируются к COO^- -группам с образованием разреженных сшивков (модуль упругости сшитых пленок 1.2 ГПа), Sr^{2+} – к COO^- - и OH -группам с более плотной сеткой (модуль упругости 1.7 ГПа); ионы Cu^{2+} формируют прочные сшивки с близким расположением ионов (модуль упругости 4.2 ГПа), Mn^{2+} – слабые сшивки

с большим межионным расстоянием (модуль упругости 0.5 ГПа). Сшивание Ca^{2+} повышает термостойкость (начало разложения $+20\text{ }^\circ\text{C}$), Cu^{2+} – ускоряет деструкцию (60% потери массы при $200\text{ }^\circ\text{C}$), сшивание ионами Mn^{2+} – практически не оказывает влияния на термическую стабильность композиционных пленок.

3. Установлено влияние поливинилпирролидона на механические свойства композитов: введение поливинилпирролидона в соотношении 1:1 с альгинатом задает пластический характер деформации пленок – модуль упругости снижается в 2 раза, разрывное удлинение увеличивается от 2.9 до 3.8%. Присутствие поливинилпирролидона в составе пленок, сшитых ионами Cu^{2+} , снижает модуль упругости в 8 раз и прочность в 1.6 раза, но увеличивает удлинение в 1.3 раза. В пленках, сшитых ионами Ca^{2+} , поливинилпирролидона снижает модуль упругости в 3 раза и прочность в 6 раз, но увеличивает удлинение в 2 раза. Введение 5 мас.% карбонатгидроксиапатита в состав смесевой пленки повышает модуль упругости в 1.7 раза и прочность в 1.6 раза, что подтверждается данными ЯМР- и ЭПР-спектроскопии о физическом взаимодействии матрицы и наполнителя.

4. В экспериментах *in vivo* на мышинной модели выявлены закономерности биодegradации и регенеративного потенциала композитных пленок от их состава: пленки поливинилпирролидон–альгинат полностью деградируют за 7 сут, пленки поливинилпирролидон–альгинат с 5 мас.% карбонатгидроксиапатита – за аналогичный срок, с сохранением частиц карбонатгидроксиапатит, окруженных здоровой грануляционной тканью; пленки поливинилпирролидон–альгинат, сшитые ионами Ca^{2+} , не деградируют полностью за 7 сут. Все материалы биосовместимы, стимулируют экспрессию генов, направленных на регенерацию тканей, и не вызывают образования фиброзной ткани.

Практическая значимость работы

1. Полученные данные о взаимосвязи вязкости исходных суспензий, пористости и размера пор композитов на основе альгината, поливинилпирролидона и карбонатгидроксиапатита, а также вида сшивающего иона позволяют получать материалы с заданной микроструктурой и механическими характеристиками.

2. Разработаны композиционные пленочные и объемные пористые материалы, биологические испытания *in vitro* которых показали их высокую биосовместимость, а в испытаниях *in vivo* продемонстрирована высокая эффективность пленок на основе поливинилпирролидона–альгината в регенерации тканей.

3. Получен патент RU 2854380 «Способ получения высокопористых композиционных материалов на основе биополимеров с фосфатами кальция для медицины», заявка: 2024113819, 22.05.2024.

Диссертационная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ по теме «Пористые композиционные материалы на основе биорезорбируемых биосовместимых полимеров медицинского назначения, содержащих фосфаты кальция, для регенеративной медицины» (№ 22-23-00278), а также грантом «УМНИК» по теме «Разработка биodeградируемого минерал-полимерного материала для восстановления костной ткани».

Диссертационная работа выполнена при поддержке гранта РФФИ по теме «Пористые композиционные материалы на основе биорезорбируемых биосовместимых полимеров медицинского назначения, содержащих фосфаты кальция, для регенеративной медицины» (№ 22-23-00278), а также грантом «УМНИК» по теме «Разработка биodeградируемого минерал-полимерного материала для восстановления костной ткани».

На защиту выносятся следующие положения:

1. Снижение кажущейся вязкости композиционных суспензий при добавлении порошка карбонатгидроксиапатита до 30 мас.%, приводящее к уменьшению объемной пористости композитов с 95 об.% до 70 об.%, а среднего размера пор с 320 до 170 мкм, и ее увеличение при добавлении 50 мас.% карбонатгидроксиапатита, приводящее к увеличению объемной пористости до 84 об.% и размера пор до 300 мкм.

2. Установленный характер взаимодействия альгината ионами Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , и Mn^{2+} , с образованием слабых (ионы Ca^{2+} и Mn^{2+}) и прочных (Sr^{2+} и Cu^{2+}), что подтверждается данными о прочности пленок, сшитых этими ионами.

3. Изменение прочностных характеристик, микроструктуры и термической стабильности пленок в зависимости от состава и вида сшивающего иона;
4. Установленные зависимости микроструктуры, пористости, прочностных характеристик и деформируемости при сжатии от содержания карбонатгидроксиапатита в пористых композитах;
5. Результаты исследования биологических свойств композиционных пленок *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ по теме «Пористые композиционные материалы на основе биорезорбируемых биосовместимых полимеров медицинского назначения, содержащих фосфаты кальция, для регенеративной медицины» (№ 22-23-00278), а также грантом «УМНИК» по теме «Разработка биodeградируемого минерал-полимерного материала для восстановления костной ткани».

Апробация работы и публикации Основные результаты работы изложены в 17 публикациях, включая 7 статей в периодических журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК и индексируемых в Scopus и Web of Science. Результаты, входящие в работу, представлены на 10 конференциях в виде устных и стендовых докладов, в том числе Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов» (с международным участием), Москва, ИМЕТ РАН 2021, 2022, 2023, 2024 г.; Конференция молодых ученых по общей и неорганической химии, Москва, ИОНХ РАН 2021, 2023 г.; Всероссийская конференция молодых ученых-химиков, Нижний Новгород, 2023 г.; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022» и «Ломоносов-2024», Москва, МГУ, 2024; Девятая Всероссийская Каргинская Конференция «Полимеры–2024», Москва, МГУ, 2024; подана 1 заявка на патент.

1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Строение костной ткани и подходы к ее восстановлению

Человеческая кость – сложная структура, обладающая уникальными свойствами и функциями [18]. Костная ткань состоит из двух основных структурных типов: кортикальная (компактная) кость, которая образует плотную внешнюю оболочку, и трабекулярная (губчатая) кость, которая образует пористое тело кости (рис. 1) [18, 19]. Кортикальная кость состоит из остеонов, которые включают в себя канал для кровеносных сосудов, при этом несут механическую нагрузку, обеспечивая сопротивление скручиванию и изгибу, а также прочность при сжатии [18, 20]. Губчатая кость состоит из взаимосвязанной сети трабекул, заполненных костным мозгом [18]. Образующим материалом является коллаген-минеральный композит, в котором минеральный компонент представлен фосфатами кальция (ФК) [19]. Именно в губчатой кости протекают метаболические процессы ремоделирования костной ткани [18, 19, 20].

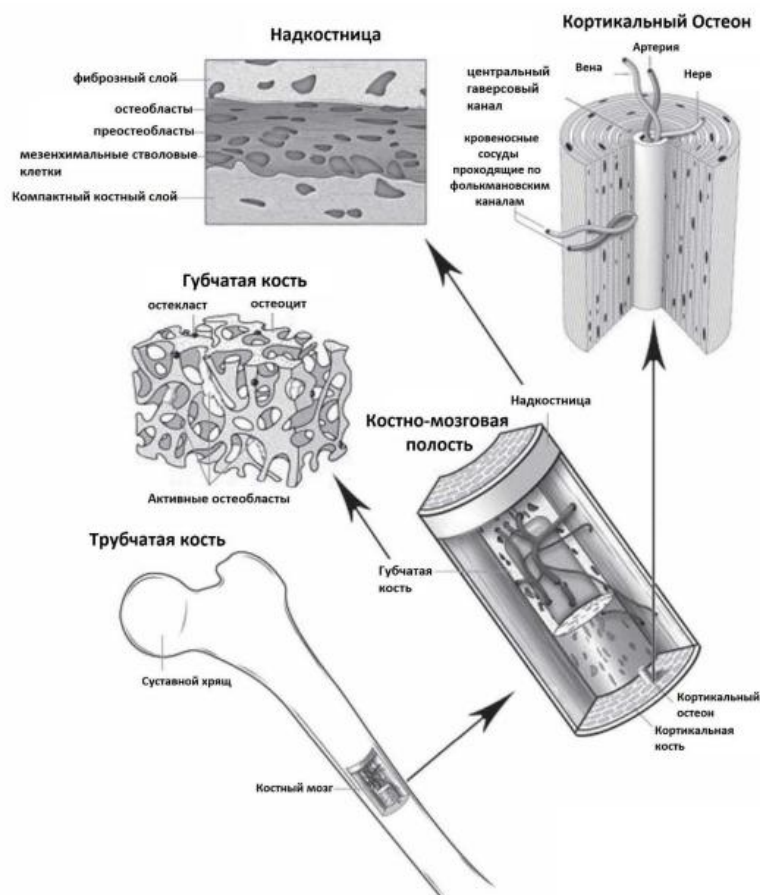


Рисунок 1. Строение костной ткани [19].

Таблица 1. Структурно-механические характеристики костной ткани.

Тип кости	Пористость, %	Плотность, г/см ³	Модуль Юнга, МПа	Прочность при сжатии вдоль оси, МПа	Ссылка
Кортикальная	5–10	1,99–2,01	17–20	131–224	[19, 20,
Губчатая	75–90	0,05–1,0	1,6–2,42	2–5	21]

Ремоделирование – остеогенез и резорбция – костной ткани обеспечиваются клетками остеобластами, остеоцитами и остеокластами [18, 19]. За остеогенез ответственны группы остеобластов. Остеоциты – покоящиеся клетки зрелой кости, которые могут дифференцироваться в остеобласты. Остеокласты отвечают за резорбцию костной ткани посредством растворения минерального компонента выделяемой кислотой и расщепления белка. В растущем организме преобладают процессы остеогенеза. Взрослая костная ткань большей частью представлена остеоцитами. С возрастом начинают преобладать процессы резорбции, что приводит к остеопорозу [18, 19].

Костная ткань обладает естественной способностью к регенерации, достаточной для заживления небольших повреждений (трещины, небольшие переломы), однако дефекты кости, превышающие некоторый критический размер (обычно >2 см, в зависимости от анатомического участка), организм не способен восстановить собственными ресурсами [22, 23]. Несращение, а также обширные дефекты, связанные с травмами, дегенеративными заболеваниями, врожденными дефектами или хирургическим удалением опухолей требуют клинического вмешательства для заживления и достижения восстановления функций в полном объеме [22]. Современная ортопедия использует те или иные инструменты для решения данных задач [22]:

- фиксация поврежденных участков металлическими конструкциями;
- ауто- и аллотрансплантаты (собственная или донорская костная ткань);

- ксенотрансплантаты (кости животных – коров или свиней);
- искусственные металлические или керамические импланты.

Существует ряд проблем, связанных с этими методами лечения [22]. Металлические устройства для фиксации кости часто требуют последующего хирургического удаления, использование костных аллотрансплантатов связано с риском передачи заболеваний из донорского материала, а использование костных аутоотрансплантатов требует дополнительного лечения донорского участка [23, 24, 25]. Искусственные импланты могут вызывать иммунный ответ, деградацию прилегающей костной ткани и требовать замены раз в несколько лет [24, 25]. Применение данных методов затруднительно при закрытии дефектов, возникших после остеомиелита или удаления опухоли [24]. Существуют значительные ограничения в детской ортопедии и травматологии из-за восприимчивости детского организма к осложнениям, недостатка материала для аутоотрансплантации, повторных травм после удаления импланта и необходимости частых операций по замене искусственных имплантатов по мере роста ребенка [26].

За последние десятилетия в области инженерии костной ткани произошли значительные изменения в направлении материалов, которые облегчают процесс регенерации кости в месте дефекта, не создавая описанных рисков [23, 24]. Тенденции в разработках новых материалов продиктованы собственной структурой и свойствами костной ткани: контролируемая резорбция, пористость, механическая прочность.

В данном ключе рассматриваются резорбируемые сплавы (на основе магния, кальция, цинка, циркония и др.) [27], биостекла (на основе сложных оксидных систем, включающих в себя оксид кремния, магния, кальция, фосфора, натрия и др.) [28] и материалы на основе ФК (керамика, цементы, покрытия металлических имплантов и композиционные материалы) [29]. Поскольку в состав костной ткани входят ФК в качестве основного компонента (на уровне 75мас.%), материалы на их основе являются наиболее приближенными по своим свойствам к костной ткани и наиболее интересны и перспективны для ее регенерации [30].

1.2. Фосфаты кальция и материалы на их основе для восстановления костной ткани

Как было сказано выше, костная ткань постоянно находится в процессе ремоделирования за счет резорбции и остеогенеза. При этом ФК в ее составе также претерпевают фазовые превращения в зависимости от pH, создаваемого клетками костной ткани: монокальций фосфат моногидрат (МКФМ, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), дикальций фосфат дигидрат (ДКФД, $\text{CaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), октакальций фосфат (ОКФ, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), трикальций фосфат (ТКФ, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), гидроксипатит (ГА, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), тетракальцийфосфат (ТеКФ, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) (табл. 2) [29, 31, 32]. Основную массу минеральной составляющей костной ткани представляют апатитовые ФК – наиболее стабильная форма ФК: ГА и карбонатгидроксипатит (КГА, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})(\text{CO}_3)_{0,5}$) – замещенная форма ГА, в которой часть гидроксо- групп или фосфат-групп заменены на карбонат-ион [32].

Таблица 2. Состав и данные о структуре некоторых ФК [32, 33].

Наименование, формула	Отношение Са/Р	Сингония, пространственная группа	Параметры ячейки, Å	Диапазон стабильности pH водного раствора при 25°C
МКФМ, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,50	Триклинная $P\bar{1}$	a=5,6261(5) b=11,889(2) c=6,4731(8)	0,0–2,0
ДКФД, $\text{CaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,00	Моноклинные Ia	a=5,812(2) b=15,180(3) c=6,239(2) $\beta=116,42(3)$	2,0–2,6
ОКФ, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33	Триклинная $P\bar{1}$	a=19,692(4) b=9,523(2) c=6,835(2)	5,5–7,0
α -ТКФ, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,50	моноклинные $P2_1/a$	a=12,887(2) b=27,280(4) c=15,219(2) $\beta=126,20(1)$	---

β -ТКФ, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		ромбоэдрическая <i>R3cH</i>	a=b=10,439(1) c=37,375(6) $\gamma=120$	---
ГА, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67	Моноклинная <i>P2₁/b</i>	a=9,84214(8) b=2a c=6,8814(7) $\gamma=120$	9,5–12,0
		гексагональная <i>P63/m</i>	a=b=9,4302(5) c=6.8911(2) $\gamma=120$	
ТеКФ, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,00	моноклинная <i>P2₁</i>	a =7,023(1) b=11,986(4) c=9,473(2) $\beta=90,90(1)$	----

ФК имеют различную скорость резорбции в организме, при этом МКФМ, ДКФД и ОКФ являются наиболее быстро резорбируемыми, а β -ТКФ и ГА обладают наименьшей скоростью резорбции [32]. Предпочтение того или иного ФК определяется размером, расположением и формой костного дефекта, а также степенью разрушения, когда требуется разная скорость резорбции материала [3]. Также важно, в какой форме представлен материал: компактный или пористый, прочный и хрупкий, или вязкоупругий. Для различных задач изучены и разработаны разные материалы на основе ФК: цементы, керамика, биостекла, композиционные материалы [3].

ФК цементами используют для заполнения небольших дефектов в малоинвазивных операциях [31]. Цементы представляют собой гетерогенную композицию, которая включает одну или более твердую дисперсную фазу (наполнитель) и цементную (затворяющую) жидкость. При взаимодействии этих компонентов происходят процессы схватывания и твердения. Соответственно, свойства цемента определяются параметрами: фазовый состав дисперсной фазы (обычно это МКФМ, ТКФ), характером реакции твердения (кислотно-основная или реакция гидролиза), скорость твердения, состав побочных продуктов реакции [34]. В зависимости от типа реакции цемент может быть апатитовым (продукт твердения

– осажженный апатит состава $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ или брушитовым (продукт твердения – ДКФД $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [31]. Резорбция (гидролиз) брушита в организме приводит к образованию ОКФ, а затем – ГА, однако в процессе гидролиза выделяется фосфорная кислота, которая может накапливаться в имплантационной области и оказывать токсическое действие на окружающие ткани [31]. Еще одним недостатком цементов является низкая механическая прочность: в брушитовом цементе сама фаза брушита обладает низкой прочностью при сжатии, а в апатитовом цементе низкая прочность обусловлена низкой степенью кристаллизации и слабой когезией. Кроме того, твердение цемента требует времени [34]. И долгое, и слишком малое время вызывает трудности при их применении.

Керамика на основе ФК – наиболее распространенный материал для замещения костных дефектов. Поскольку керамику получают спеканием порошков при высоких температурах 800–1200 °С [31], основой для нее могут быть высокотемпературные ФК: главным образом, ГА и β -ТКФ [32, 35]. Керамика обладает достаточной механической прочностью и превосходной биосовместимостью, но при этом – низкой скоростью резорбции, хотя β -ТКФ обладает большей резорбируемостью, чем ГА [6]. Данного недостатка лишена пористая керамика с большей площадью поверхности для большего контакта с клетками и межклеточной жидкостью [31]. Получать более растворимые формы керамики можно за счет катионных и анионными замещений в структурах ГА и β -ТКФ [32, 35]. С увеличением пористости наблюдается прорастание костной ткани в структуре керамического импланта, что обеспечивает лучшую биоинтеграцию и значительное улучшение механических свойств за счет биологической фиксации [35]. Катионные и анионные замещения [32] могут придавать материалу дополнительные биологические свойства: остеоиндуктивность (ионы стронция) [36] или антибактериальные свойства (ионы меди, цинка, бора и др.) [37, 38]. Однако серьезным недостатком керамики является то, что ее затруднительно приспособить к костным дефектам сложной формы [28], а пористая керамика обладает пониженной механической прочностью.

Биостекла на основе ФК – материалы сложного состава, представляющие собой системы оксидов кальция, фосфора, кремния, натрия, калия, бора и др. [31]. В настоящее время биостекла определяются как наиболее резорбируемые материалы [39], однако, как и цементы, обладают низкой механической прочностью [28], к тому же их свойства *in vivo* сильно зависят от способа получения и постобработки [40], ввиду чего данные материалы обладают малой технологичностью [32].

Композиционные материалы на основе ФК – обширный класс материалов для инженерии костной ткани. Они могут быть представлены как цементы, армированные гранулами или волокнами [41], как стеклокерамика [35], или как сочетание керамики, цемента, порошка или гранул с полимерами [39, 42]. Минерал-полимерные композиты считаются наиболее перспективными для инженерии костной ткани, поскольку полимер в составе материала имитирует органическую составляющую костной ткани, придавая материалу вязкоупругие свойства [43]. Подробнее полимер-ФК композиционные материалы будут рассмотрены в п.1.5.

1.3. Структура гидроксиапатита и карбонатгидроксиапатита

Поскольку ГА и КГА являются важнейшими формами биологических ФК, стоит рассмотреть их структуру и свойства более подробно.

Кристаллографические данные ГА представлены в табл. 2 в предыдущем разделе. Гексагональная структура $R\bar{3}m$ образуется в результате фазового перехода моноклинной при 250°C . Структура ГА имеет две подсистемы (рис. 2): первую образуют Са-каналы с группами OH^- внутри них, а вторая является остовным каркасом, образуемый тетраэдрами PO_4^{3-} -группами со средним расстоянием $\text{P-O} = 1,53 \pm 0,02 \text{ \AA}$: атомы Р окружены четырьмя атомами О и образуют тетраэдр практически правильной формы, лишь с небольшим искажением. Атомы Са занимают в структуре ГА два кристаллографически независимых положения. Атом кальция в положении (I) окружен девятью атомами кислорода в положении, близком к октаэдрическому, а атом кальция, находящийся в положении (II), окружён шестью атомами кислорода, принадлежащих группам

PO_4^{3-} и OH^- . Атомы Ca в положении (II) образуют треугольник в плоскости, перпендикулярной оси с. Треугольники повернуты друг относительно друга на 60° вдоль этой оси. При достаточно сложной координации атомов Ca в ячейке ГА образуются 75 связей Ca–OH (без учёта связей с кислородом гидроксо-группы), 24 связи P–O, 6 связей Ca–OH и 2 связи O–H [32].

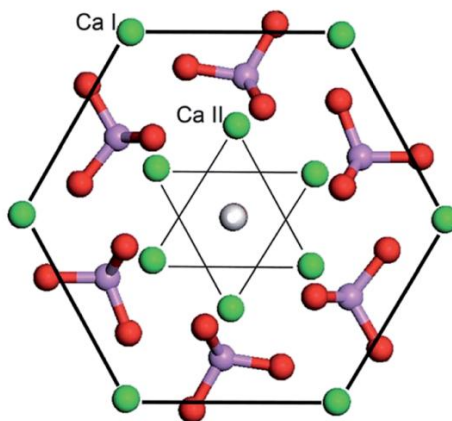


Рисунок 2. Вид гексагональной элементарной ячейки ГА [33].

Структура ГА нестехиометрична и позволяет разного рода замещения одних элементов другими. В усреднённой структуре ГА половина всех элементарных ячеек должна содержать гидроксил-ионы, смещённые в одном направлении, тогда как вторая половина – в противоположном направлении относительно плоскости симметрии. Однако разупорядочение такого рода не может быть абсолютно «беспорядочным» и существует, по-видимому, ближний порядок типа OH-OH-OH...HO-HO-HO. Изменение ориентации в расположении OH-групп может быть результатом их замещения ионами фтора или хлора, а также наличием вакансий [32].

Карбонат-группы могут занимать два положения в структуре ГА, замещая соответственно OH-группы (А-тип замещения), либо PO_4^{3-} -группы (Б-тип). Замещение OH-групп приводит к расширению элементарной ячейки вдоль оси а и небольшому сжатию вдоль оси с, что сопровождается изменением пространственной группы с $R\bar{6}3/m$ на $R21/b$. Замещение PO_4^{3-} -групп карбонат-группами приводит к уменьшению размеров кристаллов и снижению

кристалличности ГА, при этом наблюдается уменьшение параметра a и увеличение c . Параметры решетки КГА: $a = 9,48 \text{ \AA}$, $c = 6,89 \text{ \AA}$ [32].

Как природная костная ткань, так и синтетический КГА, получаемый осаждением из растворов, имеет смешанный АБ-тип замещения, в котором соотношение между А- и Б-составляющими зависит от многих факторов. В частности, при химическом синтезе это соотношение может зависеть от условий проведения реакции, степени замещения и др.

1.4. Полимеры для создания композиционных материалов

Полимеры представляют большой интерес в рассматриваемой области, поскольку их разнообразие и свойства позволяют применять различные технологии для получения материалов, создавать сложные пространственные структуры, улучшать биоинтеграцию, придавать материалу дополнительные характеристики биосовместимости и адгезии к клеткам и тканям, регулировать скорость биодеградации [43, 44].

Полимеры классифицируют по происхождению сырья (природные и синтетические полимеры), гидрофильности/гидрофобности, наличию или отсутствию способности к сшиванию [45, 46]. Вне зависимости от классификации к полимерам предъявляют набор требований, а именно: биосовместимость, отсутствие токсичных побочных продуктов, способность к биологическому разложению или биовсасыванию, проницаемость, наличию факторов заживления [47, 48]. Также полимер не должен вызывать иммунных реакций, отторгаться организмом, поскольку это замедляет восстановление и приводит к разрастанию фиброзной ткани [48]. Кроме того, материал должен обеспечивать достаточную механическую прочность [32].

Природные полимеры

Природные полимеры обладают превосходной биосовместимостью [49]. Наиболее распространенными из природных полимеров являются полисахариды – хитозан, альгинат, метилцеллюлоза и ее производные, гиалуроновая кислота (ГК), пектин, крахмал [50]. Они обладают достаточно высокой скоростью

биodeградации: полисахариды быстро разлагаются эндогенными ферментами *in vivo* [50, 51]: в частности, ГК разлагается ферментом гиалуронидазой [52].

Скорость биodeградации возможно регулировать с помощью сшивания, например, сшивание альгината ионами поливалентных металлов [53]. Ионная природа поперечных связей альгината придает гидрогелям эластичность и способность к релаксации при деформации [54], а с помощью сшивания можно управлять механическими свойствами: изменять прочность и эластичность пленок, вязкость гелей [55].

Не менее широко используются белок животного происхождения коллаген [49, 50]. Коллаген является естественным компонентом внеклеточного матрикса в большом количестве и воспринимается организмом как эндогенный компонент, что является наибольшим преимуществом коллагена как основы для биоматериала [49, 56]. Благодаря этому он так же, как и полисахариды, подвергается ферментативному разложению, для регулирования которого применяют различные способы сшивки [56, 57].

Желатин получают путем частичного гидролиза и денатурации коллагена, поэтому он сохраняет многие биологически активные участки молекулы коллагена [55]. Подобно коллагену, желатин также подвергается легкой биodeградации *in vivo* [58].

Значимой проблемой природных полимеров является то, что их получают из живых организмов, и, соответственно, их свойства сильно зависят от источника получения и обработки. Наиболее ощутимыми недостатками, связанными с обработкой сырья, обладают хитозан и коллаген.

Хитозан, известный превосходной биосовместимостью, биodeградируемостью, мукоадгезивными и антибактериальными свойствами [46], получают из панцирей ракообразных или насекомых путем деацетилирования хитина [59]. Однако при очистке сырья (депротеинизации) используют концентрированные кислоты и щелочи, а также различные отбеливатели [59, 60]. При этом депотеинизация проходит не полностью (на уровне 75 мас.%) [59], что создает опасность передачи патогенов и токсических веществ, а реагенты,

используемые для очистки и отбеливания, не могут быть полностью удалены. Хитозан не разрешен для медицинского применения в США [61], а в России – разрешен только для наружного применения (раневые повязки и гели).

Недостатки коллагена также обусловлены методами очистки от примесного биологического материала и высокой стоимостью [56]. Кроме того, коллаген из разных источников (рыбный или свиной) обладает разными свойствами [59]. Несмотря на широкое применение коллагена существует проблема провоцирования воспалений, реакции на инородное тело, иммуногенности и, особенно, межвидовой передачи заболеваний и перенос инфекционных патогенов [56, 62].

Синтетические полимеры

К активно исследуемым и практически применяемым синтетическим полимерам относятся полиэтиленгликоль (ПЭГ), производные молочной кислоты (полилактид (ПЛА), поликапролактон (ПКЛ)), поливиниловый спирт (ПВС), поливинилпирролидон (ПВП). Эти полимеры биосовместимы, биоинертны (ПЭГ, ПВС, ПВП), и, что важно, не иммуногенны [55]. Синтетические полимеры, такие как ПЭГ, ПВС, ПВП, не подвержены ферментативному разложению, а значит не вступают в биохимическое взаимодействие с организмом, не выделяют токсичных побочных продуктов [63]. Обладая гидрофильностью, ПЭГ, ПВС, ПВП растворяются в воде или набухают, образуя гели, что позволяет использовать их для основ мембран и раневых повязок [64, 65]. Снижением молекулярной массы или модификацией структуры возможно получать и биodeградируемый материал на основе ПЭГ и ПВС [63].

ПЛА и ПКЛ – полимеры, разлагаемые ферментом липазой [46]. Материалы на основе производных молочной кислоты обладают превосходными механическими свойствами, такими как модуль Юнга, ударная вязкость, относительное удлинение и предел прочности при растяжении [50], что позволяет широко использовать их для изготовления медицинских нитей, мембран для длительного закрытия ран [46]. Однако ПЛА и ПКЛ гидрофобны и не способны образовывать гидрогели [55].

Вместе с тем, обнаружены существенные недостатки указанных полимеров, связанные с их безопасностью и побочными эффектами. В клинической обнаружено, что против ПЭГ вырабатываются специфические антитела [66]. Кроме того, материалы на основе ПЭГ содержат бутилированный гидрокситолуол в качестве консерванта и другие примеси: моноэтиленгликоль, непрореагировавший этиленоксид, некоторые количества 1,4-диоксана (побочного продукт этоксилирования) [65], способные вызывать аллергические реакции, сопровождающиеся анафилактическим шоком [67].

Показано, что накопление продуктов распада производных молочной кислоты приводит к локальному повышению рН и, как следствие, повреждению тканей [68]. Кроме того, в процессе распада ПЛА приобретает аморфную структуру, из-за чего снижается его механическая прочность [55]. Полное разложение и выведение из организма остатков материала занимает несколько месяцев [69].

Все рассмотренные выше полимеры имеют место в создании скэффолдов для тканевой инженерии, поскольку подвергаются различным способам обработки и получения материалов с различными свойствами для решения разнообразных задач.

1.5. Способы получения композиционных материалов на основе полимеров с фосфатами кальция

Поскольку керамо-полимерные или цементно-полимерные композиты не лишены тех же недостатков, которые свойственны керамике и цементам, то более предпочтительными выглядят минерал-полимерные материалы, содержащие частицы ФК, распределенные в полимерной матрице [70]. С одной стороны, такие материалы могут обладать достаточной механической прочностью, а с другой – достаточной скоростью резорбции без образования побочных продуктов.

Как правило, в минерал-полимерных композитах полимер выступает как формообразующая субстанция, которая своими свойствами определяет способ получения материала. В зависимости от способности полимера растворяться и набухать в воде и других растворителях, смешиваемости с другими полимерами,

термической устойчивости, склонности к пленкообразованию, материалы на его основе могут быть получены с помощью электроспиннинга, 3D-печати, формования пленок и лиофилизацией гелей.

1.5.1. Нетканые материалы, полученные электроспиннингом

Электроспиннинг – метод, позволяющий получать материалы на основе полимерных волокон. Процесс электроспиннинга заключается в формировании материала за счет воздействия электростатического поля на электрически заряженную струю полимерного раствора или расплава. Свойства полученного нетканого каркаса зависят от параметров процесса (приложенное напряжение, расстояние от сопла до коллектора, скорость потока) и свойств полимера (концентрация раствора, электропроводность, растворитель, поверхностное натяжение и др.) [71]. Для данного метода подходят такие биосовместимые полимеры, как: ПЛА, ПКЛ и их сополимеры, ПВС, полигидроксибутират (ПГБ), ПВП, полигликолид (ПГА), поли(DL-лактид-ко-гликолид) (ПЛГА), а также хитозан, коллаген и желатин [72].

Нетканые материалы, полученные электроспиннингом, активно рассматриваются для инженерии мягких и твердых тканей ввиду их подобия структуре внеклеточного матрикса (ВМ) [73, 74]. Применительно к инженерии костной ткани рассматриваются композиционные материалы с ФК [75].

В большом количестве работ изучены композиты ПКЛ(ПЛА), ПЛГА, ПГБ с ГА или ТКФ [74, 75]. Такие материалы могут содержать до 60мас.% ГА, который придает нетканому материалу большую прочность и улучшает адгезию клеток (фибробластов и стволовых клеток) к поверхности [75].

Поскольку высокая адгезивность указанных гидрофобных полимеров может приводить к разрастанию фиброзной ткани или образованию костной мозоли, что препятствует нормальному восстановлению нативной кости [76], для электроспиннинга были приспособлены такие гидрофильные полимеры, как желатин, хитозан, фиброин шелка, а также ПВС и ПВП [74]. Однако из них получают материалы более низкого качества за счет худшей способности к

данной обработке. Данную проблему можно решить смешиванием этих полимеров, например – ПВП с желатином [77].

Вместе с тем, данный метод имеет ряд недостатков. В традиционных методах электроспиннинга чрезвычайно сложно изготавливать композитные волокнистые каркасы с трехмерной структурой или с контролируемым размером пор и распределением из-за их технических ограничений. При получении скэффолдов на основе ПКЛ, ПЛА используются таких растворители как тетрагидрофуран, трихлорэтан, которые являются токсичными [75]. Хотя в процессе печати эти растворители испаряются, следовые их количества остаются в материале. Данным материалам не хватает адекватных макроскопических механических свойств, они не могут быть использованы для применения с нагрузкой.

1.5.2. 3D-печатные материалы

Технологии 3D-печати позволяют создавать различные материалы с заданными характеристиками структуры, пористости, механической прочности под решение конкретных задач [25, 78, 79]. Существуют разновидности технологии 3D-печати, отличающиеся используемыми составами и способами их отверждения [25, 78, 79]:

- чернильная 3D-печать экструзией расплава или раствора полимера;
- стереолитография (SLA), использующая фотоотверждение;
- селективное лазерное спекание (SLS);
- моделирование методом наплавления (FDM);
- лазерная биопечать (LAB).

Ввиду особенностей технологии для данного метода больше подходят термопластичные полимеры, те же, что и для электроспиннинга: ПЛА, ПГЛА, ПКЛ, ПГА, ПЭГ и ПГБ [79]. Такие полимеры как альгинат, хитозан и др. полисахариды, желатин и коллаген мало пригодны для данной технологии. Не являясь термопластами, они требуют приготовления водного раствора для печати, и существует проблема отверждения сформованных слоев [80, 81]. В случае альгината возможно использование для этой цели ионного сшивания, а в случае

хитозана – изменения pH среды, но для этого формирование слоев должно проходить в растворе [81].

3D-печать позволяет получать скэффолды с заданной архитектурой пор, включать лекарственные препараты в пасту и даже живые клетки (LAB) [82], создавать индивидуальные импланты сложной формы. Однако к недостаткам данной технологии относятся такие факторы, как: низкая прочность получаемых скэффолдов, причем введение ФК (ГА, ТКФ, ОКФ) лишь частично решает эту проблему [80, 83], ограниченность ряда используемых полимеров, ограничение введения минеральных компонентов и их гранулометрического состава (определяется разрешением принтера) [84], а печать с фотоотверждением требует специальных добавок – фотоинициаторов – которые зачастую являются токсичными.

1.5.3. Мембраны

Биомедицинские мембраны используются для закрытия неглубоких костных дефектов, закрытия дефектов, заполненных другим материалов, а также для изоляции костного дефекта от окружающих мягких тканей [12]. Мембраны могут выполнять функции надкостницы и эндоста [85, 86]. Они могут быть получены разными способами, включая электроспиннинг, замену растворителя и формование из раствора [87]. Состав их может быть представлен одним полимером, комбинацией полимеров, а также композитом, включающим ФК [12, 85].

