

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Т.Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

СВОЙСТВА КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ  
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ  
ХОЛОДНОГО ПРЕССОВАНИЯ С ПОСЛЕДУЮЩИМ ПЛАВЛЕНИЕМ

Научный руководитель

\_\_\_\_\_  
Подпись, дата

\_\_\_\_\_  
Должность, ученая  
степень

Шумилова  
А.А.

\_\_\_\_\_  
Инициалы, фамилия

Выпускник

\_\_\_\_\_  
Подпись, дата

Зубакина К.А.

\_\_\_\_\_  
Инициалы, фамилия

Красноярск 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы .....	5
1.1 Материалы для получения имплантатов.....	5
1.2 Методы получения имплантатов .....	7
1.3 Горячее/холодное прессование .....	11
1.4 ПГА, перспективные материалы для биомедицины .....	12
Глава 2. Материалы и методы .....	15
2.1 Объекты исследования.....	15
2.2 Методы исследования .....	15
2.2.1 Синтез и выделение ПГА.....	15
2.2.2 Определение свойств образцов ПГА .....	16
2.2.3 Исследование характеристик полимерных порошков.....	16
2.2.4 Получение низкомолекулярного П(ЗГБ).....	16
2.2.5 Получение 3D-пластин методом холодного прессования.....	17
2.2.6 Получение плавленных 3D-пластин.....	17
2.2.7 Исследование смачиваемости поверхности полимерных изделий из ПГА .....	17
2.2.8 Статистическая обработка данных.....	17
Глава 3. Результаты.....	19
3.1 Синтез образцов ПГА, использованных для конструирования полимерных изделий.....	19
3.1 Характеристика полимерных порошков .....	21
3.2 Характеристика пластин.....	22
3.3 Физико-механическое исследование 3D-пластин после холодного прессования.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.4 Исследование смачиваемости поверхности 3D-пластин после холодного прессования.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.4 Физико-механическое исследование 3D-пластин после холодного прессования.....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.5 Характеристика плавленных изделий	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.6 Исследование смачиваемости поверхности полимерных изделий из ПГА .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
3.7 Физико-механическое исследование пластин	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
Заключение.....	23
Список использованных источников.....	24

## Введение

Увеличение реконструктивных операций в ортопедии из-за травм, опухоли, деформаций костной ткани требует получения и исследования новых материалов для костных имплантатов. Такой материал должен обладать следующими характеристиками: отличной совместимостью, остеогенностью, остеоиндукцией, остеокондукцией. Для этих целей могут быть использованы: металлы, сплавы, керамика, кальций - фосфатные материал, которые, к сожалению, имеют определенные ограничения по использованию, главным из которых является отсутствие биоразлагаемости. Применение полимеров способных к деструкции является новым направлением в конструировании костных имплантатов. Среди исследуемых материалов, полигидроксиалканоаты (ПГА)- полиэфиры гидроксикарбоновых кислот, благодаря своим свойствам (биосовместимость, биоразрушаемость, термопластичность) являются особенно перспективными. Опубликованы немногочисленные работы по применению ПГА в ортопедии и травматологии в качестве костнозамещающих имплантатов. Однако, процессинг ПГА такими методами, как холодное прессование и плавление требует дальнейших исследований [18] [22] [37] [43] [44].

Цель настоящей работы - получение и исследование изделий из П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) с помощью холодного прессования с последующим плавлением

Для выполнения поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Синтезировать образцы ПГА различного химического состава
2. Получить и исследовать различные фракции порошков ПГА в зависимости от параметров измельчения
3. Методом холодного прессования получить 3D-пластины разной геометрии на основе П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) при различном давлении

4. Исследовать плавление различных форм полимера (порошки, таблетки).
5. Изучить свойства поверхности и физико-механические характеристики плавленных 3D-пластин

## **Глава 1. Обзор литературы**

### **1.1 Материалы для получения имплантатов**

Костнозамещающий материал, используемый в медицинских целях, должен обладать следующими характеристиками: подходящими механическими свойствами, отличной совместимостью, относительной простотой проведения хирургического вмешательства, возможностью моделирования, отсутствием инфекционных возбудителей, способностью резорбироваться в организме без образования токсичных продуктов по мере восстановления, не травмировать живую ткань, хорошей коррозионной стойкостью и модулем упругости, сопоставимым с человеческой костью, а также, остеогенностью (содержать клеточные источники для остеогенеза), остеоиндукцией (запускать остеогенез), остеокондукцией (служить матрицей для образования новой кости в ходе репаративного остеогенеза, обладать способностью направлять ее рост), остеопротекцией (заменять кость по механическим свойствам)[11][12] [19].

Ортопедические имплантаты могут быть изготовлены из металлов, полимеров, керамики, композитов, биологически полученных материалов. Традиционные материалы, такие как, нержавеющая сталь, сплавы на основе кобальта и титановые сплавы постоянно модифицируются для эффективности биоматериалов[5].

Одной из альтернатив является ауто-, ксено- и аллотрансплантация. Аутотрансплантаты готовятся из собственных тканей пациента и имеют преимущество перед аллотрансплантатами (изготавливаются из тканей другого пациента или трупа) и ксенотрансплантатами (животного происхождения) из-за: медленной остеоинтеграции, риска передачи заболеваний, возможности развития реакции гистонесовместимости и хронического гранулематозного воспаления. Аутотрансплантаты в свою очередь тоже имеют недостатки, такие как, увеличение времени

хирургического вмешательства, возможность наличия дополнительных костных дефектов[22].

Из многочисленных материалов, прошедших экспериментальную и клиническую апробацию, были признаны полимеры, одними из которых являются политетрафторэтилен (ПТФЭ) и полиэфирэфиркетон [13][14].

