

Селективное лазерное спекание биоактивных композиционных матриц для инженерии костных тканей

**Е. Н. Антонов, С. М. Баринев, И. В. Вахрушев, В. С. Комлев,
В. К. Попов, А. Ю. Федотов, К. Н. Ярыгин**

Разработан метод поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС), который позволяет получать минерал-полимерные материалы на основе фосфатов кальция и алифатических полиэфиров. Изготовлены трехмерные матрицы заданной архитектуры для замещения костных дефектов и направленной регенерации костной ткани. Методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) изучена микроструктура полученных экспериментальных образцов, а также морфология их поверхности и внутренней структуры. Характерные значения прочности при сжатии и относительной деформации минерал-полимерных композитных образцов, полученных методом ПСЛС из мелкодисперсных порошков, состоявших из 80 масс. % керамических гранул на основе трехкальциевого фосфата и 20 масс. % D,L-полилактида PDL04 соответствуют характерным показателям аналогичных параметров трабекулярной костной ткани. В результате проведенного первичного исследования биологических свойств минерал-полимерных композитных матриц, изготовленных методом ПСЛС, показано, что они обладают низкой цитотоксичностью и не оказывают негативного влияния на пролиферативный потенциал мезенхимальных стволовых клеток. Предложенная нами технология ПСЛС может быть эффективно использована для создания клеточных носителей для тканевой инженерии.

Ключевые слова: поверхностно-селективное лазерное спекание, матрикс, алифатические полиэфиры, трикальцийфосфат, регенерации костной ткани, цитотоксичность.

Введение

Одним из наиболее актуальных и перспективных направлений современной реконструктивно-восстановительной хирургии является разработка и создание индивидуальных имплантатов и тканеинженерных конструкций (ТИК), обеспечивающих оптимальные условия для замещения дефектов и регенерации твердых тканей [1]. Ключевыми элементами этих биомедицинских изделий являются трехмерные синтетические, как правило, биорезорбируемые матрицы, имеющие заданную архитектуру [2]. Матрикс должен иметь определенный химический состав и морфологию поверхности, обеспечивающие эффективное заселение остеогенных клеток с последующим формированием нативных тканей в зоне имплантации. Также он должен

резорбироваться *in vivo* со временем, коррелирующим со скоростью образования новой костной ткани [3]. Сегодня для создания таких матриц широко используются различные минерал-полимерные композиты на основе фосфатов кальция, обладающих высоким остеокондуктивным потенциалом и регулируемой скоростью биодеградации [4], а в качестве полимеров — алифатические полиэфиры (полилактиды, полилактогликолиды, поли-ε-капролактоны и др.), активно применяемые в различных биомедицинских исследованиях, а также клинической практике [5]. При этом наибольшим потенциалом среди известных сегодня способов изготовления из этих материалов индивидуальных имплантатов и матриц для ТИК с заданной архитектурой и требуемыми физико-химическими и биохимическими характеристиками обладают

технологии быстрого прототипирования (БП) (или аддитивного производства (АП)) [6, 7]. Они основаны на программном разбиении трехмерной компьютерной модели объекта на поперечные сечения (слои) и последующем послойном изготовлении этого изделия из выбранного материала. Преимущество технологий БП становится особенно очевидным при их использовании в сочетании с современными методами медицинской диагностики (компьютерная или ядерно-магнитно резонансная (ЯМР) томографии). Так, на основе трехмерной модели фрагмента ткани реального пациента полученной, например, на рентгеновском томографе, может быть оперативно изготовлен персонализированный имплантат из биосовместимого материала. В процессе изготовления изделия в него можно дополнительно ввести или убрать определенные детали, создать требуемую архитектуру, в том числе и с градиентной пористостью.

Одной из наиболее развитых и успешно применяемых сегодня для изготовления биомедицинских изделий технологий БП является селективное лазерное спекание (СЛС) [8, 9]. СЛС базируется на послойном спекании мелкодисперсных (50 – 100 мкм) порошковых материалов (металлы, керамика, полимеры и композиты на их основе). СЛС позволяет получать индивидуальные имплантаты и матрицы для тканеинженерных конструкций с помощью систем автоматизированного проектирования/производства (САПР) с минимальными затратами времени, высокой воспроизводимостью, точной геометрией и заданной структурой. Преимуществом метода СЛС является практическое отсутствие ограничений на номенклатуру используемых порошковых материалов. В то же время изначально практически все работы в этой области, как правило, были ориентированы на использование самых экономичных и дешевых CO_2 лазеров непрерывного действия, инфракрасное (с длиной волны $\lambda = 10,6$ мкм) излучение которых поглощается полимерными частицами. Такой режим нагрева и спекания не может быть оптимальным для термолабильных биорезорбируемых полимеров (в частности, полилактидов и полилактогликолидов), поскольку при этом может происходить их сильный перегрев, приводящий к деградации, образованию сшивок и токсичных компонентов.

Поэтому, несмотря на огромное количество научных публикаций и патентов по этой теме (более сотни только за последние пять лет, главным образом зарубежных), проблема выбора методов и параметров изготовления osteoconductive материалов и osteoinductive матриц на основе фосфатов

кальция и алифатических полиэфиров в полной мере до сих пор остается нерешенной.

В работах [10, 11] был предложен и развит метод поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС), в котором, в отличие от традиционного СЛС, основанного на объемном поглощении полимерным порошком излучения CO_2 лазера, происходит контролируемое сплавление его частиц за счет поглощения лазерного излучения ближнего ИК диапазона ($\lambda = 0,97$ мкм) небольшим ($\leq 0,1$ масс. %) количеством наночастиц углерода или золота, равномерно распределенных по поверхности полимера. ПСЛС позволяет избежать перегрева внутренних областей полимерных частиц за счет деликатного расплавления только их поверхности. Этот метод был успешно применен нами для изготовления индивидуальных матриц из термически неустойчивых биорезорбируемых полимеров (таких как, полилактиды и их сополимеры) без заметных структурных и химических изменений.

Цель настоящей работы — разработка метода формирования минерал-полимерных матриц для костных ТИК с градиентным распределением пористости и фазового состава из керамических материалов на основе фосфатов кальция, обеспечивающего надежное связывание мелкодисперсных минеральных частиц за счет ПСЛС полиэфирных частиц, находящихся между ними, и изучение структурных, морфологических и физико-механических характеристики полученных образцов, а также их цитотоксичности *in vitro*.

