

УДК 576.3/7.002.3:531/534, 616-089.843;
616-77, 616.31; 617.52-089

УКПП

№ держреєстрації № 0122U000770

Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет (СумДУ)
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58 e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з наукової роботи
д-р фіз.-мат. наук, професор

А.М. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
Визначення osteoconductivних та osteoinductivних властивостей
полімернано-гідроксиапатитних біодеградуєчих скафолдів

СТВОРЕННЯ БІОПОЛІМЕРНИХ
НАНОГІДРОКСИАПАТИТНИХ СКАЛФОРДІВ
(проміжний)

Науковий керівник
канд. мед. наук. доц.

О.М. Олешко

2022

Рукопис закінчено 20 грудня 2022 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від 22.12.2022 р. № 7

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, Провідний. наук. співроб., канд. мед. наук, доц.	<hr/> (22.12.2022)	О.М. Олешко (реферат, вступ, висновки, розділи 1,2,3)
Наук. співроб.	<hr/> (22.12.2022)	В. М. Дейнека (розділ 1,2,3)
Наук. співроб., канд. мед. наук	<hr/> (22.12.2022)	Т.Б. Олешко (розділ 1,2,3)
Старший викладач кафедри договір цивільно-правового характеру	<hr/> (22.12.2022)	Х.В. Берладір (розділ 1,2,3)
Мол. наук. співроб.	<hr/> (22.12.2022)	А.В. Гапченко (розділ 2)
Студент, лаборант	<hr/> (22.12.2022)	Ю.С. Дудко (розділ 3)
Аспірант, договір цивільно- правового характеру	<hr/> (22.12.2022)	Б.О. Дригваль (розділ 3)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 75 с., 23 рис., 5 табл., 82 джерела.

3D ДРУК, БІОДЕНГРАДАЦІЯ, БІОНАНОМАТЕРІАЛИ, БІОПОЛІМЕРИ, НАНО ГІДРОКСИАПАТИТ, НАНОЧАСТОЧКИ ОКСИДУ ЦИНКУ ТА СРІБЛА, ОРТОПЕДИЧНІ ТА СТОМАТОЛОГІЧНІ СКАФОЛДИ, ПОЛІКАПРОЛАКТОН, ПОЛІМОЛОЧНА КИСЛОТА.

Об'єкт дослідження – процеси 3D-принту тривимірних біодеградуючих полімерних скафолдів.

Предмет досліджень – структура та фізико-хімічні й біологічні властивості полімер-нано-гідроксиапатитних скафолдів отриманих методом 3D-принту з наночастинками срібла та оксиду цинку.

Мета роботи – встановлення загальних закономірностей створення тривимірних полімерногідроксиапатитних скафолдів з метою контролю процесів резорбції в біологічних умовах та біосумісності імплантатів модифікованих за складом та структурою, а також їх антибактеріальні властивості, за рахунок включення наночастинок срібла та оксиду цинку.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

1. Теоретичний аналіз механізмів утворення біополімерних наногідроксиапатитних скафолдів.

2. Розробка алгоритму складання математичної моделі створення біополімерних скафолдів, що ґрунтується на методі проектування тривимірних об'єктів та статистичного аналізу, яка враховує параметри процесу 3D принту.

3. Розроблення лабораторної методики створення біополімерних скафолдів з наночасточками срібла та оксиду цинку, з урахуванням варіабельності параметрів 3D принту.

4. 3D-друк біополімерних наногідроксиапатитних скафолдів з додаванням наночасточок срібла та оксиду цинку. Визначення параметрів 3D-друку (температура, діаметр волокна, метричні параметри пор і товщини

риштовання скафолдів) в залежності від співвідношення PCL/PLA та концентрації наногідроксиapatиту.

5. Дані узагальнення результатів дослідження під кутом зору впливу співвідношення полікапролактону (PCL) / полімолочної кислоти (PLA) та концентрації наногідроксиapatиту, параметрів 3D-друку (температура, діаметр волокна, метричні параметри пор і товщини риштовання скафолдів), а також концентрації наночастинок срібла та оксиду цинку на мікроструктуру, механічні властивості отриманих біополімерних наногідроксиapatитних скафолдів.

ЗМІСТ

Перелік скорочень, умовних познач, одиниць і термінів	6
ВСТУП	7
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	10
2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	28
2.1 Матеріали та 3D друк скафолдів	28
2.2 Тест на занурення SBF	30
2.3 Скануюча електронна мікроскопія	33
2.4 Рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія	34
2.5 Вимірювання контактного кута	34
2.6 Оцінка механічних властивостей	37
2.7 Культивування культур клітин	38
2.8 Статистичні методи	39
3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ	40
3.1 Розробка та проектування моделі 3D друку	40
3.2 Характеристика поверхні та структури полімерних скафолдів	53
3.3 Фізико-хімічні властивості	54
4 ОБГОВОРЕННЯ	61
ВИСНОВКИ	65
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	66

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ, УМОВНИХ ПОЗНАК, ОДИНИЦЬ І ТЕРМІНІВ

HA – гідроксиапатит;

PLA – полімолочна кислота;

PCL – полікапролактон;

CA – контактний кут;

SBF – simulated body fluid;

EDX – energy dispersive X-ray;

SEM – scanning electron microscope;

TEM – трансмісійний електронний мікроскоп;

XPS – рентгенівська фотоелектронна спектроскопія;

°C – градус Цельсія;

KYO (CFU) – колонієутворюючі одиниці;

Ag – срібло;

AgNP – наночастинки срібла;

ZnONPs – наночастинки оксиду цинку

ВСТУП

Основною рисою третього тисячоліття є прагнення до підвищення якості та тривалості людського життя. Істотну роль у досягненні цього відіграють успіхи в розробленні та використанні нових біоматеріалів, тобто матеріалів, застосовуваних у медицині для підтримання життєдіяльності й нормального функціонування організму. За останні 50 років використано понад 40 різних матеріалів (кераміка, метали, полімери) для лікування, відновлення та заміни різних частин людського тіла, враховуючи шкірні покриви, м'язову тканину, кровоносні судини, нервові волокна, кісткову тканину тощо.

Актуальність та необхідність розроблення нових біоматеріалів обумовлена існуючим високим попитом на полімерні матеріали для різних сфер діяльності, насамперед біомедичні.

Розроблення нових матеріалів медичного призначення, необхідних для контакту живого організму із середовищем, є завданням високої складності. Особливо затребувані спеціалізовані біосумісні матеріали для нового напрямку медичного матеріалознавства, сформованого в останні роки – клітинної та тканинної інженерії, пов'язаного з реконструктивною хірургією й розробленням біоштучних органів. Ці дослідження реалізуються на стику хімії високомолекулярних сполук, біотехнології, біофізики, молекулярної та клітинної біології й медицини і містять комплекс взаємозв'язаних фундаментальних завдань.

У результаті стрімкого прогресу різних складових частин фізико-хімічної біології виник новий напрямок у науці та виробництві, що отримав назву біотехнології. Цей напрямок сформувався за останні два десятиліття і вже зараз набув потужного розвитку. Знання про процеси життєдіяльності, що стрімко розширюються, дозволяють не лише пристосовувати ці процеси для практичних цілей, а й керувати ними, а також створювати досить перспективні в практичному відношенні нові системи, що не існують у природі, хоча й аналогічні існуючим.

Біотехнології загалом є системою прийомів спрямованого використання процесів життєдіяльності живих організмів для отримання промисловим способом цінних продуктів. Ці технології базуються на використанні каталітичного потенціалу різних біологічних агентів та систем – мікроорганізмів, вірусів, рослинних і тваринних клітин та тканин, а також позаклітинних речовин і компонентів клітин. На цей час розроблення та освоєння біотехнології займають важливе місце в діяльності практично всіх країн.

Біотехнологічні процеси багатогранні за своїм історичним корінням і за своєю структурою, вони поєднують елементи фундаментальних наук, а також низку прикладних галузей, таких як хімічна технологія, машинобудування, економіка. Сучасні біотехнології гостро потребують науково-обґрунтованого опрацювання технології та апаратурного оформлення. Тому необхідний органічний зв'язок із технічними науками: машинобудуванням, електронікою, автоматикою. Суспільні та економічні науки також важливі в розвитку екологічної біотехнології, оскільки вирішувани нею практичні завдання мають велике соціально-економічне значення для будь-якого суспільства.

Біоматеріали та полімери (НА, PLA та PCL) за останні десятиліття склали реальну альтернативу традиційним металам в ортопедії, хірургії та серцевій хірургії завдяки можливості повної елімінації після виконання своєї функції. А можливість створення 3D-структур виводить сучасну науку на зовсім інший рівень. Проте, наявність ряду недоліків характерних для металевих конструкцій, таких як: неконтрольована резорбція, розбіжність механічних властивостей (модуль Юнга та ін.), а також відсутність абсолютної біологічної нейтральності чужорідного матеріалу по відношенню до кісткової тканини, є основною проблемою клінічного використання деградуючих сплавів, в зв'язку з можливістю розвитку низки клінічних ускладнень. Для усунення даної проблеми використовують різні методи: створення нових сплавів та post-cast обробка, формування захисного покриття чи заміна металевої основи на гідроксиапатитну, а також використання технологій 3D друку. Дане дослідження

спрямоване на створення абсолютно нового пористого полікапролактоново-гідроксиапатитного скафолду отриманого методом 3D друку. В дослідженні будуть використані різні модельні концентрації та типи наноструктур компонентів з метою покращення біосумісності та антимікробних властивостей, а також визначені оптимальні параметри процесу (температура, співвідношення PCL/PLA й метричні параметри пор та волокна друку). Також будуть досліджені терміни деградації та динаміка вивільнення елементів, в залежності від типу, складу та структури скафолду. Біологічна відповідь та рівень стимуляції остеогенезу буде оцінена за допомогою комерційно доступних клітинних ліній: HOS-кісткова остеосаркома, U2OS-кісткова остеосаркома людини, CHO-huCEACAM1-4L-клітина яєчника китайського хом'яка, остеобласти (вибрані з окістя).

1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Кістка – це пориста композитна структура, що складається з кристалів гідроксиапатиту у полімерній матриці [1], яка пошкоджується внаслідок багатьох причин, таких як переломи, онкологічні захворювання кісткової тканини, травми, остеопороз та інше. Саме тому відновлення пошкодженої кісткової тканини є актуальною проблемою в галузі ортопедії. До певного часу застосування аутотрансплантатів, алотрансплантатів та ксенотрансплантатів використовувалось найчастіше. Проте зараз відомо, що їх застосування супроводжується труднощами у обмеженні передачі захворювань, виникненням відповіді імунної системи, характеризуються недостатньою біосумісністю та проблемами з донорством [2].

Сьогодні альтернативним способом відновлення кістки є інженерія кісткової тканини. Основною метою тканинної інженерії є виготовлення тривимірної (3D) пористої структури, яка імітує позаклітинний матрикс і підтримує механічні та біологічні властивості, так званий каркас. Він повинен бути біосумісним, біологічно розкладаним і мати достатню механічну міцність, пористість і взаємозв'язок з кістковою тканиною [3]. Незважаючи на те, що традиційні методи можуть створювати високопористі каркаси, вони мають обмеження щодо дизайну внутрішніх каркасів і виготовлення відтворених взаємопов'язаних пористих структур для росту та міграції клітин, дифузії поживних речовин та видалення продуктів життєдіяльності клітин. Технології швидкого прототипування забезпечили неперевершений прогрес у виробництві попередньо сконструйованих крихтих пористих структур із довільною внутрішньою структурою, що є перспективним методом виготовлення скафолдів із відповідними механічними та біологічними властивостями для інженерії кісткової тканини [4]. Дійсно, ці методи можуть створювати об'єкти шар за шаром відповідно до 3D дизайну. Виготовлення плавлених ниток (FFF) – це відносно недорога техніка швидкого прототипування, яка широко використовується для виготовлення бажаних скафолдів, при абсолютно

контрольованій структурі останніх, як ззовні та і всередині [5]. У 3D слайсингу FFF нитка розплавляється в камері зріджувача та наноситься шар за шаром через сопло для виготовлення 3D-зразка, безпосередньо з моделі автоматизованого проектування. Після кожного кроку друкуюча головка піднімається, і наступний шар наноситься на попередній, доки спроектований об'єкт не буде завершено [6].

Важливу роль при виготовленні кісткового каркасу, який задовольнив би усі необхідні вимоги, відіграє коректний вибір відповідного матеріалу (біосумісного, біорозкладаного та біоактивного). В тканинній інженерії використовується широкий спектр полімерів: природних (колаген, хітозан, гіалуронова кислота тощо) і синтетичних (PLA, PGA та PLGA). Хоча природні полімери мають більш виражені властивості для посилення регенерації кісток, їхні недоліки, такі як імуногенетична відповідь, не достатні механічні властивості, обмежують їх застосування в інженерії кісткової тканини. Тому використання синтетичних полімерів є альтернативним способом лікування дефектів кісток. Синтетичні полімери мають деякі переваги, зокрема індивідуальні механічні властивості, можливість відтворення і більшу довговічність. Крім того, перевагою штучних полімерів є властивість термостійкості, що робить їх придатними для виготовлення ниток для плавлення [7].

Стрімкий розвиток галузі адитивного виробництва, яка включає 3D-друк, дозволив відносно швидко виготовляти індивідуальні медичні пристрої з високою геометричною точністю. Однак науковий пошук та розробка матеріалів зі специфічними властивостями все ще триває, включаючи ті, що застосовуються для покращеного відновлення кісток. В зоні пошуку знаходяться матеріали з індивідуальними механічними властивостями, близькими до кісткової тканини, і, що важливо, які можуть служити тимчасовою опорою, що дозволить новій кістковій тканині вростати, поки матеріал розсмоктується. Таким чином, контроль швидкості резорбції матеріалів для кісткових імплантів може сприяти

загоєнню кістки шляхом балансування між утворенням нової тканини і розсмоктуванням імплантату.

Пошук ідеальних матеріалів для відновлення завжди був викликом для хірургів-ортопедів та науковців. За характеристикою компонентів, синтетичні матеріали для відновлення структури кісток можна розділити на метали та їх сплави, біокераміку, кальцій-фосфатний кістковий цемент, полімерні матеріали, композитні матеріали, матеріали тканинної інженерії тощо. Серед них полімерні матеріали використовуються для реконструкції кісток з середини 1960-х років, з перевагами імуносумісності та еталонної біосумісності [8]. Полімерні матеріали, які зазвичай використовуються в інженерних дослідженнях кісткової тканини, можна розділити на природні та синтетичні полімерні матеріали. Серед них природні полімери такі як: колаген, фібрин, хітин, гіалуронову кислоту, альгінат натрію, хітозан тощо [9, 10]. До синтетичних полімерів відносяться полімолочна кислота (PLA), полігліколева кислота (PGA), полі (молочно-когліколева кислота) (PLGA), полівініловий спирт (PVA), полікапролактон (PCL), поліамід та інші синтетичні полімери [11]. Природні полімерні матеріали мають хорошу біосумісність і тим самим сприяють поліпшенню клітинних властивостей. Однак їх важко спроектувати, вони мають обмежену технологічну потужність, існує високий ризик забруднення, а також їм притаманні такі властивості як нестабільність і мінливість. У порівнянні з природними матеріалами, синтетичні полімерні матеріали мають стійкі хімічні властивості та можуть бути модифіковані для отримання специфічних властивостей. Інші переваги синтетичних полімерних матеріалів включають економічну ефективність, потужність масового виробництва та більш тривалий час зберігання [12]. Синтетичні полімерні матеріали в основному використовуються у вигляді каркасів для відновлення структури кісток, а композитні матеріали з тканинними клітинами, факторами росту та іншими матеріалами, а отже можуть поліпшити біологічну активність і біосумісність матеріалу [13]. Розвиток розробки біоматеріалів дає широкі перспективи для майбутнього лікування захворювань і

травм кісток, а вчені з усього світу постійно досліджують біоматеріали, які можуть відновлювати дефекти кісткової тканини.

За останні кілька десятиліть поєднання зображення високої роздільної здатності з адитивним виробництвом дозволило розробити індивідуальні імплантати та хірургічні пристрої [14]. Вчені на чолі з *К. Тарра* підтвердили, що успіх імплантату залежить від типу біоматеріалу, який використовується для його виготовлення. Ідеальний матеріал для імплантату має бути біосумісним, інертним, механічно міцним і легко піддаватися формуванню. Здатність створювати індивідуальні імплантати для пацієнтів із біоактивними препаратами, клітинами та білками зробила технологію 3D-друку революційною в медицині та фармацевтиці. Зараз у медичному напрямку 3D-принту використовується велика різноманітність біоматеріалів, включаючи метали, кераміку, полімери та композити. Завдяки безперервним дослідженням і прогресу в галузі біоматеріалів, які використовуються в 3D-слайсінгу, відбулося швидке зростання застосування 3D-друку для виготовлення індивідуальних імплантатів, протезів, скафолдів для доставки медичних препаратів і 3D-каркасів для тканинної інженерії та регенеративної медицини. Детальний аналіз найпоширеніших типів технологій медичного 3D-друку включає моделювання плавленого осадження, біодрук на основі екструзії, струменевий і поліструменевий друк, а їх клінічне застосування, різні типи біоматеріалів, які зараз використовуються дослідниками та виявлення основних обмежень у їх застосуванні, дозволяє вибрати найбільш оптимальний вид імплантату для кожного конкретного випадку. Однак, ще багато роботи належить зробити для розробки нових біоматеріалів, які можна виготовляти за допомогою такого виробництва.

Завдяки короткому періоду обробки, а також порівняно низькій вартості виготовлення ниток для плавлення (FFF – fused filament fabrication), 3D-друк є привабливою технікою для виготовлення виробів медичного призначення. За цією методикою виготовляються 3D-об'єкти шляхом плавлення термопластичних полімерних ниток, екструдуючи їх через нагріте сопло та

наносючи розплавлені матеріали на робочу пластину з високою геометричною точністю [15,16]. Останнім часом зусилля науковців були спрямовані на дослідження та розробку нових синтетичних матеріалів з хорошою придатністю для друку з метою їх застосування в тканинній інженерії. У зв'язку з цим велику увагу привернули біосумісні матеріали [15]; це стосується термопластичних полієфірів. Скаффолди на основі полімерів, спрямовані на регенеративну інженерію кісткової тканини, повинні стати тимчасовим каркасом з потенціалом сприяння регенерації кістки. Тому деградуючі матеріали, які підтримують утворення нової кісткової тканини, під час їх активного або пасивного розсмоктування, не викликаючи шкідливих наслідків для загоєння кісток [17], таких як надмірна запальна реакція, завоювали велику популярність та актуальність.

Полімолочна кислота (PLA) - це один з термопластичних полієфірів, який використовується в клініках як резорбційний опорний матеріал для фіксації кісток і зв'язок [18], що представляє великий інтерес з метою виготовлення ниток для плавлення через його хорошу здатність до друку, пластичність, біосумісність і біодеградацію. Він також має відносно високий рівень механічних властивостей і може бути виготовлений з відновлюваних ресурсів, таких як кукурудза [19, 20]. PLA гідролізується *in vivo* до утворення молочної кислоти [21]. За свої властивості PLA було схвалено Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA) для широкого клінічного застосування. Однак цей матеріал має і такі недоліки: як висока гідрофільність і висока швидкість деградації, а проміжні продукти деградації можуть призводити до окислення рН середовища, а також його модуль Юнга суттєво відрізняється від аналогічного показника живої кістки, адже сам матеріал є досить крихким. PLA як матеріал, для безпосередньо використовуються з метою відновлення дефектів кісток, не є ідеальним, і для оптимізації властивостей останнього потрібно додати інші матеріали з метою створення ідеально збалансованого полімеру [22].