Политетрафторэтилен обладает биологической инертностью, способностью к остеокондукции, высокой устойчивостью к инфекции. Имплантаты из пористого политетрафторэтилена имеют пространственную структуру, которая обеспечивает необходимые условия для врастания новообразованной соединительной ткани в его толщу, а жесткие каркасные свойства позволяют замещать объемные дефекты костных тканей. Это позволяет успешно использовать такие имплантаты на практике [13].

После открытия полиэфирэфиркетона и изучения его свойств, термопластичность, эластичность, износостойкость, возникла возможность использовать этот материал в качестве имплантатов слабонагруженных костей. Для изготовления протезов конечностей полиэфирэфиркетон используют совместно с сверхвысокомолекулярным полиэтиленом, имплантаты из которых по свойствам приближены к трубчатой кости человека[14].

Резорбируемые имплантаты со временем замещаются костной тканью и не требуют повторного хирургического вмешательства, поэтому использование деградируемых полимеров является перспективным направлением. Однако этот механизм практически не управляем, зависит от многих факторов, состояния тканей и организма, поэтому существуют ограничения на использование резорбируемых материалов в травматологии и ортопедии[Deculsi, 1999].

Одними из таких материалов являются синтетические биоразлагаемые полимеры как полилктатид (полиэфир молочной кислоты) и поликапролактон (полиэфир  $\epsilon$ -капролактона). Однако слабые механические свойства и воспалительная реакция, вызванная кислотными продуктами разложения,

ограничивают их биомедицинское применение. В нескольких статьях описаны случаи решения данных проблем. В композиты поликапролактона добавляли магний (совместим с кровью и способствует росту костей), цинк (является питательным элементом и совместим с костью), бета-трикальцийфосфат (обладает остеокондуктивным действием), гидроксид магния (нейтрализующим pH действием). Данные добавки способствовали улучшению механических характеристик и ингибировали дифференцировку предостеокластических клеток в остеокласты[43].

Полигидроксиалканоаты представляют собой семейство бактериально синтезированных биополиэфиров, обладающих биоразлагаемостью, биосовместимостью, васкуляризацией, термопроцессивностью и гибкостью. Линейная структура молекул ПГА придает им свойство термопластичности. При нагревании молекулярные цепи в ПГА легко сдвигаются относительно друг друга, в результате этого материал размягчается и приобретает текучесть. Термопластичность позволяет легко перерабатывать полимеры в изделия из порошков, растворов и расплавов, подвергать подобные изделия стерилизации общепринятыми методами (сухо-жарочная обработка, автоклавирование, гамма-облучение, дезинфицирующие растворы) без изменения структуры, потери прочности и ухудшения адгезионных свойств поверхности и без появления токсических свойств. Общие продукты биодеградации ПГА, включая олигомеры и мономеры, не токсичны для клеток и тканей. Хорошая биосовместимость П(ЗГБ) обусловлена, в первую очередь, тем, что П(ЗГБ) в виде олигомеров (до 150 остатков 3-гидроксимасляной кислоты) присутствует в крови и тканях млекопитающих. Среди ПГА поли-(3гидроксибутират) и поли-(3гидроксибутират-со-3гидроксивалерат) часто рассматриваются как биоразлагаемая матрица для биокомпозитов[17] [24] [40] [45].

## **1.2 Методы получения имплантатов**

Для получения матриц и имплантатов для костной пластики существуют такие методы, как 3D-моделирование, лазерное селективное

плавление, леофилизация, выщелачивание, электроспиннинг, холодное/ горячее прессование, литье [6][7].

Основными стадиями процесса выщелачивания являются смешение твердых порообразователей с раствором или расплавом полимера, последующая экструзия и затвердевание полученной массы в форме тонкой пленки и избирательное выщелачивание порообразователей растворителем, не растворяющем матрицу мембраны. Пористость мембран при данном методе обычно низка (менее 40%), наиболее перспективным является процесс выщелачивания, при котором порообразователями являются низкомолекулярные поверхностно-активные вещества (ПАВ) (предпочтительно ионных типов), образующие высокомолекулярные, статистически диспергированные мицеллы в жидком состоянии и сохраняющие эту структуру в твердой матрице полимера[26].

Примером данного метода является работа исследовательской группы №(RG 1435-001), которая занималась изготовлением пористой поверхности композита Ti-НА с помощью импульсивного тока с активированным спеканием с последующим выщелачиванием с использованием разбавленного H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Смешанные порошки прессовали в покрытый графит штамп с использованием импульсного тока активированного спекания под давлением 60МПа при температуре 1000° С в течение 5мин. Спеченные образцы Ti-НА погружали в восемь видов выщелачивающих растворов при комнатной температуре на 24часа. Увеличение пористости на поверхности композита Ti-НА, которое покрыто некоторыми НА и СаО, может привести к зарождению биологического апатита, созданного с помощью ткани человека, и увеличению связи между ними. Выщелоченный образец, содержащий более 30% НА, имеет низкую удельную плотность и твердость, чем коммерческий сплав ELI Ti-6Al-4V и увеличивает биосовместимость. Также в случае использования пористого композита Ti-НА в качестве имплантата в организме человека ткани будут осаждаться внутри пор, поэтому биосовместимость этих материалов и



когерентность биологических материалов в организме человека могут увеличиваться[15] [36].

Еще одним методом, применяемым в медицинской области в тканевой инженерии и доставке лекарств, является электроспиннинг. Интерес к электроспиннингованию в последнее время обострился благодаря способности производить материалы с наноразмерными свойствами. Технология Nanofiber - захватывающая область, привлекающая внимание многих исследователей как потенциальное решение текущих проблем в биомедицинской области, таких как ожог и лечение ран, ремонт органов и лечение рака и различных других заболеваний[26] [41].