Материалы и методы

В качестве исходных компонентов для проведения экспериментов использовали два типа мелкодисперсных (средний размер частиц составлял от 50 до 200 мкм) материалов на основе трикальцийфосфата (ТКФ) и денатурированного коллагена (ДК). Первый тип материалов (рис. 1) представлял собой микрочастицы сферической формы на основе порошка ТКФ и ДК, полученный по технологии несмешивающихся жидкостей [12]. В качестве материала второго типа (рис. 2) использовали керамические гранулы на основе ТКФ, предварительно спеченные при температуре 1300 °С. Для реализации режима поверхностно-селективного лазерного спекания сферических частиц обоих типов, а именно, их структурной интеграции под действием лазерного излучения умеренной (до 10 Вт) мощности, применяли биорезорбируемые аморфные D,L-полилактид марки PURASORB PDL04 (приведенная вязкость 0,4 дЛ/г) производства компании

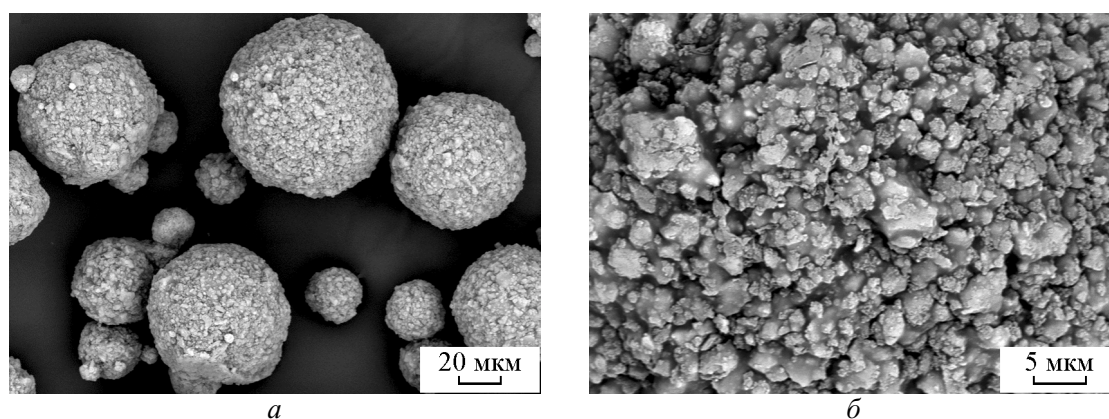


Рис. 1. СЭМ изображение частиц порошков первого типа (а) и микроструктура их поверхности (б).

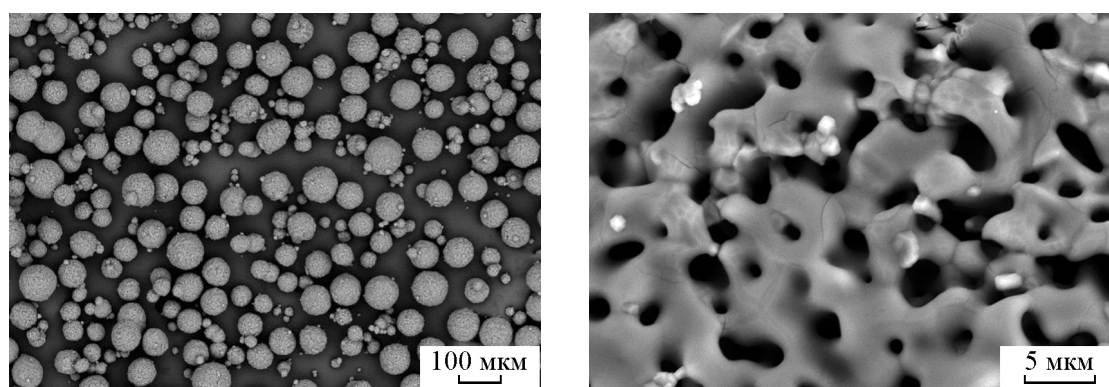


Рис. 2. СЭМ изображения микрочастиц ТКФ второго типа.

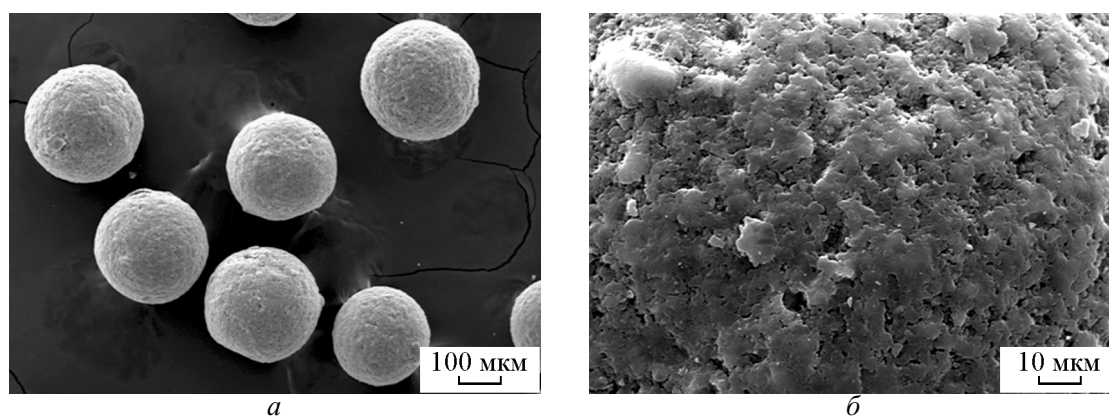


Рис. 3. СЭМ изображения микрочастицы порошков первого типа с полимерным покрытием (а) и ее поверхности (б).

“Purac” (Нидерланды), температура стеклования которого составляла 56 °С.

В наших экспериментах PDL04 использовали в двух вариантах. В первом, тонкую пленку алифатического полиэфира (толщиной ~ 2 – 5 мкм), наносили на микрочастицы ТКФ из его раствора в

хлористом метиле с последующей сушкой и диспергированием в воздушном потоке (рис. 3).

Видно, что после нанесения полимерного покрытия форма частиц ТКФ сохраняется. Однако их поверхность становится более гладкой, а поры закрываются.