Незважаючи на біосумісність і здатність до деградації PLA, його біологічна активність є недостатньою, отже розробка композитних матеріалів які включають мінеральну складову, що схожа за складом з кістковою тканиною, є актуальною проблемою сучасної науки. Наприклад, було встановлено, що гідроксиапатит (НА), який становить мінеральну складову кісткової тканини, підвищує біоактивність матеріалу [23-25]. Сам по собі гідроксиапатит володіє біоактивністю і біосумісністю, тому може стимулювати ріст кісткової тканини шляхом стимуляції адгезії клітин [7]. Однак обидва ці матеріали (PLA та НА) крихкі [19,23], що обмежує їх застосування до кісток, які несуть навантаження. Для підвищення міцності можна додавати пластифікатори, жорсткі наповнювачі та сополімери для отримання полімерного композиту, який може мати покращені механічні властивості [19,20]. Наприклад, полікапролактон (PCL), який є біосумісним і біорозсмоктуваним поліестером з перспективними властивостями для медичних скафолдів, як повідомляється, покращує міцність крихкого PLA, що може призвести до отримання полімерної матриці, більш придатної для застосування в тканинній інженерії кістки [7, 19, 20]. Групою інших науковців було досліджено роль гідроксиапатиту на властивості PCL каркасів для кісткових імплантів [2]. Попередньо розроблені пористі каркаси (розмір пор 400 мкм і пористість 37 % для посилення регенерації кістки) були виготовлені за допомогою комерційних FFF. Спочатку було синтезовано НА, потім виготовлено композитні плівки з різними відсотками НА (0 %, 5 %, 10 %, 15 % і 20 %) для підтримки механічних і біологічних властивостей експериментального матеріалу порівняно зі структурними компонентами кістки. Діапазон відсоткового вмісту НА був обраний на основі реології та можливості друку ниток. Після виготовлення волокон були надруковані каркаси з підготовлених композитних плівок та досліджено вплив різних співвідношень НА на механічні та біологічні властивості каркасу. Скафолди показали кращі механічні властивості порівняно з деякими попередніми дослідженнями. Крім того, їх біоактивність і біологічні властивості досягли бажаного рівня. А використання недорогого пристрою для виготовлення скафолдів дозволяє знизити кінцеву

ціну скафолдів, що є дуже важливим фактором для розробки медичних інструментів і їх доступності для кожного. Таким чином, надруковані на 3D-принтері каркаси PCL/HA є перспективними для інженерії кісткової тканини.

Полікапролактон (PCL) – це поліефірний органічний полімер, виготовлений шляхом штучного синтезу. При фізіологічних температурах напівкристалічний PCL досягає еластичного стану, що призводить до його високої міцності, високої в'язкості та чудових механічних властивостей, а також хорошої біосумісності, повільної швидкості деградації та кристалічності [26]. На додаток до біосумісності та біодеградації, PCL широко використовується, як основа для швів, що розсмоктуються, регенеративної терапії та скафолдів для доставки ліків, в зв'язку з його легкодоступністю та економічною доцільністю. Більший час деградації сприяє широкому застосуванню останнього для заміщення твердих і несучих тканин шляхом збільшення їх жорсткості, а також для заміщення м'яких тканин шляхом зменшення їх молекулярної маси та часу деградації [12]. Для того, щоб каркас мав антибактеріальні властивості, *Felice et al.* приготували скаффолди в суміші з оксидом цинку. Результати показали, що висока концентрація оксиду цинку може викликати ранню мінералізацію, а регулювання концентрації оксиду цинку і розподілу в матеріалі сприяє регулюванню швидкості деградації матеріалу, який проявляє антибактеріальні властивості до *S.aureus* [27]. *Lee et al.* у своїх дослідженнях культивували наночастинки на полігексиллактоновому каркасі, покритому полідопаміном. Було виявлено, що такий склад скаффолда має хорошу остеогенну активність в експериментах *in vivo*, що, як очікується, забезпечить нові варіанти матеріалів для відновлення та регенерації кісткових дефектів [28]. *Wu et al.* зробили 3D-друковані силікатні кальцієві, PCL та ацелюлярні позаклітинні матричні каркаси, і помітили, що вони продемонстрували чудову біосумісність, адгезію клітин, проліферацію та диференціацію шляхом збільшення експресії генів, пов'язаних з остеогенезом [29]. Мікропориста матриця PCL каркасу, знайдена *Palama et al.*, підтримує прикріплення, проліферацію та остеогенну диференціацію остеобластів, тоді як багат шарова

фіксація поліелектролітів на поверхні ендопор підтримує локальне вивільнення дексаметазону. Ці мікропористі каркаси демонструють здатність здійснювати лікування дексаметазоном місцево, а також сприяти проліферації та диференціації остеобластних клітин *in vitro* [30].

Швидкість розпаду та побічні продукти біоматеріалів мають першочергове значення для регенерації тканин. Деградація може відбуватися активно під впливом діяльності клітин та міжклітинного середовища в місці імплантації [31], або пасивно, що зумовлено фізико-хімічними властивостями самого біоматеріалу [32]. Швидкість деградації полімерів залежать від кількох факторів, основними з яких є молекулярна маса, ступінь кристалічності та пористості або площа поверхні [33]. До факторів зовнішнього середовища, які можуть відігравати важливу роль у деградації каркасу відносять температуру, рН середовища та наявність механічних подразників. Наприклад, швидкість деградації PLA *in vivo* затверджено в діапазоні від 12 місяців до 5 років, залежно від ступеня його кристалічності [34]. Як правило, PCL демонструє нижчі темпи деградації, ніж PLA, що становить до чотирьох років за певних умов [15]. Проте можна підвищити швидкість деградації полімерів шляхом додавання мінеральних фаз, таких як HA [35].

Нещодавні дослідження висвітлюють розробку індивідуальних композитів та суміші полімерів [36], включаючи їх застосування в техніці FFF [37-40]. Більшість досліджень зосереджено на поєднанні полімерних матриць з біоактивними мінералами для покращення їх біоактивності, деградації та біоінертності. Попередні роботи були зосереджені на комбінуванні PLA з HA або PCL з HA або аналогічної кераміки на основі фосфату кальцію. Хоча використання PCL широко досліджувалося з використанням інших методів адитивного виробництва, існує недостатньо досліджень, які б вивчали комбінацію PCL і PLA з HA за допомогою техніки прямого 3D друку за допомогою FFF ниток, а також особливостей деградації такого складу. Цей новий підхід до отримання FFF ниток має низьку собівартість, отже може служити альтернативою для покращення не лише розвитку індивідуальних

геометричних характеристик для кожного пацієнта, але й для налаштування їх фізико-хімічних характеристик з метою покращення адаптації до місця імплантації. Наприклад, механічні властивості, що є корегованими в залежності від складу та структури кінцевого скафолду чи композиту, є альтернативою при виборі методу заміщення дефекту в залежності від типу кістки [36].

У дослідженні *Rezania et al.* матеріалом для каркасу остеоімплантів були обрані (PCL) і HA [2]. Позитивні характеристики (PCL), включаючи біосумісність, довгострокову біорозкладаність, відмінні механічні властивості та схвалення FDA для широкого клінічного застосування, що робить його відповідним матеріалом для інженерії кісткової тканини [4, 41, 42]. Крім того, він також придатний для друку за допомогою пристрою FFF [43-45]. Гідроксиапатит є біосумісною та біоактивною мінеральною структурою, схожою на природну кісткову тканину, яка широко використовується як замітник кістки. Нещодавно полімерно-керамічні композиції, такі як PCL/HA, були використані для створення кісткового скелета, який посилює клітинну проліферацію та регенерацію кістки *in vivo* [4]. При цьому необхідно зазначити, що модуль Юнга отриманого матеріалу різниться з аналогічним показником живої кістки.

Опубліковано ряд праць, які стосувалися виготовлення надрукованих на 3D-принтері композитних кісткових каркасів. Хоча вони показали достатні результати, в їхніх роботах помітна недостатня кількість *in vivo* досліджень.

Kim J-W, et al. виготовили композитні каркаси з пористого полі (ε-капролактону) (PCL)/гідроксиапатиту (HA) для регенерації кісток, які можуть мати спеціалізовану макро/мікропористу структуру з високими механічними властивостями та відмінною біоактивністю *in vitro* шляхом друку з використанням ряду розчинників. Була проведена оцінка впливу співвідношення HA (0, 10, 15 і 20 %) на механічні та біологічні властивості каркасів, виготовлених за допомогою системи 3D-графіків, і показано, що цей процес призвів до отримання високопористих каркасів (пористість 78 %) із розміром пор (~248 мкм), що було характерно для всіх композитних каркасів PCL/HA і сприяло регенерації кісткової тканини. Механічні властивості, такі як межа

міцності на розтяг і межа текучості при стисненні, збільшувалися зі збільшенням вмісту НА. Крім того, введення біоактивних частинок НА у полімер PCL призвело до значного покращення здатності до утворення апатиту *in vitro*. Таким чином доведено, що додавання частинок НА підвищило механічні властивості (міцність на розтяг і стиснення) і хорошу біоактивність. Незважаючи на метод FFF, який базується на плавленні та екструзії ниток, система 3D-графіку використовує тиск повітря для екструзії матеріалу [4].

Bruyas A. et al. досліджували вплив складу (0–60 % β -TCP/PCL) на властивості каркасів, виготовлених за допомогою FFF. Ця робота була спрямована на експериментальну характеристику та розробку 3D-друкованих каркасів для потенційних ортопедичних застосувань. Показано, що шорсткість та змочуваність поверхні були прямо та обернено пропорційні кількості β -TCP, а швидкість деградації зростала зі збільшенням кількості кераміки. Додавання β -TCP посилювало проліферацію та остеогенну диференціацію. Також систематично вивчали вплив складу та пористості на механічні властивості 3D-друкованого каркасу. Як збільшення кількості β -TCP, так і зменшення пористості збільшили модуль Юнга 3D-друкованих каркасів. Таким чином збільшення β -TCP покращило механічні, біологічні, деградаційні та поверхневі властивості кісткової основи [41]. Однак вони не досліджували біоактивність зразків і реологічну поведінку надрукованих зразків.

У своїй статті *Huang et al.* досліджували використання полімерно-керамічних композитних каркасів для інженерії кісткової тканини. Різні керамічні матеріали (гідроксиапатит (НА) і β -три-кальцій фосфат (TCP)) змішували з полі- ϵ -капролактоном (PCL). Скаффолди з різним складом матеріалів були виготовлені за допомогою системи адитивного виробництва на основі екструзії. Вироблені каркаси були фізично та хімічно оцінені, враховуючи механічні випробування, змочуваність, скануючу електронну мікроскопію та термогравіметричні випробування. Тести на життєздатність, прикріплення та проліферацію клітин проводили з використанням стовбурових клітин жирової тканини людини (hADSC). Результати показують, що каркаси, що містять НА,

демонструють кращі біологічні властивості, а каркаси TSP мають покращені механічні властивості. Однак додавання цих двох керамічних частинок не вплинуло на змочуваність каркасів [43]. *Gatto M.L. et al.* повідомили про надруковані на 3D-принтері каркаси PCL/HA (70/30 % маси) для інженерії кісткової тканини. Вони підготували суміш порошку PCL/HA та використали технологію лазерного порошкового злиття (LPBF) для виготовлення скафолдів. Вони оцінювали морфологічні властивості каркасів, пористість, механічну та біологічну поведінку [46].

Використовуючи оптимізовані параметри друку LPBF, мікро- та макропористі каркаси для регенерації кісткової тканини були виготовлені шляхом регулярних повторів у просторі елементарних комірок алмазу (DO) та ромбічного додекаедра (RD). Після виробництва оцінювали структурні, механічні та біологічні характеристики каркасів. Взаємодія скафолдів з мезенхімальними стовбуровими клітинами людини (hMSC) дозволила вивчити деградаційні процеси матриці PCL. Біомеханічні показники та біорозпад каркасів порівнювали з результатами літератури та даними кісткової тканини. Випробування на механічне стиснення, біологічна життєздатність до 4 днів інкубації та швидкість деградації засвідчили сильну залежність поведінки каркаса від геометрії елементарної комірки, а також від глобальних геометричних особливостей. Вивчення комбінації біосумісних полімерних матриць з біоактивним мінералом, таким як HA, з метою надання індивідуальних характеристик матеріалам для виготовлення ниток для плавлення є актуальним та дуже важливим напрямком розвитку кісткової інженерії. Дослідження поєднання цих матеріалів дозволяє коригувати налаштування властивостей для виробництва матеріалів, придатних для застосування у відновленні кісток, з особливим акцентом на поведінці їх деградації, включаючи механічну та хімічну стійкість [46].

Відомо, що змішування PLA і PCL дає можливість отримання пористої морфології для сумішей, а мінорний компонент у полімерній суміші найчастіше утворює дисперсну фазу в безперервній фазі, утвореній головним компонентом.

Результати *Wachirahuttapong et al.* [19], *Navarro-Baena et al.* [47] і *Matta et al.* [48] у своїх працях підтвердили це. На відміну від PLA/PCL скафолдів, композитні суміші з НА демонстрували шорстку поверхню, викликану мінеральною фазою, включеною в полімерну матрицю. Таким чином, включення НА може не тільки покращувати біоактивність матеріалу, але й підвищує шорсткість поверхні, що також може мати сприятливий вплив на адгезію та проліферацію клітин [14, 49-52].

Navarro-Baena et al. було виявлено, що термічні властивості (T_g , T_m і T_{deg}) сумішей і композитних сумішей знаходяться між значеннями вхідних чистих полімерів, можна було підтвердити явище змішування обох полімерів. Температури деградації для сумішей і композитних сумішей також підтвердили, що додавання PCL покращило термічну стабільність PLA. Однак зниження T_{cc} зі збільшенням вмісту PCL може бути пов'язано з нуклеаційним ефектом, який приписують PCL під час кристалізації PLA [47].

За даними досліджень *Akerlund et al.* поряд із покращеною термічною стабільністю спостерігалася підвищена температура початку та зміщення деградації як для сумішей, так і для композитних сумішей порівняно з чистим PLA [53]. Навпаки, *Ferri J. et al.* повідомили, що композитні суміші PLA:НА продемонстрували незначне зниження температури початку деградації [24]. Вони пояснили це зниження гідролізом PLA, який, швидше за все, був ініційований НА, оскільки це гідрофільна сполука з високою спорідненістю до вологи. Гідролітичний розрив ланцюгів є найпоширенішим шляхом розкладання високомолекулярних складних полієфірів, таких як PLA, і може відбуватися двома різними основними шляхами, такими як об'ємна чи поверхнева деградація. Перша призводить до зменшення молекулярної маси полімеру через вивільнення побічних продуктів кінцевої карбоксильної та гідроксильної груп. Під час останньої деградації поверхні, молекулярна маса залишається незмінною через поверхневі побічні продукти, які залишають поверхню шляхом дифузії до середовища, що, натомість, призводить до розрідження матеріалу [33]. Однак, оскільки це зниження початкової температури розпаду не спостерігалось для

композитних сумішей у дослідженні *Akerlund et al.*, можна припустити, що це покращення викликане додаванням PCL. Загалом дослідження термостабільності показали, що ні екструзія, ні температура друку не мали впливу на ці матеріали [53]. Це було додатково підтверджено результатами, отриманими за допомогою FTIR на матеріалах, таких як плівка чи нитка, де не було виявлено жодних змін у хімічному складі. Це має велике значення при розробці матеріалів для біомедичних застосувань, оскільки зміни в хімічному складі можуть викликати шкідливі відповіді в організмі, наприклад такі як сильні імунні реакції [54].

Згідно з оприлюдненими результатами вчених *Nishida et al.* було сформульовано загальну тенденцію, яка спостерігалася щодо механічних властивостей у сумішах і композитних сумішах, що полягала в зниженні жорсткості зі збільшенням вмісту PCL, тобто збільшення кількості PCL підвищувало пластичні властивості матеріалів. Дослідження впливу вмісту PCL у сумішах PLA:PCL на модуль Юнга та пікові показники на стискання показало, що для двох сумішей з більшою кількістю PCL напруга стиску зменшувалася зі збільшенням вмісту PCL [55]. Хоча загальною тенденцією було зниження міцності на стиск із збільшенням вмісту PCL, суміш 90PLA10PCL призвела до нижчого значення міцності на стиск, ніж суміші 80PLA20PCL і 70PLA30PCL. Тим не менш, як оброблені суміші, так і композитні суміші продемонстрували вищі механічні властивості, ніж нативна трабекулярна кістка, але не кортикальна кістка [56], що вказує на можливе застосування як опорний матеріал для несучих велике навантаження губчастих кісток.

Нещодавно *Wu et al.* досліджували доцільність використання композитних ниток для моделей трабекулярної кістки, які також можна застосувати для подальшої перевірки придатності композитів PLA-PCL-НА як замінників кістки [25]. Крім того, інше дослідження вивчало вплив щільності заповнення на міцність на стиск циліндрів із чистого PLA, надрукованих на 3D-принтері. Науковці повідомили про навантаження на руйнування 21 кН на циліндри з 80 % заповненням [57], таке ж навантаження на руйнування при стисненні, яке було

отримано для чистого PLA зі 100 % щільністю заповнення в іншому дослідженні [53]. Це означає, що аналогічну стійкість до навантаження на стиск можна отримати з меншою на 20 % щільністю заповнення. Дане твердження можна додатково дослідити на сумішах і композитах, щоб мінімізувати кількість використовуваного матеріалу.

Втрата ваги і морфологічний аналіз показали повільніший коефіцієнт деградації PCL порівняно з PLA, що пов'язано з гідрофобною природою PCL і вищою кристалічністю [15, 20, 47]. Цікаво, що відповідно до попередніх досліджень [58] сополімери PLA:PCL показали вищі швидкості деградації, ніж чистий PLA. Загалом суміші PLA:PCL деградують приблизно на 10 % швидше, ніж PLA. Це явище можна пояснити ефектом пластифікатора від додавання PCL, який порушує кристалізацію PLA, отже, аморфізуючи PLA та посилюючи його деградацію. Зміни в морфології поверхні сумішей PLA:PCL також могли зіграти роль у вищих показниках деградації порівняно з чистим PLA. Відомо, що морфологія сумішей відображала вищу шорсткість із появою пор, розмір яких збільшувався зі збільшенням вмісту PCL [53]. Ця морфологія може збільшити загальну площу поверхні матеріалів і їх змочуваність, таким чином сприяючи швидшій деградації. Нарешті, додавання НА ще більше покращило поведінку деградації, забезпечивши на 40 % швидшу деградацію порівняно з PLA. Слід зазначити, що включення НА у полімерні матриці може підвищити загальну гідрофільність і знизити кристалічність PLA [15, 49], таким чином підвищуючи швидкість деградації. Що стосується кополімерів, збільшення площі поверхні через грубшу поверхню композитних сумішей і появу локальної пористості, що діє як канал для впливу середовища на сипучий матеріал, також могло вплинути на збільшення деградації. Деградація поверхні була помітна за зменшенням діаметра циліндрів, що становило приблизно 0,5 мм для сумішей і 2 мм для композитних сумішей. Деградація поверхні також спостерігалася за допомогою СЕМ; гладка поверхня первинних зразків і після 6 годин деградації стала шорсткою через 28 днів внаслідок ерозії [49]. Також можна побачити деякі відмінності в морфології поверхні між різними сумішами, які, згідно з

Mohseni et al [15], може бути наслідком різної швидкості реакції гідролізу для сумішей.

Встановлено, що незважаючи на значну деградацію, яка спостерігалася морфологічно та зі втратою ваги в зразках, спектри FTIR не виявили подальших доказів побічних продуктів деградації [53]. Основними побічними продуктами гідролізу PLA є карбоксильні (-COOH) і гідроксильні (-OH-) групи [15, 49], смуги яких перекриваються смугами первинних матеріалів.

У своєму дослідженні *Olewnik-Kruszkowska et al.* вивчила теплові властивості зразків, проаналізовані за допомогою DSC, порівнюючи первинні та деградовані зразки. Виявлено, як правило, зниження T_{sc} і розрив кривих плавлення для деградованих зразків. Нижчий T_{sc} корелює зі зниженням загальної кристалічності та молекулярної маси [58]. Подібним чином утворення коротших ланцюгів під час деградації може призвести до утворення подвійного піку на кривих плавлення, що зображує перший пік для первинної полімерної структури та другий пік для нової кристалічної структури [15]. Крім того, композитні суміші продемонстрували зниження T_g під час деградації, як потенційний результат деградації PLA, що призвело до збільшення побічних продуктів олігомеру молочної кислоти, про що також свідчить XRD-аналіз.