Электроспиннинг-популярный метод изготовления нановолокон, использующий электрифицированную струю полимерной жидкости. Волокнистый нетканый мат, который обычно является результатом электроспиннинга, находит применение в самых разных отраслях промышленности. Принцип метода заключается в образовании филаментов в сильном электрическом поле, возникающем между двумя электродами противоположной зарядности[26] [34].

Однако такие методы, как, электроспиннинг, выщелачивание, леофилизация, не совсем подходят для изготовления костных имплантатов, по сравнению с литьем, 3D-моделированием и лазерным плавлением, так как такие изделия являются очень хрупкими и не способны выдержать нагрузку.

Существует относительно новая технология изготовления каркасов ПГА — 3D-моделирование. 3D-печать- это метод прототипирования (создания прототипа, модели предмета), позволяющий из математической модели, разработанной в специальной САД-системе, при помощи 3D-принтера получить послойно созданный физический объект. Наиболее распространенными материалами для создания трехмерных моделей являются такие полимеры, как полилактид и ABS пластик [9] [20].

Также существует технология лазерного синтеза методом селективного лазерного спекания (плавления), которая применяется для изготовления

изделия с высокими прочностными и улучшенными функциональными свойствами (микро-электромеханических сенсоров, пускателей, датчиков, имплантатов, фильтров, мембран, пьезодетекторов, пьезонасосов). Принцип метода состоит в том, что воссоздаваемый физический объект формируется из плавкого порошкового материала путем его плавления под действием лазерного излучения [14].

Значительно меньшая скорость охлаждения при лазерном селективном плавлении приводит к различной микроструктуре по сравнению с горячим прессованием и литьем, проявляется наивысшая твердость и износостойкость. Таким образом, селективное лазерное плавление является потенциальным для производства индивидуальных имплантатов с улучшенными характеристиками износа[32].

Следующий метод получения имплантатов, литье осуществляется следующим образом: формуемый полимерный композиционный материал поступает в инжекционный (пластикационный) цилиндр литьевой машины, где нагревается до температуры 300-350<sup>0</sup> С в случае термопластичной матрицы и до температуры 80-110<sup>0</sup> С в случае терморективной матрицы. Литье под давлением полимерных композиционных материалов имеет много общего с литьевым (трансферным) прессованием. Литье под давлением применяется: для получения изделий сложной конфигурации массой от нескольких граммов до нескольких килограммов с толщиной стенки 6-20мм из полимерных композитных материалов с матрицей из реактопластов или термопластов. Метод литья под давлением полимерных композитов имеет несколько разновидностей: интрузия (при изготовлении изделий большого объема), инжекционное прессование, центробежное литье и литье под давлением в автоклаве (для получения крупногабаритных изделий из полимерных композиционных материалов на основе полиамидов и других термопластичных матриц) [8] [20] [29].

### 1.3 Горячее/холодное прессование

Метод прямого прессования является наиболее удачным решением для мелкосерийного производства, поскольку позволяет получать изделия сложной формы и достаточно больших размеров, с гладкими поверхностями, с характеристиками близкими к конечным изделиям, что в итоге минимизирует затраты при проведении конечной механической обработки [16] [25].

В зависимости от температуры процесса прессование полимерных материалов подразделяют на высокотемпературное (горячее) и низкотемпературное (холодное)[33].

Таблетирование – холодное прессование порошкообразных и волокнистых пресс-материалов. Операция таблетирования заключается в уплотнении приготовленной дозы материала в замкнутом объеме[15].

Пресс-материал загружается в матрицу и сдавливается пуансонами, один из которых может быть неподвижным. Возможность регулировки хода пуансона позволяет изменять при необходимости массу таблеток и степень уплотнения пресс-порошка. В процессе уплотнения в результате внутреннего трения в пресс-порошке происходит существенное уменьшение давления по высоте таблетки и, как следствие, степень уплотнения таблетки по высоте оказывается различной. Трудно таблетироваться материалы с волокнистыми наполнителями, иногда с этой целью применяют гидравлические прессы, на которых материал уплотняется жгутированием, однако такой прием малопроизводителен[35].

Горячее прессование заключается в переводе твердого в исходных условиях пресс-материала в вязотекучее состояние и дальнейшем формовании изделия из расплава под действием тепла и давления. Основными технологическими параметрами, определяющими режим прессования, являются давление, время выдержки и температура[22][32].

Физико-механические свойства полимеров в стеклообразном состоянии зависят от химического состава полимера. Топологическая структура (густота

сшивания) определяет модуль упругости и прочностные характеристики полимера в высокоэластической области. Свойства матрицы определяют механические свойства композитов при сдвиге, термоустойчивость, химическую стойкость, горючесть, токсичность и технологические режимы получения изделий[42][44].

Все, вышеприведенные технологические параметры процесса прямого прессования могут быть реализованы на гидравлических прессах Carver Inc. и Wabash MPI, которые за последние годы были успешно введены в эксплуатацию ведущих предприятиях, занимающихся исследованием полимерных КМ и производством изделий на основе ПКМ[33].

#### **1.4 ПГА, перспективные материалы для биомедицины**

ПГА представляют собой сложные полиэфиры R-гидроксиалкановых кислот и обладают широким спектром свойств в зависимости от количества атомов углерода в их мономерных единицах. Они синтезируются более чем 300 микроорганизмами (более 90 родов грамположительных и грамотрицательных бактерий в аэробных и анаэробных условиях) в виде липидных включений для хранения энергии в гранулированных формах в клеточной структуре, так как их присутствие в цитоплазме повышает стрессоустойчивость микроорганизмов[10][17][26][43].