Во втором варианте частицы ТКФ смешивали с предварительно измельченным мелкодисперсным (размер частиц ~ 100 мкм) порошком аморфного PDL04. Для этого исходные гранулы полимера (характерный размер 2 – 3 мм) размалывали в ротационной мельнице. Размолотый порошок просеивали через набор сит, и отбирали фракцию с размером частиц менее 100 мкм. Затем порошки ТКФ и измельченного полилактида тщательно перемешивали в различных весовых пропорциях (от 20:80 до 80:20).

Морфологию поверхности и внутренней структуры исходных порошков ТКФ, полилактида и полученных образцов трехмерных матриц изучение методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью микроскопа Tescan VEGA II (Тескан, Чехия). Послойное спекание частиц порошковых минерал-полимерных смесей, не поглощающих (полимеры) или слабо поглощающих (ТКФ) лазерное излучение, методом ПСЛС происходило за счет поглощения излучения наночастицами сенсibilизатора, добавляемого в спекаемый порошок в небольшом количестве. В качестве сенсibilизатора использовали наночастицы углерода размером ~ 100 нм в количестве 0,1 масс. %. Нагрев поверхности частиц порошка в этом случае происходил при поглощении энергии лазерного излучения наночастицами углерода, расположенными на их поверхности. При этом коэффициент поглощения практически не зависит от длины волны лазерного излучения (углерод рассматривается как “черное тело”), и для спекания могут быть использованы различные наиболее энергетически эффективные и стабильные оптоволоконные лазеры с диодной накачкой ближнего ИК диапазона (длина волны излучения ~ 1 мкм).

Эксперименты по спеканию трехмерных матричных структур из материалов на основе ТКФ, описанных выше типов, осуществляли на установке селективного лазерного спекания СЛС-100, разработанной и изготовленной в Институте проблем лазерных и информационных технологий РАН [13]. Установка включает в себя: специально разработанный одномодовый волоконный лазер непрерывного действия с диодной накачкой и длиной волны излучения $\lambda = 1,06$ мкм мощностью до 10 Вт (НТО “ИРЭ-Полус”, Фрязино); систему фокусировки и сканирования лазерного излучения (позволяющую получать на поверхности спекаемого порошка фокальное пятно диаметром ~ 80 мкм); рабочую камеру для спекания; систему подачи порошка и формирования его слоев; систему термостатирования и специальное программное обеспечение для управления всеми элементами установки. Макси-

мальные размеры изготавливаемых объемных объектов могут составлять $100 \times 100 \times 50$ мм³ при точности воспроизведения порядка ± 100 мкм. Архитектуру формируемых матриц, их структуру и пористость (форма и размер ячеек) задавали используемой компьютерной моделью. В процессе работы оптимальные состав порошковых смесей, толщины спекаемых слоев, интенсивность и скорость сканирования лазерного излучения подбирали экспериментально.

Механические испытания образцов проводили на универсальной испытательной машине для одноосных экспериментов в диапазоне нагрузок до 5 т с электрическим приводом и следящей системой Instron 5581 (Великобритания). Для этого поверхности торцов цилиндрических образцов предварительно зачищали в специальном шаблоне из текстолита до их параллельности. Шлифовку осуществляли с помощью алмазного абразивного инструмента. Цилиндрические образцы подвергали одноосному (вдоль оси цилиндра) сжатию со скоростью нагружения 100 Н/с. Высоту образцов определяли в каждом конкретном случае следящей системой по появлению нагрузки в момент “касания” столбика рабочей поверхностью установки. Влияние скорости проведения эксперимента на механические характеристики выявляли в экспериментах, когда скорость нагружения составляла 5 и 20 Н/с. Для оценки воспроизводимости значений прочности испытывали от 3 до 6 образцов. Пересчитанные в координаты “напряжение – деформация” кривые нагружения образцов регистрировали компьютером в оцифрованном виде.

Культуры мезенхимальных стволовых клеток (МСК) пульпы молочного зуба человека были взяты из криобанка Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича”. После размораживания клетки помещали в культуральные флаконы с площадью дна 75 см² и культивировали в ростовой среде (DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2 мМ L-глутамина (все перечисленные реактивы — Gibco, США)) в CO₂-инкубаторе в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂, 80% влажности), меняя среду два раза в неделю. При 80 – 90 % конfluence клетки снимали с поверхности пластика путем инкубации в 2 мл смеси 0,25 % раствора трипсина с раствором Версена в соотношении 1:1 (ПанЭко, РФ) при 37 °C в течение 5 – 10 мин. Клетки переводили в суспензию и осаждали центрифугиро-

ванием, полученный осадок ресуспендировали в культуральной среде, рассеивая в соотношении 1:3.

Для оценки биосовместимости разработанных материалов были изготовлены пористые матриксы в виде дисков диаметром 12 мм и толщиной 2 мм. Перед заселением осуществляли стерилизацию матриксов путём погружения их в 70%-й C_2H_5OH с последующей преинкубацией в течение 24 ч в ростовой среде. Клетки переводили в суспензию, как это было описано выше, а затем осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в культуральной среде в концентрации ~250 тыс. клеток/мл, а затем наносили аликвоты по 2 мл на матриксы, находящиеся в колодцах 24-луночного планшета. Для обеспечения эффективной адгезии клеток планшет с матриксами и нанесенными на них клетками помещали в CO_2 -инкубатор и инкубировали в течение 12 ч. После этого полученные ТИК переносили в чистые лунки планшета, содержащие по 3 мл среды, и культивировали в течение 5 дней в стандартных условиях.

Оценку количества жизнеспособных клеток в составе ТИК осуществляли путём окрашивания ядер клеток раствором 4,6-диамидино-2-фенилиндол (4,6-diamidino-2-phenylindole – DAPI; Sigma, США), а также с помощью CytoTox 96 Cytotoxicity Assay (Promega, США). ТИК извлекали из планшета и промывали в фосфатно-солевом буфере (phosphate buffer saline, PBS). Часть ТИК фиксировали в 4%-м растворе параформальдегида в течение 4 мин при комнатной температуре, а затем окрашивали раствором DAPI в концентрации 1 мкг/мл в течение 10 мин. По окончании образцы заключали в среду для протектирования флуоресценции (DakoCytomation, США) и выполняли исследование на флуоресцентном микроскопе ZEISS AxioPlan 2 (CarlZeiss, Германия). Другую часть ТИК помещали в 24 луночный планшет, лунки которого содержали по 300 мкл PBS, а затем лизировали клеточные мембраны тремя циклами замораживания до $-70^\circ C$ с последующим размораживанием. Аликвоты лизата объёмом 50 мкл переносили в 96-луночный планшет, после чего проводили исследование лактатдегидрогеназной активности при помощи набора CytoTox 96 Cytotoxicity Assay в соответствии с протоколом производителя. Измерение оптической плотности содержимого лунок осуществляли на планшетном ридере Infinite 200 PRO (“Tecan”, Германия).