Було виявлено, що PCL підвищує термічну стабільність недеградованих матеріалів, що можна пояснити швидшою деградацією PLA, збільшуючи загальний внесок PCL у термічні властивості під час гідролізу PLA. Це також може бути поясненням підвищення термічної стабільності композитів після деградації. Оскільки деградація PLA була прискорена додаванням мінералу, відносний вміст PCL збільшився порівняно з PLA у вихідній композиції. Однак зниження термічної стабільності двох сумішей із більшою кількістю PLA після розкладання може бути пов'язане зі зменшенням молекулярної маси [58].

Загалом філаменти з індивідуальним складом, що складаються з комбінацій PLA, PCL та HA, продемонстрували термічну та хімічну стабільність. Також дані матеріали показали хороші властивості необхідні для друку, щоб застосовувати їх у економічній техніці FFF [53]. Подальша характеристика

деградації матеріалів і побічних продуктів, що вивільняються під час деградації, необхідна для оцінки безпеки цих матеріалів з біологічної точки зору та подальшого дослідження їх потенціалу, як матеріалів для тканинної інженерії кісткових дефектів. Важливо, що поведінку деградації можна контролювати шляхом включення як PCL, так і HA в PLA. Завдяки ретельному контролю кількості PCL швидкість деградації може зрости до 10 %, тоді як подальше додавання HA сприяє пришвидшенню деградації в 3 рази порівняно з чистим PLA, або в 1,5-2 рази для сумішей PLA:PCL. Ці показники можна додатково оптимізувати шляхом регуляції пористості під час 3D друку і загальної геометрії каркаса. Розробка спеціальних комбінацій матеріалів, що складаються з біосумісних і біологічно розкладаних полімерів, окремо або в поєднанні з мінеральними частинами, дозволить отримати матеріали для друку з хімічною стабільністю та механічними властивостями, схожими з живою кісткою.

Отже, у порівнянні з традиційними металевими імплантатами, які застосовуються в ортопедії та хірургії, біодергадуючі полімерні скафолди мають оптимальні з біологічної точки зору механічні параметри та простоту в клінічному застосуванні. Проте, проблема не контрольованої передчасної деградації не дозволяє використовувати дані матеріали, а наявні комерційні продукти є недоступними для державної медицини та відсутні в Україні. Оптимізація та контроль термінів деградації полімерів можлива за рахунок створення біологічних сополімерів, котрі мають пролонгований термін деградації та є біосумісними. Розглядаючи можливість використання полікапролактонів, як альтернативних біоматеріалів, необхідно дослідити ряд їх особливостей. А саме, фізико хімічні властивості та біологічну відповідь окремо взятого полімеру, та зміну чи залежність вищезазначених функцій в залежності від співвідношення відсоткового компоненту окремих полімерів при створенні комбінованих багатоконпонентних біодеградуючих полімерних скафолдів. Окремо взяті синтетичні полімери володіють оптимальними фізико-хімічними параметрами, але при цьому не мають адекватної біологічної відповіді чи навпаки. При цьому, нано-гідроксиапатит (наноНА) – матеріал, що має широке

застосування через його біосумісність, схожість з неорганічною структурою кістки та прямий стимулюючий ефект остеогенезу. Однак, існує проблематика створення тривимірних структур чіткої форми з оптимальними механічними параметрами на основі нано-ГА. Тому в більшості випадків, останній використовується як функціоналізоване покриття металевих імплантатів, котрі в свою чергу мають ряд недоліків. Відсутність біодеградації металів та не контрольована резорбція, розбіжність механічних властивостей (модуль Юнга та ін.), а також відсутність абсолютної біологічної нейтральності чужорідного матеріалу по відношенню до кісткової тканини, ймовірність відторгнення монолітної структури, є основною проблемою клінічного використання металевих сплавів, в зв'язку з можливістю розвитку низки клінічних ускладнень чи навіть необхідності повторної операції [24, 25, 31].

Зважаючи на це, створення біодеградуючих полімер-нано-гідроксиапатитних скафолдів з наночасточками та визначення їх фізико-хімічних властивостей та біологічної відповіді є актуальною та до кінця не вирішеною проблемою сьогодення.

В останні роки використовують ряд методик для тканинної інженерії: моделювання плавленням осадженням, 3D-друк, 3D біосхема, стереолітографія та вибіркоче лазерне спікання. 3D друк є оптимальним методом обробки полікапролактонів, адже основним питанням щодо застосування обробки полімерних біоматеріалів звичайно є метод їх обробки. Проте, саме 3D-друк став надихаючою технологією виробництва тривимірних пористих біоматеріалів для заміщення пошкоджених твердих тканин та відновлення дефектів кісток. Проте, не всі матеріали можуть використовуватися як основа 3D-принту в зв'язку з наявністю певних обмежень: температура обробки, біосумісність, біодеградація, відповідна механічна міцність та низька цитотоксичність [32, 33]. При цьому на сьогодні існують методики як прямого, так і не прямого 3D-друку, а останній ще й має ряд недоліків: складність та висока собівартість обладнання, додаткове використання токсичних розчинників, а також довготривалість та багатоетапність методики, а головне – не можливість створення пористої

структури. Отже метод прямого 3D-друку є пріоритетним у виготовленні тривимірних пористих структур, основою яких можуть бути природні (колаген, альгінати, желатин та хітозан) та синтетичні полімери (аліфатичні поліефіри, полімолочна кислота (PLA), полігліколева кислота (PGA), полі-ε-капролактон (PCL), полідіоксанон (PDO)) [34]. При цьому останні, за рахунок своїх властивостей, є більш пріоритетними. Адже PCL та PLA, окремо вивчені на високому рівні, демонструють майже абсолютну біологічну інертність та досить швидку гідролітичну біодеградацію, оптимальні структуру та пористість, а також механічні властивості (модуль Юнга та пружність) [35].

На сьогодні відкритим залишається питання щодо оптимальних параметрів процесу 3D-друку (температура, співвідношення PCL/PLA й метричні параметри пор та волокна друку) та можливості контролю біодеградації, оптимальних концентрацій гідроксиапатиту з урахування особливостей його наноструктури, як стимулятора остеогенезу, а також вивчення біологічної відповіді застосування запропонованого комплексу в цілому.

2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали та 3D друк скафолдів

Для виготовлення зразків були використані два біодеградуючі полімери: полікапролактон (Polycaprolactone, PCL) та полілактид (Polylactic acid, PLA), а також шліфувальний папір з карбиду кремнію (SiC) з зернистістю 60, 80, 120, 160, 240, 400, 600, 800, 1 000, 1 600, 2 000 та 2 400 придбані у Sigma – Aldrich (Сент-Луїс, Міссурі, США). Усі речовини та реагенти для експерименту із культурами клітин були замовлені у Gibco®, США (Gaithersburg, Меріленд). Первинні культури людських остеобластів отримано від медичної компанії Пауа (Київ, Україна).

Матеріал, перед використанням, був попередньо висушений у термостаті ТС-80М2 при температурі 40 °С впродовж 3 годин. Суміші PLA-PCL готували шляхом розрізання нитки PLA на невеликі шматочки та розчинення в дихлорметані впродовж 1 години. Потім додавали відповідну кількість гранул PCL і залишали при перемішуванні до повної гомогенізації (4 години). Потім суміш полімерів переливали в кристалізатор і залишали для випаровування розчинника при кімнатній температурі щонайменше на 20 год. Після цього плівки суміші збирали, розрізали і зберігали в сушильній шафі до їх екструзії. Композиційні аналоги готували аналогічно вищезазначеному. Гідроксиапатит диспергували в дихлорметані протягом 15 хв перед додаванням полімерів.

Перед екструзією всі плівки були подрібнені. Пластівці подавали в одношнековий екструдер (EXO EXTRUDER, Україна) для отримання ниток товщиною 1,75 мм. Параметри екструзії варіювалися залежно від складу матеріалу.

За допомогою Echo Extruder з полікапролактону та полілактиду, а також гідроксиапатиту були виготовлені нитки діаметром 1,75 мм для використання під час 3D друку. Маркування та склад групи зразків як контрольних (чистий PLA та PCL), так і експериментальних (комбінований полімер PLA/PCL/HA у різному співвідношенні) наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Маркування та склад контрольних та експериментальних полімерів

Маркування	PLA (мас. %)	PCL (мас. %)	HA (мас. %)
PLA	100	-	-
PCL	-	100	-
90PLA10PCL	90	10	-
80PLA20PCL	80	20	-
70PLA30PCL	70	30	-
90PLA10PCL-15HA	76.5	8.5	15
80PLA20PCL-15HA	68	17	15
70PLA30PCL-15HA	59.5	25.5	15

Розробка 3D моделі проводилась в програмі FreeCad 0.19. Модель проектувалась по XY площині у вигляді шайби діаметром 10 мм. та висотою 5 мм. з використанням стандартного набору функцій. Після експорту моделі у форматі stl. за допомогою програмного забезпечення Ultimaker Cura 4.11.0 була проведена перевірка готової моделі на наявність дефектів під час моделювання та слайсингу. Параметри слайсингу групи зразків як контрольних (чистий PLA та PCL), так і експериментальних (комбінований полімер PLA/PCL/HA у різному співвідношенні) наведені в таблиці 2.2 та 2.3. Елементи підтримки не використовувались.

Отриманий G-code для 3D принтеру Flyingbear Ghost 5 на основі моделі та параметрів слайсингу, переносився за допомогою SD-карти SanDisk. Через систему меню принтера, обраний файл друкувався з використанням FFF 3D принтеру FLYINGBEAR GHOST 5 в закритому приміщенні при температурі повітря 22 °C та вологості 45 %.

Надруковані зразки, після охолодження столу принтера від'єднувалися за допомогою шпателью.

Таблиця 2.2 – Параметри слайсингу для контрольних PLA та PCL матеріалів у програмному забезпеченні Ultimaker Cura 4.11.0

Матеріал		PLA	PCL
Якість	Висота шару	0,1 мм	0,1 мм
	Висота першого шару	0,1 мм	0,1 мм
Заповнення	Заповнення	100 %	100 %
	Шаблон	Сітка	Сітка
Матеріал	Температура сопла	205 (°C)	63 (°C)
	Температура стола	60 (°C)	30 (°C)
Швидкість	Друку	40 мм/с	15 мм/с
	Переміщення	120 мм/с	120 мм/с
	Першого шару	15 мм/с	15 мм/с
Переміщення	Велечина відкату	6,5 мм	6,5 мм
	Швидкість відкату	35 мм/с	35 мм/с
Охолодження		100%	100%
Тип прилипання		Класичний	Класичний

Таблиця 2.3 – Параметри слайсингу для експериментальних полімерів у програмному забезпеченні Ultimaker Cura 4.11.0

Зразок	Швидкість друку, (мм/с)	Температура сопла (°C)	Температура стола (°C)
90PLA10PCL	25	200	60
80PLA20PCL	25	200	60
70PLA30PCL	50	200	60
90PLA10PCL-15HA	50	200	60
80PLA20PCL-15HA	50	200	60
70PLA30PCL-15HA	50	200	60

2.2 Тест на занурення SBF

З метою оцінки деградації в умовах *in vitro* та корозійної стійкості, як контрольної так і експериментальної групи зразків, проводили тест на занурення в розчин Simulated body fluid (SBF), котрий за концентрацією іонів, максимально подібний до плазми крові людини, а саме: 142,0 ммоль/л Na^+ , 5,0 ммоль/л K^+ , 1,5 ммоль/л Mg^{2+} , 2,5 ммоль/л Ca^{2+} , 147,8 ммоль/л Cl^- , 4,2 ммоль/л HCO_3^- , 1,0 ммоль/л HPO_4^{2-} , 0,5 ммоль/л SO_4^{2-} . Розчин SBF готували наступним чином – у дистильованій воді розчиняли NaHCO_3 , KCl , $\text{K}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2

та Na_2SO_4 , рН якої доводили до 7,40 за допомогою трис (гідроксиметил) амінометану та 1М CHCl при 37 °С.

Перед початком дослідження вага всіх зразків була визначена за допомогою вагів аналітичного класу (Лабораторні електронні ваги AS 220.R2).

Тест в статичних умовах:

Усі зразки занурювали окремо в 50 мл розчину SBF при 37°C (початкове значення рН $7,4 \pm 0,02$). Занурені зразки розміщували в свіжому SBF без перемішування, для збереження стабільного хімічного складу та значення рН розчину SBF, при цьому повна заміна розчину відбувалась кожні два дні. Вибрано широкий діапазон часу занурення, включаючи 6, 24, 48 і 72 годин та 7, 14, 21 і 28 дні. Для забезпечення стабільності температурних параметрів лабораторний посуд з реагентом та досліджуваними зразками знаходився в термостаті (Термостат електричний сухоповітряний ТС-80М-2) при температурі 37°C та активованій функції вентиляції. Розчин SBF змінювали кожні 2 дні.

Тест в динамічних умовах:

Для оцінки біодеградації було розроблено та запатентовано систему імітації кровообігу (рис. 2.1), що працює наступним чином: розчин SBF в об'ємі 1 літр заливають в еластичний контейнер, далі через систему трубок з медичного силікону рідина рухається через перистальтичний двигун з контролером швидкості до контейнера зі зразками та знову повертається до еластичного контейнеру. Після закриття еластичного контейнеру та запуску перистальтичного двигуна відповідно заданих параметрів, отримуємо заповнену штучно змодельовану систему кровообігу, котра герметично закрыта. За допомогою механічного затискача стискаємо еластичний контейнер, цим самим, під контролем манометра, збільшуємо тиск в змодельованій системі кровообігу. Розчин SBF в системі змінювали кожні 2 дні. В дослідженні були застосовані наступні параметри:

- тиск рідини – 760 мм.рт.ст. – 1 атм;
- швидкість току рідини 0,4 мл/хв.

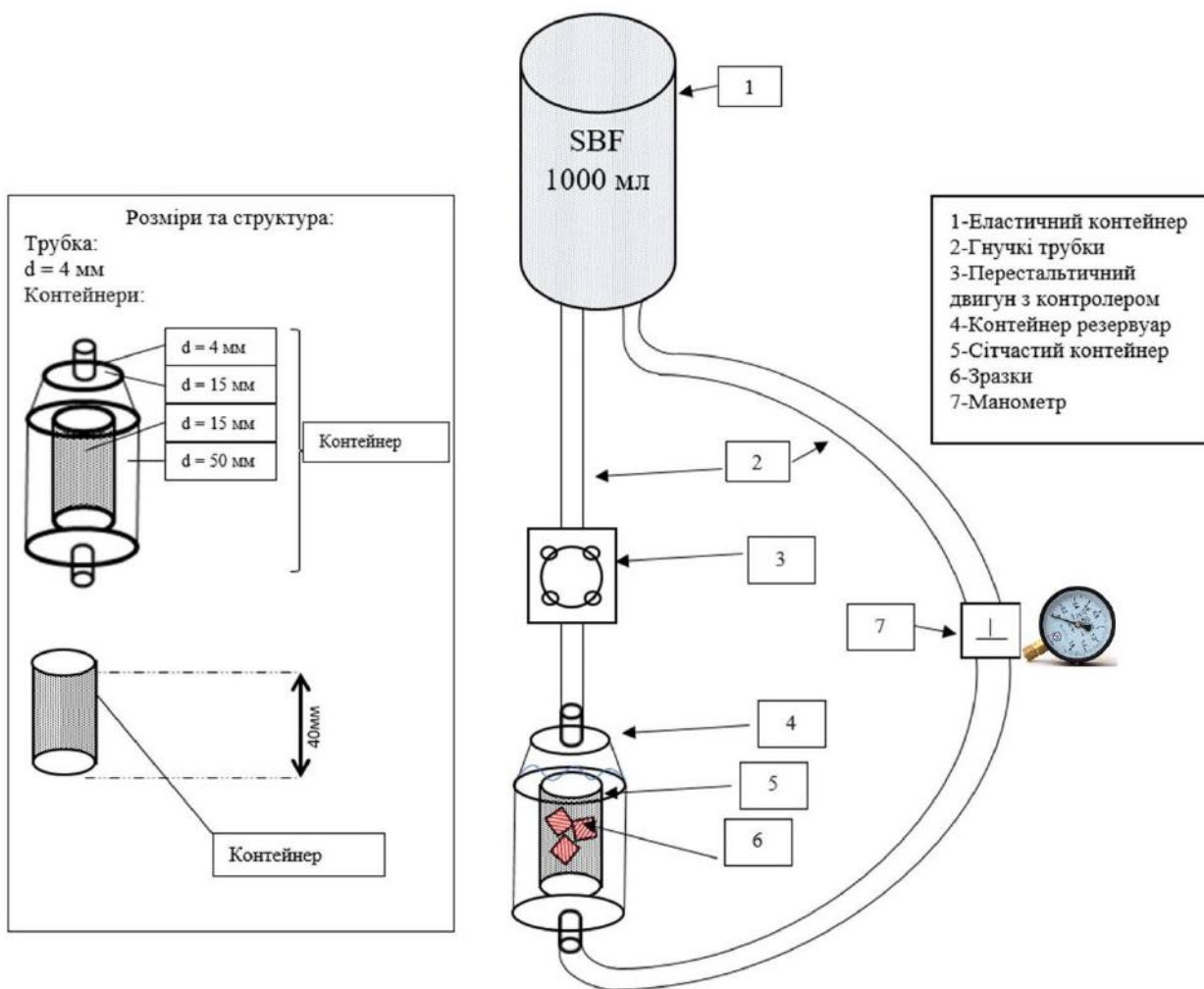


Рисунок 2.1 – Схематичне відображення системи імітації кровообігу

По завершенню кожного періоду, як при статичних так і при динамічних умовах, зразки промивали дистильованою водою, висушували на фільтрувальному папері в термостаті при температурі 37 до постійної ваги та проводили контрольний замір ваги. Швидкість деградації та рівень корозійної стійкості зразків оцінювали за допомогою вимірювань втрати ваги та аналізу морфології поверхні.

Розрахунком втрати ваги проводили за формулою:

$$\omega(\%) = \left(m_0 - \frac{m_1}{m_0}\right) \times 100,$$

де m_0 – вага до занурення;

m_1 – вага після занурення. Для оцінки корозійної стійкості (Er) отримані данні ваги та площі до та після експерименту обчислювали за допомогою наступної формули:

$$Er = \frac{M_i}{S} - \frac{M_p}{S} \quad 1)$$

де M_i – початкова вага зразка (мг);

M_p – вага зразка після обробки (мг);

S – площа зразка (см²).

2.3 Скануюча електронна мікроскопія

Для аналізу морфології поверхні (особливості рельєфу, розмір та кількість пор, кратерів та мікротріщин) після обробки зразків було використано скануючий електронний мікроскоп (SEO-SEM Inspect S50-B (FEI, Брно, Чехія)) в різних діапазонах збільшень. Використовувалися режими вторинного електрону (режим геометрії поверхні) та відбитого електрону (режим фазового контрасту). У режимі оцінки поверхні зростаючий вольтаж для визначення топографії складав 10 кеВ, струм електронного пучка – 10А, а діаметр пучка – 0,03 мкм.

Перед дослідженням зразки напиляли тонким провідниковим шаром (графіт чи срібло), щоб зняти заряд та екранувати падаючий пучок, тим самим уникнути ефекту «зарядки» поверхні зразка.

Вивчення пористості поверхні, а також визначення площі та метричних характеристик новостворених структур було реалізовано за допомогою програмного забезпечення Trial Version Image-Pro 10.0.7. З кожної групи експериментальних зразків було відібрано по шість зображень. На різних збільшеннях завантажених зображень ми визначили площу досліджуваної ділянки, загальну площу поверхні, а також площу та кількість пор, кратерів і мікротріщин. Наступний етап включав в себе розподіл новостворених структур

модифікованої поверхні за метричними характеристиками та підрахунок їх кількості в кожній групі.