Для формования из раствора хорошо подходят полисахариды (хитозан, альгинат, метилцеллюлоза, гиалуроновая кислота), коллаген и желатин, а также ПВС, ПВХ, ПЭГ, поскольку обладают пленкообразующими свойствами, а растворителем является вода [44, 87, 88]. Толщину и плотность пленок можно регулировать за счет концентрации раствора, высоты сформованного слоя геля [87, 89]. Как было отмечено в разделе 1.4., указанные полимеры достаточно быстро подвергаются биоабсорбции и биodeградации. Для того, чтобы мембрана находилась в операционной полости достаточное время, применяют сшивание полимерного геля или готовой пленки [87]. Для улучшения остеоинтеграции и придания мембранам остеоиндуктивности в их состав вводят ФК (ГА, ТКФ, ОКФ)

[12, 86, 87, 88, 90]. Частицы ФК также придают мембране шероховатость, что повышает клеточную и тканевую адгезию, но без прилипания [12, 88].

С точки зрения состава и простоты получения и применения композиционные мембраны выглядят очень привлекательно, однако они не подходят для закрытия объемных костных дефектов, которые образуются в подавляющем числе случаев травм и операций.

1.5.4. Пористые каркасы

Пористые композиционные материалы наиболее интересны в контексте инженерии костной ткани за счет сходства их микроструктуры с микроструктурой трабекулярной кости [25]. Они в наибольшей степени отвечают тому требованию, что костные импланты должны обладать архитектурой взаимосвязанных мезо- и макропор с развитой поверхностью для миграции клеток, прорастания ткани и васкуляризации [25]. Помимо этого, желательно, чтобы материалом можно было легко манипулировать, придавая ему различные формы и размеры, для закрытия костных дефектов сложной конфигурации. Пористые скэффолды на основе полимеров в полной мере отвечают данному запросу, поскольку в большинстве своем обладают деформируемостью и способностью выдерживать циклические нагрузки за счет упругого поведения. Вместе с этим такой скэффолд должен обладать прочностью на сжатие и модулем упругости, близкими к прочности и модулю упругости кости [25].

Существует ряд способов получения пористых скэффолдов. К ним относятся: вспенивание пропусканием газа через раствор полимера, использование пороженных добавок, которые выщелачиваются из застывшего объемного материала с образованием пор, лиофилизация замороженных гелей или сублимационная сушка эмульсии на основе органических растворителей, а также механическое взбивание [25, 91].

Способам получения и характеристике пористых скэффолдов посвящено множество работ. Активно разрабатываются и исследуются пористые композиционные скэффолды на основе коллагена, хитозана, гиалуроновой

кислоты, альгината, ПВС и др. с фосфатами кальция (ГА, ТКФ, ОКФ), некоторые из них представлены в табл.3.

Деформируемость пористых скэффолдов одновременно является и преимуществом, и недостатком. О преимуществе сказано выше, а недостаток заключается в недостижимости необходимой механической прочности при сохранении высокопористой структуры. Введение ФК несколько упрочняет такие материалы, поскольку частицы распределяются в стенках пор, но не дает желаемой прочности. Высокой прочностью может обладать сжатый пористый скэффолд, но в таком случае значительно теряется объем пор.

1.5.5. Свойства альгината и материалов на их основе

Водорастворимые полимеры более просты в обращении: формование пленок и лиофилизация не требуют сложного аппаратного оформления и специальных добавок (пластафикаторы, отвердители и и.д.). Природные полимеры подобны внеклеточному матриксу организма, легко всасываются или разлагаются специальными ферментами. Наиболее интересным и многообещающим из природных полимеров выглядит вышеупомянутый альгинат. Стоит подробнее рассмотреть его свойства.

Альгинаты – производные альгиновой кислоты, полисахарида растительного или бактериального происхождения, преимущественно добываемого из бурых водорослей [15]. Химическая структура альгинатов представлена чередующимися остатками гулуруновой и маннуровой кислот (рис.2), являясь таким образом сополимером, при этом соотношение двух этих компонентов зависит от источника конкретного альгината [15].

Альгинаты, в отличие от альгиновой кислоты, растворяются и набухают в воде, образуя вязкие гели [92]. Благодаря этому альгинат широко применяется в пищевой промышленности в качестве загустителя, эмульгатора, стабилизатора, и др., в фармацевтике – в качестве наполнителя лекарственных форм и энтеросорбента, в медицине – в инкапсулировании для доставки лекарств и контроля высвобождения лекарственных препаратов [93]. Анионная природа альгината позволяет ему связываться с катионами металлов, ввиду чего он

перспективен для очистки воды от тяжелых металлов [94]. Связывание альгината с поливалентными катионами приводит к образованию нерастворимых структур, т.е. к сшиванию [15]. Данное свойство обуславливает высокий интерес к альгинату в области создания материалов для биоразлагаемой упаковки и биомедицинских материалов [93].

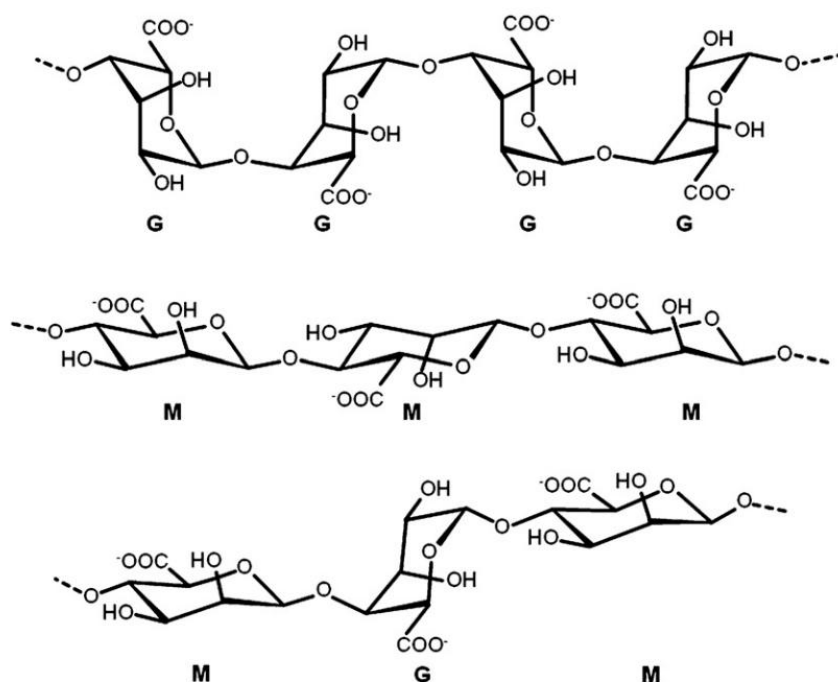


Рисунок 3. Структурная формула альгината: G- и M-блоки [15].

В случае альгината вышеобозначенные проблемы могут быть решены благодаря его уникальной способности сшиваться ионами металлов с образованием структуры, нерастворимой в нейтральной среде [15]. Данное свойство может быть использовано и в технологии 3D-печати [95].

Кроме того, ряд других особенностей делает альгинат привлекательной основой для создания композиционных биоматериалов.

Пленки и мембраны на основе альгината – это перспективные материалы для заживления ран, таких как травмы мягких тканей, ожоги, трофические язвы и др. [95]. При нанесении на рану в сухом виде они поглощают содержимое раны и могут использоваться для ее очищения [15]. А водонасыщенные повязки, наоборот, увлажняют рану и изолируют ее от окружающей среды, тем самым предотвращая

ее инфицирование [15]. Сам альгинат способствует заживлению раны: активирует макрофаги и стимулирует моноциты к выработке интерлейкина-6 [95]. Альгинатные пленки также хорошо показали себя в предотвращении послеоперационных спаек [96].

Для замещения сосудистой и хрящевой ткани изготавливают импланты с применением технологии 3D-печати [97, 98, 99] благодаря тому, что вязкие гели альгината экструдированы, а отверждение изделий осуществляется за счет ионного сшивания [97].

В качестве костных имплантов рассматривают композиционные материалы альгината с ФК: мембраны для костной пластики, 3D-печатные импланты и пористые губчатые материалы, получаемые лиофилизацией гелей альгината и других полисахаридов [100, 101, 102, 103]. Сшивание альгината в сочетании с минеральным наполнителем позволяет получать достаточно прочные материалы, которые при этом резорбируются клетками костной ткани [104].

Однако такие материалы являются достаточно жесткими, обладают очень низкой адгезией к клеткам и тканям [105]. Для устранения данных недостатков альгинат сочетают с другими гидрофильными природными полимерами, такими как желатин [13], хитозан [106], гиалуроновая кислота [107], а также синтетическими – ПВС, ПЭГ и др. [108].

1.5.6. Свойства поливинилпирролидона и материалы на его основе

Среди синтетических биосовместимых полимеров примечателен ПВП, синтетический водорастворимый полимер, получаемый радикальной полимеризацией N-винилпирролидона (рис. 4).

ПВП нетоксичен, неиммуногенен и гемосовместим [109], при этом не взаимодействует с клетками крови, ввиду чего ранее водные растворы ПВП использовались в качестве заменителя плазмы крови. В настоящее время ПВП широко применяется для создания как различных форм лекарственных препаратов, так и имплантов для контролируемой доставки лекарств [110]. ПВП термически стабилен до 140 °С, что позволяет проводить термическую стерилизацию

материалов на его основе, а также применять технологии 3D-печати для их получения.

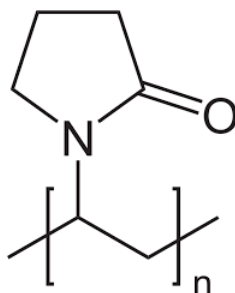


Рисунок 4. Структурная формула ПВП.

ПВП производят с различной степенью полимеризации от 30 000 кДа до 360 000 кДа, применение низко- и высокомолекулярного ПВП зависит от конкретных задач. Например, используемый в фармацевтике низкомолекулярный ПВП при пероральном применении легко выводится почками без каких-либо побочных эффектов [111].

В создании материалов на основе двух или более полимеров важно учитывать их взаимодействие друг с другом. ПВП способен образовывать комплексы с другими органическими молекулами посредством образования прочных водородных связей [112] благодаря наличию электроотрицательных кислородных и третичных амидных группы в структуре [113].

ПВП хорошо смешивается с другими гидрофильными полимерами, например, поливиниловым спиртом (ПВС). Существует множество опубликованных исследований, демонстрирующих, что ПВС и ПВП взаимодействуют посредством межмолекулярных водородных связей между –ОН группами ПВС или –ОН и –С=О группами ПВС и ПВП, которые могут быть: меж- и внутримолекулярными множественными Н-связями между –ОН группы ПВС в кристаллических областях, простые водородные связи между –ОН-группами цепей ПВС в аморфных областях, поперечные связи между С=О-группой ПВС и –ОН-группой ПВС, атом кислорода которой принимает протон от другой –ОН-группы, поперечные связи между –ОН-группой ПВС и –С=О группой ПВП. Благодаря этому ПВП может образовывать термодинамически смешивающиеся смеси [112] (рис.5).

Данный механизм касается не только ПВС, но и других гидрофильных полимеров, с которыми ПВП смешивается, в частности, полисахаридов: хитозана, метилцеллюлозы, альгината [114, 115, 116].

Взаимодействиями между ПВП и другими полимерами задает свойства смесевых материалов, которые зачастую превосходят свойства отдельных полимеров [117]. Например, ПВП снижает кристалличность ПВС, обусловленную регулярным расположением гидроксильных групп [118], тем самым повышая растворимость смеси [112,113]. Растворимость напрямую связана со способностью к набуханию (гелеобразованию). Гидрогели ПВП-ПВС поглощают больше воды, чем чистый ПВС, при этом степень набухания увеличивается с увеличением содержания ПВП [114, 115]. ПВП снижает вязкость гидрогелей: blend ПВС-ПВП с соотношением 1:1 имеет вязкость: $3,3 \pm 0,2$ Па·с, а blend с соотношением 3:1 ПВС-ПВП – $2,6 \pm 0,1$ Па·с [123].

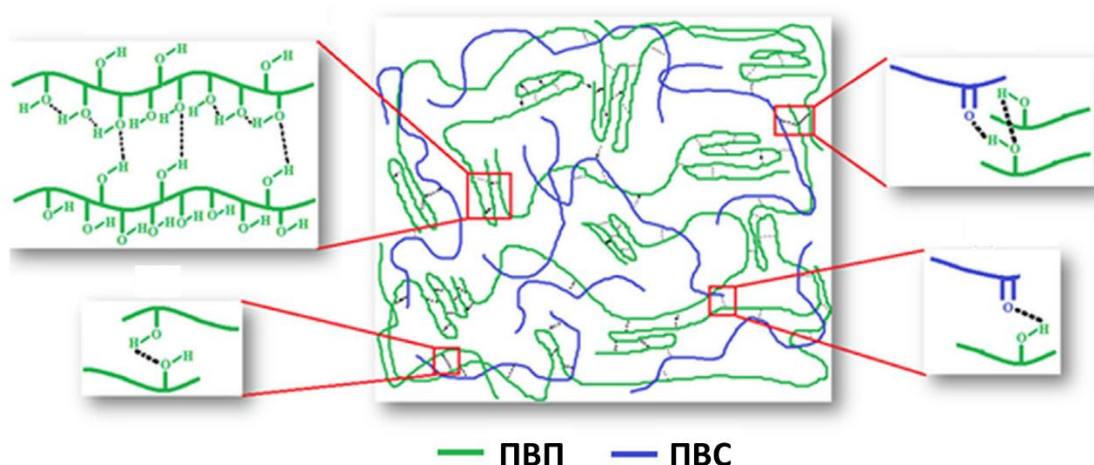


Рисунок 5. Схема образования водородных связей между ПВП и ПВС [112].

С увеличением содержания ПВП возрастает пористость материала [124]. Размер и распределение пор зависят от количества введенного ПВП: это влияние наблюдается при добавлении ПВП в количестве от 1 до 4 мас.% [121] ПВП приводит к увеличению размера пор и большей равномерности их распределения, однако введение этого 8 мас.% ПВП – к неравномерному распределению и размеру пор, а также крайне неоднородной структуре полученного материала [125].

Положительное влияние ПВП на механическую прочность пленок проявляется также в определенном интервале содержаний ПВП. Например,

показано, что модуль упругости гелей ПВС-ПВП увеличивался с увеличением содержания ПВП до 6 мас.%, но с дальнейшим повышением содержания ПВП модуль упругости уменьшается, то же самое касается прочности при сжатии [118,[120]. Обнаружено, что свойства гидрогелей смеси ПВП/ПВС проявляют линейное и вязкоупругое поведение, наибольшая механическая прочность при растяжении наблюдалась для пленок с содержанием ПВП не более 4 мас.% Та же тенденция наблюдалась в ходе испытаний прочности при сжатии [121]. Для пленок хитозан-ПВП наблюдается аналогичная закономерность: прочность мембран при разрыве и росту удлинения: 4 мас.% ПВП – 3,8МПа и 231%, 6 мас.% ПВП – 4,4МПа и 535%. Поведение пленки с 8 мас.% ПВП не отличалось от пленки с 6мас.% ПВП [126].

Водорастворимость ПВП и его blends с гидрофильными полимерами позволяет достаточно просто получать пленки литьем из водных растворов. Возможно использование как просто дистиллированной воды [120] с последующим разлитием геля в формы и сушкой на воздухе, так и сильнощелочного водного раствора [123].

С гидрофобными полимерами, производными молочной кислоты (полилактидом (ПЛА) поликапролактоном (ПКЛ)) ПВП не смешивается, но образует слабые водородные связи [127]. Несмешиваемость ПВП и ПЛА из-за различной природы позволяет создавать амфифильные материалы [128, 129].

ПВП мало пригоден для получения из него нетканых материалов, 3D-печатных структур, однако за счет свойства пленкообразования может применяться для получения мембран и пористых скэффолдов [130]. В сочетании с другими полимерами за счет своих уникальных свойств ПВП придает смесевым материалам новые уникальные свойства.

Выводы по литературному обзору

Разработка новых, особенно композиционных, материалов, для восстановления костной ткани является более чем актуальной задачей. Хотя современный уровень разработок таких материалов высок, имеется ряд нерешенных проблем, связанных с подбором полимеров, разработкой состава,

технологичностью получения, возможностью закрывать сложные дефекты без обширных операций, а также с поведением таких материалов в экспериментах *in vivo*. Непосредственное использование в медицинской практике, в основном, зарубежных материалов, получаемых из дорогостоящего сырья (коллаген), также подтверждает необходимость новых исследований и разработок отечественных материалов.

Выбор объектов для исследования – альгината, ПВП и КГА обусловлен следующими соображениями. Данные полимеры хорошо растворимы в воде, что позволяет регулировать вязкость гелей и параметры микроструктуры получаемых материалов. Альгинат, обладая способностью к ионному сшиванию, позволяет задавать степень сшивания, а значит – прочность материалов и скорость деградации. ПВП обладает превосходной биосовместимостью, придает материалам из сшитого альгината эластичность, улучшает набухаемость. Кроме того, ввиду большей растворимости, чем сшитый альгинат, ПВП выступает в качестве порогена, растворяясь быстрее, чем второй полимер. Данный процесс обеспечивает лучшую интеграцию материала в объеме дефекта и большее соприкосновение с тканями и жидкостями в ране. ПВП способен образовывать комплексы с молекулами лекарственных препаратов, поэтому материал с ним может быть дополнительно использован для доставки лекарств. ПВП и альгинат обладают низкой адгезией к клеткам и тканям, что предотвратит образование и прорастание фиброзной ткани. Выбор КГА в качестве минерального наполнителя продиктован его схожестью с основным минеральным компонентом костной ткани, лучшей остеоинтеграцией и биорезорбцией без закисления окружающих тканей. Пористые композиты обладают деформируемостью, что позволит приспособлять имплантат к форме дефекта.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Исходные материалы

При выполнении экспериментальных работ были использованы реактивы марки «ч», «хч», «чда» и «осч». Реактивы, их назначения в работе, CAS номера и марки по степени чистоты приведены в табл. 3.

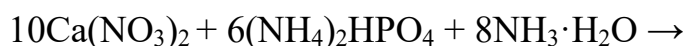
Таблица 3. Использованные реактивы

Назначение	Наименование	Формула	Чистота	CAS
Синтез ГА и КГА	Нитрат кальция тетрагидрат	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	чда	13477-34-4
	Гидрофосфат аммония однозамещенный	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	чда	7783-28-0
	Аммиак	NH_4OH	осч	7664-41-7
	Карбонат аммония	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	ч	506-87-6
Получение композиционных материалов	ПВП	$(\text{C}_6\text{H}_9\text{NO})_n$	-	9003-39-8
	Альгинат натрия	$(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_6\text{Na})_n$	-	9005-38-3
Сшивание альгината (в т.ч. ЯМР- и ЭПР-анализ)	Хлорид кальция б/в	CaCl_2	ч	10043-52-4
	Хлорид бария дигидрат	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	ч	10326-27-9
	Нитрат стронция тетрагидрат	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	ч	10042-76-9
	Сульфат меди тетрагидрат	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	чда	7758-98-7
	Ацетат марганца тетрагидрат	$\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	чда	6156-78-1

2.2. Получение порошков гидроксиапатита, карбонатгидроксиапатита и композиционных материалов

2.2.1. Синтез гидроксиапатита и карбонатгидроксиапатита

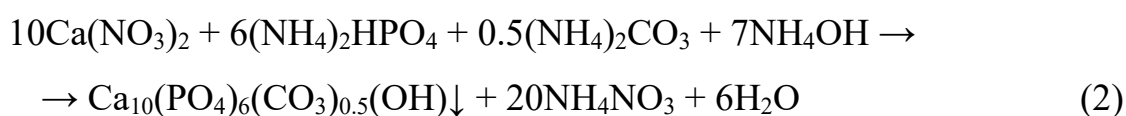
Порошок ГА для ЭПР-исследований получали осаждением по реакции (1):





Раствор, содержащий 0,6 моль $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, при перемешивании с помощью верхнеприводной мешалки ULAB US-8100 покапельно приливали к раствору, содержащему 0,1 моль $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. К реакционной смеси добавляли 25% р-р $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ для поддержания $\text{pH} \approx 7$. Полученную суспензию оставляли отстаивать на сутки, после чего фильтровали с помощью вакуумной установки и затем сушили при 110 °С в течение суток. Для получения кристаллического ГА порошок прокаливали при 900 °С в течение 1 часа.

КГА получен осаждением из растворов по реакции (2):



Уровень $\text{pH}=9$ поддерживали добавлением водного 25%-го раствора аммиака. Продукт реакции оставляли стареть в течение суток, затем отфильтровывали от маточного раствора и сушили при 110 °С, измельчали и прокаливали полученный порошок при 900 °С для получения кристаллической фазы апатита.

2.2.2. Получение композита с гидроксиапатитом и карбонатгидроксиапатитом

Для получения композита на основе ПВП-альгинат порошки ГА и КГА измельчали перетиранием до ≤ 50 мкм, смешивали с порошками полимеров (ПВП и Алг 1:1, 2:1, 1:2), смешивали с водой для получения геля с 2,5 мас.% по полимеру и перемешивали с помощью верхнеприводной мешалки до однородности. Для получения пленок гель выливали на полипропиленовые подложки и сушили на воздухе (рис. 5). Для получения объемных пористых образцов гель взбивали в пену при скорости перемешивания 3000 об/мин и последовательно замораживали при -10 и -50 °С. Замороженные гели сушили в лиофильной сушилке ЛС-100. Схема получения пористых композитов ПВП-альгинат-КГА (ПАК) приведена в Приложении.

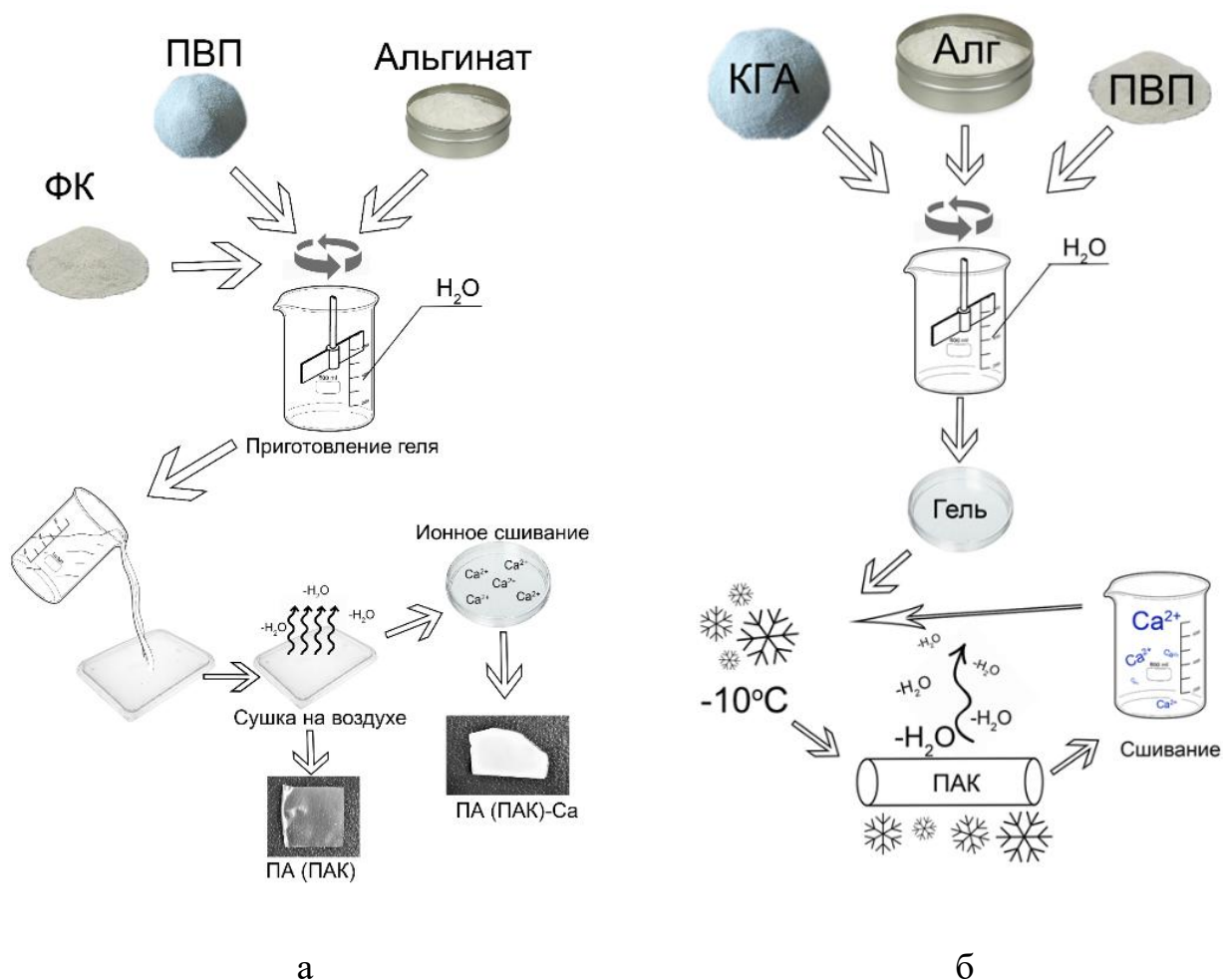


Рисунок 6. Схемы получения пленок (а) и объемных пористых материалов (б).

2.2.3. Частичное сшивание композиционных материалов

Для сшивания высушенные пленки помещали в раствор CaCl_2 , BaCl_2 , SrCl_2 , CuSO_4 , $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, в концентрациях 0,5 М на 10 минут, после чего сшитые пленки промывали 2 раза в дистиллированной воде и сушили в сушильном шкафу при 50 °С. Объемные пористые композиционные материалы, высушенные лиофилизацией, сшивали погружением в 0,5 М раствор хлорида кальция на 2 минуты, промакивали фильтровальной бумагой для удаления излишков влаги, замораживали и снова сушили в лиофильной сушилке.

В табл. 4 приведен список полученных материалов и их обозначения

Таблица 4. перечень полученных материалов и их обозначения.

Наименование	Состав и исследованные свойства
Фазовый и химический состав	
ГА	ГА
КГА	КГА
ПАК	ПВП-альгинат 2,5 мас.% 1:1 +5 мас.% КГА
ПВП-ГА	ПВП + 5мас.% ГА
Микроструктура, водопоглощение, растворимость и механические характеристики пленок, сшивание альгината	
ПВП	ПВП
Алг	Альгинат
ПА	ПВП-альгинат 2,5 мас.% 1:1
ПА-Са	Пленки ПА, частично сшитые ионами Ca^{2+}
ПА-Ва	Пленки ПА, частично сшитые ионами Ba^{2+}
ПА-Sr	Пленки ПА, частично сшитые ионами Sr^{2+}
ПА-Cu	Пленки ПА, частично сшитые ионами Cu^{2+}
ПА-Mn	Пленки ПА, частично сшитые ионами Mn^{2+}
ПА1	ПВП-альгинат 1:2
ПА2	ПВП-альгинат 2:1
Сшивание альгината	
А-Са*	Альгинат, сшитый ионами Ca^{2+}
А-Ва	Альгинат, сшитый ионами Ba^{2+}
А-Sr*	Альгинат, сшитый ионами Sr^{2+}
А-Cu*	Альгинат, сшитый ионами Cu^{2+}
А-Mn*	Альгинат, сшитый ионами Mn^{2+}
Вязкость гелей, микроструктура, пористость и механические характеристики пористых композитов	
ПАК-5	ПВП-альгинат 2,5 мас.% 1:1+5 мас.% КГА
ПАК-10	ПВП-альгинат 2,5 мас.% 1:1+10 мас.% КГА
ПАК-20	ПВП-альгинат 2,5 мас.% 1:1+10 мас.% КГА
ПАК-30	ПВП-альгинат 2,5 мас.% 1:1+10 мас.% КГА
ПАК-40	ПВП-альгинат 2,5 мас.% 1:1+10 мас.% КГА
ПАК-50	ПВП-альгинат 2,5 мас.% 1:1+10 мас.% КГА

*Эти же обозначения применимы к образцам в исследовании сшивания альгината ЯМР- и ЭПР-спектроскопией.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Рентгенофазовый анализ (РФА)

РФА выполняли на дифрактометре Rigaku SmartLab SE (Rigaku, США): с герметичной рентгеновской трубкой мощностью 3 кВт, кремниевым полосковым детектором D/teX Ultra 250, с геометрией θ - θ вертикального типа, с детектором HyPix-400 (2D HPAD). Данные порошковой дифрактометрии регистрировали при

комнатной температуре в диапазоне 2θ от 3° до 110° с шагом шага $0,02^\circ$. Диффракционные картины были построены с использованием программы Crystallographica Search-Match (V. 2. 0. 3. 1.) и базы данных PFD # 2.

2.3.2. ИК-спектроскопия

Спектры поглощения образцов записывали на Фурье-спектрометре Vertex 70V (Bruker, США) в области волновых чисел $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$, спектральное разрешение – 1 см^{-1} . Для получения спектров применяли стандартный метод таблеток KBr. Обработку спектров проводили в программе Origin Pro.

2.3.3. ЭПР-спектроскопия

ЭПР исследование композита поливинилпирролидон-гидроксиапатит

ЭПР-исследования проводились с помощью спектрометров Bruker Eleksys E580 (Bruker, Германия) (X-диапазон, рабочая частота $\nu = 9,61\text{ ГГц}$) и E680 (W-диапазон, $\nu = 94\text{ ГГц}$) в Институте физики Казанского федерального университета Г.В. Маминым при температурах 200 и 297 К . В импульсном режиме использовалась последовательность Хана: $\pi/2 - \tau - \pi - \tau -$ (электронное спиновое эхо (ЭСЭ)), где время $\pi/2 = 64\text{ нс}$, $\tau = 248\text{ нс}$. Спектры ЭПР были получены путем измерения интегральной интенсивности ЭСЭ при непрерывной развертке магнитного поля B_0 . Для исследования радиационно-наведенных дефектов исследовались образцы, которые подвергались рентгеновскому облучению при комнатной температуре в течение 1 ч на установке УРС-55 с дозой поглощения 15 кГр .

ЭПР исследование сшивания альгината

Для изучения сшивки альгината методом ЭПР-спектроскопии были получены твердые образцы (Алг) в виде пленок, сформированных из $2,5\text{ мас.}\%$ альгинатного раствора. В экспериментах использовались полоски толщиной $150\pm 10\text{ мкм}$. Наличие парамагнитных примесей в образцах не обнаружено. Образцы массой от $2,5$ до 80 мг погружали в 400 мкл $102,5\text{ ммоль/л}$ раствора $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ЧДА, Химмед, Москва, Россия) или $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ЧДА, Химмед, Россия) и помещали в перемешивающее устройство вортекс BioSan MSV-3500 (BioSan,

Латвия) на 1 ч при скорости перемешивания 1200 об/мин. После этого образцы промывали дистиллированной водой и сушили в течение 24 часов.

Образцы навески взвешивали с помощью весов Vibra HT (Shinko, Япония) (точность 0,5 мг).

Спектры ЭПР X-диапазона (9,64 ГГц) регистрировали на ЭПР-спектрометре Bruker ElexSys 580 в Институте физики Казанского федерального университета при комнатной температуре. Число парамагнитных центров измеряли по стандартной методике [131] путем сравнения интегральной интенсивности линий ЭПР измеряемого образца и интегральной интенсивности спектра раствора $\text{Cu}(\text{DETC})_2^1$ с числом ионов Cu^{2+} , равным $7,2 \cdot 10^{-9}$ моль.

2.3.4. ЯМР-спектроскопия

Твердотельные ^1H ЯМР-спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре AVANCE400WB (Bruker, Германия) с твердотельным датчиком с вращением под магическим углом MAS 4BL CP BB DVT О.Н. Гнездиловым в Институте физики Казанского федерального университета. Образцы порошка были плотно упакованы в 4-миллиметровый ротор из оксида циркония и раскручивались до частоты вращения 7 кГц. Измерения проводились при температуре 295 К. Химические явления, связанные с сигналами ЯМР, были откалиброваны путем измерения сигнала воды ($\delta = 4,67$ ppm).

Для регистрации жидкостных спектров альгината использовали раствор альгината (Химмед, фармацевтический) 1 мл 1 мас.% в D_2O (GmbH, Германия), который дополнительно разбавляли для каждого опыта. Аликвоту объемом 100 мкл отбирали пипеткой и разбавляли до 500 мкл добавлением D_2O до получения 0,2 мас.% Раствора альгината. Отдельно готовили растворы сшивающих катионов в D_2O : CaCl_2 (хч, Химмед, Москва, Россия), $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ (Ч, ЛенРеактив, Санкт-Петербург, Россия). Металлы выбраны на основе данных о прочности связи с альгинатом [132, 133].

¹ $\text{Cu}(\text{DETC})_2$ – комплекс меди (II) с диэтилдитиокарбаматом, компонент спиновой ловушки в ЭПР-исследованиях.

К раствору 0,2 мас.% альгината добавляли раствор сшивающего катиона в различных количествах (табл. 1). Количество сшивающего иона влияет на вязкость альгинатных гелей, а, следовательно, и на возможность регистрации спектров ^1H ЯМР [134].

Таблица 5. Количества сшивающих ионов, использованные в эксперименте ЯМР.

Катион	Количество, мкмоль
Ca^{2+}	0,3; 1; 2,5; 5,5; 25
Sr^{2+}	0,3; 1; 2,5

Все спектры ЯМР ^1H записаны на ЯМР-спектрометре Varian Inova 500 (Varian, США) (рабочая частота для протонов 500 МГц), оснащенном 5-мм зондом, при 25 °С. Для обработки спектров ЯМР ^1H использовали программу MestReNova 14.2.1. Спектры были получены путем усреднения 128 независимых сканирований. Ширина спектра составляла 8000 Гц (16 м.д.), размер реального спектра составлял 65,5 тыс. точек, время сбора данных – 5 с, длина импульса – 11 мкс.

2.3.5. Реологические исследования

Кинематическую вязкость гелей измеряли с помощью визкозиметра ВПЖ (Союзнаучприбор, СССР), кажущаяся вязкость была измерена на реометре RheolabQC (Anton Paar, Австрия) с использованием измерительной системы (чашка+шпиндель) СС39/Т200/ХЛ/SS в диапазоне скоростей сдвига от 10 до 1300 с^{-1} . Динамическую вязкость определяли при температуре 20 °С. Температуру контролировали (± 0.2 °С) с помощью термостатической проточной ячейки С-LTD80/QC. Калибровку прибора проводили по стандарту ГСО РЭВ-1000-ЭК (ООО «Экрес», Россия).