Результаты и их обсуждение

Для определения порога спекания частиц исследуемых материалов и выбора оптимальных параметров процесса ПСЛС, первоначально по их

поверхности проводили пробное сканирование лазерным лучом, варьируя интенсивность лазерного излучения (в диапазоне от $1 \cdot 10^3$ до $4 \cdot 10^4$ Вт/см²) и скорость сканирования (в диапазоне от 1 до 20 мм/с).

Ни в одном из использованных режимов спекания частиц порошков на основе ТКФ с полилактидным покрытием, получить устойчиво интегрированные (спеченные) структуры не удалось. Проплавленные треки (нити) рассыпались на отдельные агломераты исходных частиц. Для реализации надежного спекания данного типа частиц, по нашему мнению, толщину полимерной пленки на их поверхности необходимо увеличить примерно на порядок, что стало бы сравнимо с размером ядра ТКФ. Технология изготовления таких композитных частиц становится достаточно сложной и весьма затратной.

Режима устойчивого ПСЛС удалось достичь в другом (втором) варианте, при добавлении в исходные керамические гранулы ТКФ частиц полимера в количестве от 30 масс. %. Наиболее критичным параметром для получения прочных однородных структур являлась скорость сканирования лазерного луча. Увеличение скорости сканирования приводило к уменьшению ширины треков (улучшению пространственного разрешения). При этом отношение высоты трека к ширине увеличивалось. Трек становился более компактным. При этом также увеличивалась относительная глубина проплавления и улучшалась интеграция последующего слоя с предыдущим. Тем самым, оптимальные режимы спекания для достижения наилучших геометрических и механических характеристик структур реализовывались при наибольших скоростях сканирования пучка излучения. Выбранная нами рабочая скорость сканирования в итоге составила 20 мм/с.

Толщина слоя порошка, наносимого на рабочую поверхность, определяется глубиной проплавления порошка при заданных параметрах спекания. По результатам исследования толщины одиночных треков, полученных в результате сканирования по слою порошка, толщина которого значительно превышала глубину проплавления, были определены толщины, обеспечивающие прочную интеграцию спеченных слоев и в то же время не препятствующие свободному нанесению следующего слоя порошка с размером частиц порядка 200 мкм.

На основании результатов проведенных экспериментов, ПСЛС трехмерных матричных структур из смесей трикальцийфосфатов и алифатических полиэфиров для их последующих исследований осуществляли при одновременном выполнении следующих условий: 1) спекаемый порошок состоял

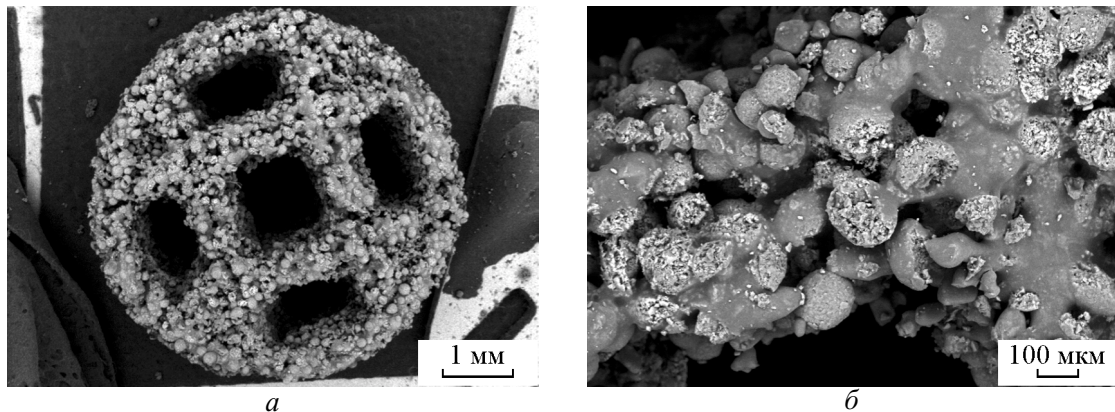


Рис. 4. СЭМ изображения минерал-полимерных композитных матриц на основе ТКФ и PDL04. *a* — вид сверху; *б* — микроструктура поверхности.

из 30 – 80 масс. % исходного ТКФ и 20 – 70 масс. % полимера; 2) толщина порошкового слоя ≈ 250 мкм; 3) интенсивность лазерного излучения при скорости его сканирования по поверхности спекаемого порошка 20 мм/с составляла $1,5 \cdot 10^4$ Вт/см².

При выполнении этих условий методом ПСЛС могут быть получены минерал-полимерные материалы и трехмерные матричные структуры на основе фосфатов кальция с градиентным распределением пористости обладающие общим объемом свободно сообщающихся пор до 80 % с характерным размером от нескольких микрон до 1,5 мм. При этом размер пор и их общее количество могут программным образом уменьшаться от внутренних областей матрикса к его поверхности. На рис. 4 показаны результаты СЭМ анализа образцов полученных методом ПСЛС.

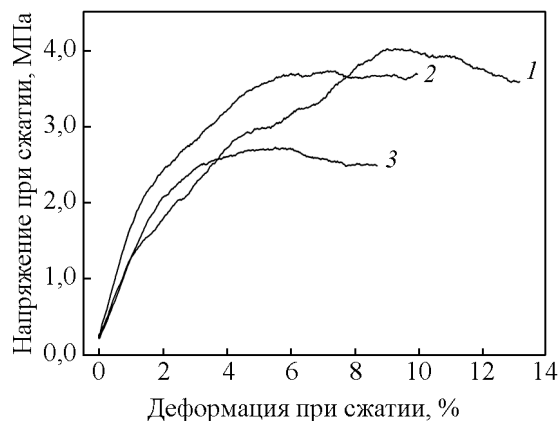


Рис. 5. Прочностные характеристики минерал-полимерных композитов полученных методом ПСЛС: 1 — ТКФ:ПЛ = 70:30, 2 — ТКФ:ПЛ = 75:25, 3 — ТКФ:ПЛ = 80:20.