2.4 Рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія

Для вивчення морфології поверхні полімерних скафолдів визначали поперечні перерізи зразків. Зразки заливали в епоксидну смолу (Eposir F 740 + Irox EN 2260), а потім поміщали у вакуумну установку на 3 хв перед висушуванням. Потім усі зразки сушили на повітрі протягом 24 год і шліфували шліфувальною машиною (Einhell TH-US 400, 1440 об/хв) з використанням абразивного паперу (Hermes BW114) з грануляцією 400, 1000, 1200 і 1500. Морфологію та хімічний склад структур вивчали за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEO-SEM Inspect S50-B, FEI, Брно, Чехія; прискорювальна напруга-15 кВ) у парі з енергодисперсійним рентгенівським спектрометром (AZtecOne). з X-MaxN20, Oxford Instruments plc, Абінгдон, Великобританія).

2.5 Вимірювання контактного кута

Експерименти з вимірювання кута контакту поверхні та краплі деіонізованої води проводили за допомогою відео-оптичного вимірювача контактного кута (OCA 15 EC, серія GM-10-473 V-5.0, Data Physics, Фільдерштадт, Німеччина) за використання ультрачистої деіонізованої води (рис. 2.2).

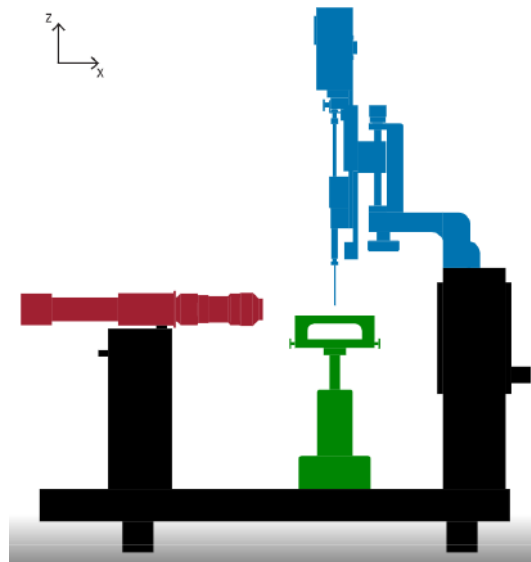


Рисунок 2.2 – Графічне відображення визначення контактного кута

Визначення контактного (крайового) кута (КК) поверхні дозволяє оцінити ступінь її гідрофільності. Поверхні з КК менше 90° вважаються гідрофільними, більше 90° – гідрофобними (рис. 2.3).

Коротка суть методу: після встановлення зразка на предметний столик приладу, оператор рухаючи останній забезпечує візуальний контакт досліджуваної поверхні в діапазоні зчитування оптичної частини мікроскопу. Потім відбувається автоматичне висаджування краплі ультрачистої води в об'ємі 2 мкл. Голка-дозатор автоматично повертається в базове положення, а різниця сили поверхневого натягу та рівня гідрофільності п'ятна контакту забезпечують динамічне положення сформованої краплі води. Наступним етапом є автоматичне визначення статичного та динамічного (впродовж 3 секунд) кута контакту між досліджуваною поверхнею та найбільш виступаючою частиною сферичної поверхні краплі, цифрове відображення якого і є відображенням результату взаємодій поверхні та рідини, відповідно рівняння Юнга (рис. 2.4):

$$\cos\theta = \frac{\sigma_{3,1} - \sigma_{3,2}}{\sigma_{2,1}}$$

де $\sigma_{3,1}$ – міжфазний поверхневий натяг тверде тіло-повітря;

$\sigma_{3,2}$ – рідина – матеріал;

$\sigma_{2,1}$ – рідина-повітря.

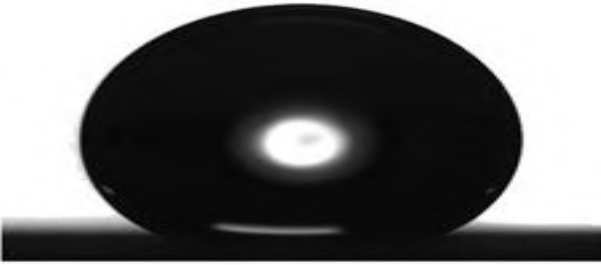
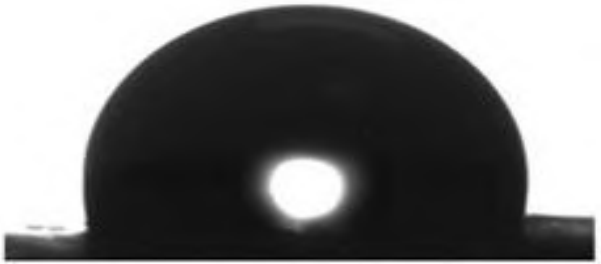
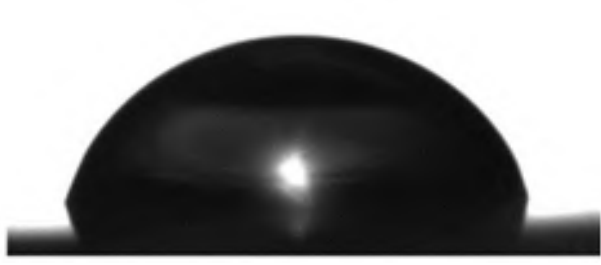

Кут контакту	Оптична візуалізація	Характеристика змочуваності поверхні
$\theta = 180^\circ$		Відсутність змочування
$90 \leq \theta \leq 180^\circ$		Гідрофобна поверхня
$0 \leq \theta \leq 90^\circ$		Гідрофільна поверхня
$\theta = 0$		Абсолютна змочуваність

Рисунок 2.3 – Графічне відображення цифрових значень контактного кута

У випадку рівноваги цих сил (рис. 2.4):

$$\sigma_{3,1} = \sigma_{2,1} \cos \theta + \sigma_{3,2}$$

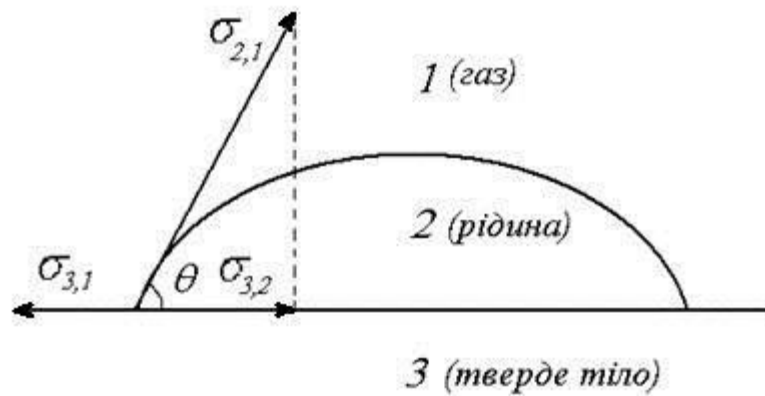


Рисунок 2.4 – Схематичне відображення рівняння Юнга:

- Θ – контактний (крайовий) кут змочування твердого тіла рідиною;
- σ_{3,1} – сила, яка діє між твердим тілом і газом і прагне розтягнути краплю;
- σ_{3,2} – стягує краплю і діє між рідиною і твердим тілом;
- σ_{2,1} – діє між газом і рідиною

Чим незначніше взаємодія, тим більше значення крайового кута. Визначивши кут контакту можна дізнатися певні властивості поверхні, як наприклад, поверхневу енергію матеріалу. Чим більше КК, тим важче змочити поверхню і тим менше сила взаємодії чужорідних речовин до поверхні.

Характеристика змочуваності покриттів спиралася на середніх значеннях цифрових відображень показників статичного та динамічного КК досліджуваної поверхні, на основі отриманих оптичних зображень сидячих крапель. Середнє значення кута контакту визначали шляхом вимірювання 10 різних точок поверхні для кожного зразка.

2.6 Оцінка механічних властивостей

Механічні характеристики надрукованих 3D-скафолдів були визначені шляхом випробування на одноосьовий стиск (ГОСТ 25.602-80) та розтягнення (ГОСТ 32656-2014) на універсальній випробувальній машині відповідно (Розривна машина Р-0,5 № 3). Корекцію відповідності проводили шляхом вимірювання жорсткості установки за допомогою комірки з навантаженням 10 кН, дані якої пізніше використовували в розрахунках. Перед випробуванням

всі зразки були попередньо навантажені силою, що відповідає 2-4 % деформації [59].

Зразки випробовували зі швидкістю руху траверси 5 мм/хв. Далі було використано по 6-11 зразків для кожного типу матеріалу і визначено модуль пружності та міцність на стиск. Модуль пружності визначався за нахилом початкової лінійної ділянки кривої "напруження- деформація", а міцність на стиск приймалася як межа текучості (якщо така є) або як 2% навантаження зі зміщенням (залежно від того, що настане раніше) відповідно до стандарту ISO 5833:2002.

2.7 Культивування культур клітин

Первинні остеобласти людини (Інституційний етичний комітет, протокол No2/17 від 14 лютого 2019 р.), культивувались у середовищі (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) з додаванням L-glutamine, та 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 2.5 µg/mL amphotericin B, 10% Fetal Bovine Serum, та 1.0 ng/mL bFGF) при 5% зволоженні з додаванням CO₂ за температури 37 °C. Коли клітини заповнили матрас на 80 – 85%, остеобласти висівали на кожну пробу та позитивні контрольні лунки при щільності клітин 2×10^4 клітин в лунку. Чисті PLA та PCL використовували як негативний контроль 1 та 2 відповідно. Клітинна адгезія та проліферація на поверхні скафолдів оцінювалась за допомогою колориметричного аналізу Alamar blue. Резазурин додавали в кількості, що дорівнює 10% від об'єму в кожну лунку. Після інкубації протягом 4 год при 37 °C у темряві, поглинання вимірювали за допомогою зчитувача планшетів Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) при довжинах хвиль 570 нм та 600 нм. Клітини визначали кількісно з різними інтервалами часу: 1, 3 та 7 днів. Всі експерименти повторювали тричі. Розрахунок відсотка відновлення Alamar blue проводили за допомогою рівняння згідно з протоколом виробника.

2.8 Статистичні методи

Дані були представлені як середні \pm стандартне відхилення. Для оцінки статистичної значимості різниці було використано t-тест Стюдента для непараметричних даних. Статистична значимість припускається на рівні 95 % ($p < 0.05$).

Для оцінки різниці між групами було використане програмне забезпечення GraphPad Prism 8.0, oneway ANOVA з декількома порівняннями. Статистичну значимість передбачали на рівні достовірності 95 % ($p < 0,05$).

3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Розробка та проектування моделі 3D друку

Створення полімерно-гідроксиапатитних біодеградуючих скафолдів було реалізовано в декілька етапів:

- Багатокомпонентний матеріал, що складається з чистого полілактату (PLA) та полікапролактону (PCL) та гідроксиапатиту, був отриманий шляхом змішування однокомпонентних чистих пластиків та порошку НА в керамічній чашці.

- Керамічну чашку поміщали на електронагрівач, при температурі 230 °С. Після переходу пластиків у в'язкотекучий стан в чашку занурювали механічну мішалку з нержавіючої сталі та перемішували утворену суміш впродовж 20 хв, як зображено на рисунку 3.1.

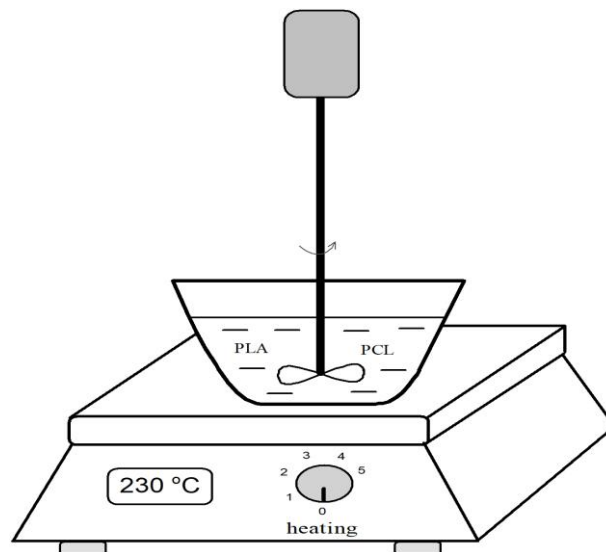


Рисунок 3.1 – Графічне зображення процесу змішування компонентів полімеру

- Отриману рідку масу виливали на поверхню з нержавіючої сталі та розкатували в лист товщиною 1-1,5 мм. Після охолодження маси сополімеру, отримані аркушеподібні одношарові шматки композитного матеріалу розрізали на вузькі смужки, а потім подрібнювали.

- Базатоконпонентний матеріал у вигляді дрібних шматочків проходив через екструдер, в результаті чого одержували нитку товщиною 1,75 мм, яку використовували для 3D-друку досліджуваних зразків.

Для більш точної оцінки необхідно поетапно розглянути вищезазначені процеси екструзії та 3D принту.

3.1.1 Екструзія – це спосіб переробки полімерних матеріалів безперервним продавлювання їх розплаву через формуючу голівку, геометрична форма вихідного каналу якої визначає профіль виробу, що отримується.

Основним обладнанням екструзійного процесу є черв'ячний екструдер, в нашому випадку EXO EXTRUDER, оснащений формуючою головкою з діаметром виходу 1,75 мм. В екструдер полімерний матеріал розплавляється, пластифікується і потім нагнітається в голівку.

Процеси, що відбуваються під час екструзії.

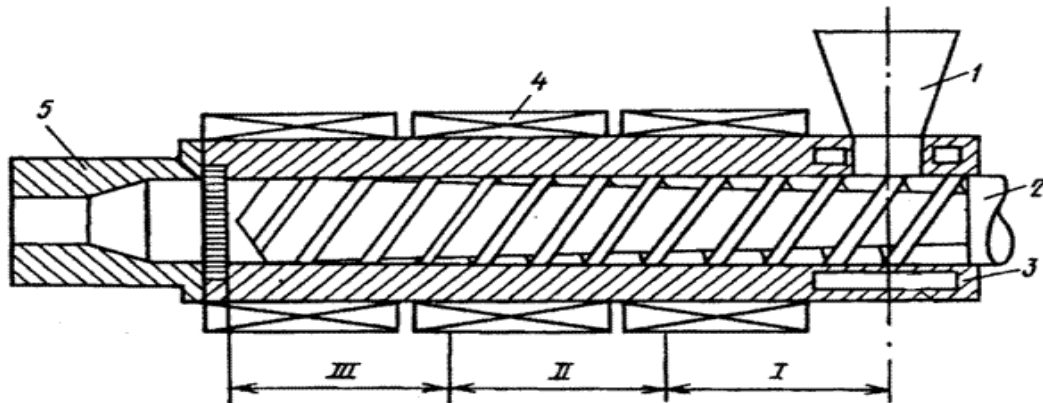


Рисунок 3.2 – Схема одношнекового екструдера: 1 бункер; 2- шнек; 3-циліндр; 4- нагрівач; 5- формуюча голівка з нагрівачем

Технологічний процес екструзії складається з послідовного переміщення матеріалу шнеком, що обертається, в його зонах (рис. 1): живлення (I), пластифікації (II), дозування розплаву (III), а потім просування розплаву в каналах формуючої головки [6].

Циліндр також має певні довжини зон обігріву. Довжина цих зон визначається розташуванням нагрівачів з його поверхні та його температурою. Межі зон шнека I-III та зон обігріву циліндра можуть не збігатися.

Вихідна сировина для екструзії, що подається в бункер, може бути у вигляді порошку, гранул, стрічок. Рівномірне дозування матеріалу з бункера забезпечує високу якість екструдату.

Переробка полімеру у вигляді гранул – найкращий варіант живлення екструдера. Гранули полімеру менше схильні до утворення «зводів» в бункері, ніж порошок, отже, виключаються пульсації потоку на виході їх екструдера.

Завантаження міжвиткового простору під лійкою бункера відбувається на відрізку довжини шнека, що дорівнює $(1 - 1,5) D$.

Сипучість матеріалу залежить великою мірою від вологості: що більше вологість, то менше сипкість. Тому матеріали мають бути спочатку підсушені. В залежності від виду матеріалу та його вологості підсушення відбувається при різних температурних режимах та різному проміжку часу за допомогою термостатів з примусовою вентиляцією та без. Зволожений матеріал також впливає на кінцевий результат, а саме наявність вкраплень бульбашок у нитці 3D філаменту, що негативно впливає на подальший 3D друк і якість кінцевого виробу.

Зона живлення (I). Гранули PLA та PCL, що надходять з бункера, заповнюють міжвитковий простір шнека зони I і ущільнюються (рис. 3.3).

Ущільнення та стиснення гранул у зоні I відбувається, за рахунок зменшення глибини нарізки h шнека. Просування гранул здійснюється внаслідок різниці значень сили тертя полімеру про внутрішню поверхню корпусу циліндра і поверхню шнека. Оскільки поверхня контакту полімеру з поверхнею шнека більша, ніж з поверхнею циліндра, необхідно зменшити коефіцієнт тертя полімеру про шнек, тому що в іншому випадку матеріал перестане рухатися вздовж осі шнека, а почне обертатися разом з ним. Це досягається підвищенням температури стінки циліндра (нагріванням) з відповідними температурними показниками для кожного типу матеріалу. У випадку використання матеріалу

PLA температура заповненого циліндру відповідає 180 °С, в той час як для PCL використовувалась 40 °С. Дана величина температури підбиралася на основі технічної документації та експериментальних корегувань. Нагрівання полімеру в зоні I відбувається за рахунок дисипативного тепла, що виділяється при терті матеріалу і за рахунок додаткового тепла від нагрівачів, розташованих по периметру циліндра. Іноді кількість дисипативного тепла може бути достатньою для плавлення полімеру, і тоді нагрівачі відключались. Насправді таке відбувається рідко.



Рисунок 3.3 – Комбіновані матеріали PLA та PCL до екструзії

При оптимальній температурі процесу полімер спресований, ущільнений та утворює у міжвитковому просторі тверду пробку (рис. 3.4). Найкраще, якщо така ковзна пробка утворюється і зберігається на межі зон I та II. Властивості пробки багато в чому визначають продуктивність машини, стабільність транспортування полімеру, величину максимального тиску тощо.

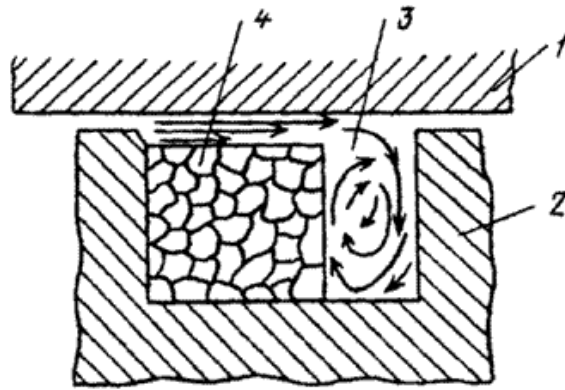


Рисунок 3.4 – Схема плавлення пробки матеріалу в зоні II у міжвитковому перерізі шнека: 1 – стінки циліндра; 2 – гребінь шнека; 3 – потоки розплаву полімеру; 4 спресований твердий полімер (пробка) в екструдері

Зона пластикації та плавлення (II). На початку зони II відбувається підплавлення полімеру, що примикає до поверхні циліндра. Розплав поступово накопичується і впливає на пробку, що зменшується по ширині. Оскільки глибина нарізки шнека зменшується в міру просування матеріалу від зони I до зони III, то тиск, що виникає, змушує пробку щільно притискатися до гарячої стінки циліндра, відбувається плавлення полімеру.

У зоні пластикації пробка плавиться також і під дією тепла, що виділяється внаслідок внутрішнього в'язкого тертя в матеріалі в тонкому шарі розплаву (позиція 3 на рис. 3.4), де відбуваються інтенсивні зсувні деформації. Остання обставина призводить до вираженого змішувального ефекту. Розплав інтенсивно гомогенізується, а складові композиційного матеріалу перемішуються.

Кінець зони II характеризується розпадом пробки на окремі фрагменти. Далі розплав полімеру із залишками твердих частинок потрапляє в зону III. Основний підйом тиску P розплаву відбувається на межі зон I та II. На цій межі пробка, що утворюється, з спресованого матеріалу як би ковзає по шнеку: в зоні I це твердий матеріал, в зоні II - плавиться. Наявність цієї пробки створює основний внесок у підвищення тиску розплаву. Також збільшення тиску відбувається за рахунок зменшення глибини нарізки шнека.