2.3.6. Измерение пористости

Открытую пористость объемных образцов определяли гидростатическим взвешиванием в соответствии с ГОСТ 2409-2014 [135]. В качестве жидкости, смачивающей образец, использовали этанол.

2.3.7. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Микроструктуру образцов изучали методом СЭМ на микроскоп Tescan Vega II («Tescan», Чехия). Предварительно на поверхность сухих образцов наносили слой золота с помощью распылительной установки Q150R Plus с роторным насосом (Quorum Technologies Ltd., Великобритания).

2.3.8. Измерение удельной поверхности методом БЭТ

Удельная поверхность порошков КГА после термообработки при $T = 900$ °С, была измерена на анализаторе удельной поверхности TriStar 3000 V6.03A. В качестве адсорбента использовали N_2 , температура ванны составляла 195,8 °С. Удельную поверхность рассчитывали по методу Брунауэра–Эмметта–Теллера (БЭТ) в соответствии со следующей формулой (3):

$$\frac{p/p_0}{a[(p/p_0)]} = \frac{C-1}{a_m C} \left(\frac{p}{p_0} \right) + \frac{1}{a_m C} \quad (3)$$

где $\frac{p/p_0}{a[(p/p_0)]}$ – соотношение между давлением в системе и давлением конденсации,

a – адсорбированный объем,

a_m – объем монослоя на поверхности адсорбента,

C – соотношение между константами равновесия адсорбции в первом слое и константа миконденсации.

2.3.9. Механические испытания

Испытания сухих и влажных пленок на растяжение (в соответствии с ГОСТ 34370—2017) и объемных пористых образцов на сжатие (в соответствии с ГОСТ 4651-2014 (ISO 604:2002) проводили на универсальной разрывной машине Instron 1196 (Instron Ltd., Великобритания). Влажность пленок для испытаний на растяжение достигали сбрызгиванием пленок дистиллированной водой до их равномерного размягчения и содержания влаги на уровне 37–38%. Из полученных при испытаниях кривых были найдены показатели прочности (предельное напряжение, модуль упругости). Для объемных пористых образцов исследована

деформируемость при сжатии. Абсолютную $\varepsilon_{\text{абс}}^{\text{обр}}$ и $\varepsilon_{\text{ист}}^{\text{обр}}$ истинную обратимую деформацию рассчитывали по формулам (4) и (5):

$$\varepsilon_{\text{абс}} = \frac{l_{\text{кон}} - l_{\text{деф}}}{l_0 - l_{\text{деф}}} \cdot 100\%, \quad (4)$$

$$\varepsilon_{\text{ист}} = \left(\frac{l_{\text{кон}} - l_{\text{деф}}}{l_0 - l_{\text{деф}}} \right) \cdot 100\%, \quad (5)$$

где l_0 – начальная высота образца,

$l_{\text{деф}}$ – высота образца после сжатия,

$l_{\text{кон}}$ – высота образца, восстановленная после сжатия.

Все расчеты проводили с использованием программ MS Excel и Origin Pro.

2.2.10. Термогравиметрический анализ

Исследование образцов методом ТГА проводили на приборе TG50 (Mettler Toledo, США) с микровесами МЗ в токе воздуха (скорость потока 200 мл/мин) в динамическом режиме со скоростью 20 °С/мин в диапазоне от 30 до 700 °С. Для этого из исследуемых пленок вырубали образцы диаметром 6,5 мм, которые помещали в один слой в фарфоровый тигель.

2.3.11. Измерение набухания

Степень набухания пленок в соответствии с ГОСТ 4650-2014 измеряли следующим образом: пленки (размер 5x10 см) погружали в 50 мл дистиллированной воды с температурой 25 °С на 1, 3, 5, 10, 15, 30 и 60 мин, взвешивали набухшую пленку и рассчитывали степень набухания по формуле (6):

$$\alpha = \frac{m - m_0}{m_0} \cdot 100\%, \quad \text{где} \quad (6)$$

α – степень набухания, m – масса сухой пленки, m_0 – масса набухшей пленки.

2.3.12. Оценка растворимости композитов

Растворимость определяли через изменения массы при выдерживании образцов в деионизированной воде.

2.3.13. *In vitro* исследования цитотоксичности

МТТ-тест использовали для оценки цитотоксичности экстрактов исследуемых материалов. Его проводили с использованием клеток фибробласта

NCSTC-клона L-929 подкожной соединительной ткани мышцы. Трехдневные экстракты готовили в соответствии с требованиями [136].

Адгезию и пролиферацию стволовых клеток пульпы зуба человека (СКПЗЧ) исследовали путем прямого контакта [137]. Клетки распределяли по поверхности тест-образцов и помещали в лунки 24-луночного планшета с плотностью слоя 40 000 см⁻². Жизнеспособность клеток СКПЗ человека на поверхности композита оценивали методом дифференцированного флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss, Германия). Для визуализации использовали флуоресцентный краситель SYTO9, зеленеющий после взаимодействия с ДНК и РНК живых и мертвых клеток. ($\lambda_{ex}=450-490\text{нм}$, $\lambda_{emiss}=515-565\text{нм}$) и йодид пропидия (ПИ), краснеющий после взаимодействия с ДНК и РНК мертвых клеток. ($\lambda_{ex}=546\text{ нм}$, $\lambda_{emiss}=575-640\text{ нм}$).

Проведен статистический анализ экспериментальных данных по адгезии СКПЗЧ человека. Набор из 24 композитных образцов помещали в 24-луночный планшет. Экстракты из каждой лунки были проанализированы и представлены средние значения и соответствующие стандартные отклонения. Для теста на адгезию ядра погибших клеток окрашивали интеркалирующим реагентом ПИ ($\lambda_{ex} = 546\text{ нм}$, $\lambda_{emiss} = 575-640\text{ нм}$).

2.2.14. *In vivo* исследования биodeградации материалов и оценка регенеративного потенциала материалов на мышинной модели

Исследование проводили на самцах мышей CD1. Мыши линии CD1 (40 ± 5 г) были получены из питомника лабораторных животных «Пушино», Московская область. Все животные имели беспрепятственный доступ к пище и воде и содержались в конвенциональных условиях. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ИБХ РАН, протокол № 232. Самцов мышей линии CD1 анестезировали введением ксилазин гидрохлорида (6,5 мг/кг, внутривентриально) и тилетамина/золазепам (телазол 100, 36 мг/кг, внутривентриально). На протяжении всего экспериментального периода использовалась асептическая техника. Шерсть на брюхе удаляли депилятором. Поверхность кожи стерилизовали раствором йода. Вдоль срединной линии передней стенки брюшной полости делали глазными

ножницами разрез длиной приблизительно 1 см. Слепую кишку извлекали пинцетом, оборачивали стерильной марлевой салфеткой, фиксировали участок поверхности площадью 0,5×0,5 см и растирали до получения точечных кровотечений, используя стерильный абразивный материал. Участок мышечного слоя размером 0,5×0,5 см на прилежащей к слепой кишке боковой стенке брюшной полости также растирали до получения точечных кровотечений. В опытных группах на поврежденные поверхности наносили пленку стерильного противовоспалительного препарата размером 1×1 см. Поврежденную слепую кишку помещали обратно в брюшную полость вблизи поврежденной стенки брюшной полости. После операции все мыши отходили от наркоза, через сутки после операции мыши были активными, шерсть гладкая. Через 7 суток после операции животных подвергали эвтаназии с использованием метода цервикальной дислокации. Брюшную полость вскрывали U-образным разрезом и проводили оценку степени тяжести спаек по пятибалльной шкале спайкообразования [138].

Таблица 6. Шкала оценки спаечного процесса и характеристика баллов

Степень спаечного процесса	Описание
0	Нет спаек
1	Тонкая пленочная спайка
2	Плотная спайка с точечным прикреплением
3	Более одной тонкой пленочной спайки
4	Плотная спайка с плоским прикреплением
5	Очень плотная кровоснабжаемая спайка или более одной спайки с плоским прикреплением

Гистологический анализ срезов тканей

Образцы тканей брюшной стенки и слепой кишки обрабатывали параформальдегидом (4%) и заливали парафином. После этого образцы разрезали на срезы толщиной 4 мкм с помощью криомикротомы Leica RM 2145 RTS (Leica Biosystems, Nussloch, Germany). После депарафинизации срезов ткани их окрашивали коммерческим набором «Окраска по Массону с анилиновым синим» (Биовитрум, Новосибирск, Россия) или гематоксилин-эозином согласно протоколу

производителя. Далее дегидратировали срезы, просветляли и заключали под покровное стекло при помощи гистологической среды Consul-Mount. Окрашенные образцы исследовали с помощью световой микроскопии Zeiss Primo Star (Carl Zeiss, Германия).

Анализ экспрессии генов

Выделение РНК из образцов поврежденных тканей (брюшина и толстая кишка), подготовка образцов к проведению полимеразной цепной реакции (ПЦР) подробно описано в работе². Для постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени использовали коммерческий набор с готовой ПЦР-смесью «БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (2×)» (Биолабмикс, Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию проводили в объёме 20 мкл, используя специфические праймеры (короткие фрагменты нуклеиновой кислоты для затравки синтеза комплиментарной цепи с помощью ДНК-полимеразы).

Статистический анализ

Оценку полученных результатов проводили с помощью методов вариационной статистики с использованием стандартных статистических программ Microsoft Excel. Определяли среднее значение, стандартное (среднеквадратичное) отклонение (SD), стандартную ошибку среднего (SEM) и значение вероятности (p). Для оценки достоверности различий выборок применяли критерий Манна-Уитни или t-критерий Стьюдента. Различия двух сравниваемых величин считали статистически значимым, если вероятность их тождества составляла менее 5% ($p < 0,05$).

² Forysenkova, A. A., Konovalova, M. V., Fadeeva, I. V., Antonova, O. S., Kotsareva, O. D., Slonskaya, T. K., Rau J.V. Svirshchevskaya, E. V. Polyvinylpyrrolidone–Alginate Film Barriers for Abdominal Surgery: Anti-Adhesion Effect in Murine Model. *Materials*. 2023. 16(16), 5532.

ГЛАВА 3. СОСТАВ И СТРУКТУРА ПОЛУЧЕННЫХ ФК И КОМПОЗИТОВ

3.1. Фазовый анализ синтезированных гидроксиапатита, карбонатгидроксиапатита и композитов

Согласно данным РФА, продукт синтеза КГА, порошок с размером частиц 10–50 нм, $S_{уд}=44\pm 1,0$ м²/г после термообработки при 900 °С представлен хорошо закристаллизованной апатитовой фазой без примесей (рис.7). Аналогично для порошка ГА.

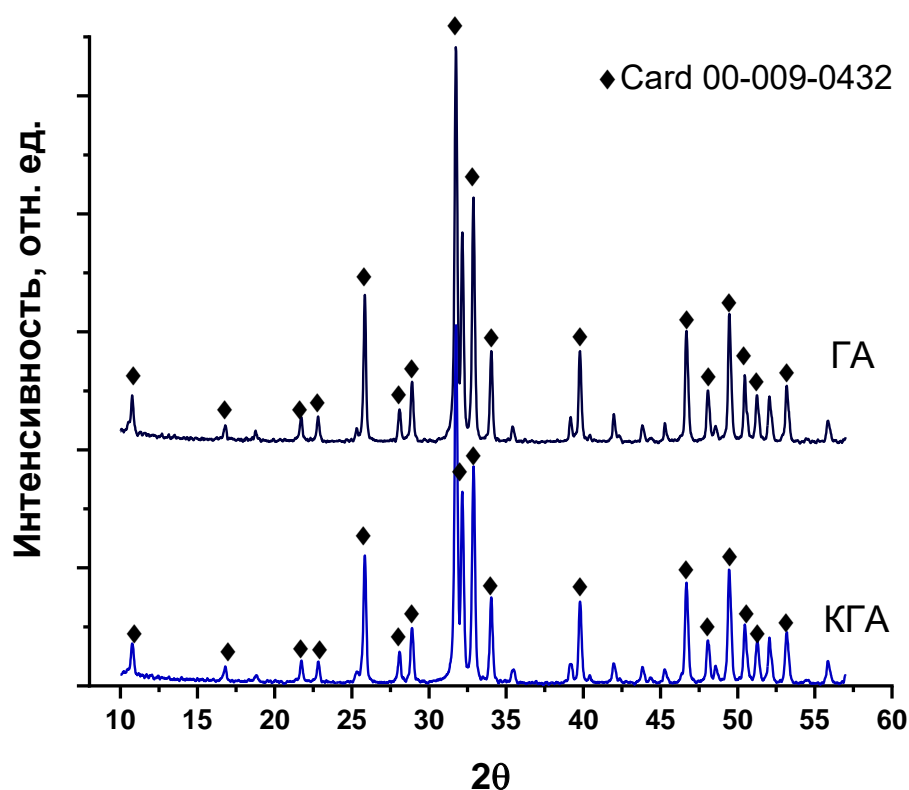


Рисунок 7. РФА ГА и КГА, полученных осаждением, после термообработки при 900°С.

На дифрактограмме композита ПАК-5 (рис.8), содержащем осажденный КГА, широкая линия при 3–40 2θ° соответствует диффракционной картине полимерной матрицы, а именно: 10.9 и 21.1 2θ° – ПВП [139, 140], 13.73 и 21.71 2θ° – альгинату [141].

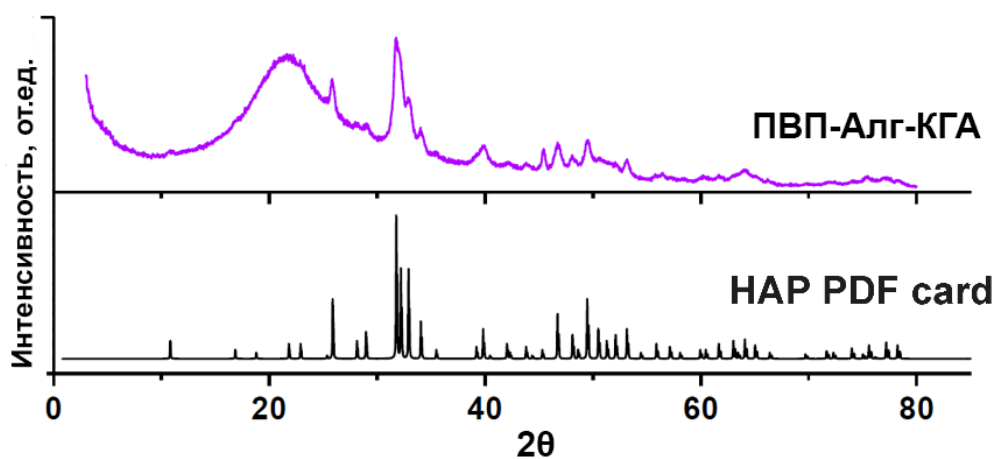


Рисунок 8. РФА композита ПАК-5.

Из ИК-спектра КГА (рис.9) после отжига при 900 °С видно, что порошок хорошо закристаллизован, наблюдаются выраженные полосы, относящиеся к колебаниям фосфатных групп в апатитовой структуре (565, 603, 1103, 963 см^{-1}), гидроксо-групп (603, 3562, 3399 см^{-1}), карбонат-группам (873, 1418, 1458 см^{-1}), замещающие фосфатные группы. И хотя в спектре не присутствует полоса при 1550 см^{-1} , говорящая о замещении гидроксо-групп карбонат-ионами, нельзя строго говорить об образовании КГА чистого Б-типа [142], поскольку при растворном методе синтеза, как правило, образуется КГА смешенного А,Б-типа [32].

В ИК-спектре композита (рис.9) присутствуют полосы, относящиеся к колебаниям фосфатных, гидроксо- и карбонат-групп КГА (рис. 10, табл. 8), а также полосы, относящиеся к колебаниям воды. При полоса деформационных колебаний Н–О–Н в композите смещена в коротковолновую область, в отличие от спектра КГА. В значительной степени присутствуют полосы, относящиеся к колебаниям функциональных групп полимеров. Колебания амидной группы в ПВП подтверждается полосой поглощения при 1738 см^{-1} [143]. Полоса при 1425 см^{-1} относится к колебаниям растяжения связи С–N ПВП [144]. Полоса валентных колебаний N–C=O в спектре отсутствует, что характерно для лактамов (циклический заместитель ПВП). Карбонильная полоса ПВП проявляется при 1663 см^{-1} [145]. Частоты функциональных групп Алг (карбоксильная группа – 1590 см^{-1} , 1411 см^{-1} , кислород кольца 1078 см^{-1}) соответствуют альгинату кальция [146], образовавшемуся в результате сшивки CaCl_2 .

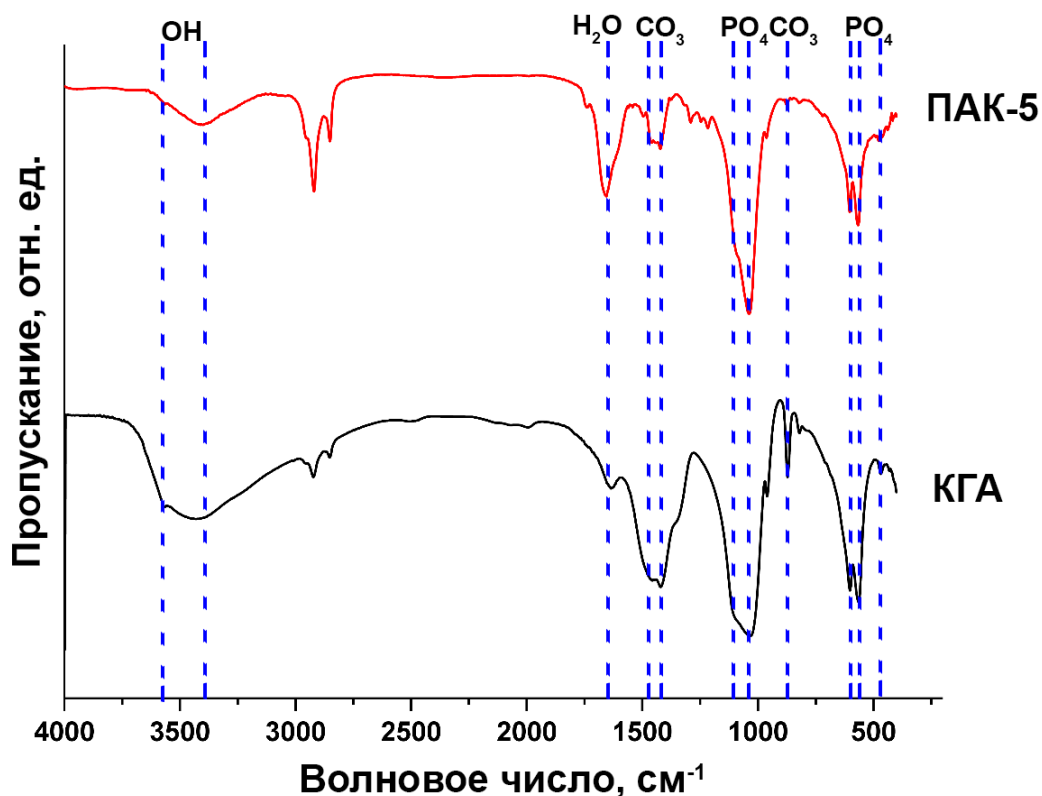


Рисунок 9. ИК-спектры композита ПАК-5 и КГА, полученного осаждением, после отжига при 900 °С.

Таблица 7. Отнесение полос колебательных частот спектров ГА, КГА и композитов ПВП-ГА, ПАК.

Обозначение	Частота, см ⁻¹		
	ГА-ос	КГА-ос	ПАК-5
$\nu_{as}[\text{OH}^-] + \nu_s[\text{OH}^-]$	3566	3562	3544
$\delta [\text{OH}^-]$		3399	3378
$\nu_2[\text{CO}_3^{2-}]$		2922	2916
$\nu_{as}[\text{CH}_2]$			2916, 2942
$\nu_s[\text{CH}_2]$			2847
амид I (C=O ν -s связь δ)			1738
$\delta[\text{CH}_2]$			1425, 1466
$\omega[\text{CH}_2]$			1323, 1367
$\tau[\text{CH}_2]$			1250, 1289

Изгибающие вибрации δ $\nu_4(\text{O-P-O})$ в $[\text{PO}_4^{3-}]$	572, 632	565, 603	563, 606
$\nu_{3as}[\text{P-O}]$	1053	1034	1038
$\nu[\text{C-C}]$		1036	1040
$\nu_2[\text{PO}_4^{3-}]$	572	433, 470	417, 438, 469
$\nu_2[\text{NO}_3^-]$	820	822	826
$\nu_s[\text{P-O-P}]$ в $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$		718, 1211	718, 1211
$\nu_3[\text{NO}_3^-]$	1342	1350	1367
Изгибающие вибрации δ O– C–O связей в $[\text{CO}_3^{2-}]$		873	872
Изгибающие вибрации δ [H– O–H] в H_2O	1653	1636	1663
[C=O] ПВП			1662
$\nu_{3as}[\text{C-O}]$ в $[\text{CO}_3^{2-}]$ of B-типа в КГА-ос		1418, 1458	1425, 1466, 1495
$\delta[\text{C-N}]$			1425, 1466, 1495
$\nu[\text{C-N}]$			1289
$\nu_{3as}[\text{PO}_4^{3-}]$	1090	1103	1092
ν_{1s} и ν_{3s} of [P–O] в PO_4^{3-}	965	963	959
$\delta[\text{OH}^-]$	602	603	606
$\rho[\text{C-H}_2]$			872
$\nu[\text{C-C}] + \rho[\text{CH}_2]$			959
$\nu_{as}[\text{O-C=O}]$ в COO^- альгината			1590
$\nu_s[\text{O-C=O}]$ в COO^- альгината			1411
ν [O–C–O] цикл альгината			1078

*после отжига композита ПВП-ГА при 900 °С.

3.2. ЭПР-спектральные исследования композитов

Методом ЭПР-спектроскопии исследовали взаимодействия матрица-наполнитель на модельном составе ПВП-ГА.

Для ГА-ос, ПВП и ПВП-ГА сигнал ЭПР не наблюдался из-за отсутствия парамагнитных центров в их структуре. ЭПР спектры стало возможно получить после рентгеновского и УФ облучения (рис. 10). поскольку известно, что воздействие видимого света не приводит к образованию стабильных радикалов в ГА [147], в отличие от ПВП.

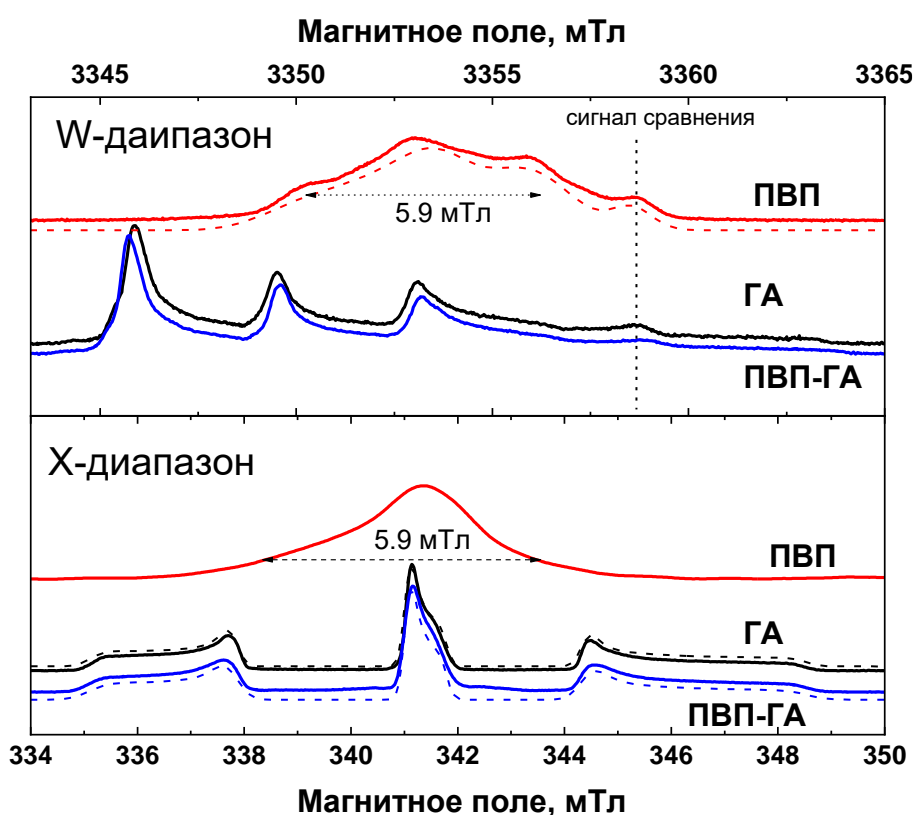


Рисунок 10. Спектры ЭПР, полученные с помощью детектирования образцов ГА ос, ПВП и ПВП-ГА, подвергнутых рентгеновскому облучению. Вверху - W-диапазон, внизу - X-диапазон. Красными линиями показаны спектры ПВП-Алг, черными – ГА, синими – ПВП-ГА. Пунктирной линией показан сигнал кварцевого держателя образца.

После рентгеновского облучения порошков ГА-ос в рентгеновском диапазоне был зарегистрирован спектр ЭПР, содержащий три линии (рис. 10, черная линия). Параметры спектра (табл. 8) позволили отнести обнаруженный сигнал к хорошо изученным стабильным азот-центрированным радикалам NO_3^{2-} в ГА [151, 152] (см. табл. 8) из-за сверхтонкого взаимодействия (А) с ядрами ^{14}N ($I = 1$): обнаружены следовые количества NO_3^- , оставшиеся после синтеза осаждением по реакции (1). NO_3^{2-} стабильные радикалы аксиальной симметрии имеют спектральные параметры, указанные в табл. 8, и, согласно [151], соответствуют положению NO_3^{2-} при замещении PO_4 -группы в структуре ГА.

Как видно из рис. 10 (синие линии), спектр ЭПР композита после рентгеновского облучения также отражает присутствие NO_3^{2-} радикалов в ГА, а компоненты полимера не наблюдались. Это означает, что радиационно-индуцированные центры в полимере (ПВП) также имеют конкурентный канал улавливания электронов, что возможно только при наличии химической связи между компонентами композита. Кроме того, смешивание ГА с ПВП несколько изменило константы сверхтонкого взаимодействия A_{\perp} и A_{\parallel} в сторону увеличения, а также увеличило распределение констант ΔA_{\perp} и ΔA_{\parallel} (табл. 8). Анализ изменений A_{\perp} и A_{\parallel} показал, что изотропная часть сверхтонкого взаимодействия увеличилась на 3,7 МГц, что соответствует увеличению электронной плотности на ядре азота радикала NO_3^{2-} на 2%. Можно предположить, что при добавлении ГА *ex situ* молекулы ПВП образуют положительно заряженный слой вокруг частиц ГА с образованием химической связи, которая увеличивает электронную плотность в его приповерхностном слое. Из-за электрической нейтральности заряд на внешней поверхности оболочки из ПВП будет отрицательным.

Таблица 8. Спектроскопические параметры ПВП-ГА.

Образец	g_{\perp}	g_{\parallel}	A_{\perp} МГц	A_{\parallel} МГц	ΔA_{\perp} МГц	ΔA_{\parallel} МГц
ПВП	2.0022 (2)	2.0026(2)	38 ± 8	106 ± 10	-	-
ГА	2.0011(1)	2.0052(1)	92.4 ± 0.5	186 ± 1	7 ± 1	12 ± 1
ПВП-ГА	2.0011(1)	2.0052(1)	93.6 ± 0.5	191 ± 1	13 ± 1	18 ± 1

Таким образом, вне зависимости от способа синтеза ГА имеет место химическая связь между частицами ГА и молекулами ПВП.

3.3. ^1H ЯМР-спектральные исследования композита ПВП-ГА

Спектры ЯМР ^1H ПВП и ПВП-ГА показаны на рис. 11. Спектр ПВП состоит из одного неразрешенного ЯМР-сигнала при 2,4 ppm, связанного с группами CH_2 пиридинового кольца и полимерной цепью. CH -группы полимерной цепи дают сигнал примерно на 5 ppm, в то время как концевые группы CH_3 дают небольшой сигнал в область 0,5–1,5 ppm. На спектре ЯМР ^1H на рис. 11 вклады этих химических групп видны в виде небольших плеч справа и слева от основного ЯМР-сигнала.



Рисунок 11. ^1H ЯМР-спектры образцов ПВП (синяя кривая) и ПВП-ГА (красная кривая).

Спектр ЯМР ^1H образца ПВП-ГА состоит из двух сигналов ЯМР ^1H при 4,7 ppm и -2,15 ppm [152]. Интегральная интенсивность ЯМР-сигнала при 4,7 ppm значительно выше по сравнению с интенсивностью ЯМР-сигнала при -2,15 ppm. Сигнал ЯМР ^1H при 4,7 ppm для ПВП-ГА связан со «свободной» водой, адсорбированной на поверхности ГА, в то время как сигнал ЯМР ^1H при -2,15 ppm связан с гидроксогруппами, присутствующими в структуре ГА. Форма ЯМР-сигнала при 4,7 ppm асимметрична из-за наложения протонных сигналов воды и полимера.

Данные, полученные для скоростей спин–решеточной релаксации протонов для двух образцов (ПВП и ПВП-ГА), приведены в табл. 9. В таблице перечислены химические сдвиги сигналов, для которых были измерены скорости спин–решеточной релаксации.

Таблица 9. Значения времени спин-решеточной релаксации для ПВП и ПВП-ГА.

Образец	Хим. сдвиг		
	2.4 ppm	4.7 ppm	-2.15 ppm
ПВП	0.67±0.02 с ⁻¹	-	-
ПВП-ГА	-	0.49±0.02 с ⁻¹	0,55±0.02 с ⁻¹

3.4. Реологические свойства композиционных суспензий

Вязкость суспензий является ключевым параметром для процесса получения объемных пористых композиционных материалов на основе растворов полимеров. Для качественной оценки влияния дисперсной фазы ФК на примере КГА на вязкость были проведены исследования кинематической вязкости растворов ПВП, Алг, ПА и суспензий ПАК-10, ПАК-20 ПАК-30, ПАК-40 и ПАК-50.

Гели Алг и ПВП демонстрируют различное поведение вследствие разной природы. Кинематическая вязкость геля Алг экспоненциально возрастает при изменении концентраций от 1 до 2,5 мас.% (рис. 12а, синяя кривая); при концентрации раствора Алг выше 2,5 мас.% измерение кинематической вязкости невозможно из-за возрастающего электростатического набухания: кинематическая вязкость растворов Алг резко возрастает в малом интервале концентраций, причем вязкость 5 мас.% геля измерить с помощью ВПЖ невозможно из-за вязкости более 1000 м²/с [153]. Зависимость вязкости геля ПВП от концентрации носит линейный характер [154] и меняется незначительно от 3 до 50 м²/с с ростом концентрации ПВП от 1 до 8 мас.% (рис. 6а, фиолетовая кривая). Кривая вязкости смесового геля ПА 1:1 при разных концентрациях имеет промежуточные значения (1390 м²/с при концентрации 2.5 мас.%), что указывает на вклад обоих полимеров в зависимость вязкости от концентрации (рис. 12а, голубая кривая): электростатическим отталкиванием молекул альгината, а с другой – образованием комплексов между

молекулами альгината и ПВП с большим трением [155]. Для дальнейших исследований кажущейся вязкости был выбран гель ПА с общей концентрацией 2,5 мас.%, имеющий оптимальную вязкость, позволяющую проводить измерения вязкости, но не такую низкую, как у чистого ПВП.

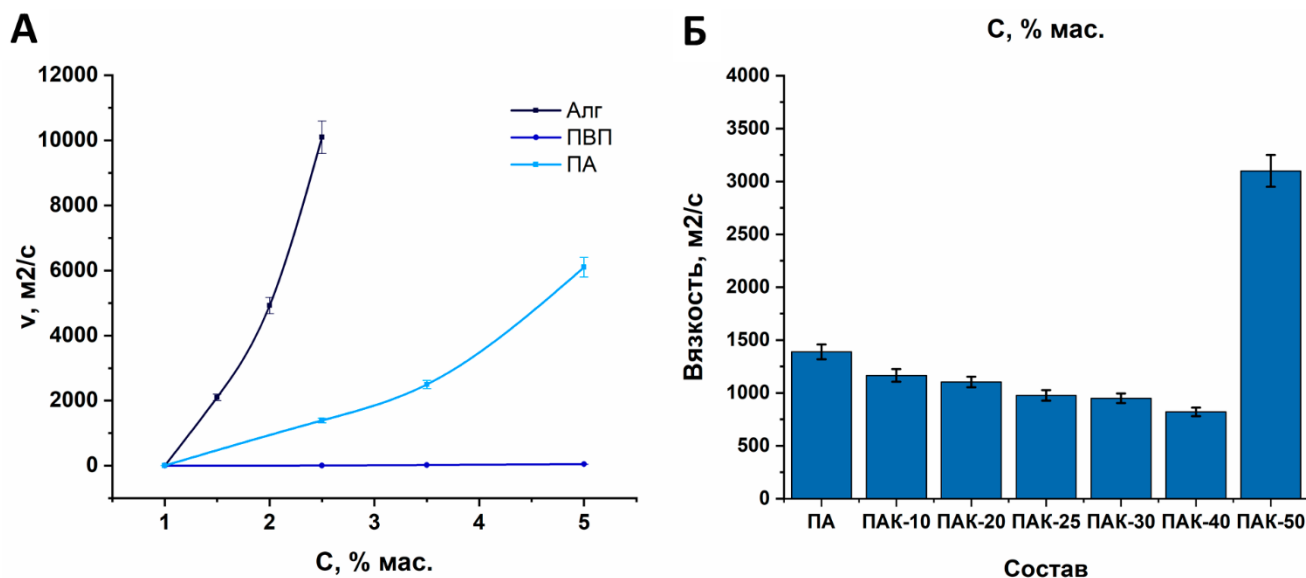


Рисунок 12. (А) кривые кинематической вязкости растворов альгината и ПВП; (Б) данные кинематической вязкости композиционных суспензий

Измерения кажущейся вязкости гелей полимеров (2,5 мас.%) (рис. 13а) показало, что кривые течения и вязкости соответствуют кривым течения псевдопластической жидкости (рис. 13). Вязкость геля альгината приводит к значительным напряжениям сдвига и не позволяет развить большую скорость сдвига (рис. 13 а), в отличие от ПВП (рис. 13 а, б), для которого меняются линейно и незначительно. Зависимости напряжений сдвига от скорости сдвига для геля ПА (рис. 13 а, б) также носят тот же характер, как и для геля альгината, но значения напряжений в 2 раза меньше, что позволяет развивать скорость сдвига такую же, как для геля ПВП (рис. 13 а, б). Кажущаяся вязкость геля ПА при малых скоростях почти в 4 раза меньше таковой для геля альгината (рис. 13 в) и с увеличением скорости сдвига приближается к значениям вязкости геля ПВП (рис. 13 в).