Для сравнительных исследований механических свойств полученных минерал-полимерных матриц методом ПСЛС с использованием оптимальных режимов (описанных ранее) было изготовлено три серии цилиндрических образцов диаметром 5 мм и высотой 10 мм по 30 штук каждая, состоявших из 70:30, 75:25 и 80:20 масс. % керамических гранул на основе ТКФ и D,L-полилактида PDL04, соответственно.

На рис. 5. показаны диаграммы деформирования образцов при сжатии. Образцы всех трех серий продемонстрировали достаточно высокие значения прочности на сжатие (до 4 МПа) при относительной деформации до 9 %. Полученные данные соответствуют характерным показателям аналогичных параметров трабекулярной (губчатой) костной ткани, что дает все основания рассматривать эти материалы в качестве весьма перспективных для создания на их основе индивидуальных минерал-полимерных композитных имплантатов и матриц для ТИК.

В качестве модельной клеточной культуры для первичной оценки биологических свойств матриц были использованы МСК пульпы молочного зуба человека. Изготовленные по технологии ПСЛС матрицы заселяли клетками, в результате чего были созданы экспериментальные образцы ТИК, которые затем культивировали в течение 5 дней. Сравнение количества жизнеспособных клеток в составе ТИК в начале и конце исследования осуществляли двумя способами — путём непосредственного визуального наблюдения, а также измерением лактатдегидрогеназной активности.

Поскольку матрицы, изготовленные по технологии ПСЛС, непрозрачны, для визуализации клеток в составе ТИК мы окрашивали их флуоресцентным ядерным красителем DAPI и фотографировали поверхность матриц с использованием флуорес-

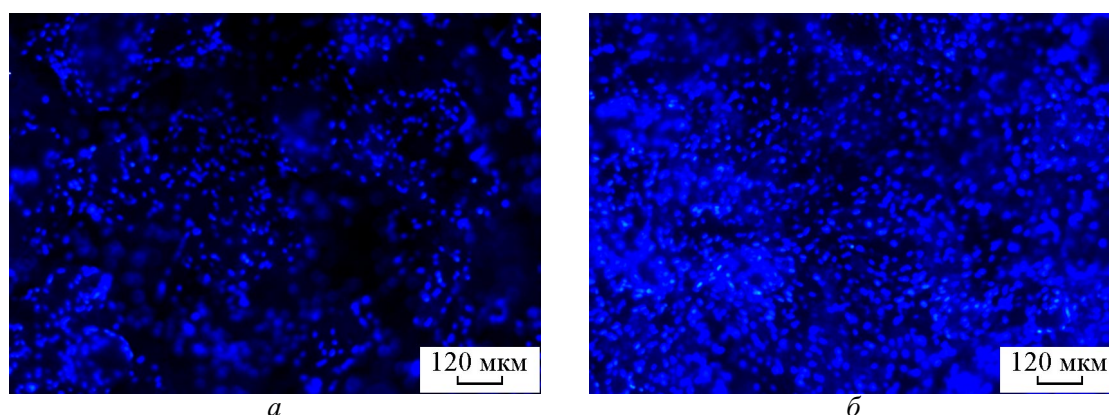


Рис. 6. МСК пульпы молочного зуба человека, культивируемые на минерал-полимерных матриксах, полученных методом ПСЛС. *а* — 1 сут.; *б* — 5 сут. Окраска ядер DAPI.

центного микроскопа. Как видно из полученных микрофотографий (рис. 6), количество клеток заметно увеличивалось через 5 дней культивирования.

Для подтверждения полученных результатов также было проведено исследование уровня активности лактатдегидрогеназы в клеточном лизате, полученном в результате 3-х циклов замораживания-размораживания ТИК. Лактатдегидрогеназа — стабильный цитозольный фермент, содержание которого может быть количественно измерено колориметрическими методами, такими как CytTox 96 Cytotoxicity Assay. Оптическая плотность растворов, полученных в результате исследования, прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток в образцах ТИК (рис. 7). Было показано, что количество клеток в составе ТИК значительно возросло в течение 5 дней культивирования.

Как уже отмечалось во Введении, при создании синтетических материалов, предназначенных для

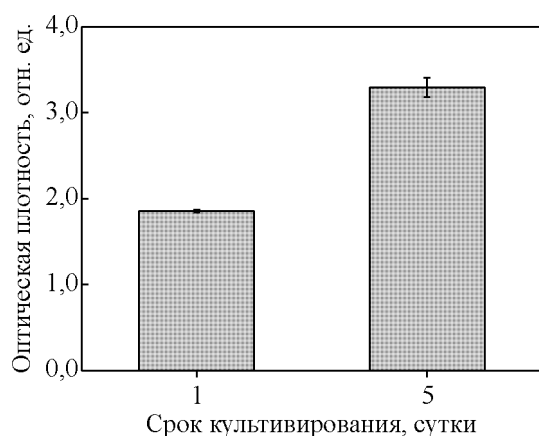


Рис. 7. Изменение количества жизнеспособных клеток в составе ТИК в процессе культивирования.

замещения и регенерации костных тканей, необходимо в максимальной степени приблизить их химический и фазовый составы, а также структуру и морфологию поверхности к составам и структурам костной ткани, чтобы такой материал мог функционировать в живом организме так же, как и естественная ткань. Сегодня общепризнана необходимость присутствия различных форм фосфатов кальция (гидроксиапатит (ГАП), ТКФ и др.) в составе костных тканеинженерных конструкций. Фосфаты кальция как минеральная составляющая нативной костной ткани, могут одновременно обеспечивать требуемые механические характеристики каркасной структуры ТИК и повышать ее остеоиндукционный и остеокондуктивный потенциал. Помимо состава, большое влияние на эффективность процессов формирования и ремоделирования костной ткани оказывает также и внутренняя архитектура синтетических матриксов, в особенности, структура и распределение пор по их объему [14]. При этом все компоненты материала матрикса должны быть биологически совместимы с организмом. Он должен быть остеокондуктивным, а в идеале, и остеоиндуктивным (за счет присутствия в нем биологически активных компонент, усиливающих регенеративный потенциал имплантируемой системы, таких как, например, морфогенетические протеины). Матрикс должен быть биodeградируем со временем, коррелирующим с кинетикой остеосинтеза, а также иметь градиентный состав и архитектуру, оптимальные для стимулирования неоваскуляризации и жизнедеятельности osteoобразующих клеток. Химические свойства материалов матрикса, его архитектура и топография поверхности не должны исключать возможность его использования в качестве депо для лекарственных препаратов с контролируемой кинетикой их выхода.