Зона дозування (III). Просування гетерогенного матеріалу (розплав, частинки твердого полімеру) продовжує супроводжуватися виділенням внутрішнього тепла, що є результатом інтенсивних деформацій зсуву в полімері та нагріванням формуючою головкою до температур 205 °C та 62 °C для PLA та PCL відповідно. Розплавлена маса продовжує гомогенізуватися, що проявляється в остаточному плавленні залишків твердого полімеру, усередненні в'язкості та температури розплавленої частини.

Процес температурного охолодження отриманого матеріалу на виході з формуючої головки відбувається за допомогою вентиляторів охолодження розміщених вздовж прямої лінії до катушки намотування. Швидкість намотування 3D-філаменту прямо-пропорційна швидкості екструзії, за рахунок чого не відбувається процес перерозтягнення отриманого матеріалу та зменшення його в діаметрі.

У міжвитковому просторі розплав має ряд потоків, основними з яких є поздовжній та циркуляційний. Величина поздовжнього (вздовж осі шнека) потоку визначає продуктивність екструдера Q , а циркуляційного - якість гомогенності полімеру або змішування компонентів.

У свою чергу поздовжній потік складається з трьох потоків розплаву: прямого, зворотного та потоку витоків.

Прямий потік викликаний рухом шнека в напрямку головки, що формує. Зворотний потік - це уявна течія, що викликається високим тиском з боку головки; насправді немає. Потік витоків відбувається при перетіканні розплаву між циліндром та гребенем черв'яка.

Продуктивність Q екструдера з урахуванням розподілу швидкостей різних потоків становить:

$$Q = Q_{\text{пр}} - Q_{\text{зв}} - Q_{\text{в}},$$

де $Q_{\text{пр}}$, $Q_{\text{зв}}$, $Q_{\text{в}}$ – продуктивності екструдера від прямого потоку, зворотного та витоків розплаву відповідно.

$$Q = \alpha n - \beta \cdot (\Delta P) / (\mu \cdot L),$$

де n – частота обертання шнека;

ΔP - тиск на виході із шнека (наприкінці зони III);

μ - ефективна в'язкість розплаву;

L - Довжина шнека;

α – константа швидкості прямого потоку;

β – константа швидкості зворотного потоку, що залежить від геометричних параметрів шнека.

Основні параметри процесу екструзії. До технологічних параметрів відносяться температура переробки полімеру, тиск розплаву, температура зон голівки та температурні режими охолодження сформованого екструдату.

При надто високій в'язкості розплаву отримувати вироби методом екструзії важко через великий опір перебігу розплаву, виникнення нестійкого режиму руху потоку. Все це призводить до утворення дефектів виробів.

Підвищення температури переробки може призвести до термодеструкції розплаву, збільшення тиску, потужності приводу при нижчих температурах - до механодеструкції, тобто, для екструзії розплавів повинні застосовуватися полімери з вузьким інтервалом коливання в'язкості.

3.1.2 Розробка алгоритму математичної моделі та лабораторної методики створення біополімерних скафолдів для 3D друку

Сам процес отримання фінального скафолду з визначеними параметрами можна поділити на створення 3D-моделі та власне технічну складову виконання всіх елементів прінтингу.

Створення 3D-моделі. Процес створення математичного представлення тривимірного об'єкту проводили за допомогою програмного забезпечення FreeCAD 0.19. Сама 3D-модель представлена за допомогою програмного коду у

форматі stl. Модель була представлена набором точок у просторі з'єднаних геометричними фігурами, що в подальшому утворили 3D-об'єкт.

Алгоритм моделювання полягав у полігональному моделюванні за допомогою точок у просторі, які поєднувались між собою лініями – ребрами, котрі утворювали між собою поверхні за законами створення геометричних площин у вигляді багатокутника, або полігону. Об'єднання цих площин утворювали полігональні сітки. Методом моделювання у цьому алгоритмі були обрані примітиви, за допомогою яких можна використовувати прості геометричні фігури, котрі в подальшому можна використати для моделювання більш складних фігур та моделей. Перевагою обраного методу є більш швидка та легка побудова. Також додатковою перевагою є поміж інших методів, примітиви володіють математичною визначеністю та точністю, що зменшує ризик появи дефектів 3D-моделі.

Кожна модель по осям X, Y, Z була розміщена в габаритному контейнері програми FreeCAD 0.19 у початковій точці 0,0,0, що дозволяло нам орієнтуватися у просторі та будувати об'єкт відповідно до площин ZX, XY, ZY (рис.3.5).

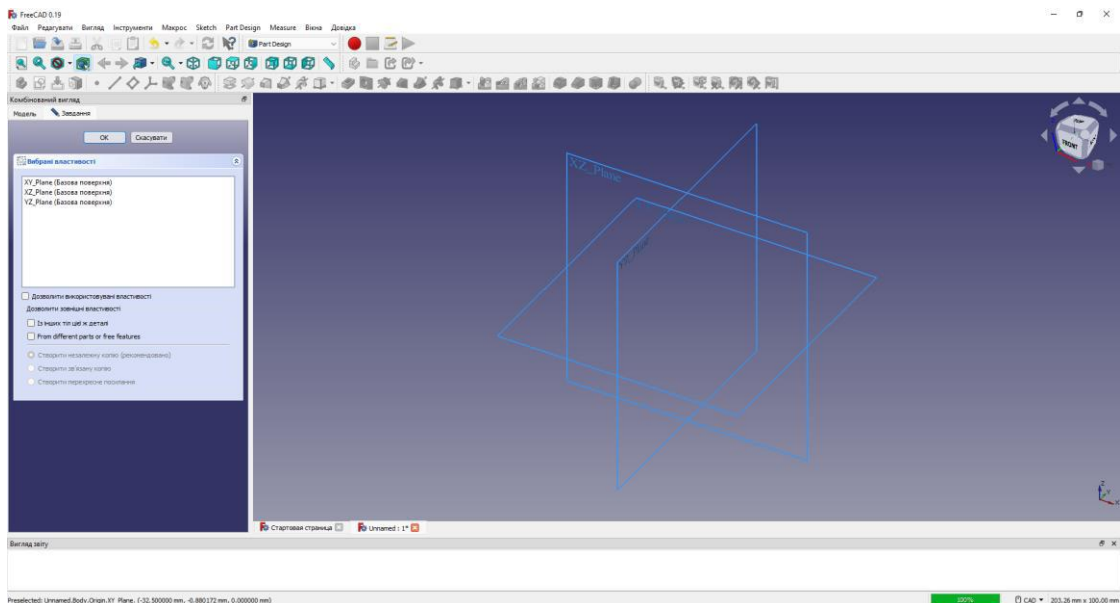


Рисунок 3.5 – Габаритний контейнер з площинами ZX, XY, ZY

Також визначати, чи закривають об'єкти один одного при спостереганні сцени, масштабувати об'єкти, визначати геометричний центр та представляти у вигляді готового виробу.

Нами була обрана модель шайби, котра дозволила б нам більш зручно провести подальші дослідження. Процес створення моделі шайби для матеріалів PLA та PCL не мав різниці.

Під час створення XY площина була обрана як базова. За допомогою інструменту Sketcher було створено 2D-ескіз коло діаметром 10 мм яке було обмежено по збігу в 0 точці площини (рис. 3.6).

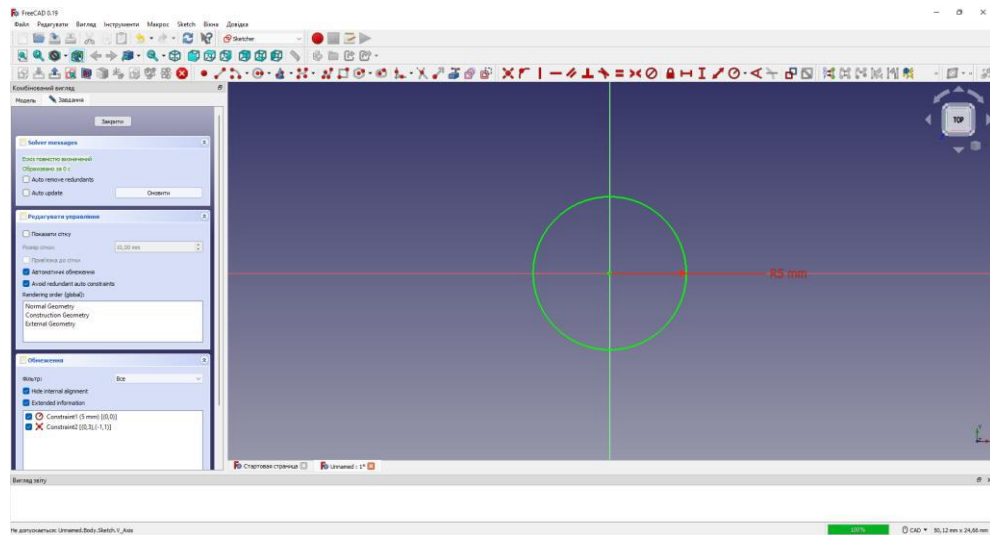


Рисунок 3.6 – Коло діаметром 10 мм обмежений по збігу у 0 точці

Подальше моделювання дозволило перевести 2D-ескіз в 3D-модель у вигляді полігональних сіток за рахунок видавлювання на висоту у 5 мм (рис.3.7).

Після перетворення 3D-моделі з полігональних сіток у візуалізацію 3D-зображення ми оцінили попередній вигляд, розміщення у просторі, наявність візуальних дефектів та ін (рис. 3.8).

Отриману 3D-модель, ми експортували у вигляді файлу ...stl для подальшої оцінки та слайсингу, процесу зміни 3D-моделі у код керування принтера g-code, за допомогою програмного забезпечення Ultimaker Cura версії 4.11.0 (рис. 3.9).

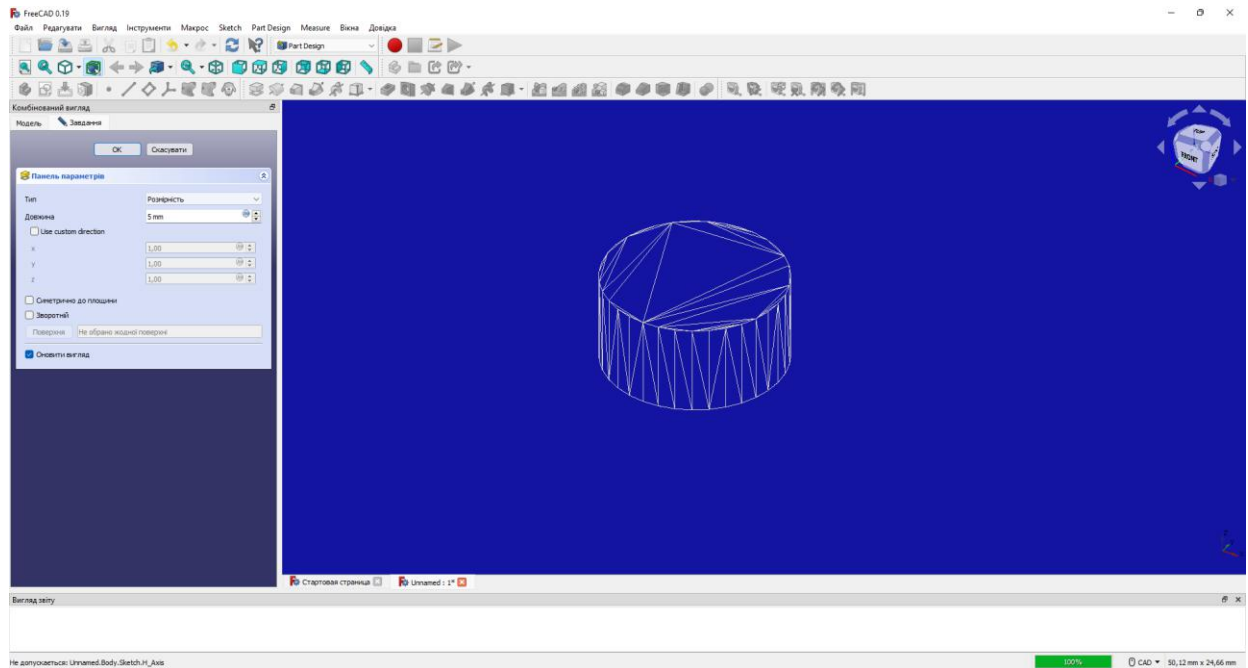


Рисунок 3.7 – 3D-модель у вигляді полігональних сіток

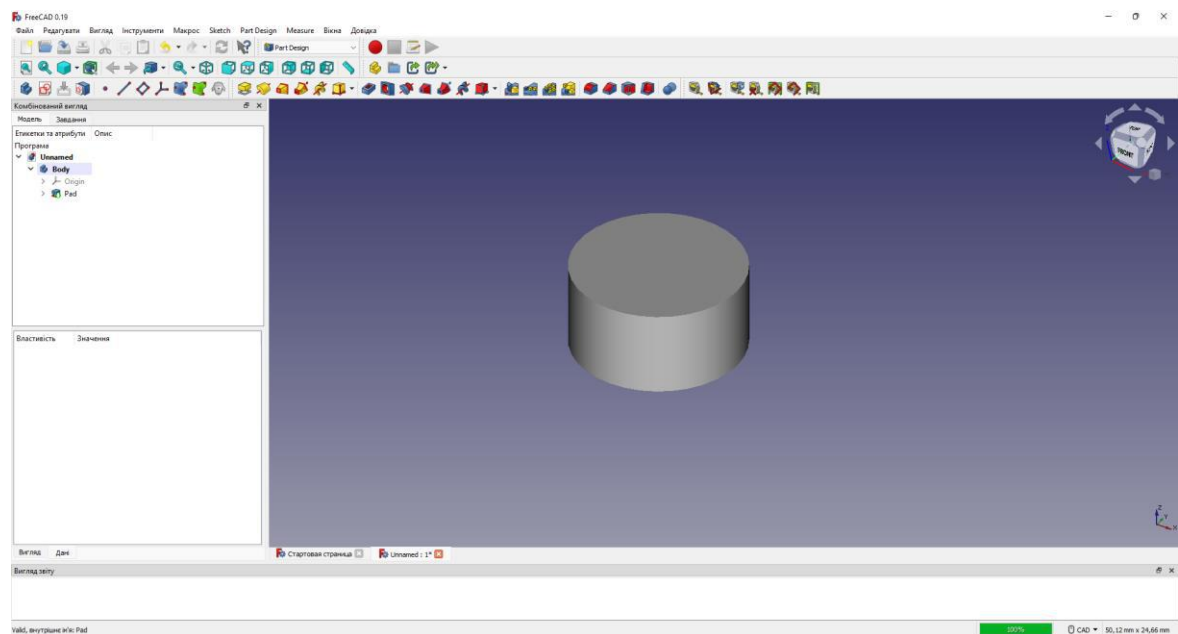


Рисунок 3.8 – 3D модель представлена у FreeCAD 0.19

На етапі підготовки до слайсингу, модель була поділена на шари та оцінена структура зовнішніх та внутрішніх шарів та цілісність 3D-моделі, щоб уникнути дефектів під час та після друк. Загальна кількість шарів для даної моделі становила 25 шт. та не мала видимих чи програмних дефектів (рис. 3.10).

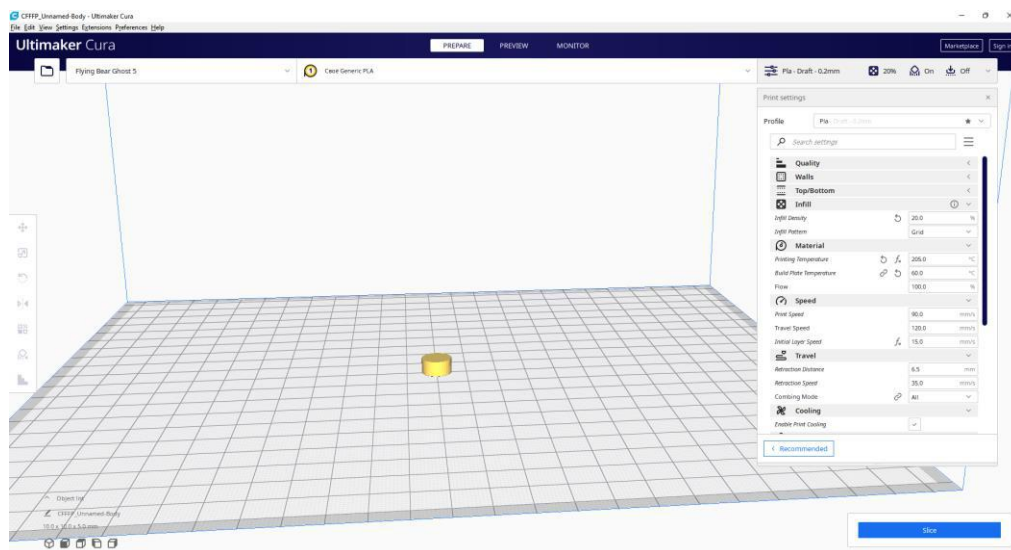


Рисунок 3.9 – 3D модель представлена у Ultimaker Cura 4.11.0

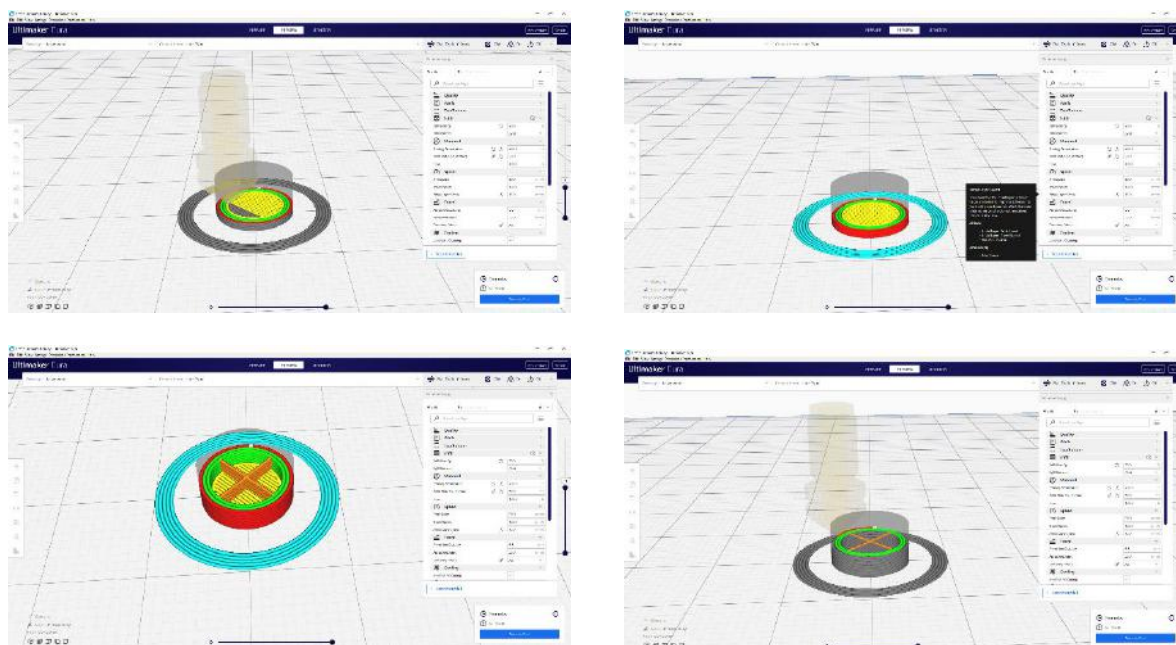


Рисунок 3.10 – Процес пошарового аналізу 3D-моделі за допомогою Ultimaker Cura 4.11.0

Після аналізу до моделі були використані параметри слайсингу представлені у таблиці 3.1. Для кожного типу матеріалу були застосовані індивідуальні параметри.