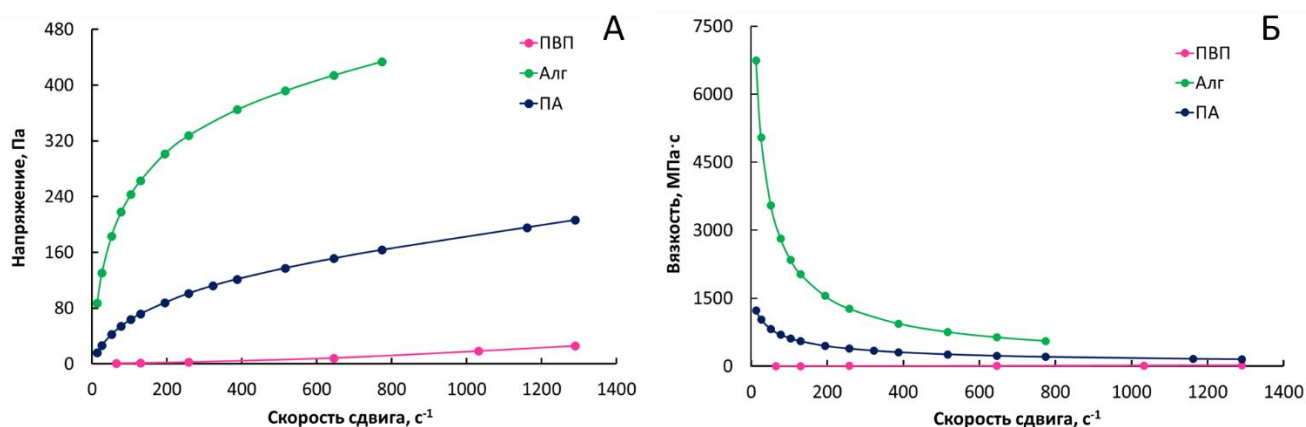


Рисунок 13. Реологические характеристики растворов полимеров: зависимость напряжений сдвига от скорости сдвига (а), зависимость вязкости от скорости сдвига (б).

Введение в раствор порошка КГА приводит к снижению кинематической вязкости раствора (рис. 12 б). Снижение вязкости по мере увеличения содержания КГА объясняется электростатическим взаимодействием частиц КГА с альгинатом, который является полиэлектролитом [156, 157]. Высокая вязкость альгинатного раствора, как указано выше, обусловлена электролитным набуханием за счет электростатического взаимодействия между заряженными группами молекул альгината [157]. Введение КГА, предположительно, приводит к агрегации молекул альгината вокруг частиц КГА, устранению отталкивания равнозаряженных групп и, как следствие, снижению вязкости раствора [158, 159]. Другое предположение заключается в том, что часть альгината агрегирует вокруг частиц КГА и эти частицы в оболочке из молекул альгината легче движутся в менее вязкой среде окружающего геля, в котором концентрация альгината уменьшилась. Однако данный механизм работает в пределах определенных содержаний КГА менее 50 мас.%. При достижении содержания КГА на уровне 50 мас.% вязкость суспензии резко возрастает до уровня вязкости 5 мас.% раствора альгината (более 1000 м²/с): по-видимому, силы трения начинают преобладать над механизмами электростатического взаимодействия. В работе [160] показано, что в случае присутствия в растворе альгината дисперсной фазы, вязкость такого раствора пропорциональна концентрации полимера в дисперсионной среде.

Зависимость кажущейся вязкости от скорости сдвига композиционных суспензий показана на рис. 14. Значения напряжений практически совпадают при малых скоростях сдвига, а при больших скоростях сдвига разница между ПАК-50 и ПАК-30 составляет 24 МПа (рис. 14А). Кривые ПА и ПАК-10 полностью совпадают во всем измеренном диапазоне скоростей сдвига (рис. 14А). При малых скоростях сдвига (13 с^{-1}) значения кажущейся вязкости раствора ПА составляет $1275 \text{ МПа}\cdot\text{с}$, а вязкость суспензий ПАК-10 и ПАК-50 имеет близкие значения 1271 и $1267 \text{ МПа}\cdot\text{с}$, соответственно (рис. 14Б). Однако кажущаяся вязкость суспензии ПАК-30 при той же скорости сдвига 13 с^{-1} ниже и составляет $756 \text{ МПа}\cdot\text{с}$, что согласуется с данными измерения кинематической вязкости. С увеличением скорости сдвига до 200 с^{-1} происходит резкое снижение вязкости. Что характерно для псевдопластических жидкостей. При высоких скоростях сдвига (более 100 с^{-1}) вязкости раствора и суспензий становятся практически одинаковы: ПА – $231 \text{ МПа}\cdot\text{с}$, ПАК-10 – $225 \text{ МПа}\cdot\text{с}$, ПАК-30 – $218 \text{ МПа}\cdot\text{с}$ и ПАК-50 – $231 \text{ МПа}\cdot\text{с}$ (рис. 14 Б).

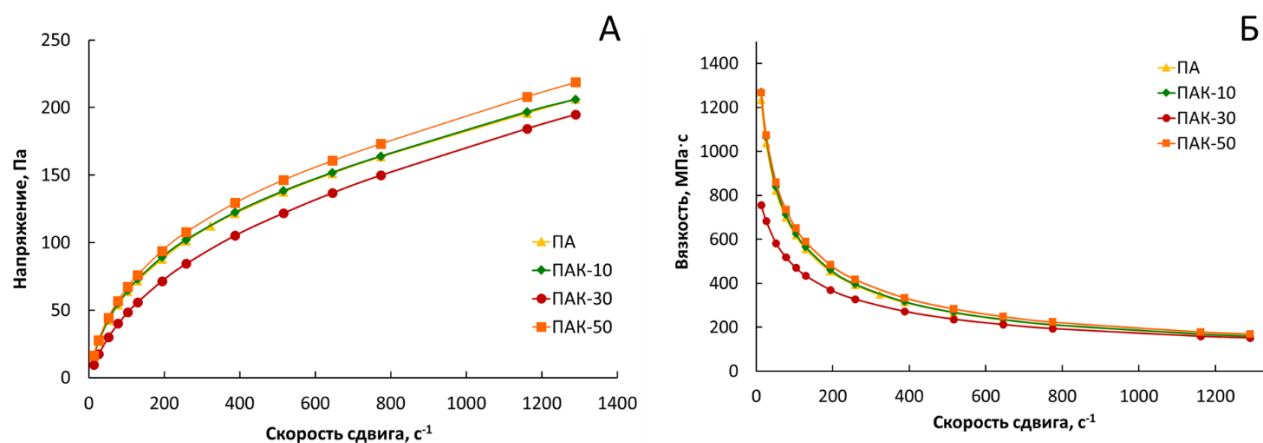


Рисунок 14. Кривые течения (а) и кривые вязкости (б) гелей ПА, ПАК-30, ПАК-50.

Полученные результаты согласуются с данными измерений кажущейся вязкости суспензий карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) с кальцитом: при добавлении 5 и 15 мас.% кальцита к 0,5 мас.% раствору КМЦ наблюдалось снижение кажущейся вязкости при малых скоростях сдвига по сравнению с чистым раствором КМЦ, а при введении 25, 40 и 60 мас.% кальцита вязкость суспензии при

малых скоростях сдвига возрастала. Однако при скоростях сдвига более 500 c^{-1} кривые вязкости КМЦ суспензий, содержащих 5, 15, 25, 40 и 60 мас.% кальцита, практически совпадают [161]. Таким образом, для дисперсных систем, содержащих полиэлектролит и твердые частицы, существует некоторое оптимальное количество твердых частиц, приводящее к снижению вязкости такой системы по сравнению с раствором полиэлектролита без частиц.

3.5. ЯМР- и ЭПР- спектральные исследования сшивания альгината

Альгинаты при растворении в воде образуют растворы с высокой вязкостью, вязкость которых растет с увеличением количества сшивающих ионов, что снижает разрешающую способность спектра ЯМР ^1H . Учитывая этот факт, а также данные о прочности связей альгината с поливалентными ионами [53], для исследования были выбраны ионы Ca^{2+} и Sr^{2+} и подобраны достаточно низкие концентрации исходного альгината натрия и сшивающих ионов, что позволило получить разрешенные сигналы, в соответствии с результатами, опубликованными в работе [134]. Из-за этого количество вещества в тестируемом растворе довольно мало, а присутствие H_2O в альгинате привело к появлению в спектре сигнала протонов воды высокой интенсивности. В результате несколько сигналов протонов до 4,3 ppm были подавлены сигналом воды высокой интенсивности. Полученные спектры Алг-Са и Алг-Sr, включающие сигналы от протонов G2, G3, G4, т.е. протонов, наиболее близких к карбоксильной группе гулурановой кислоты, а также протонов M2, M3, M4 [162, 163], показаны на рис. 15.

На рис. 15 показаны спектры альгината, сшитого с одинаковыми количествами Са и Sr (рисунки 15а и б соответственно). Спектры нормализованы к сигналу M4 (протоны H4 M-блока) [163], который одинаков для обоих спектров по своему положению и интенсивности. Сигналы протонов G- и M-блоков различаются. Спектр Алг-Sr (рис. 15а) демонстрирует разрешающую способность сигналов G2 и G3, но с меньшей относительной интенсивностью по сравнению со спектром Алг-Са (рис. 15б), в то время как сигналы M2, M3, G4, G5 имеют низкую интенсивность. Полученные спектры могут указывать на преобладание связи Sr с

блоками GG и GM. Хотя была предложена схема, в которой Sr связывается исключительно с блоками GG [164], образуя структуру «коробка для яиц», согласно нашим данным, вероятно, что координация иона Sr с сайтами GM также имеет место с образованием «карманоподобной» структуры. структура, показанная для Mn в ссылке [165]. Было отмечено, что такая конфигурация характерна для двухвалентных катионов [166]. Таким образом, при сшивании с ионами Sr они координируются с большим числом кислородных центров, чем ионы Ca.

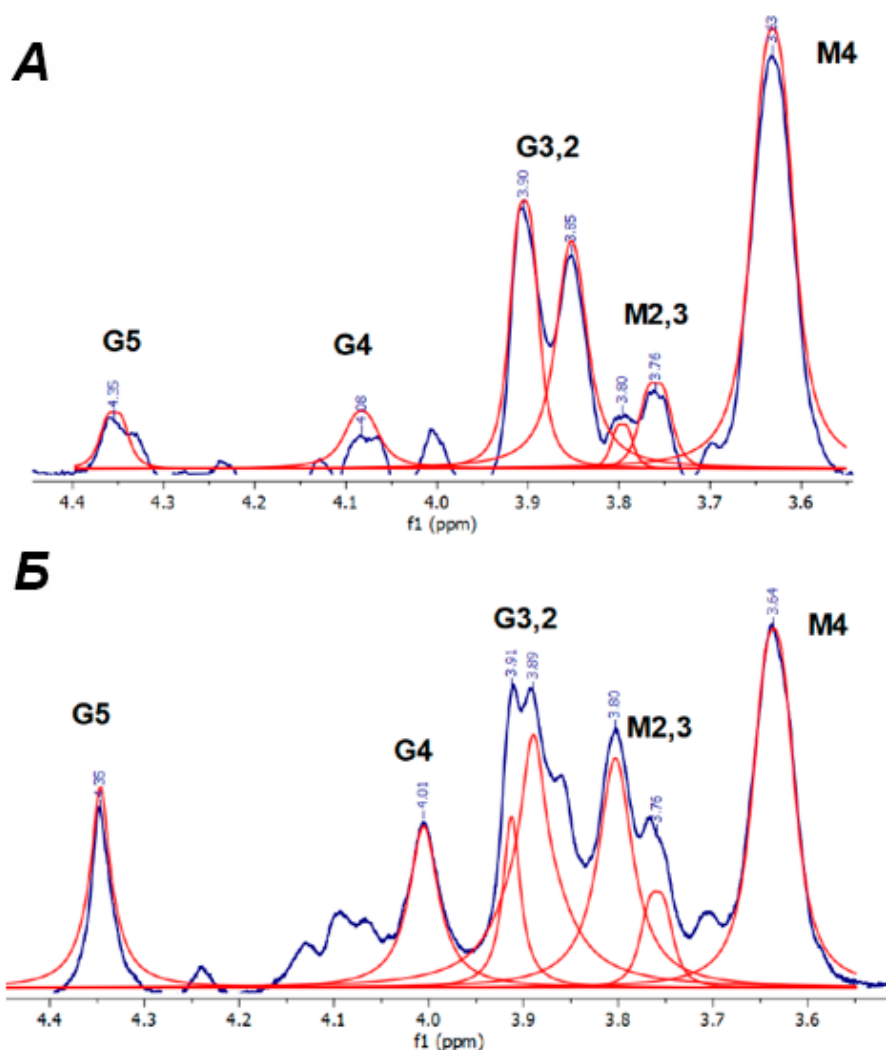


Рисунок 15. Спектры ЯМР ^1H (А) Алг–Sr и (В) Алг–Ca, сшитые равными количествами (0,3 ммоль/г) ионов Ca^{2+} и Sr^{2+} соответственно. Фиттинг показан красными линиями, базовая линия фиттинга показана внизу.

В спектре Алг-Са (рис. 15б) интенсивность сигналов G и M2,3 сравнима с интенсивностью сигнала нормализации M4. Это может указывать на то, что при

заданном количестве ионов блоки G и M в равной степени участвуют в связывании Са. В этом случае образуются слабые ионные связи [131].

По мере увеличения количества Sr^{2+} спектр Алг-Sr изменяется (рис. 16).

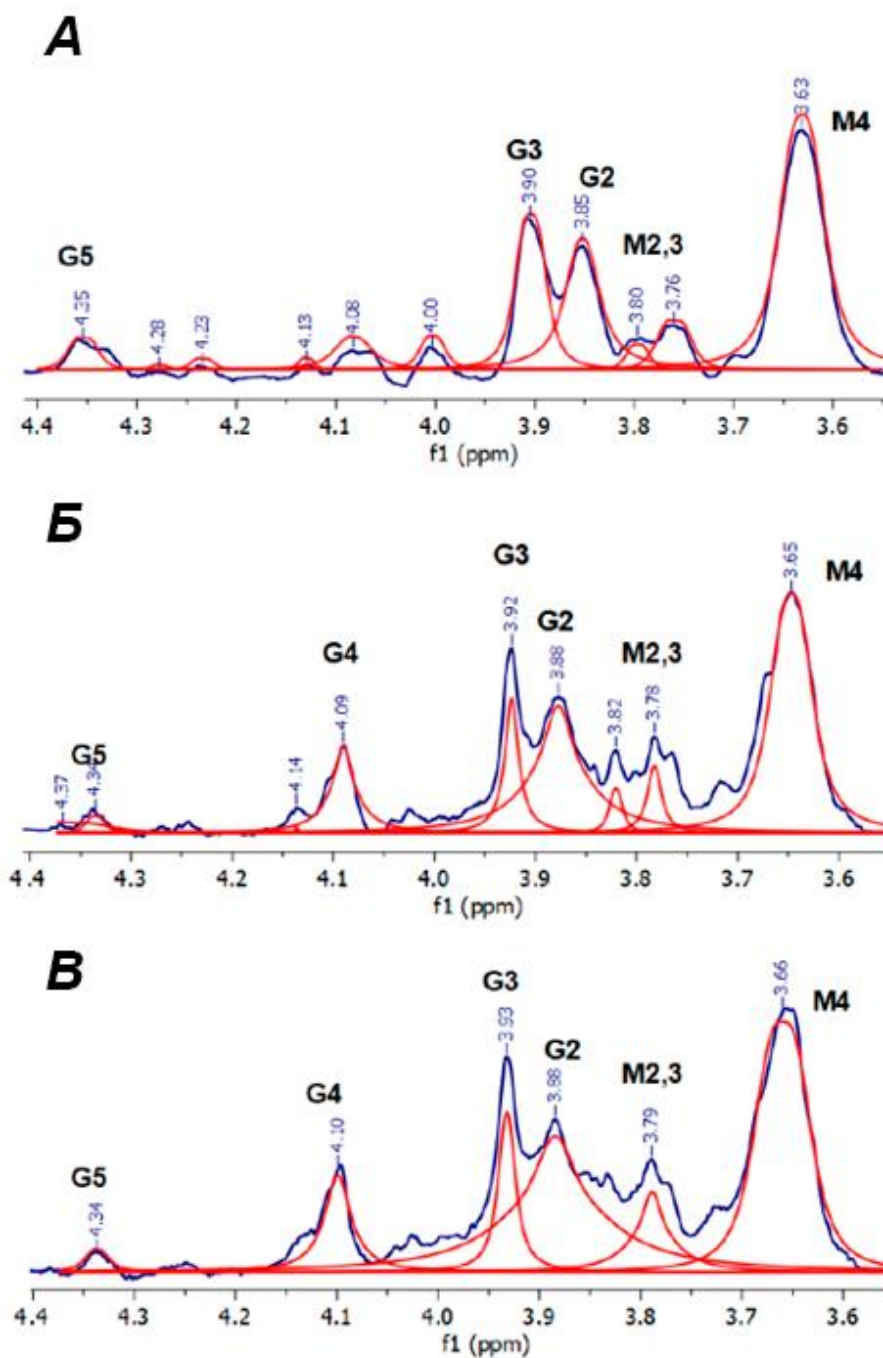


Рисунок 16. Спектры ЯМР ^1H Алг-Sr, сшитые различными количествами (мкмоль) Sr^{2+} : (А) 0,3 мкмоль, (Б) 1 мкмоль; (В) 2,5 мкмоль. Фиттинг представлен красными линиями, базовая линия фиттинга показана внизу.

При 1 ммоль/г Sr сигнал протона G4 становится более интенсивным. Это может быть связано с перераспределением ионов Sr^{2+} в структуре альгината с увеличением их количества. При низком количестве Sr^{2+} он образует структуры типа «коробки для яиц» с преимущественным участием COO-групп G-блоков. С увеличением количества ионов M-блоки с участием OH-групп задействуются гораздо активнее. Возможно, в данном исследовании не было достигнуто количество ионов Sr, когда заняты все возможные участки. Большое число сайтов связывания Sr^{2+} с молекулой альгината, по сравнению с Ca^{2+} , было подтверждено авторами [167]. Более высокая механическая прочность Sr-альгинатных волокон, а также данные ИК-спектроскопии и результаты спектроскопии кругового дихроизма способствовали предположению об образовании более прочных связей Sr–O [167]. В нашей работе сильная связь Sr–O подтверждается снижением разрешающей способности спектра и меньшей интенсивностью сигналов (рис. 16 б, в).

В спектрах ALG-Ca с увеличением концентрации ионов до 2,5 ммоль/г интенсивность сигналов G4 и G5 уменьшалась (рис. 17). Эти экспериментальные данные объясняют предпочтительное формирование структуры «Коробка для яиц». При дальнейшем увеличении количества Ca до 25 ммоль/г интенсивность этих сигналов не меняется. Исходя из этого, можно предположить, что все доступные COO-сайты были заняты. При дальнейшем добавлении Ca наблюдается уменьшение интенсивности и разрешающей способности сигналов G2 M2,3, которые соответствуют протонам, соседним с OH-группой [168]. Наиболее энергетически предпочтительными для Ca являются COO-участки, но, когда они полностью заняты и количество ионов увеличивается, ионы Ca начинают координироваться с OH-группами. Хотя это положение энергетически не является предпочтительным для Ca.

Можно сделать вывод, что, несмотря на близкие энергии ионных связей Ca–O и Sr–O в альгинате, координация этих ионов происходит по-разному. Наиболее энергетически благоприятными участками для Ca являются блоки GG с образованием структуры «коробки для яиц», в то время как в связывании Ca участвуют только COO-группы. С другой стороны, Sr координируется как с COO-

группами, так и с ОН-группами, и задействованы как G, так и M блоки. В этом случае поперечное связывание с Sr имеет более плотное пространственное расположение из-за присутствия большего числа сайтов связывания.

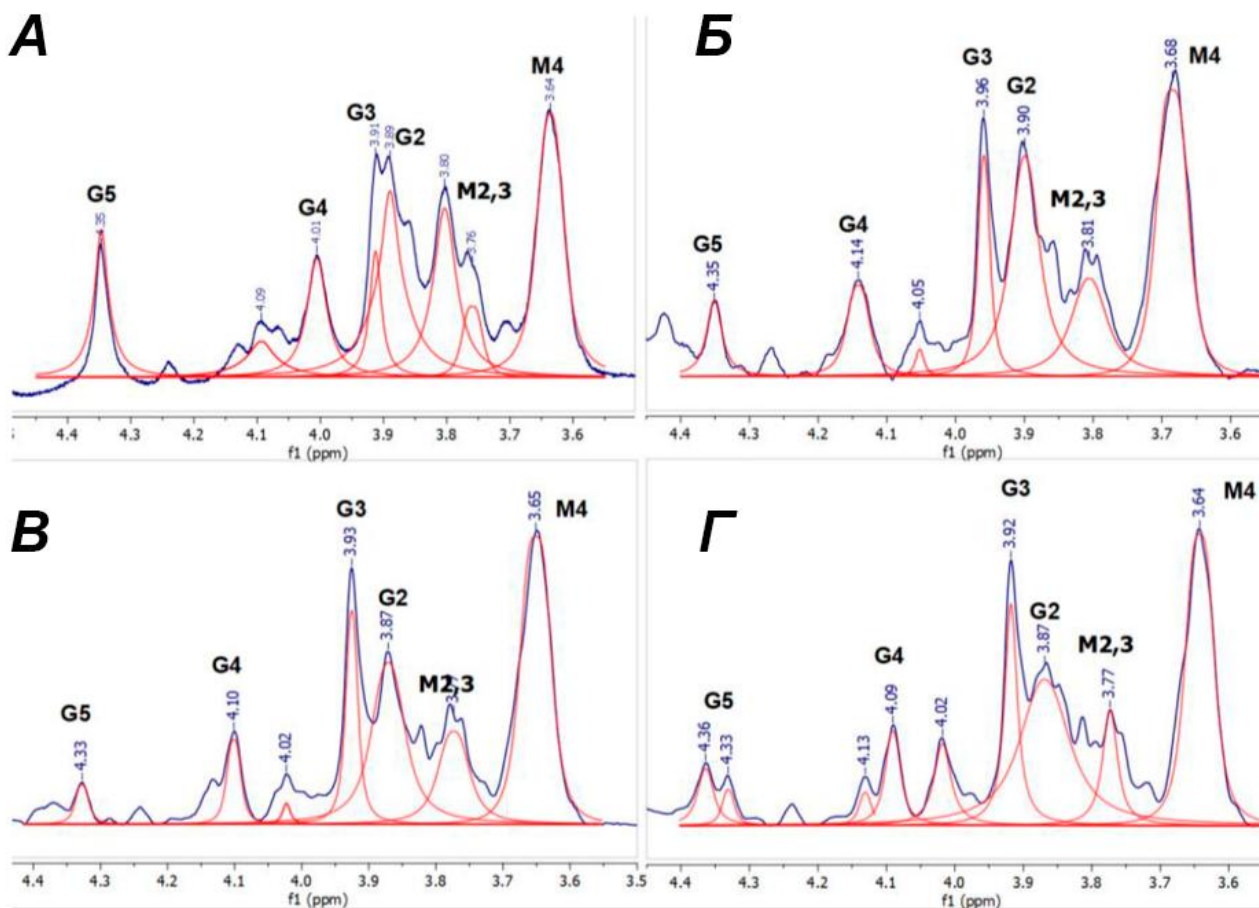


Рисунок 17. ¹H ЯМР-спектры Алг-Са, сшитого различными количествами (ммоль/г) Ca²⁺: (а) 0,3 ммоль/г, (б) 2,5 ммоль/г; (в) 5,5 ммоль/г; (г) 25 ммоль/г. Фиттинг показан красными линиями, базовая линия фиттинга показана внизу.

Были проведены ЭПР-спектроскопические исследования твердого альгината, содержащего парамагнитные ионы меди (Cu) и марганца (Mn). Связи Cu–O и Mn–O имеют координационный характер и имеют близкие энергии [169].

В спектре ЭПР растворов Cu(NO₃)₂ или Mn(CH₃COO)₂ наблюдались линии, суженные движением парамагнитного комплекса (рис. 18, спектры 1). Важным параметром является отношение количества катионов в растворе к массе Алг, помещенного в раствор, он обозначен как n_1 (см. рис. 18). После проведения реакции сшивания в высушенных образцах наблюдались более широкие

анизотропные спектры ЭПР (рис. 18, спектры 2,3). Измеренные спектры дважды объединяли и определяли массовую концентрацию парамагнитных ионов для всех измеренных образцов, которые обозначены n_2 (рис. 18). Зависимость обнаружения парамагнитных ионов n_2 от массы образца Алг в растворе показана на рис. 19. Как видно из рис. 19, выбранный диапазон n_1 составляет от 18 (левая ось рис. 19) до 0,5 (правая ось) ммоль/г. Часть непрореагировавших ионов Cu^{2+} или Mn^{2+} сохраняется в растворе, поэтому на рис. 19 можно наблюдать несоответствие между количеством катионов в растворе (n_1) и количеством катионов в образце (n_2).

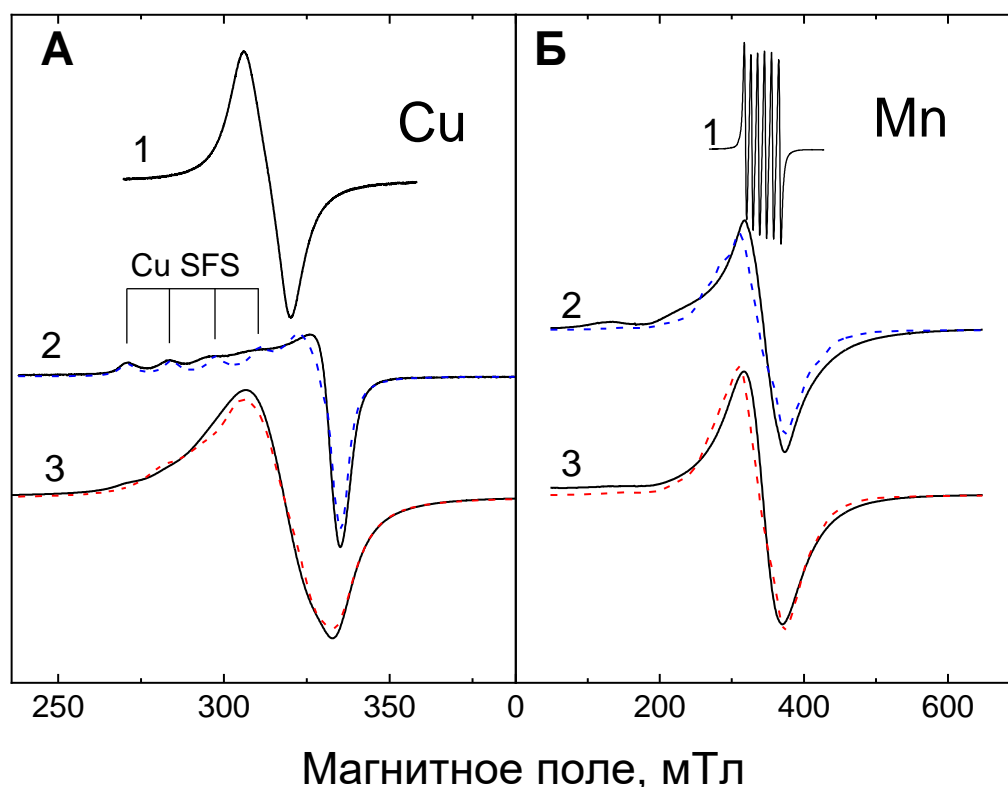


Рисунок 18. ЭПР-спектры меди (А) и марганца (Б) в исходной соли (1), в сшитых образцах альгината при недостаточной (2) и избыточной концентрации (3) иона в растворе.

При большом избытке ионов Mn^{2+} в растворе концентрация n_2 достигает 0,8 ммоль/г. С уменьшением количества ионов Mn в растворе концентрация ионов в Алг-Mn также уменьшается (рис. 19, красная пунктирная линия), однако даже при самых малых концентрациях часть ионов Mn остается в растворе. Как видно из рис. 18б, спектры ЭПР Mn^{2+} практически не изменяются, изменяется только равномерная ширина линии ЭПР в соответствии с изменением концентрации n_2 .

Форма спектра характерна для спектра ЭПР присутствия Mn в твердом теле [170]. Отсутствие влияния высокой концентрации парамагнитной примеси на спектр ЭПР указывает на слабое взаимодействие между ионами Mn^{2+} ; ионы изолированы друг от друга и не образуют пар. Можно предположить, что ионы Mn^{2+} занимают положения с наибольшим расстоянием между соседними ионами, согласно схеме, описанной для бария в исследовании [164], или согласно «карманной» схеме, предложенной в работе [165].

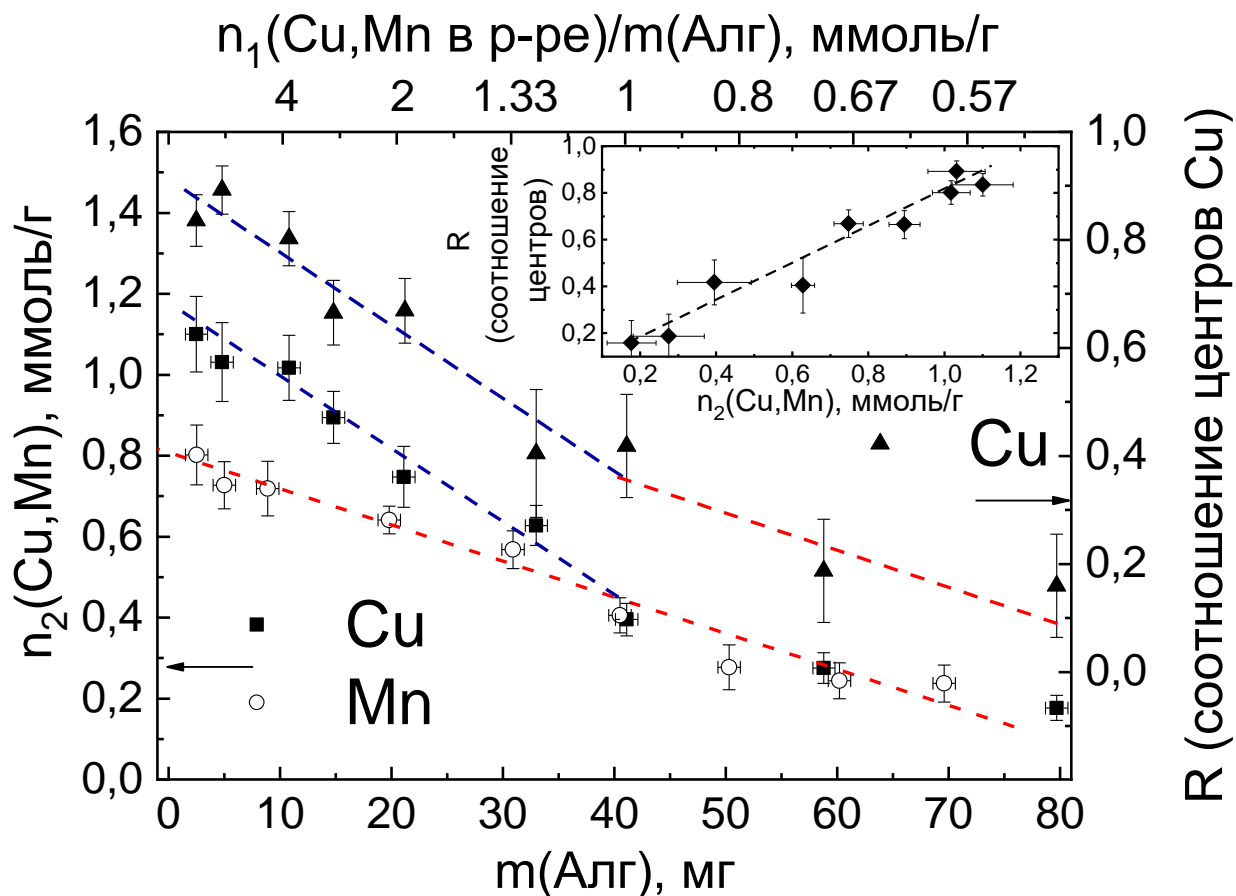


Рисунок 19. Зависимости концентраций ионов меди и марганца от массы образца Алг после погружения в 400 мкл раствора с концентрацией сшивающего иона 102,5 ммоль/л. Соотношение между количеством ионов в растворе и массой Алг образца (n_1) показано на графиках по верхней оси в виде пересчитанных нижних осей. Соотношение R между количеством парных центров Cu и количеством изолированных центров Cu (правые оси) показано в виде оранжевых треугольников.

Несмотря на сходные энергии связей Mn–O и Cu–O [169], при высоком n_1 катионы образуют в альгинате различные структуры.