Они являются полностью биodeградируемыми, биосовместимыми, пьезоэлектрическими биополимерами, обладают собственной биологической активностью, происходят из возобновляемых ресурсов и ископаемого топлива, нетоксичны для человеческого организма. Продукты деградации ПГА не являются токсичными и иммуногенными *in vivo*[18][36].

Особое место ПГА занимают в биомедицине и могут быть использованы в тканевой инженерии, в качестве микроносителей доставки лекарств, имплантатов, урологических трубок и т.д [16] [29].

Особенностью ПГА является возможность переработки в специализированные изделия (нити, пленки, мембраны, микрочастицы,

3D-формы и др.) доступными методами из различных фазовых состояний-растворов, эмульсий, расплавов и порошков [23] [24].

Имеется небольшое количество работ, которые доказывают, что ПГА являются перспективными в ортопедии, травматологии в качестве костнозамещающих имплантатов [37].

В работах Haiyan, Yang, Ye исследованы матрицы из ПГА, служащие костными имплантатами и доказана их эффективность. Имеются немногочисленные работы по получению имплантатов с помощью плавления и литья, а также исследовано влияние имплантатов на клеточную культуру [Yang, 2014] [Hayati et al., 2011][Ye et al., 2009]. В работе Kose авторами была исследована эффективность имплантированных штифтов П(3ГБ/3ГВ) в композиции с антибиотиками в осложненный стафилококковой инфекцией дефект большеберцовой кости кролика. После 6 недель эксперимента наблюдалось подавление воспаления и регенерация тканей на фоне разрушения имплантата и высвобождения из него антибиотиков, при этом активные остеобласты заполняли поры и формировали новую костную ткань [Köse et al., 2003].

В работе Wang описан метод литья для создания костных имплантатов на основе поли (3-гидроксибутирата-со-3-гидроксигексаноата) нагревали до 108 ° С и прессовали с силой около 100 Н в течение 3 мин. Были проведены исследования на клеточных линиях фибробластов мыши, подтвердившие отсутствие отрицательного воздействия имплантатов. [Wang et al., 2013].

Физико-механические свойства ПГА на данный момент мало изучены и зависят от длины боковой цепи и расстояния между эфирными связями в цепи полимера. Механические свойства зависят от процессинга и сроков деградации имплантатов. Доказано, что конструкции П(4ГБ) деградируют быстрее пористых конструкций П(3ГБ), благодаря низкой степени кристалличности П(4ГБ). Процесс биорезорбции зависит от химической структуры полимера, формы изделия и места имплантации и реализуется с

помощью макрофагов и гиганских клеток инородных тел при высокой активности сывороточной кислой и клеточной фосфатаз [27] [31].

На основании изученной литературы можно сделать вывод, что, хотя ПГА и являются перспективными материалами для костных имплантатов, методы их переработки недостаточно описаны и требуют изучения.

## Глава 2. Материалы и методы

Исследования проводились на базовые кафедры биотехнологии в лаборатории биотехнологии новых материалов СФУ.

### 2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследования были взяты: гомополимер поли-(3-гидроксипутират) и сополимер поли-(3-гидроксипутират-со-3-гидроксипутират) с включением 3-гидроксипутирата 10,18 и 82,5%.

Полимеры с включением 3-гидроксипутирата 10 и 18% синтезированы с использованием штамма-продуцента *Cupriavidus eutrophus* по запатентованной технологии [Волова, 2010]. Полимер экстрагировали из биомассы хлороформом. Осаждение полимера из экстрактов проводили гексаном. Полимер с включением 3-гидроксипутирата 82,5 % был предоставлен сотрудниками лаборатории новых биоматериалов.

### 2.2 Методы исследования

#### 2.2.1 Синтез и выделение ПГА

Для получения ПГА был использован штамм водородных бактерий *Cupriavidus eutrophus*, запатентованной технологией [Волова, 2010]. Водородные бактерии выращивали на основе солевой среды Шлегеля ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) в строго стерильных условиях. Осуществлялся несбалансированный рост с помощью прекращения подачи источника азота и углерода для накопления полимера. Культивирование проводили с использованием ферментационного автоматизированного комплекса BioFlo/CelliGen115 («New Brunswick», США). Для синтеза сополимеров П(ЗГБ/ЗГВ) в субстрат добавляли калиевые соли пентановой кислоты.

Выделение и многократную очистку полимера из экстракта бактериальной биомассы *Cupriavidus eutrophus* проводили с помощью

хлороформа с последующим осаждением полимера гексаном и высушивали при 40 °С.

### **2.2.2 Определение свойств образцов ПГА**

Молекулярные массы и молекулярно-массовое распределение образцов полимеров и изделий определяли методом гелепроникающей хроматографии («Agilent Technologies» 1260 Infinity, США) с детектором показателя преломления, используя колонку Agilent PLgel Mixed-C. Термический анализ образцов проведен с использованием дифференциально-сканирующего калориметра DSC-1 («METTLER TOLEDO», Швейцария). Определение степени кристалличности и рентгеноструктурный анализ проводили на рентгеноспектрометре D8 ADVANCE («Bruker», Германия) (графитовый монохроматор на отраженном пучке) в пошаговом режиме с шагом 0,0016 и 114-секундной выдержкой для измерения интенсивности в точке, диапазон сканирования от 5 до 60 °С (режим работы прибора – 40 кВ × 40 мкА).

### **2.2.3 Исследование характеристик полимерных порошков**

Измельчение полимерных образцов проводили с помощью ультразвукамельничной мельницы Retsch ZM-200. Полученные порошки фракционировали на просеивающей машине Retsch AT-200, насыпную плотность порошков исследовали с помощью тестера плотности утряски Pharma Test (PT-TD200) и угла естественного откоса.