Таблиця 3.1 – Параметри слайсингу для PLA та PCL матеріалу у програмному забезпеченні Ultimaker Cura 4.11.0

Матеріал		PLA	PCL
Якість	Висота шару	0,1 мм	0,1 мм
	Висота першого шару	0,1 мм	0,1 мм
Заповнення	Плотність	20%	20%
	Шаблон	Сітка	Сітка
Матеріал	Температура сопла	205	63
	Температура стола	60	30
Швидкість	Друку	40 мм/с	15 мм/с
	Переміщення	120 мм/с	120 мм/с
	Першого шару	15 мм/с	15 мм/с
Переміщення	Велечина відкату	6,5 мм	6,5 мм
	Швидкість відкату	35 мм/с	35 мм/с
Охолодження		100%	100%
Тип прилипання		Юбка	Юбка

Отриманий g-code додатково був перевірений на відповідність до вказаних параметрів моделювання та слайсингу був перенесений за допомогою SD-карти SanDisk до принтеру 3D принтеру Flyingbear Ghost 5 (рис. 3.11).

Перед початком друку, отриманий, за допомогою екструдера Echo Extruder, матеріал PLA та PCL у вигляді прутка діаметром 1,75 мм попередньо був просушений у термостаті TC-80M2 протягом 3 годин при температурі 60 °C для PLA та 30 °C для PCL.

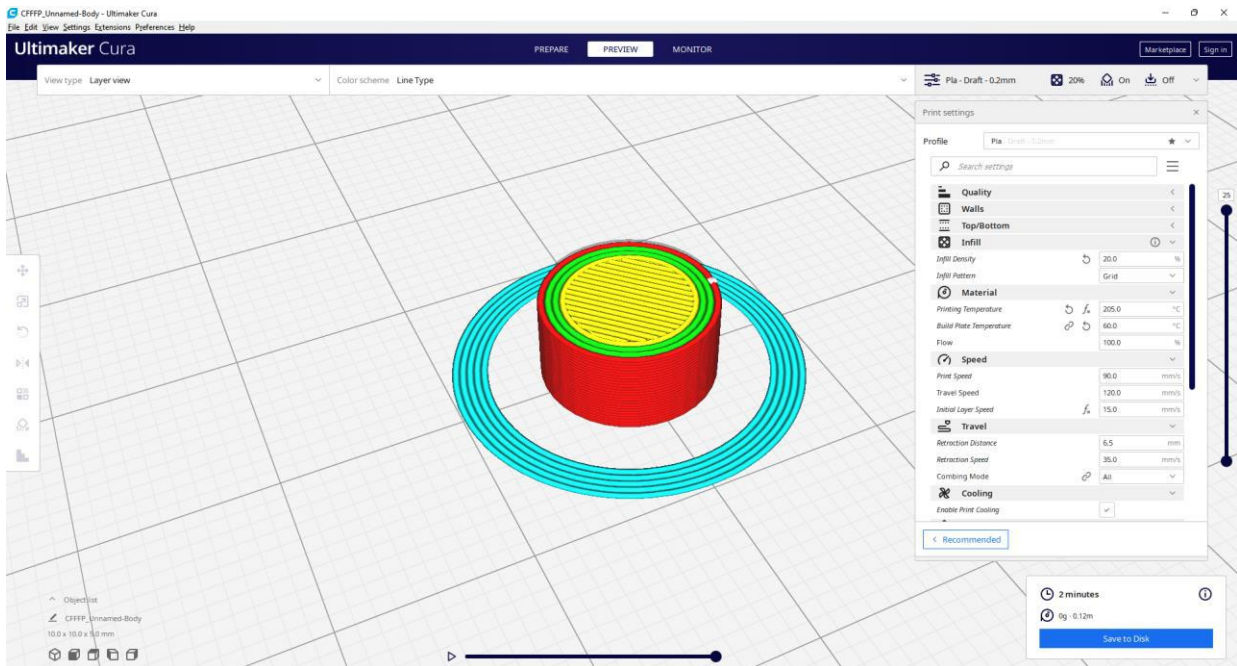


Рисунок 3.11 – Візуалізований g-code для принтеру 3D принтеру Flyingbear Ghost 5

Через систему меню принтера відповідно до обраного типу матеріалу обирався файл з відповідними характеристиками друку. Друк проходив в закритому приміщенні при температурі повітря 22 °C та 45 % вологості.

Початковим етапом друку було автоматизоване підігрівання робочого столу та друкуючої голівки до заданих температур. Підігрів робочого столу є необхідним для фіксації шляхом адгезії моделі до столу та відповідає температурі розм'якшення полімеру. Друк відбувався методом наплавлення (Fused deposition modeling, FDM), як один з найпоширеніших та доступних методів, який дозволяє використовувати обрані нами матеріали. Шаговим двигуном проводилася подача матеріалу до розігрітого сопла принтеру, котрий переміщався по заданих координатах відповідно параметрів g-code. Процес друку відбувався за рахунок пошарового наплавлення друг на друга полімеру та охолодження за допомогою вентилятора на робочому столі принтера. Друкуюча голівка переміщувалася по осі координат X, Y, а робоча поверхня столу по осі Z зверху до низу. Зовнішні стінки моделі складала 3 суцільні шари, в той час як внутрішній об'єм заповнювався полімером на 100 %.

Завершальним етапом відбувалось охолодження надрукованої моделі шляхом поступового зменшення температури робочого столу до температури оточуючого середовища та від'єднання її за допомогою шпателью.

3.2 Характеристика поверхні та структури полімерних скафолдів

Аналіз зображень СЕМ поперечного перерізу волокон після екструзії показав, що скафолди з чистого PLA мають гладку шарувату структуру, PCL - гладку волокнисту структуру, пористу структуру для сумішей і більш грубу морфологію для композитних сумішей, що пояснюється додаванням мінералу до полімерної матриці. Крім того, збільшення кількості PCL у композитних колімерах надавало поперечному перерізу більш пластичного волокнистого вигляду, а також збільшення кількості та розмірів пор та кратерів в структурі матеріалу (рис. 3.12).

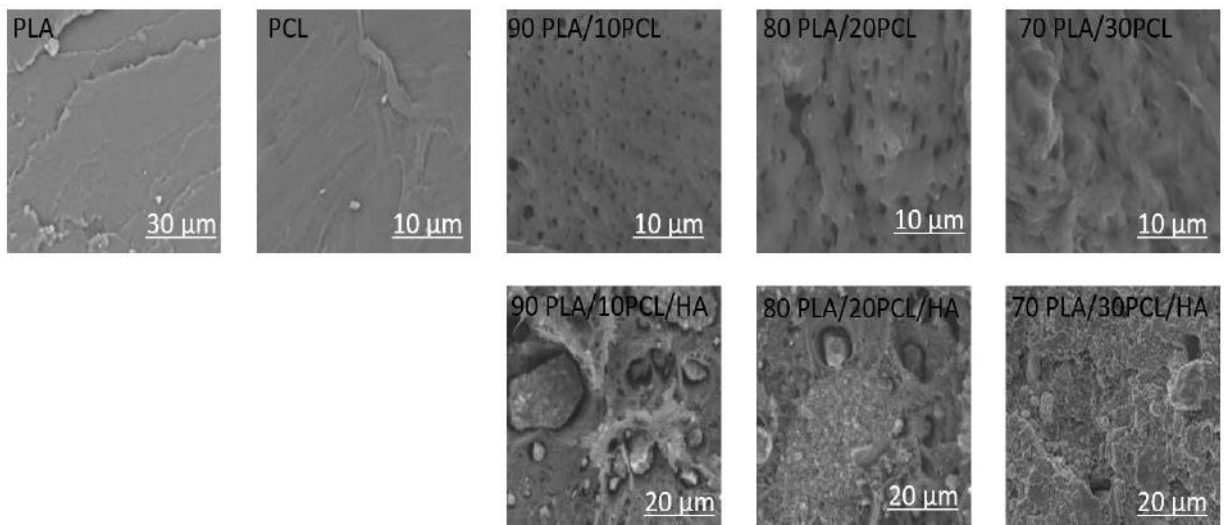


Рисунок 3.12 – Аналіз морфології та структури поперечного перерізу FFF ниток методом SEM.

Поява пористої структури із додаванням гідроксиапатиту до PLA/PCL суміші, а також прямо пропорційне збільшення пор зі збільшенням концентрації PCL у структурі кінцевого полімеру відмічається і при використанні непрямого 3D принту [60].

3.3 Фізико-хімічні властивості

Оцінка механічних властивостей контрольних та експериментальних полімерів демонструє схожість фізичних параметрів за модулем пружності з аналогічними показниками трабекулярної кістки (таб. 3.1).

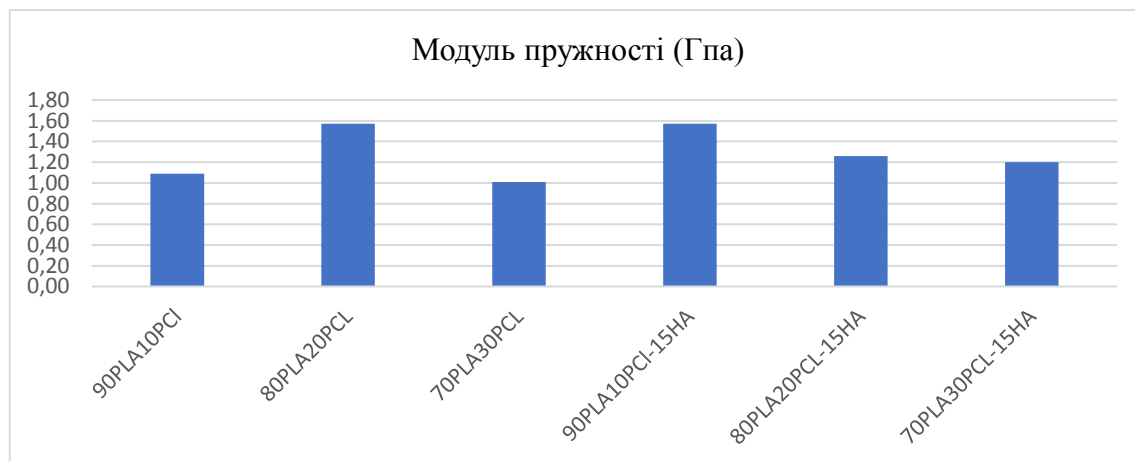
Таблиця 3.2 – Модуль пружності та міцність на осьове стискання скафолдів, а також референтні значення кісткової тканини людини

Зразок	Модуль пружності (ГПа)	Міцність на стиск (МПа)
PLA	1,63 ± 0,08	75,12 ± 8,31
PCL	0,18 ± 0,07	8,64 ± 2,08
90PLA10PCL	1,05 ± 0,04	31,61 ± 1,03
80PLA20PCL	1,58 ± 0,07	63,12 ± 4,10
70PLA30PCL	1,05 ± 0,07	35,16 ± 3,28
90PLA10PCL-15HA	1,51 ± 0,08	56,01 ± 7,11
80PLA20PCL-15HA	1,24 ± 0,11	38,91 ± 4,64
70PLA30PCL-15HA	1,20 ± 0,06	37,96 ± 0,83
Кортикальна кістка [61]	7-30	100-200
Трабекулярна кістка [61]	0,05-0,5	2-12

Як видно з графіку 3.1 прямої залежності між показниками пружності та міцності на осьове стискання не відмічається. Характеристика деформаційної кривої всіх типів полімерів представлена на рисунку 3.13. Це можна пояснити появою пористої структури із додаванням гідроксиапатиту до сополімеру PLA/PCL суміші, а також прямо пропорційне збільшення пор зі збільшенням концентрації PCL у структурі кінцевого.

Отже (рис 3.13) чистий PLA продемонстрував найвищу межу міцності, в той час як PCL показав найбільш пластичну поведінку. Криві як сополімерів, так і композитів залишалися між кривими чистого PLA та PCL. За винятком 80PLA20PCL, де додавання HA зменшило пластичність порівняно з аналогами

сумішей. Міцність на стиск і жорсткість зменшувалися зі збільшенням вмісту PCL як для сумішей, так і для композитів, за винятком суміші 90PLA10PCL, яка відрізнялася від цієї тенденції.



Графік 3.1 – Модуль пружності скафолдів різних співвідношень PLA, PCL та HA

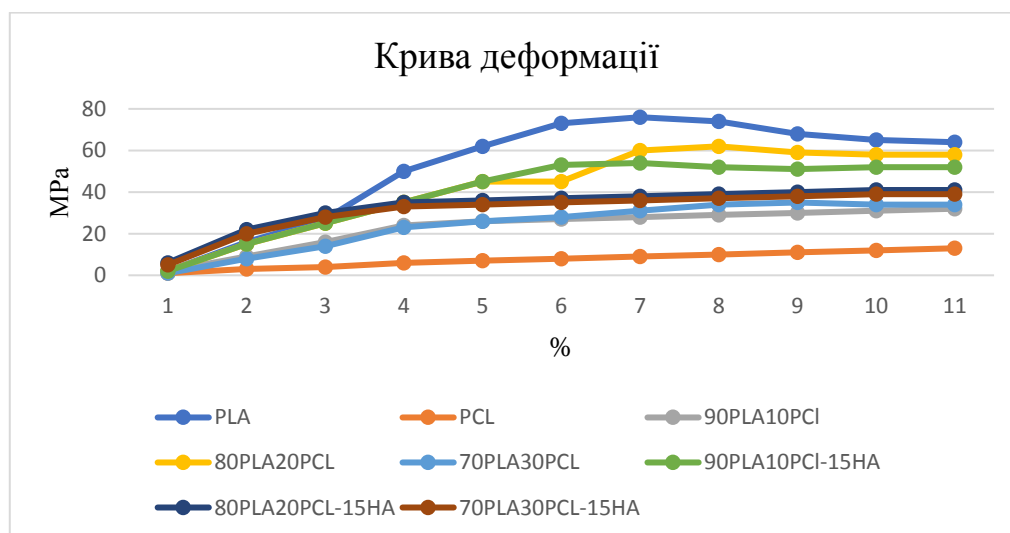
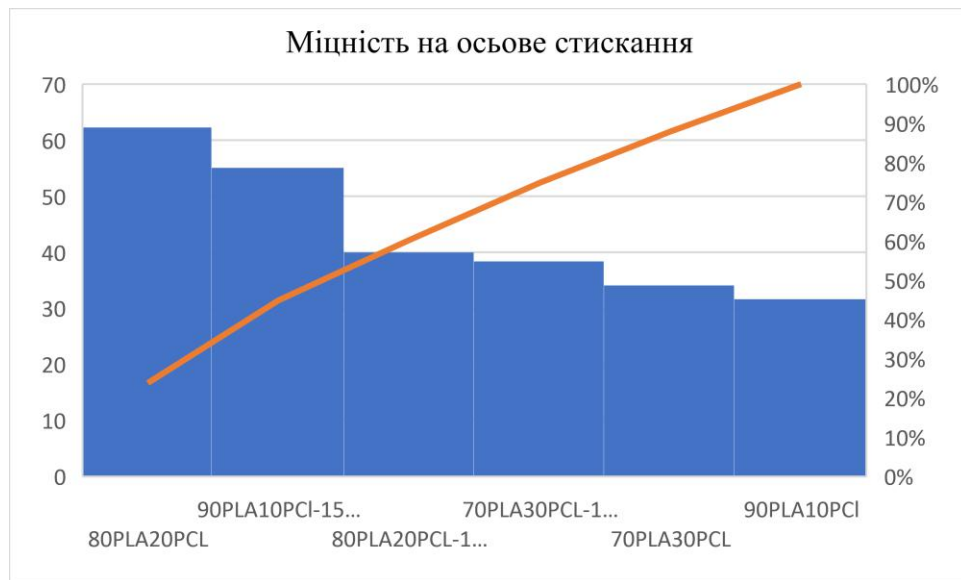


Рисунок 3.13 – Крива деформації скафолдів різних за складом

Тобто поява у структурі полімеру гідроксиапатиту призводить до суттєвого збільшення загальної площі скафолду, за рахунок появи мікропористої

структури. А збільшення розміру пор в результаті підвищення концентрації PCL призводить до зниження показників механічної стійкості [60].



Графік 3.2 – Міцність на осьове стискання скафолдів різних співвідношень PLA, PCL та HA

3.3.1 Аналіз результатів занурення в SBF

Сумарна втрата маси всіх зразків зображена на графіку 3.3. Найменша втрата маси спостерігалася для чистого PCL (0,7 %) після чотиритижневого періоду деградації. На противагу цьому, найбільша втрата маси спостерігалася для композитних сумішей (~60 %), за якими йшли полімерні суміші (~31 %) і чистий PLA (~18 %). На додаток до втрати ваги, деградація спричинила потоншення діаметру всіх зразків (крім чистого PCL), а ефект потоншення збільшився з збільшенням втрати ваги. При цьому необхідно зазначити, що при аналізі морфології поверхні, в порівнянні деградованих матеріалів з їхніми первинними аналогами, зміни на рівні поверхні були чітко помітні разом з періодом деградації. Через 6 годин поверхні чистих матеріалів і поєднаних скафолдів все ще залишалися переважно гладкими, а структура друку та пошарова конструкція – неушкодженою. Однак деякі ознаки утворення пор між надрукованими шарами можна було побачити для чистого PLA і 70PLA30PCL,

тоді як ознаки утворення волокон на поверхні були характерні для 80PLA20PCL. І навпаки, композитні суміші мали чітко шорстку поверхню після 6 годин деградації, що узгоджувалося з отриманими результатами щодо втрати ваги. Через 21 день деградації спостерігалися більш виражені морфологічні зміни. Ознаки пошаровості зникли через 21 день для композитних сумішей, що ілюструє найбільші морфологічні зміни внаслідок деградації цих зразків.

У сополімерах спостерігалася більш ослаблена деградація поверхні, при цьому поверхня була волокнистою і хвилястою. Поверхня скафолдів з чистого PCL показала найменші морфологічні зміни серед усіх матеріалів, ілюструючи лише деякі пори на рівні поверхні після 21 дня деградації [62].

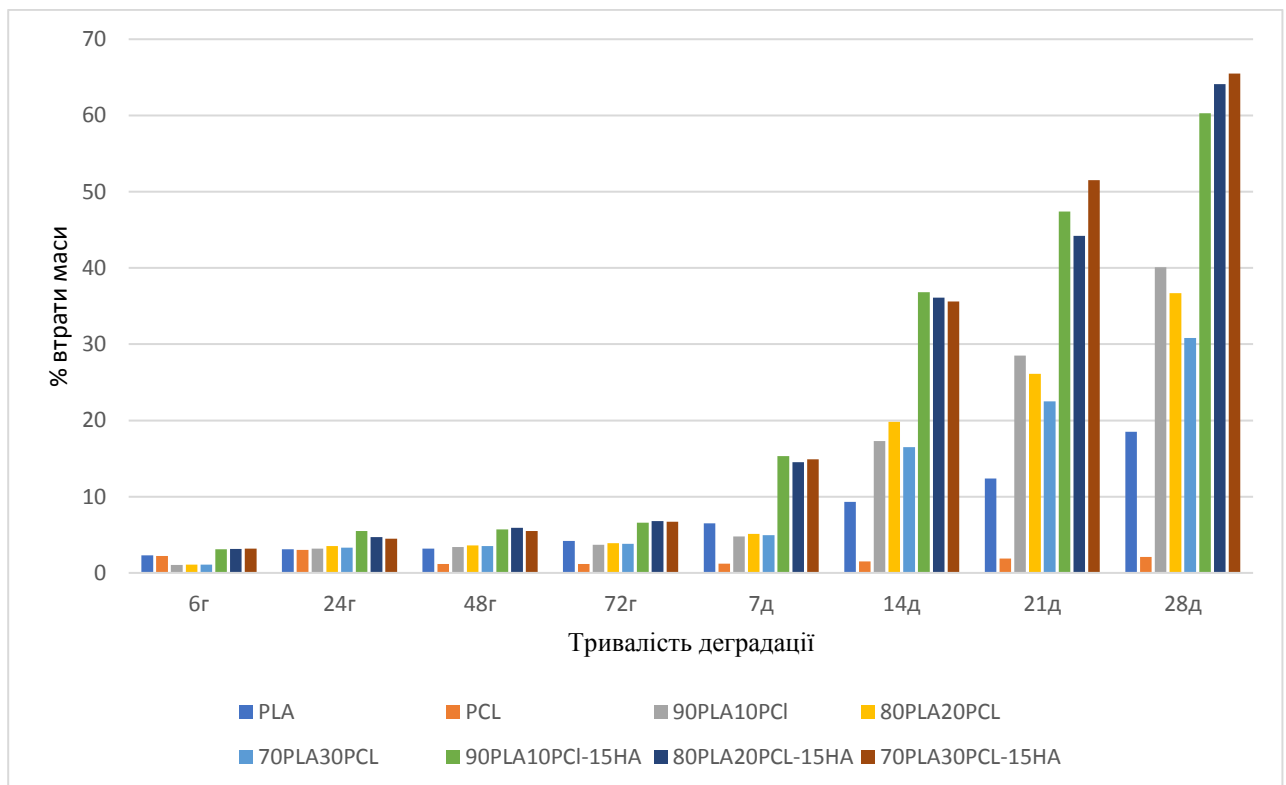


Рисунок 3.3 – Графік втрати абсолютної маси скафолдів різної природи в залежності від тривалості деградації

При цьому, проведення повторних механічних тестів зі скафолдами після деградації, вказують на не характерну картину для всіх типів полімерів.