В отличие от ионов Mn, форма спектров ЭПР ионов Cu в Алг-Cu зависит от количества катионов Cu в растворе на 1 грамм Алг, n_1 . При $n_1 = 0,5$ ммоль/г наблюдается порошкообразный спектр ЭПР с четкой сверхтонкой структурой, обусловленной ядерным магнитным моментом Cu. Моделирование спектра с параметрами $g_{xx}=2,067$, $g_{yy}=2,092$, $g_{zz}=2,387$, $A_{xx}/A_{yy}<80$ МГц, $A_{zz}=368$ МГц, $g_{zz}/A_{zz}=194$ показано на рис. 18а синей пунктирной линией. Такие параметры соответствуют одиночным ионам Cu с октаэдрической координацией в плоскости ионов кислорода [171]. По мере увеличения относительного количества катионов Cu n_1 до 16 ммоль/г спектр ЭПР становится более симметричным без выраженной сверхтонкой структуры. Авторы [132, 169] показали, что такой вид спектра ЭПР обусловлен появлением пар Cu, связанных диполь–дипольным взаимодействием с усреднением сверхтонкого взаимодействия. Основываясь на этом предположении, был смоделирован спектр ЭПР спектра пары Cu, показанный красной пунктирной линией на рисунке 18а. Энергия диполь-дипольного взаимодействия составляет 150 ± 50 МГц и, в пересчете на расстояние между ионами Cu в паре, составляет около 7 \AA . В случае промежуточного n_1 спектр ЭПР содержал как линии парных, так и одиночных центров Cu. Определяя интегральные интенсивности каждого из компонентов, было получено относительное количество парных центров в зависимости от n_1 , которое обозначено как R и показано на рис. 19 черными треугольниками. Зависимость R от n_1 повторяет зависимость от n_2 . В случае высокой концентрации ионов Cu, связанных с альгинатом, также могут образовываться парные центры, однако из-за случайности процесса их относительное количество будет пропорционально квадрату концентрации иона. В данном случае (вставка на рис. 19) наблюдается линейная зависимость, которая указывает на то, что образование парных центров Cu энергетически более предпочтительно, чем образование одиночных центров, и при достаточном количестве катионов Cu этот процесс является преобладающим.

Октаэдрическая координация возможна при участии не только карбоксильных групп, но и ОН- и О-групп альгината [132]. При октаэдрической координации Си с кислородами альгината, с учетом образования парных центров, образуются мостиковые атомы кислорода [171]. Более плотное пространственное расположение при сшивании при более высоких концентрациях обеспечивает более высокую вязкость и большую механическую прочность [172].

Выводы по главе 3

1. Присутствует электростатическое взаимодействие между частицами ГА и полимером, что доказывает характер ЯМР- и ЭПР-спектров композитов ПВП-ГА.
2. ЯМР- и ЭПР-исследования сшивания альгината в растворе и твердом теле показали, что пары таких ионов, как Ca^{2+} и Mn^{2+} , Sr^{2+} и Cu^{2+} имеют похожие механизмы связывания с G и M блоками альгината: Ионы Ca^{2+} и Mn^{2+} занимают наиболее удаленные друг от друга позиции, образуя разреженную сетку, при этом ионы кальция координируются преимущественно к COO-группам G-блоков; ионы Sr^{2+} и Cu^{2+} образуют плотную сетку с наименьшим расстоянием между соседними ионами, при этом ионы Sr^{2+} координируются к COO- и ОН-группам как G-, так и M-блоков.
3. Композиционные суспензии демонстрируют псевдопластический характер зависимости кажущейся вязкости от скорости сдвига. Введение КГА в количестве 30 мас. % снижает кажущуюся вязкость композиционных суспензий при малых скоростях сдвига (13 c^{-1}). При увеличении содержания КГА до 50 мас.% кажущаяся вязкость резко возрастает. При больших скоростях сдвига вязкости всех гелей вне зависимости от состава практически одинаковы и близки к вязкости ньютоновской жидкости.

ГЛАВА 4. ПЛЕНОЧНЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ

4.1. Характеристики структуры композиционных пленок поливинилпирролидон–альгинат–карбонатгидроксиапатит

Фотографии и микрофотографии пленок ПВП-Алг приведены на рис. 20. Состав пленок напрямую влияет на их внешний вид и микроструктуру.

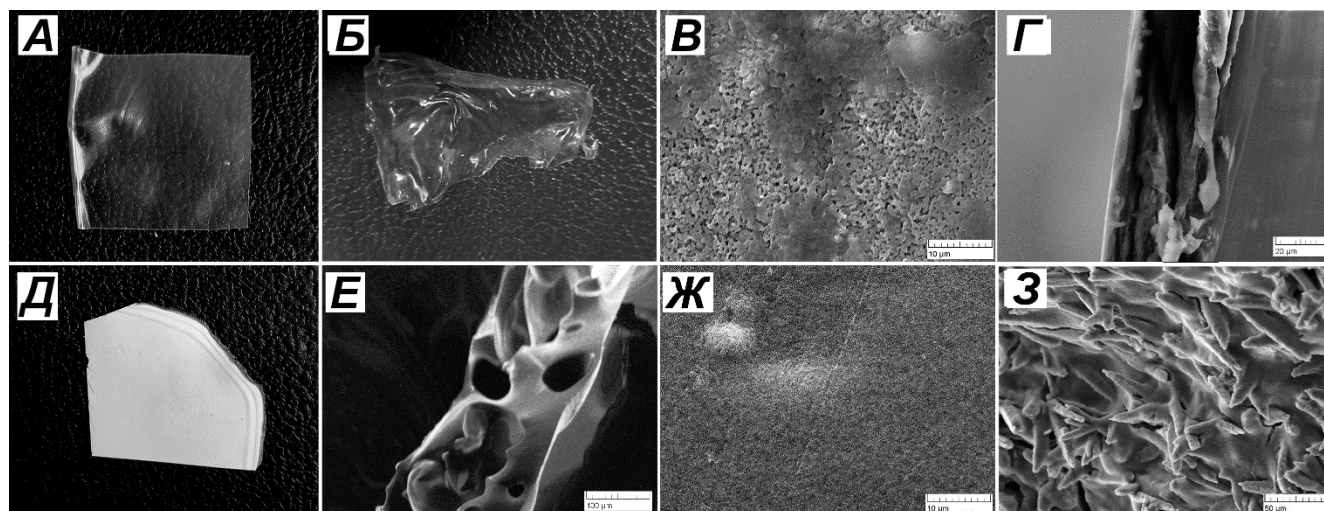


Рисунок 20. Морфология пленок: (А) внешний вид пленки ПА; (Б) внешний вид сшитой альгинатной пленки ПА-Са; (В) СЭМ поверхности сшитой пленки ПА-Са; (Г) СЭМ разреза пленки ПАК-5; (Д) внешний вид сшитой пленки ПА-Са; (Е) СЭМ разреза пленки ПА; (Ж) СЭМ нижней поверхности пленки ПА-Са; (З) СЭМ поверхности пленки ПАК-5.

Высушенные несшитые пленки ПВП-Алг – прозрачные, бесцветные, с большими порами и тонкими стенками (рис. 20 А, Е). Образование пор при высыхании пленок, по-видимому, связано с эффектом полиэлектролитного набухания альгината, которое обсуждалось в разделе 3.4. По мере высыхания и удаления воды концентрация альгината растет, при этом увеличивается взаимное отталкивание одноименно заряженных молекул, что приводит к формированию пор [173]. В целом, формирование пор в пленках при высыхании характерно для полиэлектролитов [174].

После сшивания пленки из альгината и смесевые пленки выглядят по-разному. Пленка из альгината (рис. 20 Б) – прозрачная, с искривленной формой. Это связано с тем, что при сшивании в растворе фиксируется определенное положение

сшивающихся полимерных цепочек и при высыхании оно сохраняется, из-за чего происходит усадка и искажение формы пленки [175]. Сшитые пленки ПВП-Алг-Са белые, непрозрачные, ровные и плоские (рис.20 Д). По-видимому, присутствие ПВП, изолирующего молекулы альгината друг от друга, затрудняет сшивание, поэтому усадки и искажения формы пленки не происходит. Белый непрозрачный цвет говорит о включении ПВП в частично сшитую структуру альгината с формированием взаимопроникающих сеток [176]. Микроструктура поверхности такой пленки (рис. 20 В) – неоднородная, с матовыми пористыми и гладкими областями. Матовая пористая поверхность соответствует образованной из раствора полиэлектролита – сшитому альгинату [177], глянцевая гладкая соответствует ПВП [178].

Поверхность композиционных пленок с ГА шероховатая, наблюдаются частицы ГА иглообразной формы (рис. 20 З). Введение ГА в состав пленок ПА приводит к устранению пор (рис. 20 Г). Это связано с устранением отталкивания заряженных цепочек альгината: описана возможность контроля размера пор полиэлектролитных мембран за счет добавления соли, которая снимает взаимное отталкивание заряженных полимерных молекул [179].

Взаимодействия ПВП, альгината и КГА в составе пленки также влияют на другие физико-химические свойства пленок.

Было исследовано водопоглощение (набухание) пленок в дистиллированной воде (рис. 21). Способность гидрогелей удерживать воду является одной из основных их характеристик и дает информацию об их структуре. Набухание исследовали на образцах пленок ПА 1:1, ПА 1:2, ПА 2:1, ПАК-5 и ПА-Са. Все образцы демонстрируют быстрое начальное набухание в первые 5 мин, после чего процесс стабилизируется, достигая на плато через 1 ч. Однако пленка с соотношением ПВП:альгинат 1:2 (ПА1) дольше достигает равновесного набухания, в отличие от пленки ПВП:альгинат 1:1 (ПА). При этом равновесное набухание пленки ПА1 больше на 25 мас.% это связано с полиэлектролитным набуханием альгината, которое обсуждалось ранее в разделе 3.4.

Наибольшую степень набухания достигают пленки составов ПА 1:1 и ПА 1:2 – 350 и 375 %, соответственно. Сеть цепочек полиэлектролита, содержащая ионизируемые группы, создают большое давление разбухания из-за некоторых межмолекулярных нековалентных взаимодействий, таких как кулоновское отталкивание [180]. Данный эффект наблюдался при исследовании набухания blends ПВП-МЦ [178]: смешивание ПВП с заряженными полимерами МЦ приводило к увеличению степени набухания.

Степень набухания пленки ПАК-5 с 5 мас.% КГА составляет 325 %. Сшитые пленки достигают наименьшей степени набухания – 150 % для пленок ПА-Са. Результаты согласуются с данными СЭМ (рис. 22): устранение пор в пленках ПАК-5 и ПА-Са приводит к снижению степени набухания. Введение ГА снижает набухание, снимая электростатическое отталкивание альгината, тем самым уменьшая разницу между осмотическим давлением в пленке и окружающем растворе [181]. Это также приводит и к устранению пор в пленке (рис. 23г) – уменьшению свободного объема для сорбции воды.

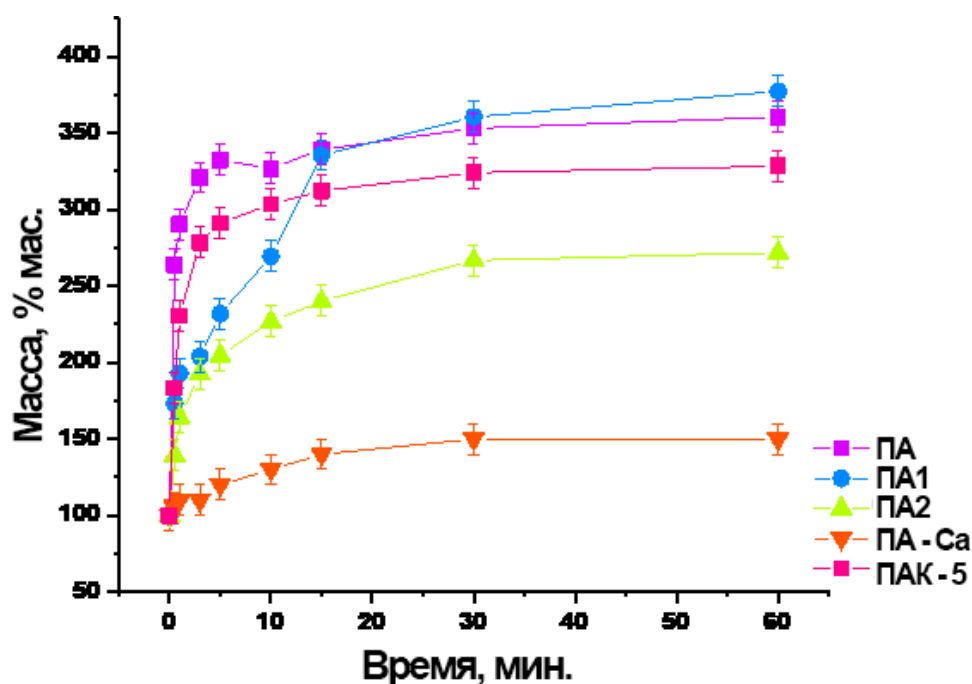


Рисунок 21. Кривые набухания пленок.

Степень набухания также связана с подвижностью полимерных цепей [180]. В то время как несшитые полимерные цепочки свободно двигаются относительно друг друга, сшивание приводит к ограничению их подвижности [180] и

уменьшению свободного объема. Как следствие, степень набухания падает, что наблюдается для пленки из сшитого альгината (рис. 21, А-Са).

Эксперимент по растворимости пленок ПА-Са иллюстрирует вывод о влиянии подвижности полимерных цепей на поведение геля в водной среде (рис. 22). Как видно из рис. 22, образцы быстро теряют вес до $\approx 50\%$ в течение первых 24 ч, а затем достигают плато в течение следующих 42 дней (рис. 22 а). При этом несвязанный ПВП высвобождается из сшитой нерастворимой альгинатной «сетки» в течение первых часов, как это было показано в работе [177, 181]. Через 24 ч образец становится более пористым, а полимер приобретает дендритную структуру [177] (рис. 22 б). Микрофотографии после 10 дней растворения показывают, что пленка ПА-Са все еще остается нерастворенной (рис. 22 в), но с более пористой структурой.

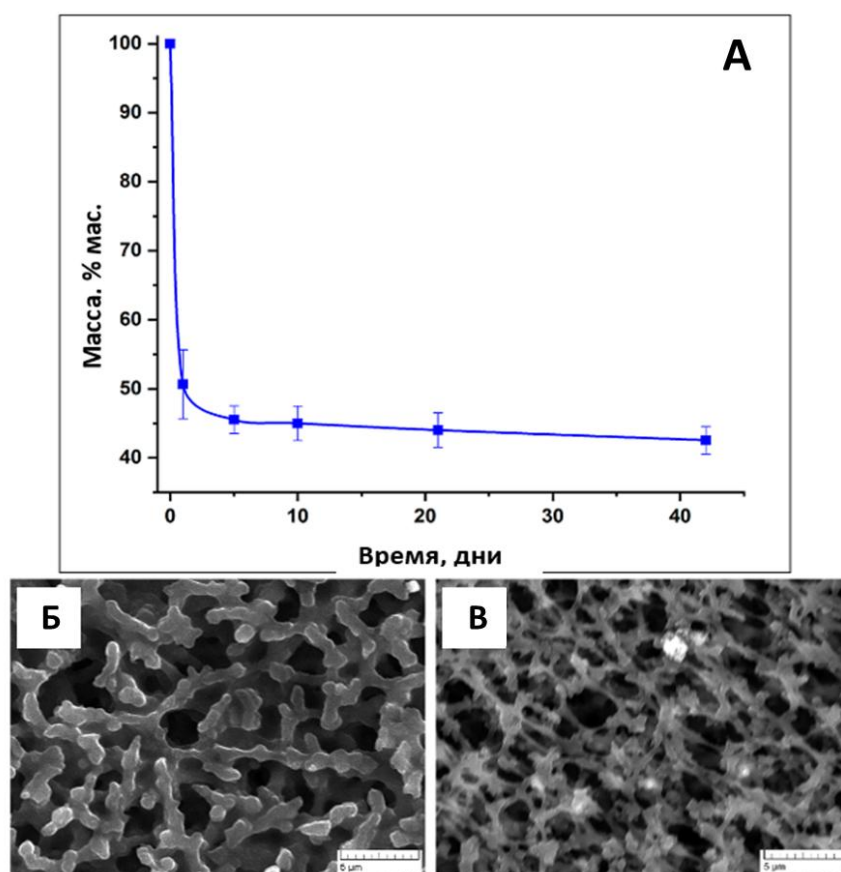


Рисунок 22. Данные растворимости пленки ПА: (А) кривая растворения; (Б) микроструктура пленки спустя 1 сутки растворения; (В) микроструктура пленки спустя 10 дней растворения.

4.2. Механическая прочность композиционных пленок поливинилпирролидон-альгинат-карбонатгидроксиапатит

Изучено влияние состава матрицы на механические свойства пленочных материалов. Кривые 1 и 2 на рис. 23 соответствуют кривым растяжения ориентированных полимеров [182]. Это объясняется тем, что молекулы альгината как полианиона в растворе вытягиваются из-за электростатического отталкивания. Данный эффект еще сказывается на кривой ПА-2 пленки. С увеличением содержания ПВП кривые принимают вид, характерный для кристаллических полимеров (с площадкой текучести) [183] (рис. 23, кривые 3 и 4), что говорит о возможном снижении отталкивания молекул альгината и устранению ориентированности.

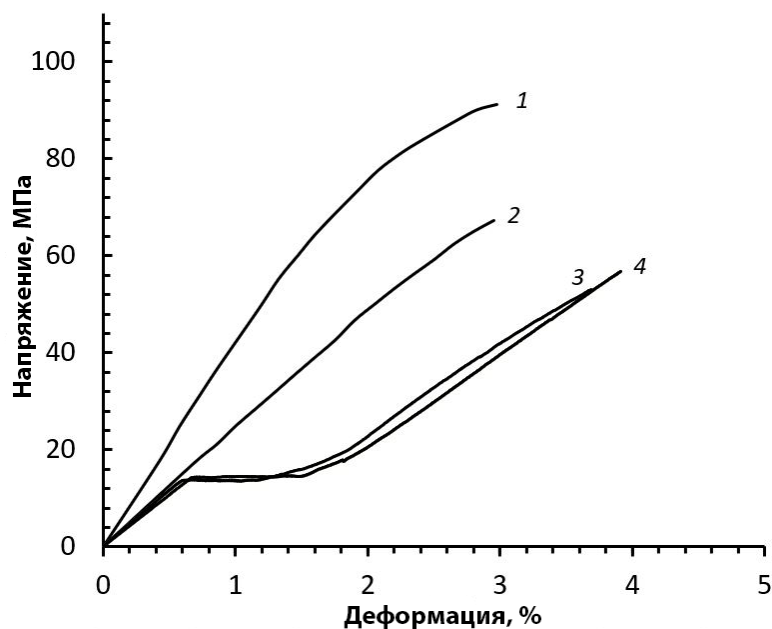


Рисунок 23. Кривые механической прочности композиционных пленок с составом матрицы: 1 – А, 2 – ПА1, 3 – ПА, 4 – ПА2

Сравнение механических характеристик плёнок, полученных без сшивания и частично сшитых ионами Ca^{2+} , представлено в табл.0. Пленки ПА являются более хрупкими, чем пленка из чистого альгината. Их разрывные удлинения составляют не более 3%. Введение 5 мас.% частиц КГА практически не влияет на механические параметры полимерной матрицы. Увеличение содержание наполнителя до 10 мас.% приводит к охрупчиванию пленок и существенному снижению (примерно в 1,3

раза) разрывных характеристик композита. Сшивание композитов ионами Ca^{2+} делает их менее жесткими (снижение модуля упругости в 2–3 раза) и менее прочными (значения прочности при разрушении снизились в 3–4 раза) в воздушно-сухом состоянии. Можно предположить, что в процессе сшивки происходит изменение исходной структуры бленда, на что также указывает изменение цвета композитов в процессе сшивки с полупрозрачного практически бесцветного на белый непрозрачный. Формирование сшитой сетки приводит к значительному снижению механических параметров композитов. Однако в набухшем состоянии сшитые материалы в отличие от исходных несшитых обладают лучшей механической прочностью и сохраняют свою целостность.

Таблица 10. Механические характеристики некоторых композиционных пленок.

Тип образца	Модуль упругости, ГПа	Прочность, МПа	Разрывное удлинение, %
А	4,4±0,4	92,7±7,0	2,9±0,1
ПА1	3,0±0,3	66,7±6,0	3,0±0,2
ПА2	2,2±0,2	58,1±5,0	3,9±0,3
ПА	2,1±0,2	53,0±5,3	3,8±0,3
ПАК-5	1,9±0,2	43,0±4,1	2,6±0,2
ПАК-5-Са	0,7±0,1	11,0±1,9	1,6±0,3
ПАК-10	1,9±0,1	33,5±5,1	1,8±0,5
ПАК-10-Са	0,5±0,1	7,6±0,6	1,5±0,1

Отдельно исследовано влияние сшивающих ионов на механическую прочность альгинатных пленок (рис. 24–25). Установлено, что сшитые пленки Алг можно выстроить в ряд по мере уменьшения прочностных свойств Алг-Сu > Алг-Са > Алг-Ва > Алг-Мn, где наибольшую прочность при растяжении и модуль упругости демонстрируют пленки Алг-Сu (42 МПа и 4 ГПа), вероятно, за счет образования прочных связей с матрицей Алг и плотной сетки, как это показано в ЭПР-

исследовании сшивания Алг в главе 3. Пленки Алг-Ва характеризуются модулем упругости 2 ГПа и прочностью 40 МПа. Пленки Алг-Са имеют сопоставимые характеристики: модуль упругости 1 ГПа и прочность 41 МПа, несмотря на менее плотные сшивки, согласно ЯМР-спектрам. Это указывает на то, что сшитая сетка альгината, образованная при сшивании ионами Ca^{2+} , способна более эффективно рассеивать энергию при деформации за счет большей подвижности полимерных цепей. Пленки Алг-Мн обладают наименьшим модулем упругости прочностью: 0.5 ГПа и 7 МПа, соответственно, что также согласуется с данными ЭПР-спектроскопии.

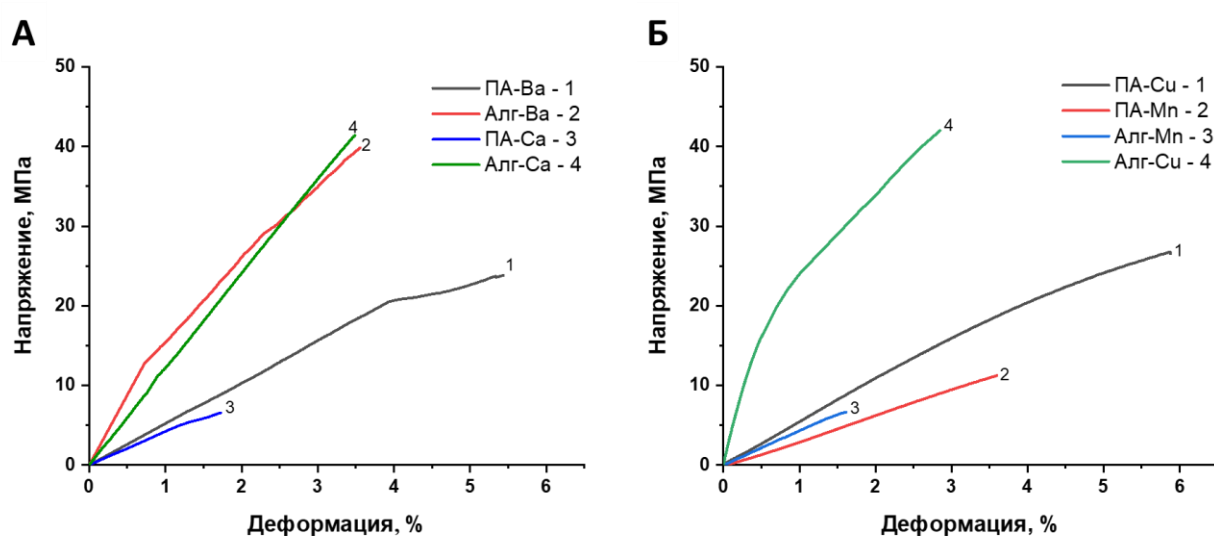


Рисунок 24. Динамические кривые сухих пленок, сшитых ионами Ba^{2+} и Ca^{2+} (А), Cu^{2+} и Mn^{2+} (Б).

В смесевых пленках присутствие ПВП приводит к снижению модуля упругости, и для большинства составов – росту относительного удлинения (рис. 24). Так, в ряду Cu-Mn-Va добавление ПВП в состав пленки 1:1 приводит к увеличению показателя на 40–50 % (рис. 25). Как показано ранее, ПВП действительно снижает прочность при растяжении за счет нарушения жесткой сетки Алг, выступая в качестве пластификатора. Смесевая пленка ПА-Са имеет в 3 раза меньший модуль упругости и в 7 раз меньшую прочность по сравнению с пленкой Алг-Са (рис. 25). При сшивании ионами Mn^{2+} введение ПВП практически не влияет на модуль упругости (рис. 25б), однако повышает прочность и разрывное

удлинение в 2 раза (рис. 25 а и в), таким образом снижая их хрупкость. В целом, присутствие ПВП делает пленки менее хрупкими, более гибкими и эластичными.

Стоит отметить, что проведение измерений прочности пленок Алг-Мп было затруднительно из-за чрезвычайной хрупкости и крошения образцов. Это может быть связано с их химическим разрушением, поскольку сухие пленки Алг-Мп спустя некоторое время после сшивания принимали коричневый оттенок, некоторые – с темными включениями, что, по-видимому, указывает на образование оксида марганца (II).

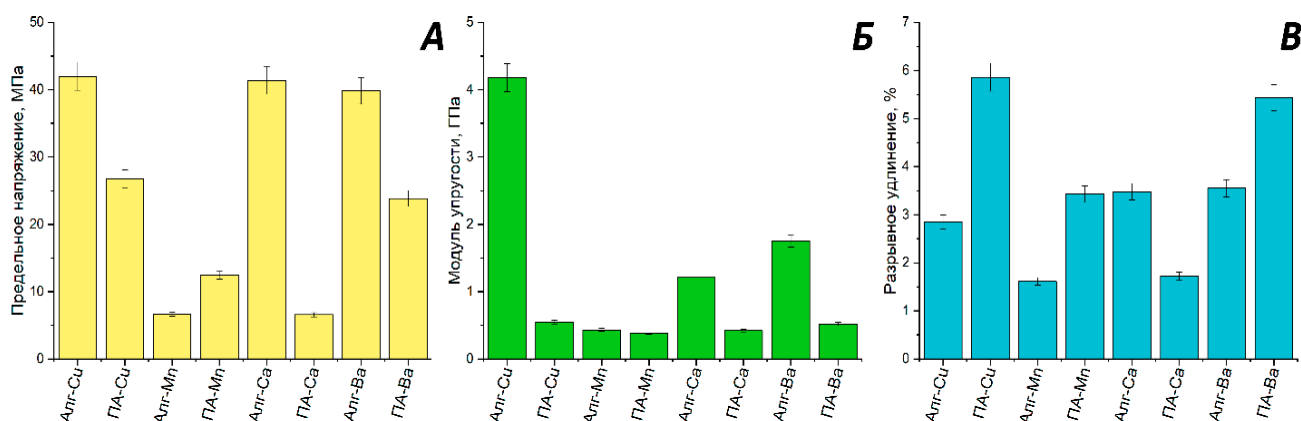


Рисунок 25. Характеристики механической прочности пленок Алг и ПА, Алг-Сu и ПА-Сu, Алг-Мп и ПА-Мп, Алг-Са и ПА-Са и Алг-Ва и ПА-Ва: (А) – предельное напряжение, (Б) – модуль упругости, (В) – разрывное удлинение.

Набухание пленок приводит к снижению прочностных характеристик и повышению эластичности (рис. 26). После набухания в воде (20–40 мас.% воды) композиционные пленки ПА-Ва и ПА-Са становятся менее жесткими (модуль упругости уменьшается в разы, рис. 26В) и эластичными (разрывные удлинения возрастают до 15–40%) (рис. 26В). Для влажных пленок, сшитых ионами Ba^{2+} (рис.24, кривая «Ва») и Ca^{2+} (рис. 26А) сохраняется прочность на уровне порядка 20 МПа.

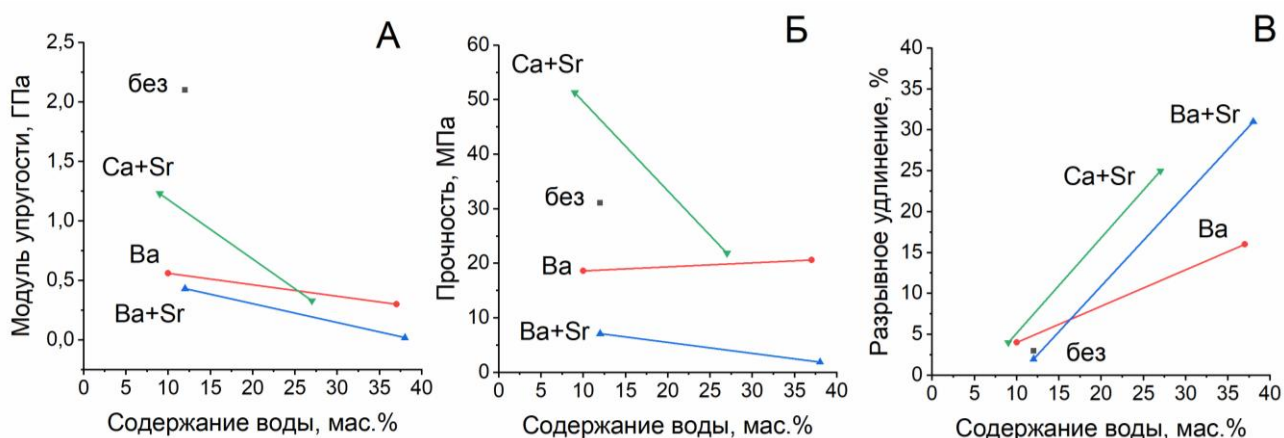


Рисунок 26. Механические характеристики суховоздушных и влажных композиционных пленок ПА, сшитых ионами двухвалентных металлов: (А) – модуль упругости, (Б) – прочность, (В) – разрывное удлинение.

4.3. Термическое разложение композиционных пленок, частично сшитых ионами бивалентных металлов

Используя метод ТГА, исследовали термические свойства полученных смесевых пленок ПА, сшитых ионами бария, стронция, кальция, меди и марганца. На рис. 27 представлены их термограммы. Видно, что в воздушно-сухом состоянии все образцы содержат 7–15 мас.% воды, которая удаляется в температурном интервале 30–180 °С. При более высоких температурах в две стадии происходит термоокислительная деструкция полимерной матрицы: разложение альгината в температурном интервале 200–294 °С и ПВП при 294–520 °С, что соответствует результатам, описанным в работе [184]. После нагревания исходного бленда до 700°С остается твердый остаток (24 мас.%). Добавление частиц КГА практически не оказывают влияния на вид термограммы и положение температурных интервалов потери массы полимерной матрицы. Однако влияние сшивки ионами металлов на термоокислительную деструкцию определяется химической природой используемых катионов. Так ионы Mn^{2+} практически не оказывают влияния на вид кривой ТГА, а сшивка ионами щелочноземельных металлов приводит к смещению начала второй стадии на 20 °С в высокотемпературную область. Наиболее сильное влияние на термостабильность бленда ПА оказывает сшивка ионами Cu^{2+} – интенсивная потеря массы полимерным образцом начинается на 65 °С раньше, и к

200 °С образец теряет больше 60 мас.%. Ранее ускорение термоокислительной деструкции полимеров наблюдали в присутствии оксидов меди, что объясняется участием CuO и Cu_2O в окислительно-восстановительных реакциях с гидропероксидами, которые образуются в процессе окисления [185]. Отметим, что в литературе представлено немного данных о термическом разложении альгинат-содержащих композитов, сшитых ионами поливалентных металлов. Среди таких работ можно выделить следующие – [186, 187], с которыми согласуются полученные данные.

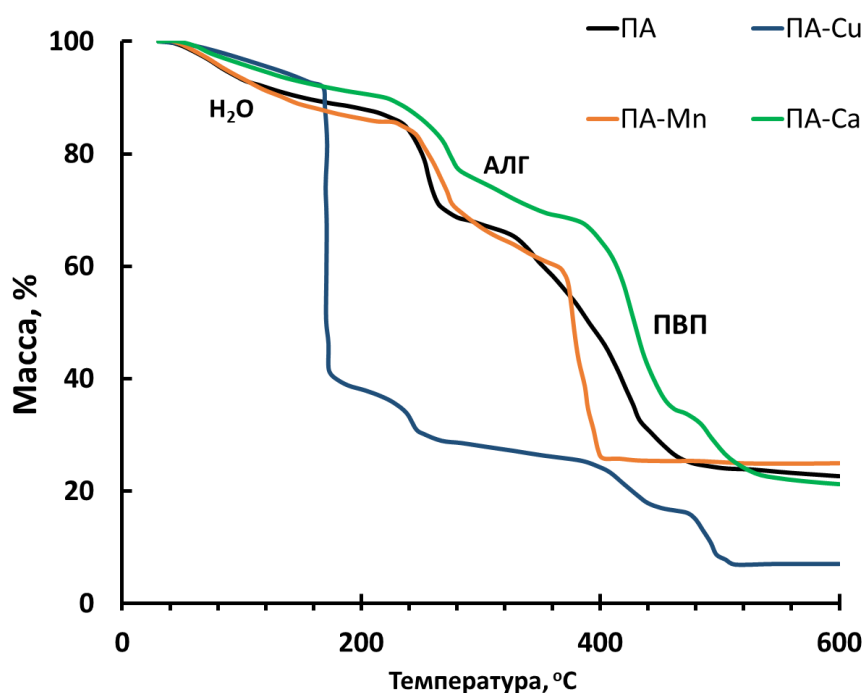


Рисунок 27. Кривые ТГА пленочных образцов.

Интересно, что по данным ТГА наименее термически стабильным является композит на основе ПА, сшитый ионами меди, в то время как растворимость АЛГ, сшитого теми же ионами, намного ниже, чем растворимость АЛГ, сшитого ионами щелочно-земельных металлов и ионами марганца (II) [188].

Исследование композиционных пленок позволило выявить ключевые закономерности, обусловленные взаимодействием полимерной матрицы с минеральным наполнителем и выбором сшивающего агента. Однако зависимости пористости и механического поведения от состава справедливы именно для плёнок, полученных методом литья и сушки на воздухе. При переходе к объёмным

пористым материалам наблюдаются принципиально иные структурно-функциональные связи, что обусловлено не только составом, но и методом получения – лиофилизацией замороженных суспензий. Следующая глава посвящена исследованию этих особенностей и установлению новых зависимостей, характерных для трёхмерных пористых скэффолдов.

Выводы по главе 4

1. Введение 5 мас.% КГА в состав полимерных пленок поливинилпирролидон (ПВП) –альгинат 1:1 приводит к устранению пор и снижению степени набухания на 50 мас.%, а сшивание смесевой пленки приводит к снижению степени набухания в 2 раза.