В настоящее время в качестве основного остеозамещающего материала в клинической практике наиболее часто используют ГАП [3]. Он обладает высокой биологической совместимостью благодаря своему химическому и структурному сходству с минеральной фазой естественной костной ткани. ГАП ускоряет рост, пролиферацию и дифференциацию остеобластов [15]. Однако поликристаллический ГАП по своим химическим, механическим и биологическим свойствам не удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к современным биоматериалам для инженерии костной ткани. Его широкое применение сегодня ограничено целым рядом факторов, таких, как: хрупкость, сложность в формировании изделий необходимой формы и крайне низкая скорость биорезорбции [16]. Кроме того, установлено, что применение объемных (более нескольких кубических сантиметров) блоков ГАП приводит к неприемлемо высокой вероятности отторжения имплантатов при клинических применениях [14].

Важно также учитывать, что ГАП по-разному влияет на формирование и рост клеток различных типов. Так в работе [17] исследовали биосовместимость ГАП различной дисперсности (от 0,5 до 800 мкм) с фибробластами и миобластами. Было показано, что индивидуальные микрочастицы ГАП подавляют рост этих клеток, причем наиболее активно этот процесс проявляется с частицами наименьших размеров. В тоже время применение наноразмерного ГАП (нано-ГАП) увеличивает площадь его поверхности по сравнению с микро-размерным ГАП, и, соответственно, увеличивает скорость его биорезорбции. Это, в свою очередь повышает его биоактивность и улучшает остеointеграцию имплантата с окружающими тканями [18]. Наноструктурированные фосфаты кальция обладают специфическими биологическими свойствами: высокой адсорбцией протеинов, повышенной функцией стимулирования остеокластов и остеобластов — клеток, участвующих в процессе ремоделирования костной ткани, а также пониженной функцией пролиферации конкурирующих клеток, в частности фибробластов, ответственных за формирование соединительной ткани [19]. Эти свойства связывают с высокими энергетическими состояниями и морфологией поверхности нанокристаллической керамики. Поэтому, изучение влияния нано-ГАП на рост клеток и формирование тканей, начавшееся в последние годы, является чрезвычайно актуальным и одним из активно развивающихся направлений современной тканевой инженерии.

Поэтому понятно, что использование ГАП в качестве мелкодисперсного биоактивного наполнителя различных полимерных матриц позволяет устранить практически все перечисленные ранее недостатки объемных конструкций ГАП, существенно улучшая при этом остеointеграционные свойства [20].

Среди различных форм фосфатов кальция, обладающих контролируемой скоростью биодеградации, наибольшее внимание сегодня привлекает композиционная бифазная керамика на основе ГАП – ТКФ. Важным преимуществом этих бифазных композиционных материалов является возможность прецизионного регулирования кинетики их биодеградации простым изменением соотношения ГАП:ТКФ, имеющих различные скорости биорезорбции растворимых фаз в одном материале. Более быстрое растворение ТКФ в организме способствует процессу минерализации в зоне имплантации, а более устойчивая фаза ГАП обеспечивает требуемые механические характеристики матрикса в течение времени, необходимого для формирования нативного костного межклеточного матрикса и последующего цикла ремоделирования костной ткани *de novo*.

Развитый в настоящей работе подход позволяет в принципе реализовать выполнение всех вышеперечисленных требований к композиционным керамическим материалам с градиентной структурой, что, в свою очередь, может обеспечить создание высококачественных имплантационных систем и биомедицинских изделий, предназначенных для эффективного замещения дефектов и направленной регенерации костных тканей.

Выводы

Разработанный метод ПСЛС позволяет получать минерал-полимерные материалы на основе фосфатов кальция и алифатических полиэфиров и изготавливать из них трехмерные матриксы заданной архитектоники для замещения костных дефектов и направленной регенерации костной ткани.

Методом сканирующей электронной микроскопии изучены микроструктура полученных экспериментальных образцов, а также морфология их поверхности и внутренней структуры.

Показано, что эффективное связывание мелкодисперсных частиц фосфатов кальция может осуществляться за счет размягчения или плавления поверхности полимерных частиц, находящихся между ними. Для реализации такого режима ПСЛС сферических частиц ТКФ вполне достаточно воздействия

непрерывного лазерного излучения умеренной (до 10 Вт) мощности.

Архитектура формируемых матриц, их структура и пористость (форма и размер ячеек) задается используемой компьютерной моделью. В ходе подготовки процесса формирования керамических композиционных материалов и объемных структур на основе фосфатов кальция с градиентным распределением пористости могут варьироваться и экспериментально подбираться оптимальные порошковые смеси и толщины спекаемых слоев, интенсивность и скорость сканирования лазерного излучения.

Устойчивого режима ПСЛС можно достичь при добавлении в исходные порошки ТКФ частиц полилактида в соотношении от 20 до 30 масс. %. При этом наиболее критичным параметром для получения прочных и пространственно однородных структур является скорость сканирования лазерного луча.

Характерные значения прочности при сжатии и относительной деформации минерал-полимерных композитных образцов, полученных методом ПСЛС из мелкодисперсных порошков, состоявших из 80 масс. % керамических гранул на основе ТКФ и 20 масс. % D,L-полилактида PDL04 соответствуют характерным показателям аналогичных параметров трабекулярной костной ткани.

В результате проведенного первичного исследования биологических свойств минерал-полимерных композитных матриц, изготовленных методом ПСЛС, показано, что они обладают низкой цитотоксичностью и не оказывают негативного влияния на пролиферативный потенциал МСК при культивировании в составе ТИК. А это значит, предложенная нами технология ПСЛС может быть эффективно использована для создания клеточных носителей для тканевой инженерии.