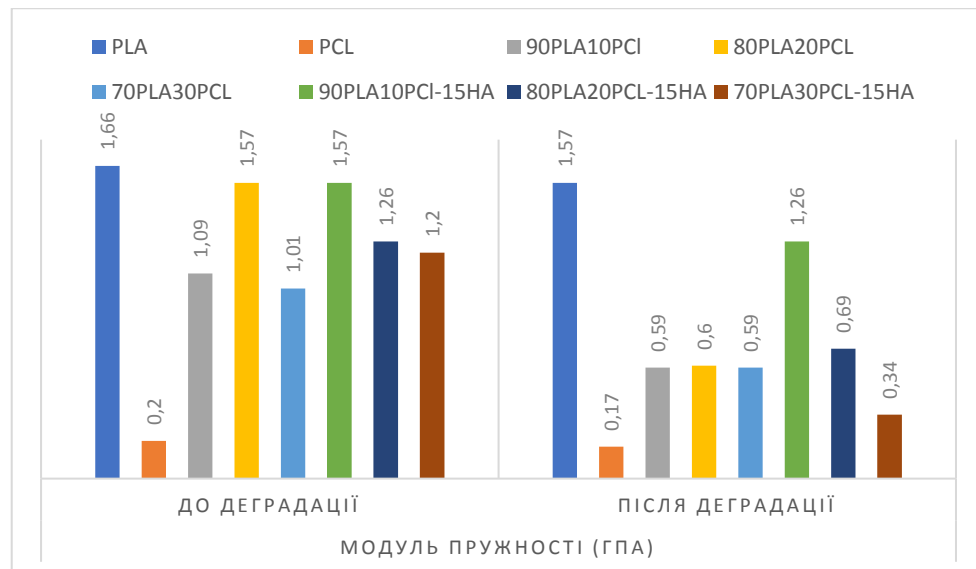


Рисунок 3.4 – Графік порівняння модуля пружності до та після деградації

Адже, після 28 днів деградації як полімери, так і композитні суміші демонстрували меншу крижість порівняно з відповідним недеградованим матеріалом, зберігаючи фізичну реакцію, подібну до механічної поведінки чистого PCL (граф. 3.4 та 3.5).

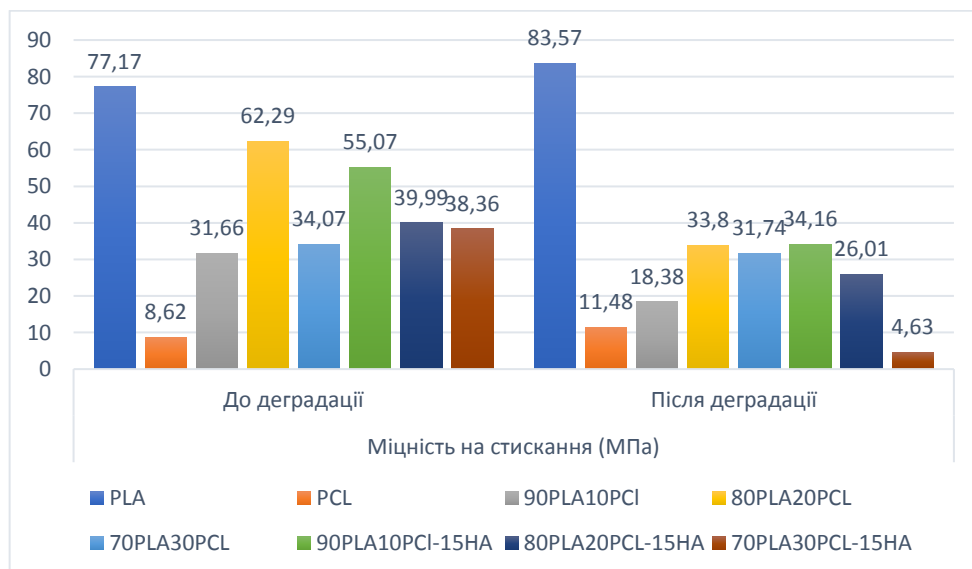


Рисунок 3.5 – Графік порівняння показників міцності на стискання до та після деградації

Після оцінки результатів проведення визначення рівня змочуваності поверхні контрольних (чистий полікапролактон і полімолочна кислота) та експериментальних кополімерних зразків (поєднання останніх у різних співвідношеннях окремо та з додаванням гідроксиапатиту) необхідно зазначити прямо пропорційну залежність рівня змочуваності від концентрації PLA (граф. 3.6).

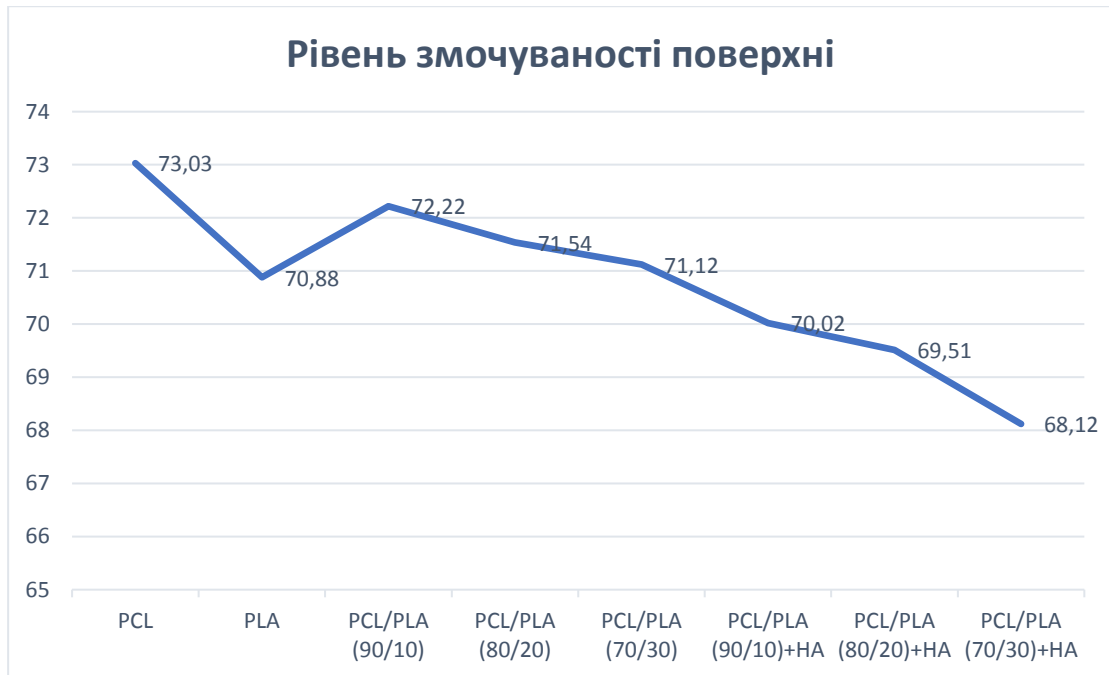


Рисунок 3.6 – Графік залежності КК від складу полімеру

А також, збільшення гнідрофільності поверхні при введенні в структуру полімерного скафолда навіть не значної кількості гідроксиапатиту.

Ferri J. et al. Пояснюють цю залежність тим, що композитні суміші PLA:HA продемонстрували незначне зниження температури початку деградації [24]. Вони пояснили це зниження гідролізом PLA, який, швидше за все, був ініційований HA, оскільки це гнідрофільна сполука з високою спорідненістю до вологи. Гідролітичний розрив ланцюгів є найпоширенішим шляхом розкладання високомолекулярних складних полієфірів, таких як PLA, і може відбуватися двома різними основними шляхами, такими як об'ємна чи

поверхнева деградація. Перша призводить до зменшення молекулярної маси полімеру через вивільнення побічних продуктів кінцевої карбоксильної та гідроксильної груп. Під час останньої деградації поверхні, молекулярна маса залишається незмінною через поверхневі побічні продукти, які залишають поверхню шляхом дифузії до середовища, що, натомість, призводить до розрідження матеріалу [33].

Результати розділу опубліковані:

1. K.V. Berladir, T.P. Novorun, S.G. Rudenko, O.A. Bilous, S.V. Varenyk, V.V. Kravets, D.V. Shvetsov. Mechanically Activated Polytetrafluoroethylene: Morphology and Supramolecular Structure. JOURNAL OF NANO- AND ELECTRONIC PHYSICS Vol. 14 No 1, 01030 (5pp) (2022).

2. Berladir, K., Zhyhylii, D., Gaponova, O., Krmela, J., Krmelová, V., Artyukhov, A. Modeling of Polymer Composite Materials Chaotically Reinforced with Spherical and Cylindrical Inclusions. Polymers 2022, 14, 2087.

3. Moskalenko Y, Smorodska O, Deineka V, Kravets O, Moskalenko R. Prognostic factors for recurrence in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. Contemp Oncol (Pozn) 2022; 26 (3): 239–246.

4. Біомедичні матеріали: від історії до сьогодення [Електронний ресурс]: навч. посіб. / Х. В. Берладір, Т. П. Говорун, О. М. Олешко. – Суми: СумДУ, 2022. – 223 с.

5. Спосіб моделювання імітації системи кровообігу з омиванням експериментальних зразків. Олешко О.М., Дригваль Б.О., Олешко Т.Б. та ін. Заявка патенту на корисну модель.

4 ОБГОВОРЕННЯ

Отже, в результаті дослідження було розроблено шість різних ниток для FFF-друку та оцінено їхні друковані, фізико-хімічні та механічні характеристики. Характеристики були сформовані на недеградованих і деградованих матеріалах для оцінки їхніх хімічних, морфологічних, термічних і механічних властивостей до і після деградації.

Поєднання PLA та PCL призвело до утворення пористої не лише поверхні, а й структури скафолдів. Patrício та ін. [63] повідомили, що мінорний компонент у суміші полімерів найчастіше утворює дисперсну фазу в безперервній фазі, утвореній основним компонентом. Результати Wachirahuttapong та ін. [64], Navarro-Baena та ін. [65] і Mattaа та ін. [66] підтверджують особливості морфології поверхонь, виявлені в досліджених при поєднанні PLA та PCL. Натомість, композитні суміші мали шорстку поверхню, спричинену мінеральною фазою, включеною в полімерну матрицю. Таким чином, включення НА не тільки підвищує біоактивність матеріалу, але й збільшує шорсткість поверхні, що також може сприятливо впливати на адгезію та проліферацію клітин [67-71].

Гідролітичне розщеплення ланцюгів є найпоширенішим шляхом деградації високомолекулярних полієфірів, таких як PLA, і може відбуватися двома різними основними шляхами, такими як об'ємна деградація або поверхнева деградація. Перша призводить до зменшення молекулярної маси полімеру через вивільнення побічних продуктів карбоксильної та гідроксильної кінцевих груп. Під час другої, поверхневої деструкції, молекулярна маса залишається незмінною через те, що поверхневі побічні продукти залишають поверхню, дифундуючи в середовище, що, натомість, призводить до потоншення матеріалу [33].

Загальною тенденцією для механічних властивостей кополімерів і композиційних сумішей було зменшення жорсткості зі збільшенням вмісту PCL, тобто збільшення кількості PCL підвищувало пластичність матеріалів. Для двох

сумішей з більшим вмістом PCL напруження при стисканні зменшувалося зі збільшенням вмісту PCL, що узгоджується з результатами дослідження Nishida та ін. [72], де вони досліджували вплив вмісту PCL у сумішах PLA:PCL на модуль Юнга. Хоча загальна тенденція полягала у зменшенні міцності на стиск зі збільшенням вмісту PCL, суміш 90PLA10PCL має нижчі значення міцності на стиск, ніж суміші 80PLA20PCL та 70PLA30PCL. Проте, як кополімерні матеріали, так і композитні суміші демонстрували вищі механічні властивості, ніж нативна трабекулярна, але не кортикальна кістка [73], що вказує на можливе застосування в якості опорного матеріалу для несучої губчастої кістки. Нещодавно Wu et al. дослідили можливість використання композитних ниток для моделей трабекулярної кістки, які також можуть бути застосовані для подальшої перевірки придатності композитів PLA-PCL-НА, як заміників кістки [74]. Крім того, в іншому дослідженні вивчали вплив щільності наповнювача на міцність на стиск 3D-друкованих циліндрів з чистого ПЛА. Вони повідомили про руйнівне навантаження 21 кН на циліндри при 80 % наповненні [75], таке ж руйнівне навантаження на стиск ПЛА має при 100 % щільності. Це означає, що подібний опір стискаючому навантаженню можна отримати при на 20 % нижчій щільності наповнювача. Дана тенденція має бути додатково вивчена та підтверджена, з метою контролю механічних властивостей з урахуванням різних похідних, а також з метою мінімізації кількості використовуваного матеріалу.

Втрата ваги й аналіз морфології поверхні показали повільнішу деградацію PCL порівняно з PLA, що корелює з гідрофобною природою PCL і вищою кристалічністю [76]. Цікаво, що суміші PLA:PCL показали вищу швидкість деградації, ніж чистий PLA, відповідно до попередніх досліджень [47]. Загалом, кополімери PLA:PCL деградували приблизно на 10% швидше, ніж чистий PLA. Це явище можна пояснити пластифікуючим ефектом додавання PCL, який порушує кристалізацію PLA, а отже, аморфізує PLA і прискорює його деградацію. Зміни в морфології поверхні сумішей PLA:PCL також могли відігравати певну роль у вищих швидкостях деградації порівняно з чистим PLA. Морфологія поверхні кополімерів характеризувалася більшою шорсткістю з

появою пор, які збільшувалися в розмірах зі збільшенням вмісту PCL. Ця особливість хоч і не була чітко підтверджена, могла збільшити загальну площу поверхні матеріалів та їх змочуваність, сприяючи, таким чином, швидшій деградації.

Нарешті, додавання ГК ще більше прискорило швидкість деградації на 40 % порівняно з чистим PLA. Варто зазначити, що включення ГК в полімерні матриці може підвищити загальну гідрофільність і знизити кристалічність ПЛА [77], таким чином, збільшуючи швидкість деградації. Що стосується поєднаних кополімерів, то збільшення площі поверхні за рахунок шорсткості поверхні в композитних сумішах і поява локальної пористості, що діє як канал для впливу середовища на об'ємний матеріал, також могли вплинути на збільшення деградації. Поверхнева деградація була помітна по зменшенню діаметра циліндрів, що становило приблизно 0,5 мм для сумішей і 2 мм для композитних сумішей (дані не показані). Також можна побачити деякі відмінності в морфології поверхні між різними сумішами полімерів, що, згідно з Мохсені та ін. [77], може бути пов'язано з різною швидкістю реакції гідролізу для скафолдів.

Як полімери, так і композитні суміші показали зниження модуля пружності після деградації майже вдвічі, що характерно для всіх сумішей і композитів, окрім 90PLA10PCL-15HA. Це підтверджує швидшу деградацію жорсткого PLA, оскільки під час випробувань на стиснення матеріали поводитися більш подібно до чистого PCL. Незважаючи на те, що композитні суміші деградували швидше, ніж чисті суміші, вони все ще демонстрували вищий модуль пружності (за винятком 70PLA30PCL-15HA), ніж кополімери після деградації. Це вказує на підсилюючий ефект мінералу, включеного в полімерну матрицю. Однак лише композитна суміш поліефірів 90PLA10PCL-15HA продемонструвала вищу міцність на стиск, ніж відповідна полімерна суміш після деградації. Проте механічні властивості були вищими, ніж у трабекулярної кістки людини, що свідчить про те, що навіть після певної деградації матеріал може зберігати

механічні властивості, необхідні для того, щоб бути кандидатом для заміної терапії в тканинній інженерії.

Отже, подальша характеристика деградуючих матеріалів та побічних продуктів, що вивільняються під час деградації, буде необхідною для оцінки безпеки цих матеріалів з біологічної точки зору та подальшого дослідження їх потенціалу, як матеріалів для регенерації кісткової тканини. Важливо, що поведінку деградації можна активно контролювати шляхом включення як PCL, так і HA в PLA, а також за рахунок різного відсотка наповнюваності 3D скафолда. Завдяки ретельному контролю кількості PCL, швидкість деградації може збільшитися до 10 %, в той час як подальше додавання HA сприяє деградації в 3 рази для чистого PLA або в 1,5-2 рази для сумішей PLA:PCL. Ці показники деградації можна ще більше оптимізувати, враховуючи пористість під час друку FFF і загальну геометрію скафолду.