### **2.2.4 Получение низкомолекулярного П(ЗГБ)**

Уменьшение молекулярного веса П(ЗГБ) производилось по методике Baran et al. (Baran, 2002). 300± 0,0014 мг порошка П(ЗГБ) растворили в 9 мл хлороформа. 10± 0,0012мг борогидрида натрия (NaBH<sub>4</sub>) растворили в 2 мл метанола. Смешали 2 полученных раствора и поставили на магнитную мешалку (250 оборотов) на 3,6,9,18 и 40 часов. Молекулярная масса полученного полимера была равна 7,0 кДа.



### **2.2.5 Получение 3D-пластин методом холодного прессования**

Полимер ПЗГБ/ЗГВ фракцией на 300 мкм в виде порошка по  $1 \pm 0,0015$  грамм прессовали на автоматизированном прессе CarverAutoPellet, при давлении равно 4,7; 5,8; 10,4 Бар в формах для прессования размером 20×40 см.

### **2.2.6 Получение плавленных 3D-пластин**

Спрессованный полимер и порошки подвергали плавлению в тефлоновой форме в сушильном шкафу Memmert при температуре от 160 до 175°C и времени плавления  $104,5 \pm 10$  мин в зависимости от состава полимера.

### **2.2.7 Исследование смачиваемости поверхности полимерных изделий из ПГА**

Для исследования поверхностных характеристик были отобраны три типа пластин, варьирующихся по давлению прессования (4,7; 5,8; 10,4 Бар). На поверхность пластин микрошприцами прибора DSA-25E (Krüss, Germany) поочередно наносили воду и дийодметан, объемом 1,5 мкл с видеофиксацией моментов взаимодействия каждой жидкости с поверхностью 3D-формы. Обработку измерения краевых углов смачивания производили в полуавтоматическом режиме встроенным в программный пакет методом «Circle» используя кадр видеозаписи стабилизированной капли. Из полученных значений методом Оунса–Вендта–Рабея–Кьельбле рассчитывали свободную поверхностную энергию ( $\text{эрг}/\text{см}^2$ ), её дисперсную и полярную составляющую ( $\text{мН}/\text{м}$ ). Для каждого образца проводили не менее 3 измерений, определяли среднее значение и стандартное отклонение.

### **2.2.8 Статистическая обработка данных**

Обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel. Вычислялась средняя арифметическая, коэффициент достоверности существующей разницы (t) и вероятность ошибки (p). При нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента для сравнения средних величин, определения

погрешности измерений, достоверности различий параметров между исследуемыми группами. Различия между группами считали достоверными при  $t > 2$  и  $p < 0,05$ .

## Глава 3. Результаты

### 3.1 Синтез образцов ПГА, использованных для конструирования полимерных изделий

Для биосинтеза образцов полимеров штамм водородных бактерий *Cupriavidus eutropha*, выращивали в периодическом режиме по принятой технологии с использованием ферментационного автоматизированного комплекса BioFlo/CelliGen115 («New Brunswick», США) [Волова, 2011]. При использовании фруктозы в качестве субстрата за 65 часов выращивания урожай биомассы бактерий составлял  $5 \pm 0,01$  г/л (по весу абсолютно сухого вещества). Для получения сополимеров поли-3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом П(ЗГБ/ЗГВ) в состав среды дополнительно вносили валерат калия в концентрации 2 и 2,5 г/л. Получили 2 вида сополимеров с различным содержанием ЗГВ 10 и 18% (рисунок 1 и 2), полимер с содержанием 82,5% предоставлен сотрудниками лаборатории новых биоматериалов.

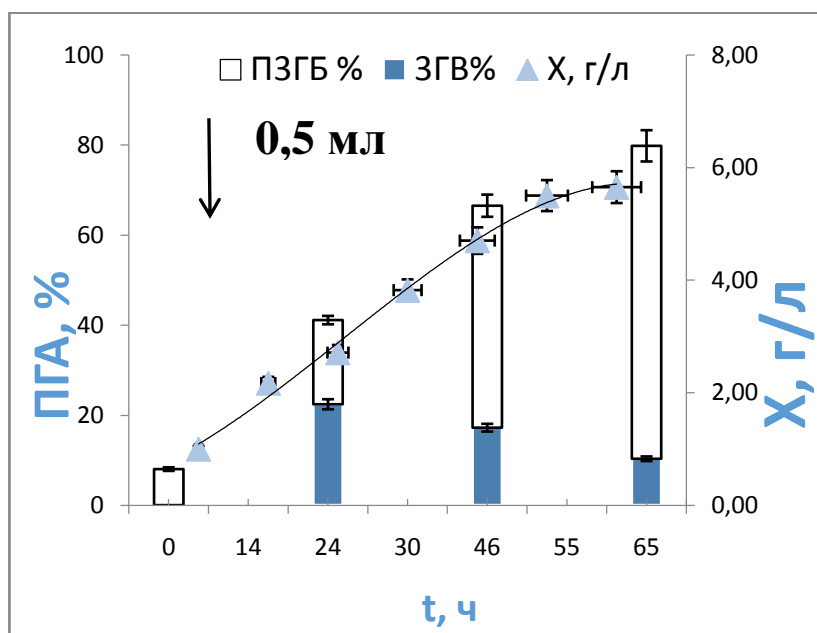


Рисунок 1-Культивирование П(ЗГБ/ЗГВ) с включением ЗГВ 10 мол.%

На данном графике показан рост биомассы при культивировании П(ЗГБ/ЗГВ) с включением ЗГВ 10 мол.%. При добавлении 0,5 мл валерата калия рост культуры немного замедляется из-за вредного воздействия -ЗГВ,

