

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

**ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА імені О. М. БЕКЕТОВА**

СУЧАСНІ МАТЕРІАЛИ ДЛЯ КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

**Харків
ХНУМГ ім. О. М. Бекетова
2025**

УДК 601.2:575.853:602.9]:608.1](075.8)
С91

Автори

Саввова Оксана Вікторівна, доктор технічних наук, професорка – розділи 1–3;

Бабіч Олена Вікторівна, кандидат технічних наук, доцентка – розділ 2;

Фесенко Олексій Ігорович, кандидат технічних наук, старший викладач – розділи 1–3;

Смирнова Юлія Олегівна, кандидат технічних наук, старша викладачка – розділ 3;

Пилипенко Олексій Іванович, кандидат технічних наук, доцент – вступ, загальна редакція;

Гопко Андрій Олексійович, аспірант – розділ 1

Рецензенти:

Корогодська Алла Михайлівна, доктор технічних наук, завідувачка кафедри загальної та неорганічної хімії Національного технічного університету «Харківський політехнічний інститут»;

Цапко Наталія Сергіївна, кандидат технічних наук, доцентка, завідувачка лабораторії Науково-дослідної установи «Український науково-дослідний інститут екологічних проблем»

*Рекомендовано до друку Вченою радою ХНУМГ ім. О. М. Бекетова,
протокол № 7 від 2 лютого 2024 р.*

Сучасні матеріали для клітинної інженерії : навч. посіб. / О. В. Саввова, С91 О. В. Бабіч, О. І. Фесенко, Ю. О. Смирнова, О. І. Пилипенко, А. О. Гопко ; Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова. – Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2025. – 169 с.

ISBN 978-966-695-624-1

Розглянутий сучасний стан розвитку тканинно-інженерних систем, етичні й соціальні аспекти трансплантації анатомічних матеріалів людини та застосування стовбурових клітин для створення біоматеріалів. Описана концепція тканинної інженерії, основні критерії конструювання клітинних матриць та інноваційні матеріали у біологічно активних системах. Наведені основи біомеханіки біосумісних матеріалів та біологічних тканин.

Посібник призначений для студентів вищих навчальних закладів, технікумів та коледжів, які навчаються за спеціальністю 161 – Хімічні технології та інженерія, а також аспірантів, фахівців відповідної галузі.

УДК 601.2:575.853:602.9]:608.1](075.8)

© О. В. Саввова, О. В. Бабіч,
О. І. Фесенко, Ю. О. Смирнова,
О. І. Пилипенко, А. О. Гопко, 2025
© ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2025

ISBN 978-966-695-624-1

ЗМІСТ

Терміни та скорочення.....	5
Вступ.....	6
Розділ 1 Сучасні аспекти створення тканинно-інженерних систем	7
1.1 Основні тенденції розвитку сучасного медичного матеріалознавства.....	7
1.2 Сучасний стан розвитку матеріалів для тканинної інженерії .	9
1.2.1 Шляхи розвитку та історія питання.....	9
1.2.2 Основні напрямки розвитку функціональних матеріалів для реконструктивної медицини.....	12
1.2.3 Вимоги до матеріалів біомедичного призначення	14
1.3 Класифікація матеріалів біомедичного призначення.....	16
1.3.1 Основні терміни та поняття в біомедичній інженерії.....	16
1.3.2 Класифікація матеріалів біомедичного призначення	20
Розділ 2 Клітинні технології та матеріали у біологічно активних системах.....	28
2.1 Сучасні клітинні технології у тканинній інженерії.....	28
2.1.1 Сучасне уявлення про клітинні технології.....	28
2.1.2 Клітинні технології та тканинна інженерія	30
2.1.3 Перспективи та етичні проблеми застосування стовбурових клітин у реконструктивній технології	34
2.2 Сучасні тенденції створення клітинних матриць	40
2.2.1 Основні критерії конструювання клітинних матриць.....	40
2.2.2 Методи створення клітинних матриць у тканинній інженерії кістки	43
2.3 Біоматеріали для тканинної інженерії.....	47
2.3.1 Біополімери природного походження.....	50
2.3.2 Синтетичні полімери.....	69
2.3.3 Застосування синтетичних неорганічних матеріалів для тканинної інженерії	73
2.3.4 Біокомпозити	86
2.3.5 Матеріали для регенерації кісткової тканини	87
2.3.6 Застосовування протеїнів плазми для одержання тканинно-інженерних конструкцій.....	89
2.4 Біоміметика та біоміметичні матеріали	93
2.4.1 Основні поняття біоміметики	93
2.4.2 Основні фізико-хімічні властивості біоміметичних матеріалів	97
2.4.3 Біоміметичні наноматеріали в імплантології	100