Все это позволяет рассматривать полученные материалы в качестве весьма перспективных для создания на их основе методом ПСЛС индивидуальных минерал-полимерных композитных имплантатов и матриц для костных ТИК, способных обеспечить ускорение репаративных процессов и эффективную остеointеграцию.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-25-00055, в части разработки исходных минерал-полимерных композиций для ПСЛС) и РФФИ (грант № 13-02-12041 офи-м, в части исследования и оптимизации процесса ПСЛС вышеуказанных композиций и № 13-04-12073 офи-м в части биологических испытаний in vitro).

Литература

1. Laurencin C.T., Khan Y., El-Amin S.F. Bone graft substitutes. *Expert Rev. Med. Devices*, 2006, v. 3, p. 49 – 57.
2. Попов В.К. Имплантаты в замещающей и регенеративной медицине костных тканей. В кн.: Биосовместимые материалы, ред. В.И. Севастьянов и М.П. Кирпичников. М.: Изд-во “МИА”, 2011, с. 253 – 294.
3. Yang S., Leong K., Du Z., Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering*, 2001, v. 7, p. 679 – 689.
4. Баринов С.М. Керамические и композиционные матрицы на основе фосфатов кальция для медицины. *Успехи химии*, 2010, v. 79, p. 15 – 30.
5. Штильман Б.И. Полимеры медико-биологического назначения. М.: Академкнига, 2006, 400 с.
6. Naing M.W., Chua C.K., Leung K.F., Wang Y. Fabrication of customised scaffolds using computer-aided design and rapid prototyping techniques. *Rapid Prototyping Journal*, 2005, v. 11, p. 249 – 259.
7. Peltola S.M., Melchels F.P., Grijpma D.W., Kellomäki M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of Medicine*, 2008, v. 40, no. 4, p. 268 – 280.
8. Simpson R.L., Wiria F.E., Amis A.A., Chua C.K., Leong K.F., Hansen U.N. Development of a 95/5 poly(L-lactide-coglycolide)/hydroxylapatite and b-tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *J. Biomed Mater Res B*, 2008, v. 84B, p. 17 – 25.
9. Savalani M.M., Hao L., Dickens P.M., Zhang Y., Tanner K.E., Harris R.A. The effects and interactions of fabrication parameters on the properties of selective laser sintered hydroxyapatite polyamide composite biomaterials. *Rapid Prototyping Journal*, 2012, v. 18, p. 16 – 27.
10. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Howdle S.M., Konovalov A.N., Popov V.K., Shakesheff K.M., Whitaker M.J. 3-D bioactive and biodegradable scaffolds fabricated by selective laser sintering. *Advanced Materials*, 2005, v. 17, no. 3, p. 327 – 330.
11. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Howdle S.M., Konovalov A.N., Popov V.K., Panchenko V.Ya. Fabrication of polymer scaffolds for tissue engineering using surface selective laser sintering. *Laser Physics*, 2006, v. 16, p. 774 – 787.
12. Komlev V.S., Barinov S.M., Koplik E.V. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. *Biomaterials*, 2002, v. 23, p. 3449 – 3454.
13. Попов В.К., Евсеев А.В., Антонов Е.Н., Баграташвили В.Н., Коновалов А.Н., Панченко В.Я., Барри Дж.Дж., Уитакер М.Дж., Хоудл С.М. Лазерные технологии изготовления индивидуальных имплантатов и матриц для тканевой инженерии. *Оптический Журнал*, 2007, т. 74, № 9, с. 636 – 640.
14. *Bioceramics and their clinical applications*, ed. Tadashi Kokubo, Woodhead Publishing Limited and Boca Raton

- CRC Press, Boston, New York, Washington DC, 2008, 784 p.
15. Boskey A.L. Bone mineralization, in Cowin S.C., Bone Mechanics Handbook, Boca Raton, CRC Press, Boston, New York, Washington DC, 2001, p. 5-1 – 5-33.
 16. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*, 2003, v. 24, p. 2133 – 2151.
 17. Sun J.S., Tsuang Y.H., Chang W.H.S., Lis J., Liu H.C., Lins F.H. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. *Biomaterials*, 1997, v. 18, p. 683 – 690.
 18. Lewandowski K.U., Bondre S.P., Wise D.L., Trantolo D.J. Enhanced bioactivity of a poly(propylene fumarate) bone graft substitute by augmentation with nano-hydroxyapatite. *Biomed. Mater. Eng.*, 2003, v. 13, p. 115 – 124.
 19. Ginebra M.P., Driessens F.C., Planell J.A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*, 2004; 25, p. 3453 – 3462.
 20. Levenberg S., Lange R. Current topics in developmental biology. *Advances in Tissue Engineering*, 2004, v. 61, p. 113 – 134.
 - selective laser sintering. *J. Biomed Mater Res B*, 2008, vol. 84B, pp. 17 – 25.
 9. Savalani M.M., Hao L., Dickens P.M., Zhang Y., Tanner K.E., Harris R.A. The effects and interactions of fabrication parameters on the properties of selective laser sintered hydroxyapatite polyamide composite biomaterials. *Rapid Prototyping Journal*, 2012, vol. 18, pp. 16 – 27.
 10. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Howdle S.M., Konovalov A.N., Popov V.K., Shakesheff K.M., Whitaker M.J. 3-D bioactive and biodegradable scaffolds fabricated by selective laser sintering. *Advanced Materials*, 2005, vol. 17, iss. 3, pp. 327 – 330.
 11. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Howdle S.M., Konovalov A.N., Popov V.K., Panchenko V.Ya. Fabrication of polymer scaffolds for tissue engineering using surface selective laser sintering. *Laser Physics*, 2006, vol. 16, pp. 774 – 787.
 12. Komlev V.S., Barinov S.M., Koplik E.V. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, pp. 3449 – 3454.
 13. Popov V.K., Evseev A.V., Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Konovalov A.N., Panchenko V.Ja., Barri Dzh.Dzh., Uitaker M.Dzh., Houdl S.M. Lazernye tehnologii izgotovleniya individual'nyh implantatov i matric dlja tkanevoj inzhenerii [Laser technology of individual implants and matrices for tissue engineering]. *Opticheskij zhurnal — Journal of optical technology*, 2007, vol. 74, no. 9, pp. 636 – 640.
 14. Bioceramics and their clinical applications, ed. Tadashi Kokubo, Woodhead Publishing Limited and Boca Raton CRC Press, Boston, New York, Washington DC, 2008, 784 p.
 15. Boskey A.L. Bone mineralization, in Cowin S.C., Bone Mechanics Handbook, Boca Raton, CRC Press, Boston, New York, Washington DC, 2001, 5-1–5-33.
 16. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* 2003, vol. 24, p. 2133–2151.
 17. Sun J.S., Tsuang Y.H., Chang W.H.S., Lis J., Liu H.C., Lins F.H. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. *Biomaterials*, 1997, vol. 18, pp. 683 – 690.
 18. Lewandowski K.U., Bondre S.P., Wise D.L., Trantolo D.J. Enhanced bioactivity of a poly(propylene fumarate) bone graft substitute by augmentation with nano-hydroxyapatite. *Biomed. Mater. Eng.*, 2003, vol. 13, pp. 115 – 124.
 19. Ginebra M.P., Driessens F.C., Planell J.A. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*, 2004, vol. 25, pp. 3453 – 3462.
 20. Levenberg S., Lange R. Current topics in developmental biology. *Advances in Tissue Engineering*, 2004, vol. 61, pp. 113 – 134.