однако позже рост культуры стабилизируется. На 24 часу наблюдалась высокая концентрация 3-ГВ равная 22,3%, далее процентное содержание постепенно израсходуется и на 65 часу достигает значение 10,1%

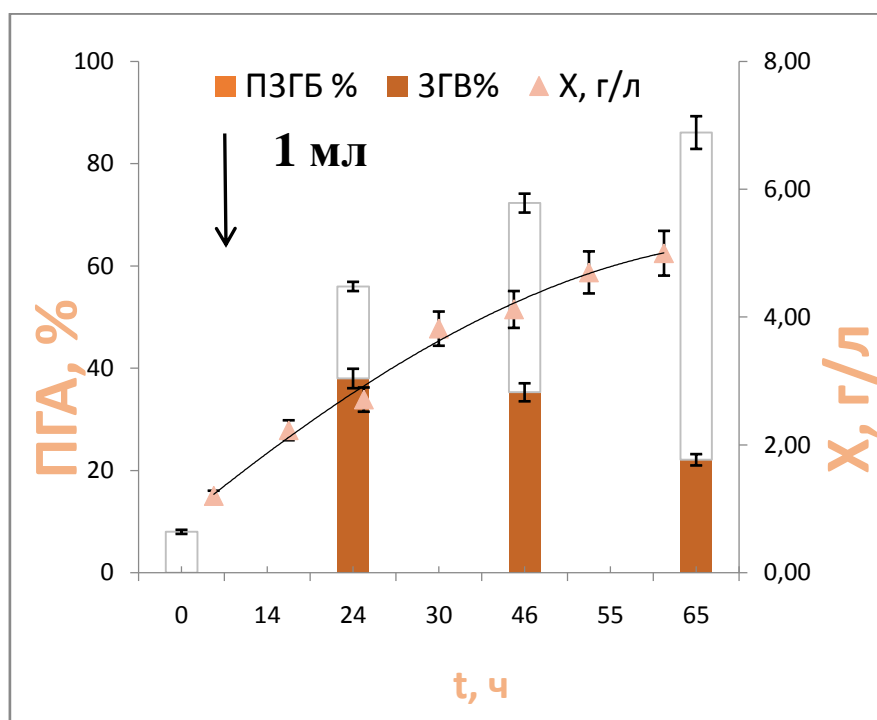


Рисунок 2-Культивирование П(ЗГБ/ЗГВ) с включением ЗГВ 18мол.%

При культивировании П(ЗГБ/ЗГВ) с включением ЗГВ 18мол.%наблюдалсяпостепенный рост биомассы, несмотря на непродолжительное ингибирование роста и накопления полимера при добавлении валерата калия в концентрации 1мл. Содержание ЗГВ на 24 часу составляло 37 мол.%, а на выходе снизилось до 18 мол.%

Результаты исследования физико-химических свойств ПГА представлены в таблице 1

Таблица 1 – Физико-химические свойства ПГА различного химического состава

Состав полимеров, мол.%	Мч, кДа	Мв, кДа	ПД	Сх, %	Тпл, °С	Тдегр, °С

П(ЗГБ) 100	728±6,3	1234±13, 2	1,69±0,03	77±1,2	179±0,5	273±0,5
П(ЗГБ/ЗГВ) 89,9/10,1	315±4,2	986±19,2	3,30±0,04	58±1,0	169±0,5	270±0,5

В таблице 1 приведены значения средневесовой и среднечисловой молекулярных масс образцов, а также полидисперсность, показывающая неоднородность полимера. Наиболее высокие значения  $M_w$  и  $M_n$  у гомополимера П(ЗГБ) при этом полидисперсность (ПД) имеет низкие значения. Сополимерный образец имеет молекулярную массу в 1,5 раза ниже гомополимера. Самая высокая степень кристалличности ( $S_x$ ) наблюдалась у П(ЗГБ). Соотношение кристаллической и аморфной фаз в сополимерных образцах иное, поэтому для них характерно явление амморфизации вследствие включения в С-цепь 3-гидроксипутирата мономеров ЗГВ и выравнивания соотношения фаз. В результате этого  $S_x$  сополимера составила 58 %. Температуры плавления и термической дегградации для сополимерного образца были определены несколько сниженными значениями ( $T_{пл}$  170 °С,  $T_{дегр}$  268 °С) относительно гомополимера ( $T_{пл}$  179,7 °С,  $T_{дегр}$  273 °С). При этом важно отметить, что сохранение разрыва между  $T_{пл}$  и  $T_{дегр}$  на уровне 90 °С свидетельствовало о сохранении термостабильности этих образцов. Полученные и охарактеризованные образцы полимеров были использованы для конструирования специализированных изделий.

### 3.1 Характеристика полимерных порошков

Полученные в результате культивирования очищенные порошки при измельчении на просеивающей машине AS 200 control показало наличие в них нескольких фракций частиц различного размера: фракция 1 – 100 мкм; 2 – 300 мкм; 3 – 500 мкм; 4 – 800 мкм. Фракционный состав оказывает

определенное влияние на степень сыпучести порошков, следовательно, на качественные характеристики прессованных форм. Результаты исследования характеристик порошков П(ЗГБ) и П(ЗГБ/ЗГВ) (насыпной объем до и после уплотнения, насыпная плотность, плотность утряски, угол естественного откоса) представлены в таблице 2 на примере фракций размером 300 и 800.