2. Введение (ПВП) в соотношении с альгинатом 1:1 приводит к появлению площадки текучести на кривых растяжения не сшитых пленок и снижению модуля упругости в 2 раза, а также увеличению разрывного удлинения с 2.9 до 3.8% по сравнению с пленками из альгината. Введение 5 мас.% КГА в состав смесевой пленки, сшитой ионами Ca^{2+} , повышает модуль упругости в 1,7 раз и прочность в 1,6 раз, что согласуется с данными ЯМР- и ЭПР-спектроскопии о физических связях между полимерной матрицей и наполнителем (КГА).

3. Введение (ПВП) в сшитую альгинатную матрицу (образцы ПА) снижает модуль упругости и предел прочности, одновременно повышая гибкость: так, прочность пленок на основе чистого альгината, сшитого Cu^{2+} (Алг-Cu), составляет 42 МПа, тогда как у композитных пленок ПА-Cu (соотношение ПВП:альгинат 1:1) – в 2 раза ниже. Аналогично, модуль упругости пленок Алг-Ca равен 1.2 ГПа, а у пленок ПА-Ca – 0.5 ГПа. При этом наблюдается рост относительного удлинения при разрыве на 40–50 %, что делает композиты менее хрупкими.

4. Композиты, сшитые ионами Cu^{2+} , показали наименьшую термическую стабильность: потеря 60 мас.% происходит при 200 °С, в то время как при сшивании ионами Ca^{2+} температура начала разложения увеличивается на 20 °С.

ГЛАВА 5. ПОРИСТЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОН-АЛЬГИНАТ- КАРБОНАТГИДРОКСИАПАТИТ

5.1. Характеристики структуры объемных пористых композиционных материалов

Получена серия высокопористых ячеистых композиционных материалов на основе ПВП–альгината–КГА (ПАК) с различным содержанием КГА: от 10 до 50 мас.%. На рис. 28. представлены фотографии СЭМ материала без КГА (ПА) и с содержанием КГА 10, 30 и 50 мас.%. Микроструктура образцов представлена разноориентированными порами сложной формы размерностью порядка от десятков до сотен мкм. Частицы ФК распределены в полимерных стенках. Материал имеет типичную ячеистую структуру пенопласта [91, 189], характерную для материалов, полученных внедрением пузырьков газа в раствор полимера [190]. Микроструктура также схожа с микроструктурой других пен, полученных с использованием лиофильной сушки, например, полученных в работе [191].

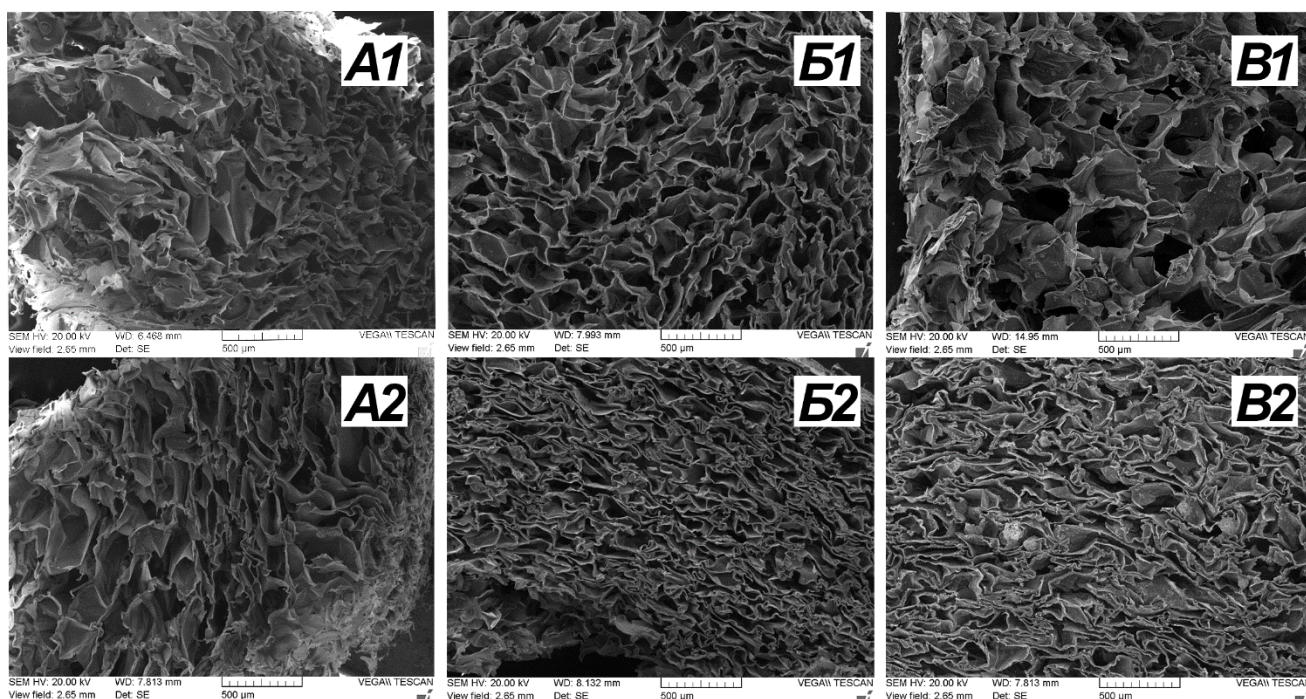


Рисунок 28. СЭМ изображения объемных композитов: А – ПАК-10, Б – ПАК-30, ПАК-50 до (1) и после (2) сжатия.

Пористость материала носит открытый характер [192]. На рис. 29 приведены данные пористости и кажущейся плотности объемных пористых композитов ПАК. Высокий процент объемной доли пор характерен для пен, образованных из гелей путем удаления пузырьков воздуха и растворителя [91]. Ранее отмечено, что пористость пены прямо связана со свойствами исходных полимеров и их гелей, в частности, с их вязкостью [193]. Полученные данные (рис. 29) указывают на то, что с ростом содержания КГА до 40 мас.% пористость уменьшается с некоторым ростом кажущейся плотности, что, по-видимому, сопровождается утолщению стенок и уменьшению объема пор. Данное наблюдение согласуется с данными, полученными при измерении вязкости гелей. Хотя при высоких скоростях перемешивания вязкость всех гелей вне зависимости от состава практически одинакова, в взбитом геле, возможно, вязкость влияет на удерживание пузырьков воздуха уже после взбивания тем самым задавая конечную пористость композита.

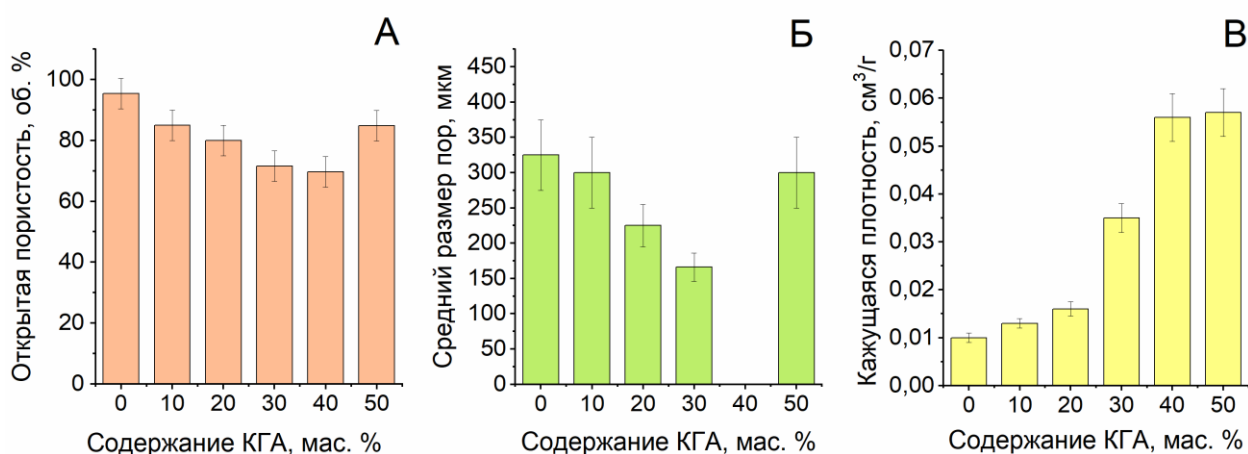


Рисунок 29. Характеристики пористости и плотности объемных пористых композитов ПАК в зависимости от содержания КГА: (А) –открытая пористость, (Б) – средний размер пор, (В) – кажущаяся плотность.

При нагрузке на сжатие образцы легко деформируются, а поры приобретают единую ориентацию в направлении, перпендикулярном направлению сжатия (рис. 28). Чем больше содержание КГА, тем более выражена деформация и изменение ориентации пор, наиболее это заметно для композитов, содержащих от 25 мас.% КГА.

5.2. Механические свойства объемных пористых композиционных материалов

Для полученных композитов была измерена прочность при одноосном сжатии (рис. 30). Исследовано влияние состава матрицы и количества наполнителя на прочность материалов и модуль сжатия. Кривые сжатия всех материалов вне зависимости от компонентного состава имеют вид, характерный для кривых сжатия материалов с пористой нерегулярной структурой [91, 189, 194]. Для данных материалов преобладает процесс изгиба стенок ячеек и для них характерна легкая деформируемость [189], что видно из кривых сжатия (рис. 30). Первый прямолинейный участок кривой мал, а модуль сжатия для композитов с содержанием ФК до 30 мас.% вне зависимости от состава матрицы (рис. 31). Заметен первый прямолинейный участок только на кривых композитов с содержанием ФК от 30 мас.%, что соответствует возрастанию модуля сжатия в 2 раза, и – в 10 раз – для образца с содержанием ФК 50 мас. % (рис. 31). Поскольку частицы ФК размещены в стенках пор, а не в самих порах (рис. 30), характер поведения композитов при сжатии сохраняется, т.к. сжатие происходит за счет изгиба стенок, но при этом возрастает предельное напряжение и модуль сжатия (рис. 30 и 31). Стоит отметить, что хотя с увеличением содержания ФК пористость композитов снижается более чем на 20% (рис. 31), это не отражается на механических характеристиках. В целом, порядок значений напряжений соответствует таковому для высокопористых материалов, полученных вспениванием раствора полимера [195].

С повышением содержания КГА способность материала восстанавливаться после приложенной нагрузки практически не меняется при деформациях до 20%, (рис. 32). несмотря на большую жесткость стенок пор.

Однако при деформации 80% композиты с высоким содержанием КГА восстанавливаются не полностью, что видно из микрофотографий композитов после сжатия (рис. 28). При сжатии поры без разрушения приобретают единую ориентацию в направлении, перпендикулярном направлению сжатия, что хорошо

заметно для образца ПАК-25 и ПАК-50. По-видимому, жесткость стенок не позволяет им принять прежнюю форму.

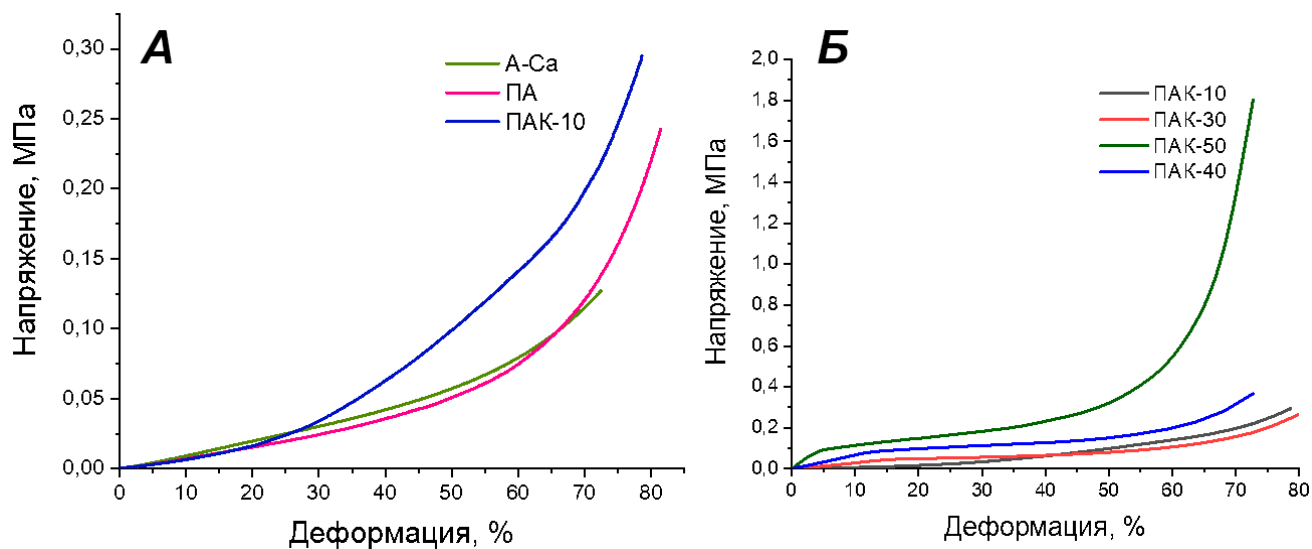


Рисунок 30. Кривые сжатия композитов: А – А-Са, ПА и ПАК-10;
Б – ПАК-10, ПАК-30, ПАК-40 и ПАК-50.

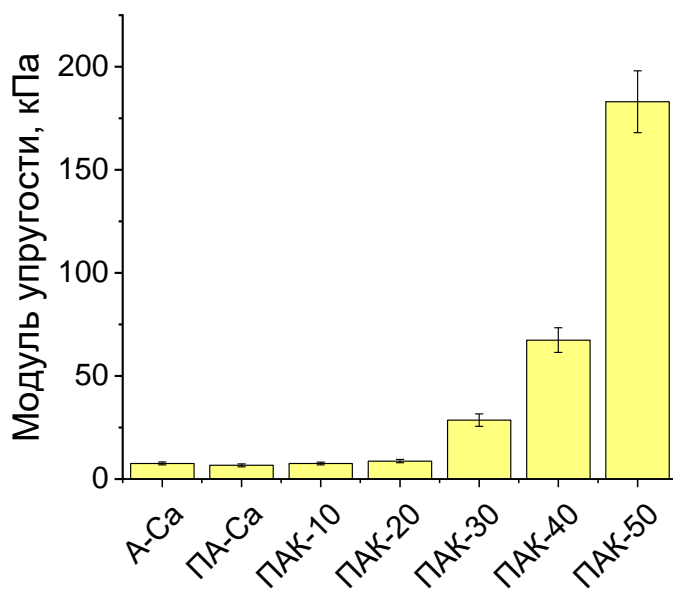


Рисунок 31. Модуль сжатия композитов в зависимости от состава.

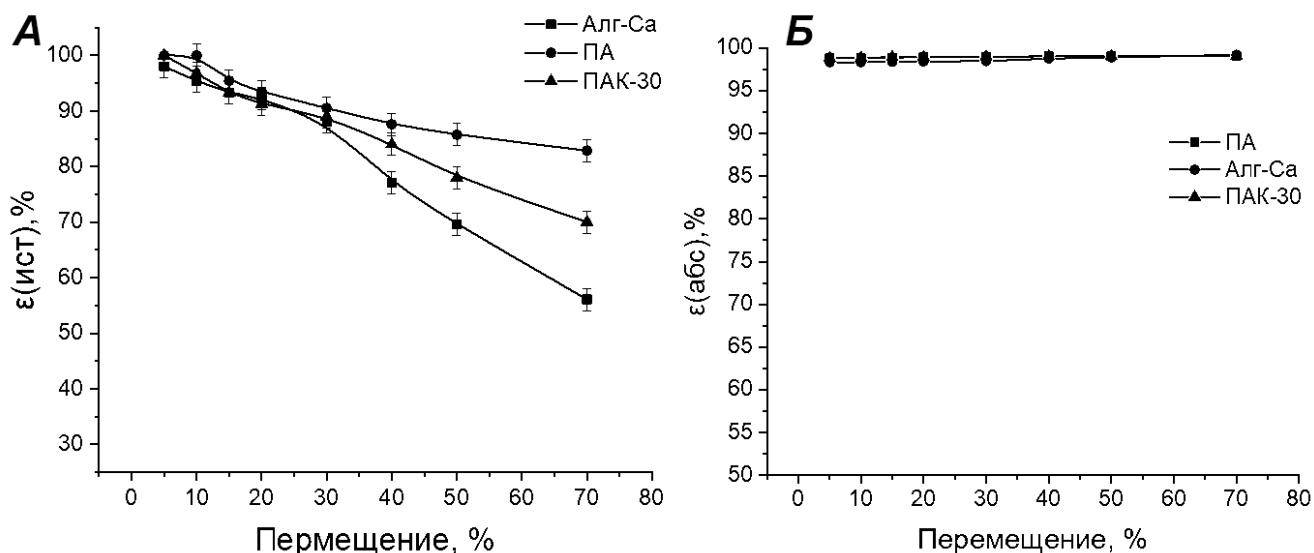


Рисунок 32. Абсолютная (а) и истинная (б) обратимая деформация образцов ПА, ПА-Са и ПАК-30.

Выводы по главе 5

1. Объемные композиты поливинилпирролидон–альгинат–карбонатгидроксиапатит имеют макропористую структуру. При этом объемная доля пор и их средний размер зависят от состава: при содержании КГА 10 мас.% объемная пористость составляет 85 об.%, а средний размер пор – 320 мкм, при содержании КГА 30 мас.% – 71 об.% и 170 мкм, а при содержании 50 мас.% КГА – 84 об.% и 300 мкм. Эти данные коррелируют с результатами измерения кажущейся вязкости соответствующих суспензий.

2. Кривые сжатия объемных пористых композитов носят характер, свойственный высокопористым ячеистым материалам, с площадкой, соответствующей уплотнению. Композиты сжимаются без разрушения, способны восстанавливать исходную форму после снятия нагрузки. С ростом содержания КГА до 50 мас.% в 10 раз возрастают модуль упругости и предельное напряжение при сжатии материала на 80%. Как материалы без КГА, так и содержащие 30 мас.% КГА демонстрируют абсолютную обратимую деформацию на уровне 98%.

ГЛАВА 6. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПОЗИТОВ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОН-АЛЬГИНАТ- КАРБОНАТГИДРОКСИАПАТИТ.

6.1. Цитотоксичность и биосовместимость композитов *in vitro*

Для определения цитотоксичности полученных материалов был проведен МТТ-тест с использованием фибробластов мыши (рис. 33). Показана выживаемость мышинных фибробластов в зависимости от состава полимерной матрицы и присутствия КГА.

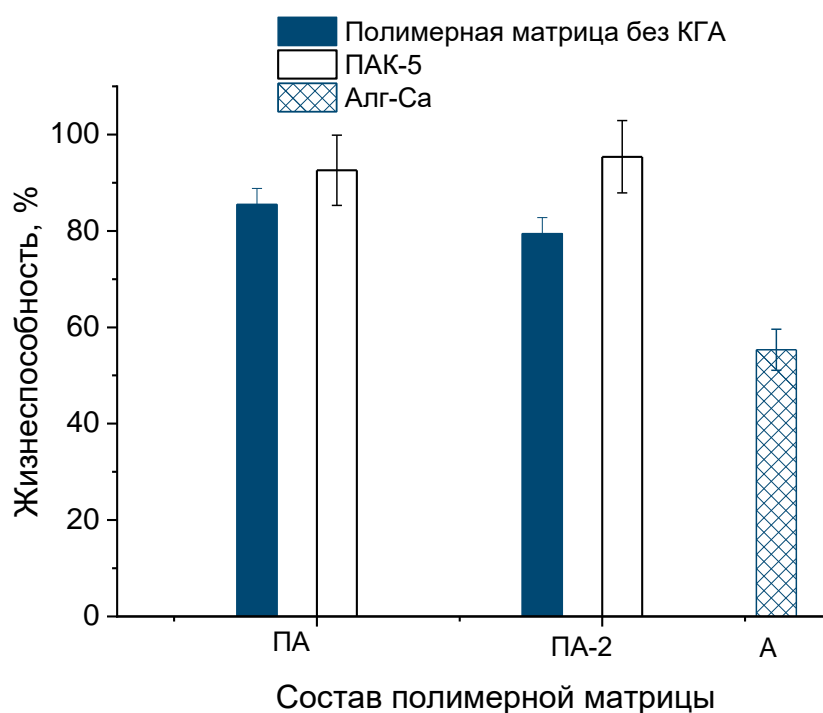


Рисунок 33. Данные жизнеспособности мышинных фибробластов при контакте с композиционными пленками.

МТТ-тест показывает статистически значимые различия для образцов с преобладающим содержанием альгината. Полимерные матрицы ПА и композиты не имеют статистически значимых различий.

Изображения клеток на поверхности пленочных и объемных пористых образцов показаны на рис. 34.

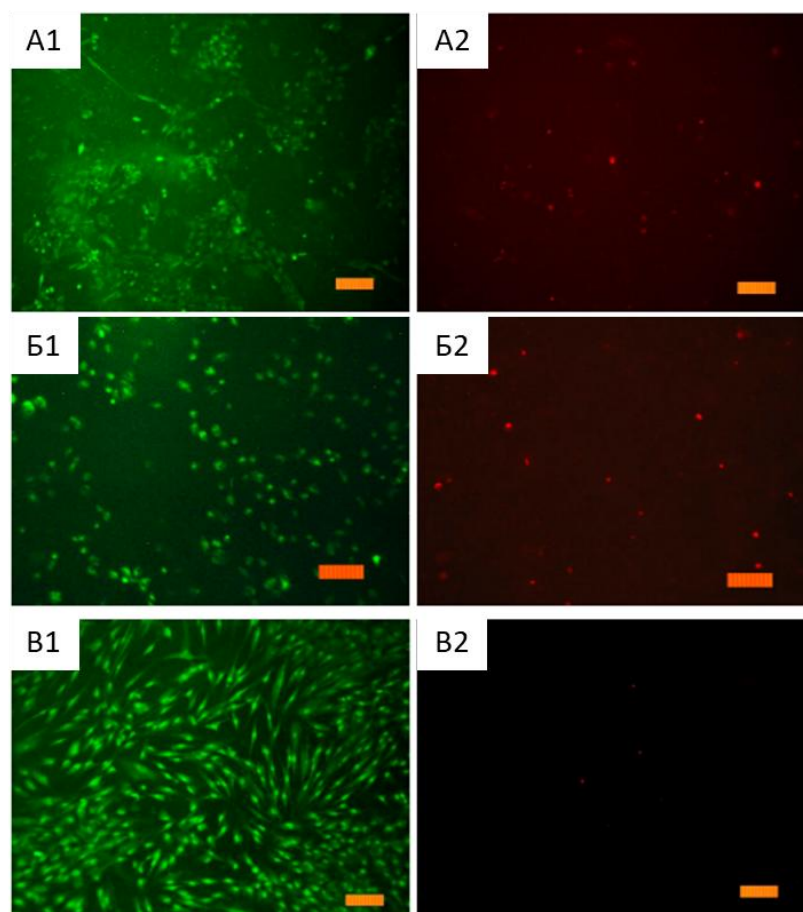


Рисунок 34. Фото СКП на поверхности композиционных пленок: А – ПА, Б – ПАК-5, В – контроль; 1 – все клетки, красный – мертвые клетки.

Изображения СКП на поверхности образцов ПА и ПАК-30 представлены на рис. 35. Хорошо видно, что клетки имеют сферическую форму и не образуют монослоя на поверхности пленок. Сферическая форма клеток указывала на низкую адгезию ячеек к поверхности материалов [196]. Это свойство альгината и ПВП, как и многих других полимеров, полезно для создания антиадгезивных устройств, которые предотвращают образование рубцов на ранах и способствуют нормальному заживлению [55]. В контексте данной работы это свойство также может быть полезным. Низкая адгезия материала может предотвратить фиброз и неправильное сращивание тканей, а также может служить материалом для функционирования остеокластов и роста новой костной ткани. Многие из них находятся вне фокуса микроскопа (фото пористых образцов – рис. 40). Это связано с тем, что образцы композита пористые и ячейки располагались в порах (белые

кружки на рис.40 A1 и B1). Расположение клеток в порах образцов также может быть полезным с точки зрения биоинтеграции материала.

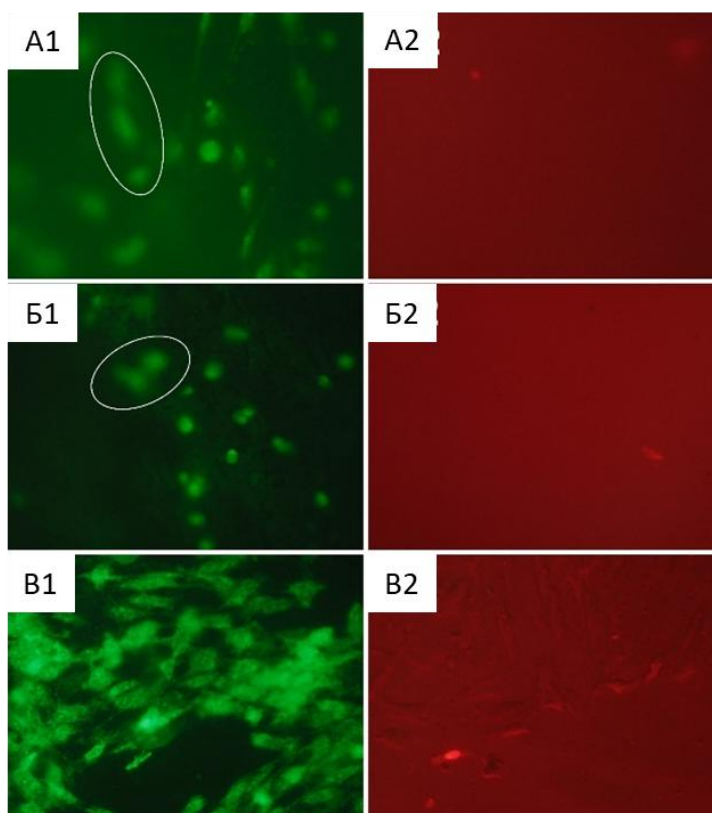


Рисунок 35. Фото стволовых клеток пульпы зуба на поверхности пористых композиционных материалов: А – ПА-Са, Б – ПАК-5, В – контроль;

1 – все клетки 2 – мертвые клетки.

Сфероиды клеток, показанные на рис. 36, также наблюдались на поверхности пористого композита альгинат-ГА, о котором сообщалось в работе [197], при этом рост популяции клеток был связан с увеличением содержания ГА.

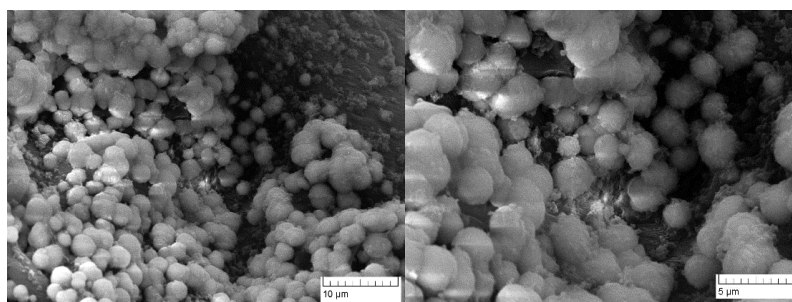


Рисунок 36. СЭМ изображения сфероидов стволовых клеток пульпы зуба в порах объемного пористого композита ПАК-30

6.2. Биоактивность композитов *in vivo*

Синтетический полимер ПВП не разлагается в организме. Известно, что альгинат разлагается альгинатлиазой, которая содержится только в водорослях, морских беспозвоночных и микроорганизмах, из которых его получают [198, 199]. У млекопитающих нет специфического фермента, расщепляющего альгинат. Однако любые экзогенные вещества могут быть выведены с помощью некоторых неспецифических механизмов, таких как макрофаги. Для элиминации макрофагами биополимеры должны легко распадаться на мелкие фрагменты, сравнимые по размеру с микроорганизмами. В данном эксперименте (см. главу 2, п.2.2.14.) с использованием пленок ПА, ПАК-5 и ПА-Са наблюдался именно этот процесс.

6.2.1. Гистологический анализ

На рис.37А желтой стрелкой показана неокрашенная область, которая, по-видимому, соответствует полимеру пленки ПА, распределенному между тканями (розовое окрашивание – мышечные волокна брюшины, фиолетовые – ткани слепой кишки). В случае использования ПАК-5 вокруг частиц КГА наблюдалось образование тонкого слоя грануляционной ткани – (темно-фиолетовое окрашивание, показано желтой стрелкой на рис. 37Б), обусловленное присутствием фибробластов. При этом отсутствие выраженной фиброзной капсулы говорит о биосовместимости частиц КГА и контролируемой реакции организма. Пленка ПА-Са также проявляется неокрашенной областью на рис. 37В, при этом окрашенные синим участки соответствуют коллагену рыхлой грануляционной ткани. Отсутствие однородной, равномерно окрашенной в синий фиброзной капсулы говорит об отсутствии хронического воспаления и биосовместимости материала ПА-Са. Согласно табл 7., плотность спаек между брюшиной и слепой кишкой была оценена следующим образом: ПА – 0 баллов, ПАК-5 – 0 баллов, ПА-Са – 5 баллов.

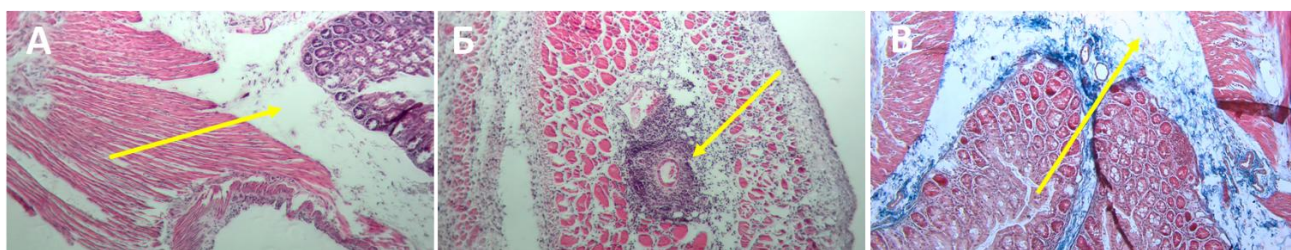


Рисунок 37. Гистологические срезы места имплантации пленок ПА (А) – спустя 3 суток (окрашивание гематоксилин-эозином), ПАК-5 (Б) – спустя 7 суток (окрашивание гематоксилин-эозином), ПА-Са (В) – спустя 7 суток (окрашивание Трихромом Массона). Масштабная линейка – 50 мкм

6.2.2. Анализ экспрессии генов

Было проведено исследование экспрессии генов в поврежденных тканях для более точной оценки влияния пленок на заживление и восстановление тканей. Для этого образцы тканей из поврежденных участков стенки брюшины и слепой кишки были использованы для выделения РНК для анализа методом полимеразной цепной реакции (см. главу 2, п.2.2.14.). Была исследована экспрессия генов с продуцированием таких белков, как: трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), фибриноген α , β и γ , матриксные металлопротеиназы (ММП), тканевой активатор плазминогена (tPA); ингибитор активатора плазминогена 1 (РАI-1), тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ (TIMP). Функции данных белков кратко представлены в табл. 11. Экспрессия данных генов не специфична и наблюдается в ответ на повреждения как мягких, так и костных тканей. Она также не зависела от материала, помещенного в оперированную полость. В табл. 12 представлены данные экспрессии генов в экспериментальных группах по сравнению с неоперированными животными.

После оперативного истирания тканей слепой кишки и брюшной стенки протекают два процесса: первый направлен на остановку кровотечения с образованием сгустков, закрывающих повреждение сосуда (фибриновые сгустки), второй – на их рассасывание (фибринолиз). Своевременность и полнота протекания

данных процессов является залогом нормального заживления ран без образования рубцов (фиброза).

Таблица 11. Функции белков, образующихся при экспрессии генов в данном эксперименте.

Белки – продукты экспрессии генов	Функция
Трансформирующий фактор роста, TGF-β	Контролирует пролиферацию и дифференцировку клеток
Фибриноген α, β и γ	Участвуют в формировании сгустка для остановки кровотечения
Матриксная металлопротеиназа, MMP 12	Разрушают белки внеклеточного матрикса, участвуют в ремоделировании тканей, пролиферации, дифференцировки и миграции клеток
Активатор плазминогена, tPA	Участвует в расщеплении фибриновых сгустков
Ингибитор активатора плазминогена, PAI-1	Предотвращает преждевременное расщепление сгустков
Ингибитор матриксной металлопротеиназы, TIMP-1,2	Контролирует работу матриксных металлопротеиназ, препятствует преждевременному расщеплению белков внеклеточного матрикса

Таблица 12. Сравнение данных экспрессии генов в клетках брюшной стенки и слепой кишки в группах контроля (К), пленок ПА и ПА-Са, ложнооперированных животных (Л).

Ген	Соотношение экспрессии генов*	
	Брюшная стенка	Слепая кишка
TGF-β**	ПА ≥ К ≥ Л ≥ ПА-Са	ПА-Са ≥ ПА ≥ К > Л
Фибриноген	ПА ≥ К ≥ ПА-Са ≥ Л	ПА-Са ≥ ПА ≥ К > Л
tPA	ПА ≥ К ≥ Па-Са > Л	ПА-Са ≈ К ≥ ПА > Л
MMP-12	ПА ≥ ПА-Са ≥ Л ≥ К	ПА-Са ≥ ПА ≈ К > Л
PAI-1	ПА-Са ≥ ПА ≥ К > Л	К ≥ ПА-Са > ПА > Л
TIMP-2	К ≥ ПА ≥ ПА-Са ≥ Л	ПА-Са ≥ К ≥ ПА > Л

*данные представлены по возрастанию, «≥» означает статистически не значимые различия, «>» статистически значимые; **экспрессия гена TGF-β в 100 раз больше экспрессии остальных генов.

В экспериментальных группах наблюдалась значительная экспрессия генов, связанных с остановкой кровотечения, заживлением раны и удалением полимеров из оперированной области.