Розділ 3 Перспективи застосування скаффолдів у клітинній інженерії.....	109
3.1 Стратегії вибору скаффолдів для біоінженерії кісткової тканини	109
3.1.1 Принципи проектування та основні вимоги до скаффолдів	109
3.1.2 Конструктивні параметри скаффолдів для кісткової інженерії	113
3.1.3 Основні механізм реконструкції кістки та ремоделювання хряща	122
3.2 Матеріали для виготовлення скаффолдів	129
3.2.1 Основні вимоги до матеріалів для скаффолдів	129
3.2.2 Скаффолди на основі металів та їх сплавів	137
3.2.3 Скаффолди на основі полімерів та фосфатів кальцію.....	139
3.2.4 Скаффолди на основі біокераміки.....	151
3.2.5 Модифікація поверхні імплантатів	153
3.3 Сучасні технології виготовлення скаффолдів для тканинної інженерії	156
3.3.1 Порівняльна характеристика методів отримання скаффолдів для тканинної інженерії	156
3.3.2 Традиційні технології виготовлення скаффолдів для кісткових матриць	157
3.3.3 Інноваційні технології виготовлення скаффолдів для кісткових матриць	162
Список використаної літератури	168

ТЕРМІНИ ТА СКОРОЧЕННЯ

Скаффолди (англ. scaffold – каркас; конструкція з риштувань, на якій працівники можуть стояти, коли хочуть дістатися до високих частин будівлі) – це клітинні матриці, що вводяться з метою регенерації кісток. Вони використовуються у поєднанні з біологічними носіями, які прискорюють процеси загоєння та регенерації кісткової тканини.

Ангіогенез – процес утворення нових кровоносних судин у органі або тканині.

BTE (bone tissue engineering) – інженерія кісткової тканини.

MCK – мезенхімальні стовбурові клітини.

CAGR (англ. compound annual growth rate) – сукупний щорічний темп зростання.

ПКМ – позаклітинний матрикс.

PLA – полілактид.

PGA – полігліколід.

PLGA – сополімер молочної та гліколевої кислоти.

PCL – полікапролактон.

PEG – поліетиленгліколь.

PAAAs – поліамінокислоти.

PAA – поліакрилова кислота.

ГА – гідроксиапатит.

ТКФ – трикальційфосфат.

SLA – стеріолітографія.

SLM – селективне лазерне плавлення.

SLS – селективне лазерне спікання.

EBM – електронне променеве плавлення.

FDM – технологія пошарового наплавлення.

CaP – фосфати кальцію.

ВСТУП

Загальна проблема всього медичного матеріалознавства полягає в тому, що штучний матеріал повинен бути тотожним біологічній тканині з точки зору механіки та фізіології – тобто на межі «тканина – імплантат» має бути структурно-функціональна відповідність («ідеальний імплантат»). Звичайно, пошук такого штучного матеріалу є чимось подібним до пошуку алхіміками філософського каменю. Незважаючи на здобутки сучасного матеріалознавства, така відповідність штучного матеріалу природному в першому наближенні досягнута лише для кісткових імплантатів.

Розвиток тканинної інженерії за останнє десятиліття є результатом сполучення різних факторів: розширення знань та доступності стовбурових клітин, геноміки, протеоміки, появи нових біоматеріалів як потенційних шаблонів для вирощування тканин, вдосконалення конструкцій біореакторів для вирощування клітин *in vitro*, розширення розуміння процесів загоєння ран. Однак, незважаючи на те, що дослідження в галузі тканинної інженерії розвиваються дуже швидко, не можна не відзначити, що в галузі комерціалізації тканинно-інженерних продуктів й у сфері їх клінічного застосування успіхи менш вражаючі.