References

1. Laurencin C.T., Khan Y., El-Amin S.F. Bone graft substitutes. *Expert Rev. Med. Devices*, 2006, vol. 3, pp. 49 – 57.
2. Popov V.K. *Implantaty v zamestitel'noj i regenerativnoj medicine kostnyh tkanej* [Implants in replacement and regenerative medicine bone]. V kn.: *Biosovmestimye materialy*, ed. V.I. Sevast'janov, M.P. Kirpichnikov, Moscow, MIA Publ., 2011, pp. 253 – 294.
3. Yang S., Leong K., Du Z., Chua C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering*, 2001, vol.7, pp. 679 – 689.
4. Barinov S.M. Keramicheskie i kompozicionnye materialy na osnove fosfatov kal'cija dlja mediciny [Ceramic and composite materials based on calcium phosphates for medicine]. *Uspekhi himii — Russian chemical reviews*, 2010, vol. 79, pp. 15 – 30.
5. Shtil'man B.I. *Polimery mediko-biologicheskogo naznachenija* [Polymers of medical and biological applications]. Moscow, Akademkniga Publ., 2006, 400 p.
6. Naing M.W., Chua C.K., Leung K.F., Wang Y. Fabrication of customised scaffolds using computer-aided design and rapid prototyping techniques. *Rapid Prototyping Journal*, 2005, vol. 11, pp. 249 – 259.
7. Peltola S.M., Melchels F.P., Grijpma D.W., Kellomäki M. A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes. *Annals of Medicine*, 2008, vol. 40, no.4, pp. 268 – 280.
8. Simpson R.L., Wiria F.E., Amis A.A., Chua C.K., Leong K.F., Hansen U.N. Development of a 95/5 poly(L-lactide-coglycolide)/ hydroxylapatite and b-tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via

Статья поступила в редакцию 6.10.2014 г.

Антонов Евгений Николаевич — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН (г. Троицк, Московская область), кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, специалист в области лазерных технологий. E-mail: e_n_antonov@mail.ru.

Баринов Сергей Миронович — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН (г. Москва), доктор технических наук, заместитель директора, заведующий лабораторией, специалист в области материаловедения. E-mail: barinov_s@mail.ru.

Вахрушев Игорь Викторович — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича” (г. Москва), кандидат медицинских наук, научный сотрудник, специалист в области клеточных технологий и тканевой инженерии. E-mail: vakhrunya@gmail.com.

Комлев Владимир Сергеевич — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН (г. Москва), доктор технических наук, ведущий научный сотрудник, специалист в области биоматериалов. E-mail: komlev@mail.ru.

Попов Владимир Карпович — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН (г. Троицк, Московская область), доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией, специалист в области лазерных и аддитивных технологий. E-mail: popov@laser.ru.

Федотов Александр Юрьевич — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН (г. Москва), кандидат технических наук, старший научный сотрудник, специалист в области биоматериалов. E-mail: antishurik@mail.ru.

Ярыгин Константин Никитич — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича” (г. Москва), доктор биологических наук, заведующий лабораторией, специалист в области клеточной биологии и регенеративной медицины.

Selective laser sintering of bioactive composite matrix for bone tissue engineering

**E. N. Antonov, S. M. Barinov, I. V. Vakhrushev, V. S. Komlev,
V. K. Popov, A. Yu. Fedotov, K. N. Yarygin**

A method for surface-selective laser sintering, which produces mineral-polymeric materials based on calcium phosphates and aliphatic polyesters. The three-dimensional matrices given architectonics for bone defects replacement and bone tissue engineering were obtained. By Scanning Electron Microscopy the microstructure of the obtained experimental samples and their surface morphology and internal structure were investigated. The characteristic values of the compressive strength and the relative deformation mineral-polymer composite samples obtained by surface-selective laser sintering of fine powders consisting of 80 wt. % of ceramic granules on the basis of tricalcium phosphate and 20 wt. % D, L-poly(lactide PDL04 match the characteristic parameters of the similar parameters of the trabecular bone. As a result of the initial study the biological properties of mineral-polymer composite scaffolds fabricated by surface-selective laser sintering, it is shown that they have a low cytotoxicity and no adverse effect on the proliferative potential of mesenchymal stem cells. The proposed technology surfactant selective laser sintering can be effectively used to establish scaffolds for bone tissue engineering.

Keywords: selective laser sintering, scaffold, aliphatic polyesters, tricalcium phosphate, bone tissue engineering, cytotoxicity.

Antonov Evgeny — Institute on laser and information technologies of RAS, PhD.
e_n_antonov@mail.ru.

Barinov Sergey — A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Material Science RAS, Moscow, DrSci
(Eng), deputy director, *barinov_s@mail.ru.*

Vakhrushev Igor — Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, PhD, *vakhrunya@gmail.com.*

Komlev Vladimir — A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Material Science RAS, Moscow,
DrSci (Eng), *komlev@mail.ru.*

Popov Vladimir — Institute on Laser and Information Technologies of RAS, Troitsk, Moscow
Region, Russia, DrSci (PhysMath), *popov@laser.ru.*

Fedotov Alexander — A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Material Science RAS, Moscow,
PhD, *antishurik@mail.ru.*

Yarygin Konstantin — Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, DrSci (Biolog).