Таблица 2 – Характеристики фракционного состава порошков

Фракция	Диапазон частиц	Насыпной объем до уплотнения $V_0$ мл	Насыпной объем после уплотнения, $V_0$ мл	Насыпная плотность, г/мл	Плотность утряски, %	Угол естественного откоса, %
ПЗГБ/ЗГВ-1	100-300	50±0,02	29±0,05	0,078±0,01	44±0,01	50±0,01
ПЗГБ/ЗГВ-2	500-800	50±0,01	32±0,04	0,065±0,01	38±0,01	48±0,03
ПЗГБ-1	100-300	50±0,01	26±0,02	0,082±0,01	47±0,01	52±0,02
ПЗГБ-2	500-800	50±0,01	30±0,03	0,066±0,01	44±0,01	46±0,01

Плотность утряски фракций на 300 мкм у П(ЗГБ) оказалась выше, чем выше насыпная плотность порошка, тем хуже формуемость и лучше прессуемость. Также можно сделать вывод о том, что величина сил сцепления и трения между частицами выше у фракции на 300 мкм, так как данные показатели связаны с углом естественного откоса.

### 3.2 Характеристика пластин

Для понимания зависимости физико-механических свойств от фракции полимерных частиц, предварительно методом прямого холодного прессования из охарактеризованных порошков П(ЗГБ) получены 3D-имплантаты (рисунок 3) размером 20 мм в ширину и 40 мм в длину, массой  $1 \pm 0,0015$  г из фракций П(ЗГБ) 100, 300, 500 и 800 мкм, а также пластины из смешанных фракций 100 и 300 мкм в процентном соотношении 70/30, 50/50.

## Заключение

1. В автотрофных условиях синтезированы и исследованы образцы полимеров различного химического состава: гомополимер поли-3-гидроксибутират и сополимер поли-3-гидроксибутирата - 3-гидроксивалерата с включением 3-ГВ 10 и 18 мол. %.

2. Получены и исследованы различные фракции порошков ПГА. Доказано, что размер фракции непосредственно влияет на основные характеристики порошка (насыпная плотность, угол естественного откоса) его прессуемость и физико-механические свойства 3D-имплантатов.

3. Методом холодного прямого прессования при различном давлении получены и исследованы 3D-имплантаты. Установлено, с увеличением силы прессования (давления) повышаются физико-механические характеристики и гидрофильные свойства 3D-пластин.

4. Изучены свойства поверхности и физико-механические характеристики прессованных 3D-пластин, после плавления. Доказано, что включение 3-гидроксивалерата (10, 18 мол. %) влияет на повышение модуля упругости, предел прочности и деформацию, однако включение более 40% имеет обратную зависимость.

## Список использованных источников

1. Богданова Ю.Г., Адгезия и ее роль в обеспечении прочности полимерных композитов [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие/ Ю.Г. Богданова, с.-30-36
2. Вильямс Д.Ф., Имплантаты в хирургии/ Д.Ф. Вильямс.,Р. Роуф// Пер. с англ. М.: Медицина, 1978,с.-552
3. Волова Т.Г., Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов, с-30-89
4. Волова, Т.Г. Полиоксиданканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск.: СО РАН, 2003, с.-105-163
5. Голдинг Б., Химия и технология полимерных материалов, / Голдинг Б., // пер. с англ., М., 1963,с.-76-92
6. Горячее прессование [Электронный ресурс]: - Режим доступа: <http://wabashpress.ru/pdf/composite.pdf>
7. Гундорова Р.А., Травмы глаза/Р.А. Гундорова, В.В. Нероев, В.В. Кашников //М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009, с.-553
8. Дударев И.В., Новые возможности применения имплантатов из пористого политетрафторэтилена в ринохирургии/ И.В. Дударев, Ю.В. Тюкин М. И. Тюкина//Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. Казань, 2014, с.-43
9. Еолчиян С.А., Пластика сложных дефектов черепа имплантатами из титана и полиэтерэтеркетона (РЕЕК), изготовленными по САД/САМ технологиям / С.А. Еолчиян // Журнал Вопросы нейрохирургии 4, 2014, с.-3-8
10. Коваленко Р.В. , Современные полимерные материалы и технологии 3д печати , УДК 675. с. 263-266



11. Крыжановский В.К., производство изделий из полимерных материалов / Крыжановский В.К., Кербер М.Л., Бурлов В.В. // Издательство профессия, 2004, с.-318-327
12. 22 ИСТОЧНИК Матвеев С.Н., Моделирование изделий из полимерных материалов методом 3д печати //Журнал Вестник Казанского технологического университета 2015 С.Н. Матвеев , УДК 687.0 с.- 260-262
13. Николаева Е., Свойства резобируемых матриц из полигидроксиалканоев различного химического состава / Е.Д. Николаева, Е. И. Шишацкая // Институт биофизики СО РАН, 2011, с. 110-129
14. Прессование полимерных композиционных материалов [Электронный ресурс] : - Режим доступа : <https://mplast.by/encyklopedia/pressovanie-polimernyih-kompozitsionnyih-materialov/>
15. Схемы и режимы прямого прессования[Электронный ресурс] : - Режим доступа <http://upinip.narod.ru/otviti/43.html>
16. Технологические характеристики реактопластов [Электронный ресурс] : - Режим доступа <http://knigitut.net/2/90.htm>
17. Шеметов С.А., Способ эвисцерации при субатрофии глазного яблока/ С.А. Шеметов, И.А. Филатова, И. Мохаммад, Д. Мохаммад// Патент 2629245
18. Шумилова А., Материалы для восстановления костной ткани / А.А. Шумилова, Е.И. Шишацкая // Институт биофизики СО РАН, 2014, с.-210-214
19. Шишацкая Е., Научные основы медико-биологического применения/Е. И. Шишацкая // Институт биофизики СО Ран, 2011 с.-105-120
20. Anil S., Biomaterials for craniofacial tissue engineering and regenerative dentistry / S. Anil, E. P. Chalisserry // Advanced Dental Biomaterials, 2019, p.-643-674
21. Arai N., Hierarchical porous ceramics via two-stage freeze casting of preceramic polymers / N. Arai, K. Faber // Scripta Materialia, 2019, p.-72-76
22. Bhattacharjee РК, Комплексныебиоматериалы / РК Bhattacharjee, GC Rutledge // Том 5, 2017, p.-200-216