Самый высокий уровень экспрессии наблюдался у гена трансформирующего фактора роста β (TGF- β) (табл. 12) – ключевого фактора регенерации: в брюшной стенке максимальная экспрессия была в группах ПА и ПА-Са, а в тканях слепой кишки – статистически значимо выше в группе ПА-Са. Это свидетельствует, что обе пленки активно стимулируют заживление повреждённых тканей. В группе ПА активируются механизмы, предотвращающие спайки: снижается экспрессия фибриногена (гемостаз), повышается экспрессия матриксной металлопротеиназы (ММР-12) (удаление матрикса) и снижается экспрессия ингибитора матриксных металлопротеиназ (ТИМР-2). Кроме того, в слепой кишке экспрессия ингибитора активатора плазминогена (РАI-1 – ингибитора активатора плазминогена и ММР-12) была ниже, что способствует разрушению фибриновых сгустков и предотвращению спаек. Повышенная экспрессия матриксной металлопротеиназы (ММР-12) – фермента, продуцируемого клетками макрофагами для удаления полимера – наблюдается в брюшинной стенке в обеих группах, но в слепой кишке – только в группе ПА-Са. В группе ПА макрофаги накапливаются в грануляционной ткани и эффективно удаляют полимер, тогда как в группе ПА-Са грануляционной ткани недостаточно, и система не справляется с удалением материала (табл. 12).

В группе ПА-Са, несмотря на образование спаек, система «пытается» заживить ткани: повышается экспрессия фибриногена, сохраняется высокий уровень трансформирующего фактора роста β , а также наблюдается рост экспрессии как матриксной металлопротеиназы (ММР-12), так и ее ингибитора (табл. 12), что свидетельствует о продолжающихся попытках удалить фиброзную ткань. Однако из-за физических свойств сшитой пленки (жесткость, размер) и недостаточного количества макрофагов полное предотвращение спаек не достигается. Остаточные спайки наблюдаются в обеих группах (рис. 38, зелёные стрелки): они состоят из соединительной ткани, инфильтрированной

фибробластами и макрофагами (рис. 38 г, синие стрелки), что подтверждает активацию регенеративных процессов даже при формировании спаек.

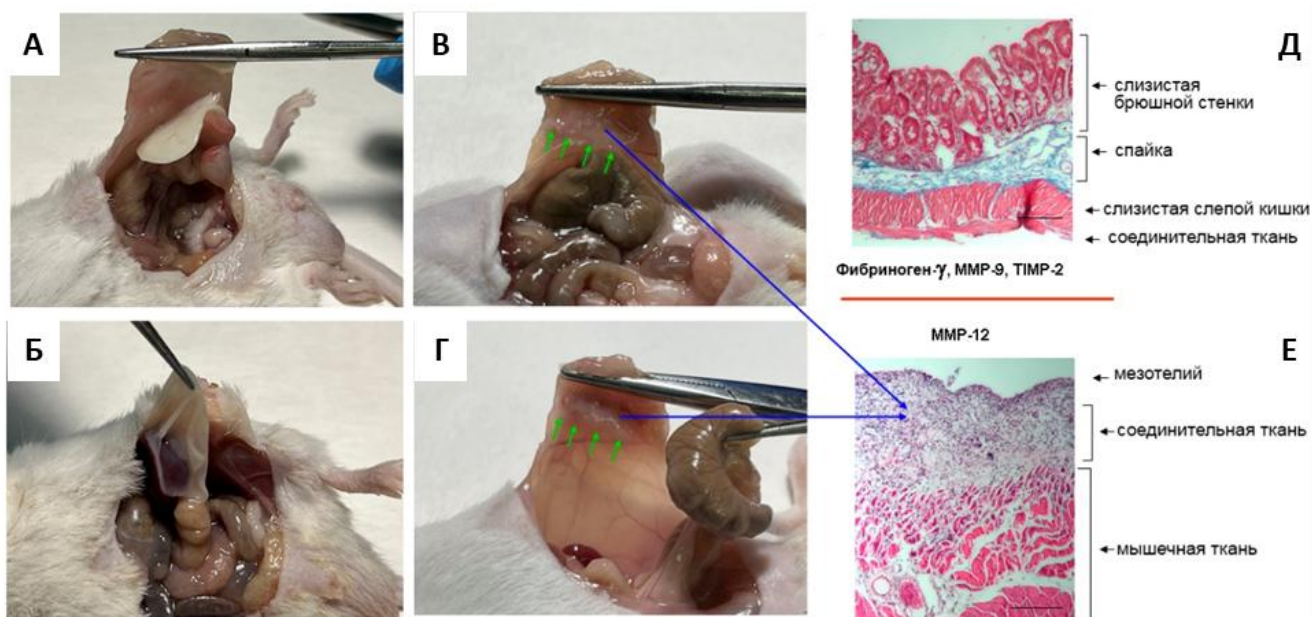


Рисунок 38. Общий вид и структура спаек. а-б: пленка ПА-Са в оперированной полости после окончания эксперимента; в: спайки в группе пленок ПА-Са и г - остаточная соединительная ткань в группе пленок ПА. д-е: гистологическое изображение участков спайки, образованных клетками слепой кишки (д) и стенки брюшины (е). Масштабная линейка – 30 мкм.

Таким образом, как пленки ПА, так и пленки ПА-Са повышают экспрессию множественных генов. Однако неспособность гомеостатической системы разрушить нерастворимую пленку ПА-Са препятствовала устранению спаек и ограничивало выработку генов, ответственных за удаление внеклеточного матрикса (MMP-9 и TIMP-2). Вероятно, это связано с отсутствием в исследованных тканях специфических механизмов разложения таких структур, как сшитый альгинат.

Полученные данные экспрессии генов могут быть перенесены на костную ткань, поскольку не являются специфическими для исследованных тканей брюшной стенки и слепой кишки. В костной ткани сшитый альгинат может быть подвергнут биорезорбции с образованием костной ткани *de novo* [200] с помощью специфичных клеток костной ткани, остеокластов, чувствительных к ионам кальция [201].

Выводы по главе 6

1. Композиционные материалы ПА-Са, ПАК-5 являются биосовместимыми и не проявляет цитотоксичности в сочетании с умеренной адгезией к клеткам.
2. Подтверждена биофункциональность разработанных материалов *in vivo*: композиты ПА, а также ПАК-5 и ПА-Са вызывают в тканях эксперссию генов, направленную на регенерацию. При этом пленки ПА полностью деградируют за 7 дней, матрица пленок ПАК-5 также деградирует, но остаются частицы КГА, окруженные здоровой грануляционной тканью; пленки ПА-Са деградируют не полностью за 7 дней.

ВЫВОДЫ

1. Компонентный состав влияет на реологические и структурные свойства композиционных суспензий на основе альгината, поливинилпирролидона и карбонатгидроксиапатита: при введении карбонатгидроксиапатита (КГА) в количестве от 10 до 30 мас.% кажущаяся вязкость при фиксированной скорости сдвига (13c^{-1}) снижается с 1271 мПа·с до 756 мПа·с, а с ростом содержания КГА до 50 мас.% – возрастает до 1267 мПа·с. При этом изменяются параметры пористости объемных пористых композитов ПАК: при содержании КГА 10 мас.% объемная пористость составляет 85 об.%, а средний размер пор – 320 мкм, при содержании КГА 30 мас.% – 71 об.% и 170 мкм, а при содержании 50 мас.% КГА – 84 об.% и 300 мкм.

2. Методами ЯМР- и ЭПР-спектроскопии выявлены различия в механизмах сшивания альгината ионами Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} и Mn^{2+} : ионы Ca^{2+} и Mn^{2+} образуют слабые сшивки с ограниченным числом связывающих центров, в то время как Sr^{2+} и особенно Cu^{2+} координируются к большему числу функциональных групп молекул альгината и формируют более плотные и прочные сетки. При этом прочность при растяжении пленок, сшитых ионами Ca^{2+} и Cu^{2+} , практически одинакова – 41 и 42 МПа, соответственно, однако модуль упругости различается в 3.5 раза – 1.2 ГПа и 4.2 ГПа, соответственно. Это может быть связано с тем, что плотная сетка, образованная ионами Cu^{2+} , обеспечивает высокую прочность, но ограничивает пластическую деформацию пленок (2.8%), в то время как разреженная сетка, образованная Ca^{2+} , при той же позволяет достичь большей деформации (3.4%).

3. Введение поливинилпирролидона (ПВП) в альгинатную матрицу (образцы ПА) снижает модуль упругости и предел прочности пленок, одновременно повышая гибкость: так, прочность пленок на основе чистого альгината, сшитого Cu^{2+} (Алг-Сu), составляет 42 МПа, тогда как у композитных пленок ПА-Сu (соотношение ПВП:Алг 1:1) – в 2 раза ниже. Аналогично, модуль упругости пленок Алг-Са равен 1.2 ГПа, а у пленок ПА-Са – 0.5 ГПа. При этом наблюдается рост относительного удлинения при разрыве на 40–50 %, что делает композиты менее

хрупкими. Композиты, сшитые ионами Cu^{2+} , показали наименьшую термическую стабильность: потеря 60 мас.% происходит при 200 °С, в то время как при сшивании ионами Ca^{2+} температура начала разложения увеличивается на 20 °С.

4. Введение поливинилпирролидона (ПВП) в соотношении с альгинатом 1:1 приводит к появлению площадки текучести на кривых растяжения не сшитых пленок и снижению модуля упругости в 2 раза, а также увеличению разрывного удлинения с 2.9 до 3.8% по сравнению с пленками из альгината. Введение 5 мас.% КГА в состав смесевой пленки, сшитой ионами Ca^{2+} , повышает модуль упругости в 1,7 раз и прочность в 1,6 раз, а введение 50 мас.% КГА в 10 раз повышает модуль и предельное напряжение при сжатии объемных пористых композитов. Это подкрепляется данными ЯМР- и ЭПР-спектроскопии о физических связях между полимерной матрицей и наполнителем (КГА).

5. Подтверждена биосовместимость и биофункциональность разработанных материалов *in vitro* и *in vivo*: композиты на основе альгината–ПВП не проявляют цитотоксичности, способствуют адгезии клеток при наличии КГА в составе, демонстрируют гемостатический и антиадгезионный эффекты, а также стимулируют регенерацию повреждённых тканей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biomaterials in Orthopedic Devices: Current Issues and Future Perspectives / N. Filip, I. Radu, B. Veliceasa, C. Filip [et al.] // *Coatings*. – 2022. – Vol. 12. – № 10. – P. 1-12.
2. The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering / D. Yang, J. Xiao, B. Wang, L. Li [et al.] // *Mater. Sci. Eng., C*. – 2019. – Vol. 104. – № 11. – P. 1-69.
3. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration / J. Jeong, J. H. Kim, J. H. Shim, N. S. Hwang [et al.]. // *Biomaterials Research*. – 2019. – P. 1-11.
4. Barinov, S. M. Approaches to the fabrication of calcium phosphate-based porous materials for bone tissue regeneration / S. M. Barinov, V. S. Komlev // *Inorg. Mater.* – 2016. – Vol. 52. – № 4. – P. 339-346.
5. Bioactive Materials for Bone Tissue Engineering / J. V. Rau, I. Antoniac, G. Cama, V. S. Komlev [et al.] // *Biomed Res Int*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 1-3.
6. Trends in Development of Bioresorbable Calcium Phosphate Ceramic Materials for Bone Tissue Engineering / M. A. Goldberg, V. V Smirnov, A. Y. Teterina, S. M. Barinov [et al.]. // *Polymer Science, Series D* – 2018. – Vol. 11. – № 4. – P. 419-422.
7. The effect of implant length and diameter on the primary stability in different bone types. / H. Barikani, S. Rashtak, S. Akbari, S. Badri [et al.] // *J. Dent.* – 2013. – Vol. 10. – № 5. – P. 449-455.
8. Multiscale osteointegration as a new paradigm for the design of calcium phosphate scaffolds for bone regeneration / S. K. Lan Levensgood, S. J. Polak, M. B. Wheeler, A. J. Maki [et al.] // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – № 13. – P. 3552-3563.
9. Mechanical, material, and biological study of a PCL/bioactive glass bone scaffold: Importance of viscoelasticity / A. Shahin-Shamsabadi, A. Hashemi, M. Tahriri, F. Bastami [et al.] // *Mater. Sci. Eng., C*. – 2018. – Vol. 90. – №4. – P. 280-288.
10. The role of natural polymers in bone tissue engineering / L. Guo, Z. Liang, L. Yang, W. Du [et al.] // *J. Controlled Release*. – 2021. – Vol. 338. – №8. – P. 571-582.
11. P. Rokkanen. Bioabsorbable Polymers for Medical Applications with an Emphasis on Orthopedic Surgery / Pentti U. Rokkanen // *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded* / ed. S. Dumitriu. – Boca Raton: Taylor&Francis, 2001. – P. 18
12. S. Caridade. Engineering membranes for bone regeneration / S. G. Caridade, J. F. Mano // *Tissue Eng.* – 2017. – Vol. 23. – № 23-24. – P. 1502-1533.
13. Designing Porous Bone Tissue Engineering Scaffolds with Enhanced Mechanical Properties from Composite Hydrogels Composed of Modified Alginate, Gelatin, and Bioactive Glass / B. Sarker, W. Li, K. Zheng, R. Detsch [et al.] // *ACS Biomater. Sci. Eng.* – 2016. – Vol. 2. – № 12. – P. 2240-2254.

14. Tian, Z. The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde / Z. Tian, W. Liu, G. Li // *Polym. Degrad. Stab.* – 2016. – Vol. 130. – P. 264-270.
15. Lee, K. Y. Alginate: Properties and biomedical applications / K. Y. Lee, D. J. Mooney // *Prog. Polym. Sci.* – 2012. – Vol. 37. – № 1. – P. 106-126.
16. Kuo, C. K. Maintaining dimensions and mechanical properties of ionically crosslinked alginate hydrogel scaffolds in vitro / C. K. Kuo, P. X. Ma // *J Biomed Mater Res.* – 2008. – Vol. 84. – № 4. – P. 899-907.
17. Increased Survival and Function of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Entrapped in Instructive Alginate Hydrogels / S. Ho; K. Murphy, B. Binder, C. Vissers, K. Leach. // *Stem Cells Transl Med.* – 2016. – №5. – P. 1-9.
18. Тортора, Д. Анатомия, Физиология: фундаментальные основы / Д. Тортора, Б. Дерриксон. – Издательство «Э», 2017. 1280 с.
19. Buck, D. W. Bone biology and physiology: Part I. the fundamentals / D. W. Buck, G. A. Dumanian // *Plast Reconstr Surg.* – 2012. – Vol. 129. – № 6. – P. 1314-1320.
20. Zioupos, P. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone / P. Zioupos, J. D. Currey, A. J. Hamer // *J Biomed Mater Res.* – 1999. – Vol. 45. – № 2. – P. 108-116.
21. Three-dimensional tissue engineering-based Dentin/Pulp tissue analogue as advanced biocompatibility evaluation tool of dental restorative materials / C. Hadjichristou, E. Papachristou, I. Bonovolias, A. Bakopoulou // *Dent. Mater.* – 2020. – Vol. 36. – № 2. – P. 229-248.
22. Koons, G. L. Materials design for bone-tissue engineering / G. L. Koons, M. Diba, A. G. Mikos // *Nat Rev Mater.* – 2020. – Vol. 5. – № 8. – P. 584-603.
23. Buck, D. W. Bone biology and physiology: Part II. clinical correlates / D. W. Buck, G. A. Dumanian // *Plast Reconstr Surg.* – 2012. – Vol. 129. – № 6. – P. 950-956.
24. Polo-Corrales, L. Scaffold design for bone regeneration / L. Polo-Corrales, M. Latorre-Esteves, J. E. Ramirez-Vick // *J Nanosci Nanotechnol.* – 2014. – Vol. 14. – № 1. – P. 15-56.
25. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering / G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches [et al.] // *Bioact Mater.* – 2018. – Vol. 3. – № 3. – P. 278-314.
26. Pediatric fractures following implant removal: A systematic review / A. M. Padgett, C. M. Howie, T. C. Sanchez, A. Cimino [et al.] // *J Child Orthop.* – 2022. – Vol. 16. – № 6. – P. 488-497.
27. Chandra, G. Biodegradable bone implants in orthopedic applications: a review / G. Chandra, A. Pandey // *Int. Med. Res.* – 2020. – Vol. 40. – № 2. – P. 596-610.
28. Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review / R. G. Ribas, V. M. Schatkoski, T. L. do A. Montanheiro, B. R. C. de Menezes [et al.] // *Ceram. Int.* – 2019. – Vol. 45. – № 17. – P. 21051-21061.

29. Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future? / W. Habraken, P. Habibovic, M. Epple, M. Bohner // *Mater. Today*. – 2016. – Vol. 19. – № 2. – P. 69-87.
30. Uskoković, V. Calcium phosphate as a key material for socially responsible tissue engineering / V. Uskoković, V. M. Wu // *Materials*. – 2016. – Vol. 9. – № 6. – P. 1-27.
31. Calcium phosphates for biomedical applications / M. Canillas, P. Pena, A. H. De Aza, M. A. Rodríguez // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2017. – Vol. 56. – № 3. – P. 91-112.
32. Баринов С. М. Биокерамика на основе фосфатов кальция / С. М. Баринов, В. С. Комлев. – Москва: Наука, 2005.
33. Uskokovic, V. The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite / V. Uskokovic // *RSC Advances*. – 2015. – Vol. 5. – P. 36614-36633.
34. Calcium phosphate cements for bone substitution: Chemistry, handling and mechanical properties / J. Zhang, W. Liu, V. Schnitzler, F. Tancret [et al.] // *Acta Biomater.* – 2014. – Vol. 10. – № 3. – P. 1035-1049.
35. Denry, I. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering / I. Denry, L. T. Kuhn // *Dent. Mater.* – 2016. – Vol. 32. – № 1. – P. 43-53.
36. Building Osteogenic Microenvironments with Strontium-Substituted Calcium Phosphate Ceramics / B. Wan, R. Wang, Y. Sun, J. Cao [et al.] // *Front Bioeng Biotechnol.* – 2020. – Vol. 8. – № October. – P. 1-8.
37. Ion-Doped Calcium Phosphate-Based Coatings with Antibacterial Properties / M. Fosca, A. Streza, I. V Antoniac, G. Vadal [et al.] // *J. Funct. Biomater.* – 2023. – Vol. 14. – № 5. – P. 1-250.
38. Exploring Borate-Modified Calcium Phosphate Ceramics: Antimicrobial Potential and Cytocompatibility Assessment / I. V Fadeeva, K. Barbaro, A. Altigeri, A. A. Forsenkova [et al.] // *Nanomaterials*. – 2024. – Vol. 14. – № 6. – P. 250-265.
39. Dziadek M. Biodegradable ceramic-polymer composites for biomedical applications: A review / M. Dziadek, E. Stodolak-Zych, K. Cholewa-Kowalska // *Mater. Sci. Eng., C*. – 2017. – Vol. 71. – P. 1175-1191.
40. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models / A. A. El-Rashidy, J. A. Roether, L. Harhaus, U. Kneser [et al.] // *Acta Biomater.* – 2017. – Vol. 62. – P. 1-28.
41. Lodoso-Torrecilla I. Calcium phosphate cements: Optimization toward biodegradability / I. Lodoso-Torrecilla, J. J. J. P. van den Beucken, J. A. Jansen // *Acta Biomater.* – 2021. – Vol. 119. – P. 1-12.
42. Preparation of in situ hardening composite microcarriers: Calcium phosphate cement combined with alginate for bone regeneration / J. H. Park, E. J. Lee, J. C.

- Knowles, H. W. Kim // *J. Biomater. Appl.* – 2014. – Vol. 28. – № 7. – P. 1079-1084.
43. Novel Trends into the Development of Natural Hydroxyapatite-Based Polymeric Composites for Bone Tissue Engineering / D.-E. Radulescu, L. Zhang, Z. Zhou, X. Luo [et al.] // *J. Funct. Biomater.* – 2022. – Vol. 13. – № 4. – P. 187.
44. Biswal, T. Biopolymers for tissue engineering applications: A review / T. Biswal // *Materials Today: Proceedings.* – 2019. – Vol. 41. – № 2. – P. 397-402.
45. Adhesion mechanism and application progress of hydrogels / Z. Xiao, Q. Li, H. Liu, Q. Zhao [et al.] // *Eur. Polym. J.* – 2022. – Vol. 173. – № 6. – P. 111277-111287.
46. Advancement of Biomaterial-Based Postoperative Adhesion Barriers / A. K. S. Chandel, A. Shimizu, K. Hasegawa, T. Ito // *Macromol Biosci.* – 2021. – Vol. 21. – № 3. – P. 1-34.
47. Current Strategies and Future Perspectives for Intraperitoneal Adhesion Prevention / C. Brochhausen, V. H. Schmitt, D. Hollemann, C. Tapprich [et al.] // *J Gastrointest Surg.* – 2012. – Vol. 16. – № 6. – P. 1256-1274.
48. Viable cryopreserved umbilical tissue (vCUT) reduces post-operative adhesions in a rabbit abdominal adhesion model / S. Dhall, T. Coksaygan, T. Ho, M. Moorman [et al.] // *Bioact Mater.* – 2018. – Vol. 4. – № 1. – P. 97-106.
49. Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications / M. C. Catoira, L. Fusaro, D. Di, F. Martina [et al.] // *J. Mater. Sci. – Mater. Med.* – 2019. – Vol. 30. – № 115. – P. 1-10.
50. Park, H. Biomaterials to Prevent Post-Operative Adhesion / H. Park, S. Baek, H. Kang. // *Materials.* – 2020. – Vol. 13. – № 14. – P. 1-26.
51. Biomaterials Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid-based hydrogels for postoperative adhesion prevention / L. Li, N. Wang, X. Jin, R. Deng [et al.] // *Biomater.* – 2014. – Vol. 35. – № 12. – P. 3903-3917.
52. Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks / X. Xu, A. K. Jha, D. A. Harrington, M. C. Farach-carson [et al.] // *Soft Matter.* – 2012. – № 12. – P. 3280-3294.
53. The Structure and Dynamics of Alginate Gels Crosslinked by Polyvalent Ions Probed via Solid State NMR Spectroscopy / J. Brus, M. Urbanová, J. Czernek, M. Pavelkova [et al.]. // *Biomacromolecules.* – 2017. – Vol. 18. – № 8. – P. 2478-2488.
54. Mechanical confinement regulates cartilage matrix formation by chondrocytes / H. P. Lee, L. Gu, D. J. Mooney, M. E. Levenston [et al.] // *Nat Mater.* – 2017. – Vol. 16. – № 12. – P. 1243-1251.
55. Spicer, C. D. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Polymer Chemistry importance of polymer choice / C. D. Spicer // *Polym. Chem.* – 2020. – Vol. 11. – № 2. – P. 184-219.

56. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development / A. Sorushanova, L. M. Delgado, Z. Wu, N. Shologu [et al.]. // *Adv Mater.* – 2019. – Vol. 31. – №1. – P. 1-39.
57. GelMA-collagen blends enable drop-on-demand 3D printability and promote angiogenesis / H. Stratesteffen, M. Köpf, F. Kreimendahl, A. Blaeser, [et al.]. // *Biofabrication.* – 2017. – Vol. 9. – №4. – P. 1-14.
58. Click-Crosslinked Injectable Gelatin Hydrogels / S. T. Koshy, R. M. Desai, P. Joly, J. Li [et al.]. // *Adv Healthc Mater.* – 2016. – Vol. 5. – №5. – P. 541-547.
59. Methods of Chitin Production a Short Review / C. L. Pighinelli, L. Pighinelli, J. Broquá, Z. Bg [et al.]. // *Am J Biomed Sci & Res.* – 2019. – Vol.3. – №4. – P. 307-314.
60. International Journal of Biological Macromolecules Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan / H. El Knidri, R. Belaabed, A. Addaou, A. Laajeb [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 120. – P. 1181-1189.
61. M. Kantak. Analysis of clinical trials on biomaterial and therapeutic applications of chitosan: A review / M. Kantak, S. Bharate // *Carbohydr Polym.* – 2022. – Vol. 278. – P. 118999- 11907.
62. An Overview of the Use of Equine Collagen as Emerging Material for Biomedical Applications / N. Gallo, M. L. Natali, A. Sannino, L. Salvatore. // *J Funct Biomater.* – 2020. – Vol.11. – №4. – P. 1181-1189.
63. Shi, J. PEG-based thermosensitive and biodegradable hydrogels / J. Shi, L. Yu, J. Ding // *Acta Biomater.* – 2021. – Vol.1. – №128. – P. 42-59.
64. Franco, P. The Use of Poly (N-vinylpyrrolidone) in the Delivery of Drugs: A Review / P. Franco, I. De Marco // *Polymers (Basel).* – 2020. – Vol.12. – №5. – P. 18-21.
65. Anisha, A. D. Expert Opinion on Drug Delivery Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications / A. D. Anisha, R. Shegokar // *Expert Opin Drug Deliv.* – 2016. – Vol. 13. – № 9. – P. 1257-1275.
66. Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation / P. Zhang, F. Sun, S. Liu, S. Jiang // *J. Controlled Release.* – 2016. – Vol. 244. – P. 184-193.
67. Wylon, K. Polyethylene glycol as a cause of anaphylaxis / K. Wylon, S. Dölle, M. Worm // *Allergy Asthma Clin Immunol.* – 2016. – Vol. 12. – № 67. – P. 1-3.
68. Effect of Inflammation on Endothelial Cells Induced by Poly-L-lactic Acid Degradation in vitro and in vivo / C. Dongping, S. Zhaobing, W. Linsheng, C. Longbin [et al.] // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 2018. – Vol. 29. – № 15. – P. 1909-1919.
69. Makadia, H. K. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier / H. K. Makadia, S. J. Siegel. // *Polymers (Basel).* – 2011. – Vol. 3. – №3. – P. 1377-1397.

70. Effect of particle size of an amorphous calcium phosphate filler on the mechanical strength and ion release of polymeric composites / S. Y. Lee, W. F. Regnault, J. M. Antonucci, D. Skrtic // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* – 2007. – Vol. 80. – № 1. – P. 11-17.
71. Kishan, A. P. Recent advancements in electrospinning design for tissue engineering applications: A review / A. P. Kishan, E. M. Cosgriff-Hernandez // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2017. – Vol. 105. – № 10. – P. 2892-2905.
72. Kai, D. Biodegradable polymers for electrospinning: Towards biomedical applications / D. Kai, S. S. Liow, X. J. Loh // *Mater. Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.* – 2014. – Vol. 45. – P. 659-670.
73. Electrospinning for tissue engineering applications / M. Rahmati, D. K. Mills, A. M. Urbanska, M. R. Saeb [et al.] // *Prog. Mater Sci.* – 2021. – Vol. 117. – P. 1-101.
74. Electrospun scaffolds for bone tissue engineering / A. Di Martino, L. Liverani, A. Rainer, G. Salvatore [et al.] // *Musculoskelet Surg.* – 2011. – Vol. 95. – № 2. – P. 69-80.
75. Nathanael, A. J. Encapsulation of calcium phosphates on electrospun nanofibers for tissue engineering applications / A. J. Nathanael, T. H. Oh // *Crystals.* – 2021. – Vol. 11. – № 2. – P. 1-23.
76. Hu, K. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration / K. Hu, B. R. Olsen // *Bone.* – 2016. – Vol. 91. – P. 30-38.
77. Salles, T. H. C. Electrospinning of gelatin/poly (vinyl pyrrolidone) blends from water/acetic acid solutions / T. H. C. Salles, C. B. Lombello, M. A. D'Ávila // *Mater. Res.* – 2015. – Vol. 18. – № 3. – P. 509-518.
78. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds / C. Wang, W. Huang, Y. Zhou, L. He [et al.] // *Bioact. Mater.* – 2020. – Vol. 5. – № 1. – P. 82-91.
79. Highley, C. B. 3D Bioprinting in Medicine: Technologies, Bioinks, and Applications. 3D Bioprinting Med. Technol. Bioinks, Appl. / C. B. Highley; ed. M. Guverdiren. – Springer, 2019. – 1-209 p.
80. 3D Printing of Gelatine/Alginate/ β -Tricalcium Phosphate Composite Constructs for Bone Tissue Engineering / C. Kalkandelen, S. Ulag, B. Ozbek, G. O. Eroglu [et al.] // *ChemistrySelect.* – 2019. – Vol. 4. – № 41. – P. 12032-12036.
81. Preparation and properties of 3D printed alginate-chitosan polyion complex hydrogels for tissue engineering / Q. Liu, Q. Li, S. Xu, Q. Zheng [et al.] // *Polymers.* – 2018. – Vol. 10. – № 6.
82. 3D-Cultivation of bone marrow stromal cells on hydroxyapatite scaffolds fabricated by dispense-plotting and negative mould technique / R. Detsch, F. Uhl, U. Deisinger, G. Ziegler // *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* – 2008. – Vol. 19. – № 4. – P. 1491-1496.
83. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency / J. M.

- Sobral, S. G. Caridade, R. A. Sousa, J. F. Mano [et al.] // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7. – № 3. – P. 1009-1018.
84. Highly filled poly (l-lactic acid)/hydroxyapatite composite for 3D printing of personalized bone tissue engineering scaffolds / G. Dubinenko, A. Zinoviev, E. Bolbasov, A. Kozelskaya [et al.] // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2021. – Vol. 138. – № 2.
85. Polymeric membranes for guided bone regeneration / P. Gentile, V. Chiono, C. Tonda-Turo, A. M. Ferreira [et al.] // *Biotechnol. J.* – 2011. – Vol. 6. – № 10. – P. 1187-1197.
86. Periosteum tissue engineering - A review / N. Li, J. Song, G. Zhu, X. Li [et al.] // *Biomater. Sci.* – 2016. – Vol. 4. – № 11. – P. 1554-1561.
87. Biodegradable Polymeric Films and Membranes Processing and Forming for Tissue Engineering / R. Suntornnond, J. An, W. Y. Yeong, C. K. Chua // *Macromolecular Materials and Engineering.* – 2015. – Vol. 300. – № 9. – P. 858-877.
88. S. Ber. Bone tissue engineering on patterned collagen films: An in vitro study / S. Ber, G. Torun Köse, V. Hasirci // *Biomater.* – 2005. – Vol. 26. – № 14. – P. 1977-1986.
89. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane / Y. Ueyama, K. Ishikawa, T. Mano, T. Koyama [et al.] // *Biomater.* – 2002. – Vol. 23. – № 9. – P. 2027-2033.
90. Mandibular segmental defect regenerated with macroporous biphasic calcium phosphate, collagen membrane, and bone marrow graft in dogs / F. Jégoux, E. Goyenvallée, R. Cognet, O. Malard [et al.] // *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* – 2010. – Vol. 136. – № 10. – P. 971-978.
91. Hydrogel foams from liquid foam templates: Properties and optimisation / I. Ben Djemaa, S. Auguste, W. Drenckhan-Andreata, S. Andrieux // *Adv. Colloid. Interface Sci.* – 2021. – Vol. 294. – P. 13-22.
92. Hernández-González, A. C. Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A review / A. C. Hernández-González, L. Téllez-Jurado, L. M. Rodríguez-Lorenzo // *Carbohydr. Polym.* – 2020. – Vol. 229. – P. 1-52.
93. Łabowska, M. B. Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field - A review / M. B. Łabowska, I. Michalak, J. Detyna // *Open Chemistry.* – 2019. – Vol. 17. – № 1. – P. 738-762.
94. Biosorbents for removing hazardous metals and metalloids / K. Inoue, D. Parajuli, K. N. Ghimire, B. K. Biswas [et al.] // *Materials (Basel).* – 2017. – Vol. 10. – № 8. – P. 1-33.
95. Zhang, M. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management / M. Zhang, X. Zhao // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 162. – P. 1414-1428.
96. Prevention of postsurgical adhesions using an ultrapure alginate-based gel. / A. A. Chaturvedi, R. M. Lomme, T. Hendriks, H. van Goor // *Br J Surg.* – 2013. – Vol. 100. – № 7. – P. 904-910.

97. Axpe, E. Applications of Alginate-Based Bioinks in 3D Bioprinting / E. Axpe, M. L. Oyen. // *Int J Mol Sci.* – 2016. – Vol. 17. – №12. – P. 1-33.
98. 3D bioprinting of soft materials-based regenerative vascular structures and tissues / Z. Zhang, B. Wang, D. Hui, J. Qiu [et al.] // *Composites Part B.* – 2017. – Vol. 17. – P. 279-291.
99. Abdollahiyan, P. Hydrogel-Based 3D Bioprinting for Bone and Cartilage Tissue Engineering / P. Abdollahiyan, F. Oroojalian, A. Mokhtarzadeh. // *Biotechnol. J.* – 2020. – Vol. 15. – №12. – P. 1-16.
100. Alginate composites for bone tissue engineering: A review / J. Venkatesan, I. Bhatnagar, P. Manivasagan, K. Kang [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2014. – Vol. 72. – P. 269-281.
101. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry / J. Sasaki, G. L. Abe, A. Li, P. Thongthai [et al.] // *Biomater. Investig. Dent.* – 2021. – Vol. 8. – № 1. – P. 54-63.
102. A. Iglesias-Mejuto. 3D-printed alginate-hydroxyapatite aerogel scaffolds for bone tissue engineering / A. Iglesias-Mejuto, C. A. García-gonz. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* – 2021. – Vol. 131. – №10. – P. 1-9.
103. Biocompatible Biodegradable Composite Materials in the Biopolymer – Calcium Phosphate System for Replacing Osteochondral Defects / A. Y. Teterina, V. E. Fetisova, A. Y. Fedotov, A. A. Egorov [et al.]. // *Inorg. Mater.* – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 242-249.
104. Gelation and biocompatibility of injectable alginate-calcium phosphate gels for bone regeneration / D. Alves Cardoso, J. J. J. P. Van Den Beucken, L. L. H. Both, J. Bender [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. A. - Part A.* – 2014. – Vol. 102. – № 3. – P. 808-817.
105. Physical and mechanical properties of alginate based composite gels / T. Ramdhan, S. Hung, S. Prakash, B. Bhandari // *Trends in Food Science & Technology.* – 2020. – Vol. 106. – № 7. – P. 150-159.
106. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering / H. L. Kim, G. Y. Jung, J. H. Yoon, J. S. Han [et al.] // *Mater. Sci. Eng., C.* – 2015. – Vol. 54. – P. 20-25.
107. Development and investigation of novel alginate-hyaluronic acid bone fillers using freeze drying technique for orthopedic field / S. Jamnezhad, A. Asefnejad, M. Motififard, H. Yazdekhashti [et al.] // *Nanomed. Res. J.* – 2020. – Vol. 5. – № 4. – P. 306-315.
108. S. Bendtsen. Development of a novel alginate-polyvinyl alcohol-hydroxyapatite hydrogel for 3D bioprinting bone tissue engineered scaffolds / S. T. Bendtsen, S. P. Quinnell, M. Wei // *J Biomed Mater Res A.* – 2017. – Vol. 105. – № 5. – P. 1457-1468.