ВИСНОВКИ

Розробка індивідуальних матеріалів, що складаються з біосумісних і здатних до біологічного розпаду полімерів, окремо або в поєднанні з мінеральними компонентами, дозволила отримати матеріали для друку з хімічною стабільністю і механічними властивостями, придатними для регенерації кісткової тканини. Було продемонстровано, що механічні властивості відповідають механічним характеристикам та можуть бути використані для застосування в трабекулярній кістці. Контроль швидкості деградації сильно залежить від складу кополімеру, демонструючи покращення за рахунок включення мінеральних фаз, таких як гідроксиапатит, що ще більше посилює деградацію кополімерів PLA:PCL. Разом із можливістю корекції пористості та архітектури каркасу, з'являються важілі контролю та балансу в напрямку резорбції біоматеріалу, а отже, можливості розробки штучної кістки.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Donnalaja F., et al. Natural and synthetic polymers for bone scaffolds optimization. *Polymers*. 2020. Vol. 12. 905. doi: 10.3390/polym12040905.
2. Rezania N., Asadi-Eydivand M., Abolfathi N., Bonakdar S., Mehrjoo M., Solati-Hashjin M. Three-dimensional printing of polycaprolactone/hydroxyapatite bone tissue engineering scaffolds mechanical properties and biological behavior. *J Mater Sci Mater Med*. 2022. Vol. 33(3):31. doi: 10.1007/s10856-022-06653-8.
3. Naghieh S., et al. Numerical investigation of the mechanical properties of the additive manufactured bone scaffolds fabricated by FDM: The effect of layer penetration and post-heating. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2016. Vol. 59. P. 241–50. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.01.031.
4. Kim J-W, et al. Production of poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composite scaffolds with a tailored macro/micro-porous structure, high mechanical properties, and excellent bioactivity. *Materials*. 2017. Vol. 10:1123. doi: 10.3390/ma10101123.
5. Koons G.L., Diba M., Mikos A.G. Materials design for bone-tissue engineering. *Nat Rev Mater*. 2020. Vol. 5. P. 584–603. doi: 10.1038/s41578-020-0204-2.
6. Mazzanti V., Malagutti L., Mollica F. FDM 3D printing of polymers containing natural fillers: a review of their mechanical properties. *Polymers*. 2019. Vol. 11:1094. doi: 10.3390/polym11071094.
7. Bharadwaz A., Jayasuriya A.C. Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration. *Mater Sci Eng: C*. 2020. Vol. 110:110698. doi: 10.1016/j.msec.2020.110698.
8. Cao G. D., Pei Y. Q., Liu J., Li P., Liu P., Li X. S. Research progress on bone defect repair materials. *Zhongguo Gu Shang*. 2021. Vol. 34 (4). P. 382–388. doi: 10.12200/j.issn.1003-0034.2021.04.018
9. Zhang H., Cheng J., Ao Q. Preparation of alginate-based biomaterials and their applications in biomedicine. *Mar. Drugs*. 2021. Vol. 19 (5): 264. doi: 10.3390/md19050264

10. Zhang H., Wu X., Quan L., Ao Q. Characteristics of marine biomaterials and their applications in biomedicine. *Mar. Drugs*. 2022. Vol. 20 (6): 372. doi: 10.3390/md20060372
11. He W., Fan Y., Li X. Recent research progress of bioactivity mechanism and application of bone repair materials. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2018. Vol. 32 (9). P. 1107–1115.
12. Dwivedi R., Kumar S., Pandey R., Mahajan A., Nandana D., Katti D. S., et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *J. Oral Biol. Craniofac Res*. 2020. Vol. 10 (1). P. 381–388.
13. Yassin M. A., Mustafa K., Xing Z., Sun Y., Fasmer K. E., Waag T., et al. A copolymer scaffold functionalized with nanodiamond particles enhances osteogenic metabolic activity and bone regeneration. *Macromol. Biosci*. 2017. Vol. 17 (6): 1600427. doi: 10.1002/mabi.201600427
14. Tappa K., Jammalamadaka U. Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques. *J. Funct. Biomater*. 2018. Vol. 9:17. doi: 10.3390/jfb9010017.
15. Mohseni M., Hutmacher D.W., Castro N.J. Independent Evaluation of Medical-Grade Bioresorbable Filaments for Fused Deposition Modelling/Fused Filament Fabrication of Tissue Engineered Constructs. *Polymers*. 2018. Vol. 10:40. doi: 10.3390/polym10010040.
16. Gebisa A.W., Lemu H.G. Investigating Effects of Fused-Deposition Modeling (FDM) Processing Parameters on Flexural Properties of ULTEM 9085 Using Designed Experiment. *Materials*. 2018. Vol. 11:500. doi: 10.3390/ma11040500.
17. Haq R.H.A., Rahman M.N.A., Ariffin A.M.T., Hassan M.F., Yunus M.Z., Adzila S. Characterization and Mechanical Analysis of PCL/PLA Composites for FDM Feedstock Filament. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng*. 2017. Vol. 226:012038. doi: 10.1088/1757-899X/226/1/012038.
18. Sundaraj K., Salmon L.J., Heath E.L., Winalski C.S., Colak C., VasANJI A., Roe J.P., Pinczewski L.A. Bioabsorbable Versus Titanium Screws in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using Hamstring Autograft: A Prospective, Randomized

- Controlled Trial With 13-Year Follow-Up. *Am. J. Sports Med.* 2020. Vol. 48. P. 1316–1326. doi: 10.1177/0363546520911024.
19. Wachirahuttapong S., Thongpin C., Sombatsompop N. Effect of PCL and Compatibility Contents on the Morphology, Crystallization and Mechanical Properties of PLA/PCL Blends. *Energy Procedia.* 2016. Vol. 89. P. 198–206. doi: 10.1016/j.egypro.2016.05.026.
 20. Ostafinska A., Fortelný I., Hodan J., Krejčíková S., Nevoralová M., Kredatusová J., Kruliš Z., Kotek J., Šlouf M. Strong Synergistic Effects in PLA/PCL Blends: Impact of PLA Matrix Viscosity. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2017. Vol. 69. P. 229–241. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.01.015.
 21. Liu Z., Yu B. Development prospect and research value of biodegradable poly(lactic acid) for bone repair. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2021. Vol. 25(34). P. 5552–5560.
 22. He W., Fan Y., Li X. Recent research progress of bioactivity mechanism and application of bone repair materials. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2018. Vol. 32 (9). P. 1107–1115. doi: 10.7507/1002-1892.201807039
 23. Akindoyo J.O., Beg M.D.H., Ghazali S., Heim H.P., Feldmann M. Effects of Surface Modification on Dispersion, Mechanical, Thermal and Dynamic Mechanical Properties of Injection Molded PLA-Hydroxyapatite Composites. *Compos. Part Appl. Sci. Manuf.* 2017. Vol. 103. P. 96–105. doi: 10.1016/j.compositesa.2017.09.013.
 24. Ferri J., Jordá J., Montanes N., Fenollar O., Balart R. Manufacturing and Characterization of Poly(Lactic Acid) Composites with Hydroxyapatite. *J. Thermoplast. Compos. Mater.* 2018. Vol. 31. P. 865–881. doi: 10.1177/0892705717729014.
 25. Wu D., Spanou A., Diez-Escudero A., Persson C. 3D-Printed PLA/HA Composite Structures as Synthetic Trabecular Bone: A Feasibility Study Using Fused Deposition Modeling. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2020. Vol. 103:103608. doi: 10.1016/j.jmbbm.2019.103608.

26. Yu H, Liu H, Shen Y, Ao Q. Synthetic biodegradable polymer materials in the repair of tumor-associated bone defects. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023. Vol. 16(11):1096525. doi: 10.3389/fbioe.2023.1096525.
27. Felice B., Sánchez M. A., Socci M. C., Sappia L. D., Gómez M. I., Cruz M. K., et al. Controlled degradability of PCL-ZnO nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering and their antibacterial activity. *Mater Sci. Eng. C Mater Biol. Appl.* 2018. Vol. 93. P. 724–738. doi: 10.1016/j.msec.2018.08.009
28. Lee S. J., Lee H. J., Kim S. Y., Seok J. M., Lee J. H., Kim W. D., et al. *In situ* gold nanoparticle growth on polydopamine-coated 3D-printed scaffolds improves osteogenic differentiation for bone tissue engineering applications: *In vitro* and *in vivo* studies. *Nanoscale.* 2018. Vol. 10 (33). P. 15447–15453. doi: 10.1039/c8nr04037k
29. Wu Y. A., Chiu Y. C., Lin Y. H., Ho C. C., Shie M. Y., Chen Y. W.. 3D-Printed bioactive calcium silicate/poly- ϵ -caprolactone bioscaffolds modified with biomimetic extracellular matrices for bone regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2019b. Vol. 20 (4):942. doi: 10.3390/ijms20040942
30. Palamà I. E., Arcadio V., D'Amone S., Biasiucci M., Gigli G., Cortese B. Therapeutic PCL scaffold for reparation of resected osteosarcoma defect. *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7 (1):12672. doi: 10.1038/s41598-017-12824-3
31. Steffi C., Shi Z., Kong C.H., Wang W. Modulation of Osteoclast Interactions with Orthopaedic Biomaterials. *J. Funct. Biomater.* 2018. Vol. 9:18. doi: 10.3390/jfb9010018.
32. Filippi M., Born G., Chaaban M., Scherberich A. Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. Vol. 8. doi: 10.3389/fbioe.2020.00474.
33. Gong M., Zhao Q., Dai L., Li Y., Jiang T. Fabrication of Polylactic Acid/Hydroxyapatite/Graphene Oxide Composite and Their Thermal Stability, Hydrophobic and Mechanical Properties. *J. Asian Ceram. Soc.* 2017. Vol. 5. P. 160–168. doi: 10.1016/j.jascer.2017.04.001.

34. Narayanan G., Vernekar V.N., Kuyinu E.L., Laurencin C.T. Poly (Lactic Acid)-Based Biomaterials for Orthopaedic Regenerative Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. Vol. 107. P. 247–276. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.015.
35. Daskalakis E., Hassan M.H., Omar A.M., Acar A.A., Fallah A., Cooper G., Weightman A., Blunn G., Koc B., Bartolo P. Accelerated Degradation of Poly- ϵ -caprolactone Composite Scaffolds for Large Bone Defects. *Polymers (Basel)*. 2023. Vol. 15(3):670. doi: 10.3390/polym15030670.
36. Rodríguez-Merchán E.C. Bone Healing Materials in the Treatment of Recalcitrant Nonunions and Bone Defects. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23:3352. doi: 10.3390/ijms23063352.
37. Esposito Corcione C., Gervaso F., Scalera F., Padmanabhan S.K., Madaghiele M., Montagna F., Sannino A., Licciulli A., Maffezzoli A. Highly Loaded Hydroxyapatite Microsphere/ PLA Porous Scaffolds Obtained by Fused Deposition Modelling. *Ceram. Int.* 2019. Vol. 45. P. 2803–2810. doi: 10.1016/j.ceramint.2018.07.297.
38. Cheng C.-H., Shie M.-Y., Lai Y.-H., Foo N.-P., Lee M.-J., Yao C.-H. Fabrication of 3D Printed Poly(Lactic Acid)/Polycaprolactone Scaffolds Using TGF-B1 for Promoting Bone Regeneration. *Polymers*. 2021. Vol. 13:3731. doi: 10.3390/polym13213731.
39. Esposito Corcione C., Scalera F., Gervaso F., Montagna F., Sannino A., Maffezzoli A. One-Step Solvent-Free Process for the Fabrication of High Loaded PLA/HA Composite Filament for 3D Printing. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2018. Vol. 134. P. 575–582. doi: 10.1007/s10973-018-7155-5.
40. Orozco-Díaz C.A., Moorehead R., Reilly G.C., Gilchrist F., Miller C. Characterization of a Composite Polylactic Acid-Hydroxyapatite 3D-Printing Filament for Bone-Regeneration. *Biomed. Phys. Eng. Express*. 2020. Vol. 6:025007. doi: 10.1088/2057-1976/ab73f8.
41. Bruyas A., et al. Systematic characterization of 3D-printed PCL/ β -TCP scaffolds for biomedical devices and bone tissue engineering: influence of composition and porosity. *J Mater Res*. 2018. Vol. 33. P. 1948–59. doi: 10.1557/jmr.2018.112.

42. Roh H-S, et al. Addition of MgO nanoparticles and plasma surface treatment of three-dimensional printed polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds for improving bone regeneration. *Mater Sci Eng: C*. 2017. Vol. 74. P. 525–35. doi: 10.1016/j.msec.2016.12.054.
43. Huang B., Bártolo P.J. Rheological characterization of polymer/ceramic blends for 3D printing of bone scaffolds. *Polym Test*. 2018. Vol. 68. P. 365–78. doi: 10.1016/j.polymertesting.2018.04.033.
44. Liu F., et al. Structural evolution of PCL during melt extrusion 3D printing. *Macromol Mater Eng*. 2018. Vol. 303:1700494. doi: 10.1002/mame.201700494.
45. Brunelli M., Perrault C., Lacroix D. Mechanical response of 3D Insert PCL to compression. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017. Vol. 65. P. 478–89. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.08.038.
46. Gatto M.L., et al. Biomechanical performances of PCL/HA micro-and macro-porous lattice scaffolds fabricated via laser powder bed fusion for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng: C*. 2021. Vol. 128:112300. doi: 10.1016/j.msec.2021.112300.
47. Navarro-Baena I., Sessini V., Dominici F., Torre L., Kenny J.M., Peponi L. Design of Biodegradable Blends Based on PLA and PCL: From Morphological, Thermal and Mechanical Studies to Shape Memory Behavior. *Polym. Degrad. Stab*. 2016. Vol. 132. P. 97–108. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.03.037.
48. Matta A.K., Rao R.U., Suman K.N.S., Rambabu V. Preparation and Characterization of Biodegradable PLA/PCL Polymeric Blends. *Procedia Mater. Sci*. 2014. Vol. 6. P. 1266–1270. doi: 10.1016/j.mspro.2014.07.201.
49. Lam C.X.F., Savalani M.M., Teoh S.-H., Hutmacher D.W. Dynamics of in Vitro Polymer Degradation of Polycaprolactone-Based Scaffolds: Accelerated versus Simulated Physiological Conditions. *Biomed. Mater*. 2008. Vol. 3:034108. doi: 10.1088/1748-6041/3/3/034108.
50. Yeo A., Rai B., Sju E., Cheong J.J., Teoh S.H. The Degradation Profile of Novel, Bioresorbable PCL–TCP Scaffolds: An In Vitro and In Vivo Study. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2008. Vol. 84. P. 208–218. doi: 10.1002/jbm.a.31454.

51. Zareidoost A., Yousefpour M., Ghaseme B., Amanzadeh A. The Relationship of Surface Roughness and Cell Response of Chemical Surface Modification of Titanium. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2012. Vol. 23. P. 1479–1488. doi: 10.1007/s10856-012-4611-9.
52. Li L., Crosby K., Sawicki M. Effects of Surface Roughness of Hydroxyapatite on Cell Attachment and Proliferation. *J. Biotechnol. Biomater.* 2012. Vol. 2:150. doi: 10.4172/2155-952X.1000150.
53. Åkerlund E., Diez-Escudero A., Grzeszczak A., Persson C. The Effect of PCL Addition on 3D-Printable PLA/HA Composite Filaments for the Treatment of Bone Defects. *Polymers (Basel)*. 2022. Vol. 14(16):3305. doi: 10.3390/polym14163305.
54. Ulery B.D., Nair L.S., Laurencin C.T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 2011. Vol. 49. P. 832–864. doi: 10.1002/polb.22259.
55. Nishida M., Yamaguchi M., Todo M., Takayama T., Häggblad H.-Å., Jonsén P. Evaluation of Dynamic Compressive Properties of PLA Polymer Blends Using Split Hopkinson Pressure Bar. Volume 1. EDP Sciences; Les Ulis, France: 2009. P. 909–915.
56. Hench L.L. *An Introduction to Bioceramics*. 2nd ed. World Scientific Publishing Company; Hackensack, NJ, USA: 2013.
57. Singh Mehta L., Pillai P. Compression Testing of PLA in 3D Printing. *Int. J. Electron. Electr. Comput. Syst.* 2017. Vol. 6. P. 466–470.
58. Olewnik-Kruszkowska E., Kasperska P., Koter I. Effect of Poly(ϵ -Caprolactone) as Plasticizer on the Properties of Composites Based on Polylactide during Hydrolytic Degradation. *React. Funct. Polym.* 2016. Vol. 103. P. 99–107. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.03.026.
59. Helgason B., Stirnimann P., Widmer R., Boger A., Ferguson S.J. Вплив жорсткості цементу та морфології кістки на компресійні властивості кістково-цементних композитів при моделюванні вертебропластики. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2013, 101, 364-374.

60. Brundavanam, S.; Poinern, G.E.J.; Fawcett, D. Kinetic and Adsorption Behaviour of Aqueous Fe²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ Using a 30 Nm Hydroxyapatite Based Powder Synthesized via a Combined Ultrasound and Microwave Based Technique. *Am. J. Mater. Sci.* 2015, 5, 31–40.
61. Hench, L.L. *An Introduction to Bioceramics*; World Scientific: Hackensack, NJ, USA, 1993; ISBN 978-981-02-1400-5.
62. Elin Åkerlund, Anna Diez-Escudero, Ana Grzeszczak and Cecilia Persson, The Effect of PCL Addition on 3D-Printable PLA/HA Composite Filaments for the Treatment of Bone Defects., *Polymers* 2022, 14(16), 3305;
63. Patrício, T.; Bártolo, P. Thermal Stability of PCL/PLA Blends Produced by Physical Blending Process. *Procedia Eng.* 2013, 59, 292–297.
64. Wachirahuttapong, S.; Thongpin, C.; Sombatsompop, N. Effect of PCL and Compatibility Contents on the Morphology, Crystallization and Mechanical Properties of PLA/PCL Blends. *Energy Procedia* 2016, 89, 198–206.
65. Navarro-Baena, I.; Sessini, V.; Dominici, F.; Torre, L.; Kenny, J.M.; Peponi, L. Design of Biodegradable Blends Based on PLA and PCL: From Morphological, Thermal and Mechanical Studies to Shape Memory Behavior. *Polym. Degrad. Stab.* 2016, 132, 97–108.
66. Matta, A.K.; Rao, R.U.; Suman, K.N.S.; Rambabu, V. Preparation and Characterization of Biodegradable PLA/PCL Polymeric Blends. *Procedia Mater. Sci.* 2019, 6, 1266–1270.
67. Tappa, K.; Jammalamadaka, U. Novel Biomaterials Used in Medical 3D Printing Techniques. *J. Funct. Biomater.* 2018, 9, 17.
68. Lam, C.X.F.; Savalani, M.M.; Teoh, S.-H.; Hutmacher, D.W. Dynamics of in Vitro Polymer Degradation of Polycaprolactone-Based Scaffolds: Accelerated versus Simulated Physiological Conditions. *Biomed. Mater.* 2008, 3, 034108.
69. Yeo, A.; Rai, B.; Sju, E.; Cheong, J.J.; Teoh, S.H. The Degradation Profile of Novel, Bioresorbable PCL–TCP Scaffolds: An In Vitro and In Vivo Study. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2008, 84, 208–218.

70. Zareidoost, A.; Yousefpour, M.; Ghaseme, B.; Amanzadeh, A. The Relationship of Surface Roughness and Cell Response of Chemical Surface Modification of Titanium. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2012, 23, 1479–1488.
71. Li, L.; Crosby, K.; Sawicki, M. Effects of Surface Roughness of Hydroxyapatite on Cell Attachment and Proliferation. *J. Biotechnol. Biomater.* 2012, 2, 150.
72. Nishida, M.; Yamaguchi, M.; Todo, M.; Takayama, T.; Häggblad, H.-Å.; Jonsén, P. Evaluation of Dynamic Compressive Properties of PLA Polymer Blends Using Split Hopkinson Pressure Bar.; EDP Sciences: Les Ulis, France, 2019; Volume 1, pp. 909–915.
73. Brundavanam, S.; Poinern, G.E.J.; Fawcett, D. Kinetic and Adsorption Behaviour of Aqueous Fe²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ Using a 30 Nm Hydroxyapatite Based Powder Synthesized via a Combined Ultrasound and Microwave Based Technique. *Am. J. Mater. Sci.* 2015, 5, 31–40.
74. Wu, D.; Spanou, A.; Diez-Escudero, A.; Persson, C. 3D-Printed PLA/HA Composite Structures as Synthetic Trabecular Bone: A Feasibility Study Using Fused Deposition Modeling. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2020, 103, 103608.
75. Singh Mehta, L.; Pillai, P. Compression Testing of PLA in 3D Printing. *Int. J. Electron. Electr. Comput. Syst.* 2017, 6, 466–470.
76. Navarro-Baena, I.; Sessini, V.; Dominici, F.; Torre, L.; Kenny, J.M.; Peponi, L. Design of Biodegradable Blends Based on PLA and PCL: From Morphological, Thermal and Mechanical Studies to Shape Memory Behavior. *Polym. Degrad. Stab.* 2018, 132, 97–108.
77. Mohseni, M.; Hutmacher, D.W.; Castro, N.J. Independent Evaluation of Medical-Grade Bioresorbable Filaments for Fused Deposition Modelling/Fused Filament Fabrication of Tissue Engineered Constructs. *Polymers* 2018, 10, 40.
78. K.V. Berladir, T.P. Hovorun, S.G. Rudenko, O.A. Bilous, S.V. Varenyk, V.V. Kravets, D.V. Shvetsov. Mechanically Activated Polytetrafluoroethylene: Morphology and Supramolecular Structure. *JOURNAL OF NANO- AND ELECTRONIC PHYSICS* Vol. 14 No 1, 01030 (5pp) (2022).

79. Berladir, K., Zhyhylii, D., Gaponova, O., Krmela, J., Krmelová, V., Artyukhov, A. Modeling of Polymer Composite Materials Chaotically Reinforced with Spherical and Cylindrical Inclusions. *Polymers* 2022, 14, 2087.
80. Moskalenko Y, Smorodska O, Deineka V, Kravets O, Moskalenko R. Prognostic factors for recurrence in patients with surgically resected non-small cell lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* 2022; 26 (3): 239–246.
81. Біомедичні матеріали: від історії до сьогодення [Електронний ресурс]: навч. посіб. / Х. В. Берладір, Т. П. Говорун, О. М. Олешко. – Суми: СумДУ, 2022. – 223 с.
82. Спосіб моделювання імітації системи кровообігу з омиванням експериментальних зразків. Олешко О.М., Дригваль Б.О., Олешко Т.Б. та ін. Заявка патенту на корисну модель.