23. Bolay N., Production, by co-grinding in a media mill, of porous biodegradable polylactic acid–apatite composite materials for bone tissue engineering / N. Bolay, V. Santran // Powder Technology, 2009, p.-89-94
24. Calvao, P.S. Influence of the rubbery phase on the crystallinity and thermomechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate)/elastomer blends / P.S. Calvao, J.M. Chenal, C. Gauthier et al. // Pol. Intern, 2010, p. 851–858.
25. Chavali M., Inorganic composites in biomedical engineering / M. Chavali, P. Palanisamy // Materials for Biomedical Engineering, 2019, p.- 47-80
26. Chen G-Q., PHA/PHB / Q Wu YK Jung and SY Lee // China.,2011, p.-225-227
27. Freier, T. Biopolyesters in tissue engineering applications. Polymers for Regenerative / T. Freier // Medicine, 2006, p. 1–61
28. Hayati, A.N. Preparation of poly(3-hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering / A.N. Hayati, H.R. Rezaie, S.M. Hosseinalipour // Materials Letters, 2011, p.-736–739.
29. Junyu Z., Accepted Manuscript / Zhang Junyu, Ekaterina I. Shishatskaya, Tatiana G. Volova, Luiziana Ferreira da Silva, Guo-Qiang Chen // Institute of Biophysics of Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk.,2017, p.-8-13
30. Kashmira K., Film forming systems for topical and transdermal drug delivery/ K. Kashmira, H. Kathpalia// Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, Volume 12, November 2017, p.- 487-497
31. Kaur M., Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications / M. Kaur, K. Singh // Materials Science and Engineering: C, 2019,p.-844-862
32. Ke Y.,Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application / Y. Ke, X.Y. Zhang, S. Ramakrishna, L.M. He,G. Wu//Guangdong-Hong Kong-Macau Institute of CNS Regeneration, Jinan University, Guangzhou.,2017, p.-107-111

33. Köse, G. Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) based tissue engineering matrices / G. Köse, V. Korkusuz, T. Hasirci // *Materials in medicine*, 2003, p. 121–126.
34. Lim J., Accepted Manuscript / Janice Lim, Mingliang You, Jian Li, Zibiao Li // Singapore ., 2017. p.-6-9
35. Limongi T., Laboratory injection molder for the fabrication of polymeric porous poly-epsilon-caprolactone scaffolds for preliminary mesenchymal stem cells tissue engineering applications / T. Limongi // *Microelectronic Engineering*, 2017. p.-12-16
36. Magesh S., Use of nanostructured materials in implants/ S.Magesh, G. Vasanth, A.Revathi, M.Geetha // Elsevier Ltd., 2018, p.-481-501
37. Marois, Y. Synthetic bioabsorbable polymers for implants / Y. Marois, Z. Zhang, M. Vert et al. // *Amer. Soc. for Test. and Mater*, 2012, p.-12–38.
38. Obruca S., Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications / Stanislav Obruca, Petr Sedlacek, Martin Koller, Dan Kucera, Iva Pernicova // *Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkynova .*, 2017, p.-4-6
39. Omran A.M., Fabrication and evaluation of porous Ti–HA bio-nanomaterial by leaching process / A.M. Omran , Kee Do Woo , Duck Soo Kang, G.T. Abdel-Gaber, H. Fouad , Hany S. Abdo, Khalil Abdelrazek Khalil // *Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of King Saud University*, 2014, p. -3-10
40. Silva J.I., Author's Accepted Manuscript / J.I. Silva, A.C. Alves, A.M. Pinto, F. Toptan // *Universidade do Minho, Dept. Eng. Mecânica, Azurém.*, 2017, p.-5-10
41. Tanzi M. C., *Biomaterials and Applications* / M. C. Tanzi, S. Fare // *Foundations of Biomaterials Engineering*, 2019, p.-199-287
42. Wang, Y. Fabrication, characterization and long-term in vitro release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres / Y. Wang, X. Wang, K. Wei et al. // *J. Mater. Sci. Lett*, 2007, p. -1071–1076
43. Xiao M., Bio-functionalization of biomedical metals / M. Xiao, Y.M. Chen, M.N. Biao, X.D. Zhang, B.C. Yang // *Published by Elsevier B.V.*, 2016, p.-30-35

44. Yang, S. Mesoporous bioactive glass doped-poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) composite scaffolds with 3-dimensionally hierarchical pore networks for bone regeneration / S. Yang, J. Wang, L. Tang et al. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, p.-72–80
45. Ye, Ch. PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering / Ch. Ye, P. Hu, M.X. Ma et al. // *Biomaterials*, 2009, p.-4401– 4406


Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии

Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т.Г. Волова

« 05 » 07 20 19 г.


**БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА**

06.03.01 Биология

СВОЙСТВА КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ  
ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ  
ХОЛОДНОГО ПРЕССОВАНИЯ С ПОСЛЕДУЮЩИМ ПЛАВЛЕНИЕМ

Научный руководитель

05.07.19.  
Подпись, дата

 к.б.н.  
Должность, ученая  
степень

Шумилова  
А.А.  
Инициалы, фамилия

Выпускник

78  
Подпись, дата

Зубакина К.А.  
Инициалы, фамилия

Красноярск 2019