109. Impact of Hydrophilic Modification of Synthetic Dialysis Membranes on Hemocompatibility and Performance / A. M. Zawada, T. Lang, B. Ottlinger, F. Kircelli [et al.] // *Membranes* (Basel). – 2022. – Vol. 12. – №10. – P. 1-16.
110. Multifunctional Role of Polyvinylpyrrolidone in Pharmaceutical Formulations / Y. Luo, Y. Hong, L. Shen, F. Wu [et al.] // *AAPS PharmSciTech.* – 2021. – Vol. 22. – №1. – P. 1-16.
111. W. Schwarz. PVP: A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone (Povidone) / W. Schwarz. CRC Press. –1990. – 232 p.
112. M. Teodorescu. Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges / M. Teodorescu, M. Bercea, S. Morariu // *Biotechnol Adv.* – 2019. – Vol. 37. – №1. – P. 109-131.
113. In situ approach induced growth of highly monodispersed Ag nanoparticles within free standing PVA/PVP films / W. H. Eisa, Y. K. Abdel-moneam, A. A. Shabaka, A. Elhameed [et al.] // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2012. – Vol. 95. – P. 341-346.
114. Fast and long-acting antibacterial properties of chitosan-Ag/polyvinylpyrrolidone nanocomposite films / B. L. Wang, X. S. Liu, Y. Ji, K. F. Ren [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – Vol. 90. – № 1. – P. 8-15.
115. Fabrication of chitosan/polyvinylpyrrolidone hydrogel scaffolds containing PLGA microparticles loaded with dexamethasone for biomedical applications / S. Saeedi Garakani, S. M. Davachi, Z. Bagher, A. Heraji Esfahani [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 164. – P. 356-370.
116. Properties of the methyl cellulose-polyvinylpyrrolidone binary system in solution and in the solid state / L. I. Kutsenko, Y. G. Santuryan, E. B. Karetnikova, I. V. Gofman [et al.] // *Russ. J. Appl. Chem.* – 2007. – Vol. 80. – № 5. – P. 771-776.
117. Structural, optical, thermal and electrical studies on PVA/PVP blends filled with lithium bromide / E. M. Abdelrazek, I. S. Elashmawi, A. El-khodary, A. Yassin // *Curr. Appl. Phy.* – 2010. – Vol. 10. – № 2. – P. 607-613.
118. Cassu, S. N. Poly (vinyl alcohol) and poly (vinyl pyrrolidone) blends: miscibility, microheterogeneity and free volume change / S. N. Cassu // *Polymer.* – 1997. – Vol. 38. – № 15. – P. 3907-3911.
119. Bernal, A. Preparation and Characterization of Poly (vinyl alcohol) -poly (vinyl pyrrolidone) Blend: A Biomaterial with Latent Medical Applications / A. Bernal, I. Kuritka, P. Saha // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2012. – Vol. 127. – № 5. – P. 3560-3568.
120. Fabrication of a novel partially dissolving polymer microneedle patch for transdermal drug delivery / H. Lee, J. He, M. Tsai, K. Lin. // *J. Mater. Chem.* – 2015. – Vol. 3. – № 2. – P. 276–285.

121. Novel PVP/PVA hydrogels for articular cartilage replacement / R. Ma, D. Xiong, F. Miao, J. Zhang [et al.] // *Mater. Sci. Eng., C*. – 2009. – Vol. 29. – № 6. – P. 1979-1983.
122. Temperature and Solvent Facilitated Extrusion Based 3D Printing for Pharmaceuticals / F. Dores, M. Kuzminska, C. Soares, M. Bohus [et al.] // *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* – 2020. – Vol. 152. – P. 1-25.
123. A PVA / PVP hydrogel for human lens substitution: Synthesis, rheological characterization, and in vitro biocompatibility / G. Leone, M. Consumi, G. Greco, C. Bonechi [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* – 2011. – Vol. 97. – № 2. – P. 278-288.
124. H. L. Abd El-Mohdy. Biodegradability, antimicrobial activity and properties of PVA/PVP hydrogels prepared by γ -irradiation / H. L. Abd El-Mohdy, S. Ghanem // *J. Polym. Res.* – 2009. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-10.
125. High performances of dual network PVA hydrogel modified by PVP using borax as the structure-forming accelerator / M. Huang, Y. Hou, Y. Li, D. Wang [et al.] // *Des. Monomers. Polym.* – 2017. – Vol. 20. – № 01. – P. 505-513.
126. Optimization of Oligomer Chitosan/Polyvinylpyrrolidone Coating for Enhancing Antibacterial, Hemostatic Effects and Biocompatibility of Nanofibrous Wound Dressing / V. K. Doan, C. M. Tran, T. T. P. Ho, L. K. K. Nguyen [et al.] // *Polymers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14. – № 17. – P. 1-18.
127. Miscibility and Phase Structure of Binary Blends of Polylactide and Poly(vinylpyrrolidone) / G. Zhang, J. Zhang, X. Zhou, D. Shen // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2003. – Vol. 88. – P. 973–979.
128. Synthesis of novel amphiphilic block copolymers of poly-N-vinylpyrrolidone and poly(D, L-lactide) by atom transfer radical polymerization / S. Shi, J. Liu, Y. Xia, S. Jiao [et al.] // *Adv. Mater. Res.* – 2006. – Vol. 11-12. – P. 461-464.
129. A. Benahmed. Novel Polymeric Micelles Based on the Amphiphilic Diblock Copolymer poly(D, L-lactide) / A. Benahmed, M. Ranger, J. Leroux // *Pharm. res.* – 2001. – Vol. 18. – № 3. – P. 2-7.
130. Synthesis and characterization of gelatin-PVP polymer composite scaffold for potential application in bone tissue engineering / R. Mishra, R. Varshney, N. Das, D. Sircar [et al.] // *Eur. Polym. J.* – 2019. – Vol. 119. – №7. – P. 155-168.
131. Bertrand P. Electron paramagnetic resonance spectroscopy: application / Bertrand P. – Springer. – 2022. – 454 p.
132. Structure of alginate gels: Interaction of diuronate units with divalent cations from density functional calculations / P. Agulhon, V. Markova, M. Robitzer, F. Quignard [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2012. – Vol. 13. – № 6. – P. 1899-1907.
133. Effect of Ca^{2+} , Ba^{2+} , and Sr^{2+} on alginate microbeads / Ý. A. Mørch, I. Donati, B. L. Strand, G. Skjåk-Bræk // *Biomacromolecules*. – 2006. – Vol. 7. – № 5. – P. 1471-1480.

134. Lattner, D. ¹³C-NMR study of the interaction of bacterial alginate with bivalent cations / D. Lattner, H. C. Flemming, C. Mayer // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2003. – Vol. 33. – № 1-3. – P. 81-88.
135. ГОСТ 2409-2014. Огнеупоры. Метод определения кажущейся плотности, открытой и общей пористости, водопоглощения. - М.: Стандартинформ, 2014. - 10 с.
136. ГОСТ ISO 10993-12-2015. Изделия медицинские. Оценка биологического действия. Приготовление проб и контрольные образцы. - М.: Стандартинформ, 2015. - 24 с.
137. ГОСТ ИСО 10993.5-99-Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. - М.: Госстандарт России, 1999. - 16 с.
138. Prevention of postoperative adhesions by biodegradable cryogels from pectin and chitosan polysaccharides / M. V Konovalova, P. A. Markov, G. Y. Popova, I. R. Nikitina [et al.] // *J. of Bioact. Comp. Polym.* – 2017. – Vol. 32. – № 5. – P. 487-502.
139. A novel biocompatible conducting polyvinyl alcohol (PVA) - polyvinylpyrrolidone (PVP) -hydroxyapatite (HAP) composite scaffolds for probable biological application / B. Chaudhuri, B. Mondal, S. K. Ray, S. C. Sarkar // *Colloids Surf., B.* – 2016. – Vol. 143. – P. 71-80.
140. Bioactive composites of hydroxyapatite/polyvinylpyrrolidone for bone regeneration applications / Y. Guesmi, H. Agougui, M. Jabli, A. M. Alsharabasy // *Chem. Eng. Commun.* – 2019. – Vol. 206. – № 3. – P. 279-288.
141. Preparation of the sodium alginate-g- (polyacrylic acid-co-allyltrimethylammonium chloride) polyampholytic superabsorbent polymer and its dye adsorption property / S. Tang, Y. Zhao, H. Wang, Y. Wang [et al.] // *Mar. Drugs.* – 2018. – Vol. 16. – № 12. – P. 476-496.
142. Mason, H. E. Solid-state NMR study of the role of H and Na in AB-type carbonate hydroxylapatite / H. E. Mason, A. Kozlowski, B. L. Phillips // *Chem. Mater.* – 2008. – Vol. 20. – № 1. – P. 294-302.
143. DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components / Y. Ji, X. Yang, Z. Ji, L. Zhu [et al.] // *ACS Omega.* – 2020. – Vol. 5. – № 15. – P. 8572-8578.
144. Electron spin resonance and infrared spectroscopy study of the polyvinylpyrrolidone-C60 composite / Y. H. Chen, I. I. Khairullin, M. P. Suen, L. P. Hwang // *Fullerene Sci. Technol.* – 1999. – Vol. 7. – № 5. – P. 807-823.
145. Investigation of the interaction between polyvinylpyrrolidone and metal cations / M. Liu, X. Yan, H. Liu, W. Yu // *React. Funct. Polym.* – 2000. – Vol. 44. – № 1. – P. 55-64.
146. Metal – carboxylate interactions in metal – alginate complexes studied with FTIR spectroscopy / S. K. Papageorgiou, E. P. Kouvelos, E. P. Favvas, A. A. Sapalidis [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 2010. – Vol. 345. – № 4. – P. 469-473.

147. Conventional, pulsed and high-field electron paramagnetic resonance for studying metal impurities in calcium phosphates of biogenic and synthetic origins / B. Gabbasov, M. Gafurov, A. Starshova, D. Shurtakova [et al.] // *J. Magn. Magn. Mater.* – 2019. – Vol. 470. – P. 109-117.
148. NO_3^{2-} -centers in synthetic hydroxyapatite / I. P. Vorona, S. S. Ishchenko, N. P. Baran, V. V. Rudko [et al.] // *Phys. Solid State.* – 2010. – Vol. 52. – № 11. – P. 2364-2368.
149. Effect of pre-annealing on NO_3^{2-} centers in synthetic hydroxyapatite / V. V. Nosenko, I. P. Vorona, S. S. Ishchenko, N. P. Baran [et al.] // *Radiat. Meas.* – 2012. – Vol. 47. – № 10. – P. 970-973.
150. Fattibene, P. EPR dosimetry with tooth enamel: A review / P. Fattibene, F. Callens // *Appl. Radiat. Isot.* – 2010. – Vol. 68. – № 11. – P. 2033-2116.
151. A DFT, X- and W-band EPR and ENDOR study of nitrogen-centered species in (Nano)hydroxyapatite / M. Gafurov, T. Biktagirov, G. Mamin, S. Orlinskii // *Appl. Magn. Reson.* – 2014. – Vol. 45. – № 11. – P. 1189-1203.
152. Yesinowski, J. P. Hydrogen Environments in Calcium Phosphates: ^1H MAS NMR at High Spinning Speeds. / J. P. Yesinowski, H. Eckert // *J. Am. Chem. Soc.* – 1987. – Vol. 109. – № 21. – P. 6274-6282.
153. Sodium alginate solutions: correlation between rheological properties and spinnability / A. Doderò, S. Vicini, M. Alloisio, M. Castellano // *J. Mater. Sci.* – 2019. – Vol. 54. – № 10. – P. 8034-8046.
154. Studies on the viscosity behavior of polymer solutions at low concentrations / H. Yang, Y. Yan, P. Zhu, H. Li [et al.] // *Eur. Polym. J.* – 2005. – Vol. 41. – № 2. – P. 329-340.
155. Polyelectrolyte and non-polyelectrolyte polyacrylamide copolymer solutions: The role of salt on the intra- and intermolecular interactions / A. M. S. Maia, M. A. Villetti, R. Borsali, R. C. Balaban // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 24. – № 11. – P. 1871-1879.
156. Mann, B. A. Swelling of polyelectrolyte networks / B. A. Mann, C. Holm, K. Kremer // *J. Chem. Phys.* – 2005. – Vol. 122. – № 15. – P. 1-15.
157. Szabó, L. Strategies to functionalize the anionic biopolymer na-alginate without restricting its polyelectrolyte properties / L. Szabó, S. Gerber-Lemaire, C. Wandrey // *Polymers (Basel)*. – 2020. – Vol. 12. – № 4. – P. 919-943.
158. Aggregation Kinetics of Alginate-Coated Hematite Nanoparticles in Monovalent and Divalent Electrolytes / X. G. Chen, J. P. Li, Z. J. Li, B. De Chen [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2006. – Vol. 26. – № 5. – P. 1516-1522.
159. Preparation and characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles stabilized by alginate / H. li Ma, X. Qi, Y. Maitani, T. Nagai // *Int. J. Pharm.* – 2007. – Vol. 333. – № 1-2. – P. 177-186.

160. Barbetta, A. Porous alginate hydrogels: Synthetic methods for tailoring the porous texture / A. Barbetta, E. Barigelli, M. Dentini // *Biomacromolecules*. – 2009. – Vol. 10. – № 8. – P. 2328-2337.
161. Influence of solids concentration and solid / polymer interaction on the apparent viscosity of drilling fluids / V. Gabriel, D. P. Saide, B. Rosas [et al.] // *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. – 2021. – Vol. 38. – № 1. – P. 47-60.
162. ¹³C NMR and molecular modeling studies of alginic acid binding with alkaline earth and lanthanide metal ions / C. M. Deramos, A. E. Irwin, J. L. Nauss, B. E. U. Stout. // *Inorg. Chim. Acta*. – 1997. – Vol. 256. – P. 69-75.
163. An examination of sodium alginate from Sargassum by NMR spectrometry / F. Lianes, F. Sauriol, F. G. Morin, A. S. Perlin // *Can. J. Chem.* – 1997. – Vol. 13. – № 1. – P. 104-116.
164. Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems / G. A. Paredes Juárez, M. Spasojevic, M. M. Faas, P. de Vos // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 2. – №8. – P. 1-15.
165. Interaction between alginates and manganese cations: Identification of preferred cation binding sites / N. Emmerichs, J. Wingender, H. C. Flemming, C. Mayer // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2004. – Vol. 34. – № 1-2. – P. 73-79.
166. Structure of alginate gels: Interaction of diuronate units with divalent cations from density functional calculations / S. K. Bajpai, S. Sharma, I. Braccini, S. Pérez [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2004. – Vol. 13. – № 4. – P. 1899-1907.
167. Strontium ion substituted alginate-based hydrogel fibers and its coordination binding model / X. Zhang, L. Wang, L. Weng, B. Deng // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2020. – Vol. 137. – № 16. – P. 1-9.
168. NMR Analysis of Non-Hydrolyzed Samples of Sodium Alginate / C. Santi, D. Coppetta, S. Santoro, G. Basta [et al.]. // 12th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry ECSOC-12 (1-10 November 2008) – 2008. – P. 1268-1273.
169. Hari, D. A DFT study on Ca-Alginate interactions with divalent transition metals / D. Hari, A. Kannan // *Mater. Today*. – 2022. – Vol. 62. – №7. – P. 1532-1543.
170. Conventional electron paramagnetic resonance of Mn²⁺ in synthetic hydroxyapatite at different concentrations of the doped manganese / F. Murzakhanov, G. Mamin, A. Voloshin, E. Klimashina [et al.] // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2018. – Vol. 155. – № 1. – P. 0-5.
171. Kozlevčar, B. Structural analysis of a series of copper(II) coordination compounds and correlation with their magnetic properties / B. Kozlevčar, P. Šegedin // *Croat. Chem. Acta*. – 2008. – Vol. 81. – № 2. – P. 369-379.
172. Rui Rodrigues, J. Copper ions binding in Cu-alginate gelation / J. Rui Rodrigues, R. Lagoa // *J. Carbohydr. Chem.* – 2006. – Vol. 25. – № 2-3. – P. 219-232.

173. Zhang, W. Porous polyelectrolytes: charge pores for more functionalities / W. Zhang, Q. Zhao, J. Yuan // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2018. – Vol. 57. – № 23. – P. 6754-6773.
174. Layer-by-layer assembly of salt-containing polyelectrolyte complexes for the fabrication of dewetting-induced porous coatings / L. Zhang, M. Zheng, X. Liu, J. Sun // *Langmuir*. – 2011. – Vol. 27. – № 4. – P. 1346-1352.
175. Effects of ionic crosslinking on physical and mechanical properties of alginate mulching films / G. Liling, Z. Di, X. Jiachao, G. Xin [et al.] // *Carbohydr. Polym.* – 2016. – Vol. 136. – P. 259-265.
176. Dragan, E. S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. A review / E. S. Dragan // *Chem. Eng. J.* – 2017. – Vol. 243. – № October. – P. 572-590.
177. Fabrication of Microporous Thin Films from Polyelectrolyte Multilayers / J. D. Mendelsohn, C. J. Barrett, V. V Chan, A. J. Pal [et al.]. // *Langmuir*. – 2000. – № 10. – P. 5017-5023.
178. Novel Hydrogels of PVP–CMC and Their Swelling Effect on Viscoelastic Properties / N. Roy, N. Saha, T. Kitano, P. Saha // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2010. – Vol. 117. – № 5. – P. 1703-1710.
179. Controlling pore structure of polyelectrolyte multilayer nanofiltration membranes by tuning polyelectrolyte-salt interactions / R. M. Duchanois, R. Epsztein, J. A. Trivedi, M. Elimelech // *J. Membr. Sci.* – 2019. – Vol. 581. – № March. – P. 413-420.
180. Toomey, R. Swelling behavior of thin, surface-attached polymer networks / R. Toomey, D. Freidank, J. Rühle // *Macromolecules*. – 2004. – Vol. 37. – № 3. – P. 882-887.
181. Poly (N-vinyl pyrrolidone) - Calcium Alginate (PVP - Ca-alg) Composite Hydrogels: Physical Properties and Activated Sludge Immobilization for Wastewater Treatment / M. Doria-Serrano, G. Riva-Palacio, F. A. Ruiz-Treviño, M. Hernández-Esparza // *Ind. Eng. Chem. Res.* – 2002. – Vol. 41. – № 13. – P. 3163-3168.
182. Кудрявцева, С. Е. Особенности деформирования полимеров, образующих жидкокристаллическую фазу, при кратковременном и длительном нагружении / С. Е. Кудрявцева, В. В. Коврига // *Высокомолекулярные соединения Серия А*. – 1995. – Т. 37. – № 4. – С. 628-632.
183. Galeski, A. Strength and toughness of crystalline polymer systems / A. Galeski // *Prog. Polym. Sci.* – 2003. – Vol. 28. – № 12. – P. 1643-1699.
184. Çaykara, T. Thermal, spectroscopic, and mechanical properties of blend films of poly(N-Vinyl-2-Pyrrolidone) and sodium alginate / T. Çaykara, S. Demirci, Ö. Kantoğlu // *Polym. Plast. Technol. Eng.* – 2007. – Vol. 46. – № 7. – P. 737-741.

185. Брык, М. Т. Деструкция наполненных полимеров / М. Т. Брык. – Москва: Химия, 1989. – 192с.
186. Thermal stability increases in metallic nanoparticles-loaded cellulose nanocrystal nanocomposites / U. Goikuria, A. Larrañaga, J. L. Vilas, E. Lizundia // *Carbohydr. Polym.*. – 2017. – Vol. 171. – P. 193-201.
187. R. Russo. Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginate films / R. Russo, M. Malinconico, G. Santagata // *Biomacromolecules*. – 2007. – Vol. 8. – № 10. – P. 3193-3197.
188. C. Ardiles. Theoretical study for determining the type of interactions between a GG block of an alginate chain with metals Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} / C. Ardiles, C. Rodríguez // *Arab. J. Chem.* – 2021. – Vol. 14. – № 10. – P. 1-18.
189. Overview and comparison of modelling methods for foams / A. Hössinger-Kalteis, M. Reiter, M. Jerabek, Z. Major // *J. Cell. Plastics*. – 2021. – Vol. 57. – № 6. – P. 951-1001.
190. Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering / N. Annabi, J. W. Nichol, X. Zhong, C. Ji [et al.] // *Tissue Eng.* – 2010. – Vol. 16. – № 4. – P. 371-383.
191. Ice-templating hydrogels with high concentrations of cellulose nanofibers to produce architected cellular materials for structural applications / L. Orgéas, S. Gupta, F. Martoia, J. Dumont // *Mater. Des.* – 2022. – Vol. 223. – P. 1-13.
192. Shutov, F. A. Foamed polymers. cellular structure and properties / F. A. Shutov. // *Industrial Develop.* – 2005. – 155-218 p.
193. Cunningham, A., & Hilyard, N. C. Physical behaviour of polymeric foams — An overview / N. C. Cunningham, A., & Hilyard // *Low density cellular plastics*. – Springer, Dordrecht, 1994. – 1-21 p.
194. Accelerated Aging on the Compression Properties of a Green Polyurethane Foam: Experimental and Numerical Analysis / E. H. P. Da Silva, S. De Barros, A. F. C. Vieira, R. R. C. Da Costa [et al.] // *Polymers*. – 2023. – Vol. 15. – № 7. – P. 1-18.
195. Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds / A. S. P. Lin, T. H. Barrows, S. H. Cartmell, R. E. Guldberg // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – № 3. – P. 481-489.
196. Mechanical confinement regulates cartilage matrix formation by chondrocytes / H. P. Lee, L. Gu, D. J. Mooney, M. E. Levenston [et al.] // *Nature Mater.* – 2017. – Vol. 16. – № 12. – P. 1243-1251.
197. Lin, H. R. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and in vitro studies / H. R. Lin, Y. J. Yen // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2004. – Vol. 71. – № 1. – P. 52-65.

198. Wong, T. Y. Alginate lyase: Review of Major Sources and Enzyme Characteristics, Structure-Function Analysis, Biological Roles / T. Y. Wong, L. A. Preston, N. L. Schiller. // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2000. – Vol. 54. – P. 289-340.
199. Characteristics and applications of alginate lyases: A review / D. Cheng, C. Jiang, J. Xu, Z. Liu [et al.] // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 164. – P. 1304-1320.
200. Peptide-incorporated 3D porous alginate scaffolds with enhanced osteogenesis for bone tissue engineering / Z. Luo, Y. Yang, Y. Deng, Y. Sun [et al.] // *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* – 2016. – Vol. 143. – P. 243-251.
201. Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts, which are bone resorbing cells / T. Kameda, H. Mano, Y. Yamada, H. Takai [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – Vol. 245. – № 2. – P. 419-422.

ПРИЛОЖЕНИЕ

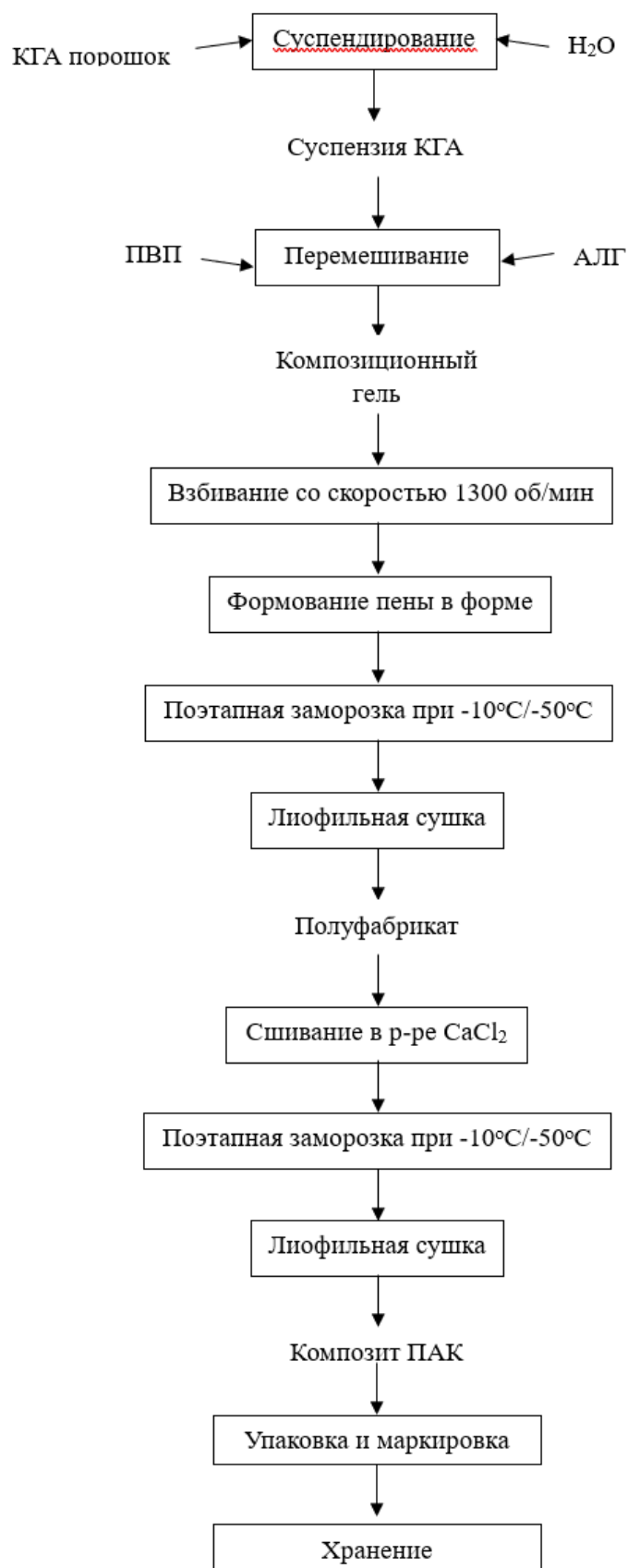


Схема 1. Схема получения композиционного материала ПАК

Публикации по теме диссертации

Публикации в ведущих периодических изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ:

1. Композиционные минерал-полимерные материалы, содержащие катион замещенные фосфаты кальция. – Текст: непосредственный / **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**, Слукин П.В. [и др.] // Перспективные материалы. – 2022. – Т. 7. – С. 35-48. (перев.: Composite Mineral–Polymer Materials with Cation-Substituted Calcium Phosphates / **A. Forysenkova (Grechishnikova) A.A.**, Slukin P.V., Trofimchuk E.S. [et al.]. // Inorg. Mater. – 2023. – Vol. 14. – № 2. – P.331-340.)
2. Пористые матрицы на основе поливинилпирролидона, содержащие фосфаты кальция, для медицинских применений / Фадеева И.В., **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**, Гафуров М.Ф. [и др.]. // Известия Академии Наук. Серия Химическая. – 2022. – Т. 3. – С.543-548. (перев.: Porous matrixes based on polyvinylpyrrolidone containing calcium phosphates for medical application / Fadeeva I.V., **Forysenkova (Grechishnikova) A.A.**, Gafurov M.R. [et.al]. // Russ. Chem. Bull. – 2022. – Vol. 71. – № 3. – P. 543-548.)
3. Polyvinylpyrrolidone–Alginate Film Barriers for Abdominal Surgery: Anti-Adhesion Effect in Murine Model / **Forysenkova (Grechishnikova) A.A.**, Konovalova M.V., Fadeeva I.V. [et al.]. // Materials (Basel). –2023. – Vol. 16. – № 16. P.1-17.
4. Polyvinylpyrrolidone—Alginate—Carbonate Hydroxyapatite Porous Composites for Dental Applications / **Forysenkova (Grechishnikova) A.A.**, Fadeeva I.V., Deyneko D.V. [et al.] // Materials (Basel). –2023. –Vol. 16. – № 12. –P. 1-16.
5. NMR and EPR Spectroscopies Investigation of Alginate Cross-Linking by Divalent Ions / **Forysenkova (Grechishnikova) A.A.**, Ivanova V.A., Fadeeva I.V. [et al.]. // Materials. – 2023. – Vol. 16. – № 7. – P. 1-11.
6. Magnetic Resonance-Based Analytical Tools to Study Polyvinylpyrrolidone–Hydroxyapatite Composites / Petrova A., Mamin G., Gnezdilov, O., Fadeeva, I., Antonova, O., **Forysenkova (Grechishnikova) A.** [et al.] // Polymers. – 2023. – Vol. 15. – №22. P. 1-15.

7. Влияние состава на вязкость растворов и структуру высокопористых композиционных материалов альгинат–поливинилпирролидон–карбонатгидроксиапатит/ **Гречишникова А. А.**, Трофимчук Е. С., Егоров А. А. [и др.]. // Перспективные материалы. – 2025. – № 11. – С. 17–28. (перев.: Effect of Composition on Viscosity of Solutions and Structure of Highly Porous Composite Materials of Alginate Polyvinylpyrrolidone-Carbonate Hydroxyapatite/ **Grechishnikova (Forysenkova) A.A.**, Trofimchuk E.S., Egorov A.A. [et.al]. // Inorg. Mater. – 2026. – Vol. 17. – № 2. – P. 374–383.)

Патенты:

1. Способ получения высокопористых композиционных материалов на основе биополимеров с фосфатами кальция для медицины/ **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**, Егоров А.А., Трофимчук Е.С. [и др.]. // Патент РФ № 2854380. Опубл. 22.05.2024

Тезисы докладов:

1. Получение и биологические свойства смесевых пленок на основе поливинилпирролидона с фосфатами кальция / **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**, Павлова М.В., И.В. Фадеева И.В. [и др.]. // XI Конференция молодых ученых по общей и неорганической химии. Тезисы докладов. – Москва, ИОНХ РАН, 2021. С. 189.
2. **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**/ Композиционные материалы на основе биополимеров с карбонатгидроксиапатитом для хирургии костной ткани - Текст: электронный/ XVIII Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов». Тезисы докладов. – Москва, ИМЕТ РАН, 2021. С. 195-197.
3. Материалы на основе катион-замещенных трикальций фосфатов с антибактериальными свойствами для хирургии костной ткани/ **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**, Фадеева И.В., Горемыкина Е.В., [и др.]. // XII конференция молодых ученых по общей и неорганической химии. Тезисы докладов. – Москва, ИОНХ РАН, 2022, С. 156.
4. Композиционные материалы на основе катион-замещенных трикальций фосфатов с антибактериальными свойствами/ **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**, Слукин П.В., Давыдова Г.А., [и др.]. // Международная научная

- конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2022». Тезисы докладов. – Москва, МГУ, 2022. С. 893.
5. **Форысенкова (Гречишникова) А.А.** / Композиционные материалы на основе биополимеров с антибактериальными свойствами для медицины. // Сборник трудов XIX Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов». Тезисы докладов. – Москва, ИМЕТ РАН, 2022. С. 187.
 6. **Форысенкова (Гречишникова) А.А.** / Исследование ионного сшивания альгината методом жидкостной спектроскопии ЯМР/ Форысенкова А.А., Иванова В.А. // XXVI Всероссийская конференция молодых ученых-химиков. Тезисы докладов. – Нижний Новгород, ННГУ, 2023. С. 517.
 7. Исследование сшивания альгината бивалентными ионами с помощью ^1H ЯМР и ЭПР спектроскопии/ **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**, Иванова В.А., Мамин Г.В., [и др.]. // 65 Всероссийская научная конференция МФТИ в честь 115-летия Л.Д. Ландау. Тезисы докладов. – Москва, МФТИ, 2023. С. 320.
 8. **Форысенкова (Гречишникова) А.А.** / Композиционный материал поливинилпирролидон–альгинат–карбонатгидроксиапатит для применения в стоматологии // XX Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов». Тезисы докладов. – Москва, ИМЕТ РАН, 2023. С. 180.
 9. Биосовместимые пористые композиционные материалы на основе альгината-поливинилпирролидона-карбонатгидроксиапатита/ **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**, Трофимчук Е.С., Егоров А.А., Антонова О.С., [и др.]. // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024». Тезисы докладов. – Москва, МГУ, 2024. С. 945.
 10. Пористые композиционные материалы на основе биополимеров с карбонатгидроксиапатитом для медицины/ **Форысенкова (Гречишникова) А.А.**, Трофимчук Е.С., Антонова О.С., Егоров А.А., [и др.]. // IX Всероссийская Каргинская конференция «Полимеры–2024». Тезисы докладов. – Москва, МГУ, 2024. С. 566.

АВТОР ВЫРАЖАЕТ БЛАГОДАРНОСТЬ

Научному руководителю в.н.с., к.х.н. **Фадеевой И.В.** за помощь в постановке целей и задач исследования, в проведении экспериментов, обсуждении результатов и общее руководство работой.

Сотрудникам Лаборатории керамических композиционных материалов ИМЕТ РАН: **Антоновой О.С.** – за проведение СЭМ исследований, к.т.н. **Егорову А.А.** – за помощь в получении пористых композиционных материалов, и.о. зав. лаб., к.х.н. **Петраковой Н.В.** за помощь в редактировании и структурировании автореферата, зав. отделом аспирантуры и докторантуры **Тютюковой Ю.Б.** – за помощь в организационных вопросах;

Секретарю Ученого совета к.г.-м.н. **Ивичевой С. Н.** за профессиональную помощь в подготовке диссертационной работы к защите;

Сотрудникам МГУ им. М.В. Ломоносова: к.х.н. **Трофимчук Е.С.** – за помощь в проведении реологических и термогравиметрических исследований, механических испытаний; д.х.н. **Дейнеко Д.В.** – за проведение рентгенофазового анализа;

Сотрудникам Института физики Казанского Федерального Университета: к.ф.-м.н. **Мамину Г.В.**, к.ф.-м.н. **Гнездилову О.И.**, д. ф.-м.н. **Гафурову М.Р.** за проведение ЭПР-исследований;

Сотруднику МФТИ к.ф.-м.н. **Ивановой В.А.** за проведение ЯМР-исследований;

Сотруднику Кольского научного центра РАН к.х.н. **Гостевой А.Н.** – за проведение ИК-спектроскопических исследований;

Сотруднику ИТЭБ РАН к.ф.-м.н. **Давыдовой Г.А.** за помощь в проведении *in vitro* исследований;

Сотрудникам ИБХ РАН к.б.н. **Свищевской Е.В.**; к.б.н. **Коноваловой М.В.** за проведение *in vivo* исследований;

Сотруднику ПМГМУ имени И.М. Сеченова к.х.н. **Рау Д.В.** за помощь в написании статей.