Основними проблемами на шляху практичного застосування продуктів тканинної інженерії є складність розробки ефективних процесів їх застосування, що гарантують життєздатність отриманих матеріалів та задовольняють необхідним нормативним вимогам. Проте прогрес у цьому напрямку очевидний, і кількість людей, які використовують результати продуктів та технологій тканинної інженерії, зростає.

Завдяки огляду та аналізу поточної літератури досить великої кількості джерел інформації з застосування біокераміки цей посібник надає певні можливості з розширення кругозору читача, яким може бути як професіонал, так і здобувач освіти у галузі матеріалознавства та інженерії. Корисним він буде і для медичних працівників, які цікавляться сучасними матеріалами для клітинної інженерії.

РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ ТКАНИННО-ІНЖЕНЕРНИХ СИСТЕМ

1.1 Основні тенденції розвитку сучасного медичного матеріалознавства

Медичне матеріалознавство розвивається стрімкими темпами, охоплюючи три основні напрямки: 1) створення функціональних матеріалів, 2) створення медичних технологій; 3) створення медичних приладів та обладнання. Всі ці напрямки включають застосування технологій робототехніки (рис. 1.1).

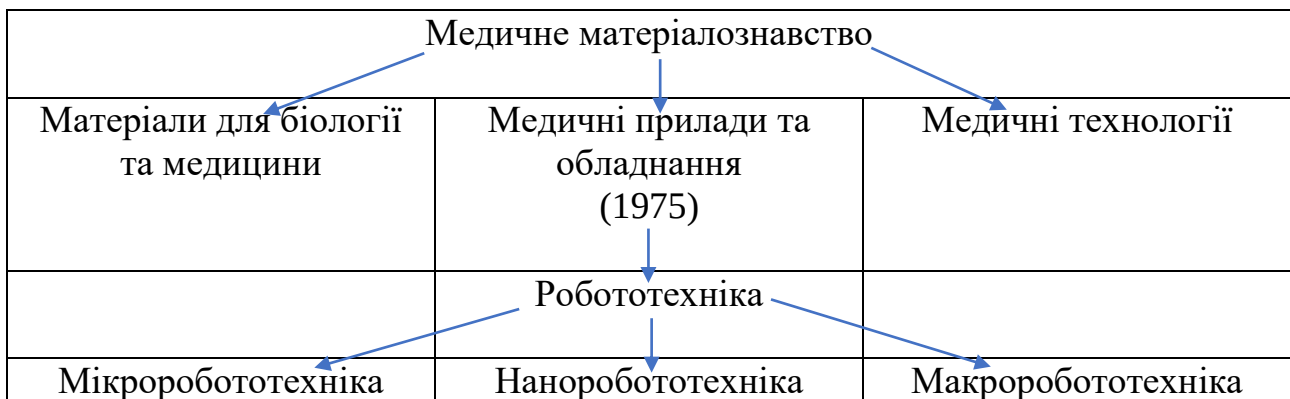


Рисунок 1.1 – Основні галузі медичного матеріалознавства

Структура медична класифікація включає наступні напрямки:

1) *біофармацевтика*

- доставка лікарських препаратів;
- виявлення лікарських засобів.

2) *матеріали для імплантації*

а) *відновлення та заміщення тканин:*

- покриття імплантатів;
- скаффолди для регенерації тканин.

б) *структурні матеріали імплантатів:*

- відновлення кістки;
- біодеградуючі матеріали;
- «розумні» матеріали.

3) *імплантовані прилади*

- прилади для діагностики та лікування;
- імплантовані сенсори;
- імплантовані медичні прилади;

4) *хірургічна апаратура*

- операційні інструменти;
- розумні інструменти;
- хірургічні роботи.

5) *діагностичні прилади.*

Основні напрямки розвитку біомедичного матеріалознавства включають:

1) **матеріали для біології та медицини**

- метали та металокераміка;
- полімери;
- керамічні матеріали;
- вуглецеві матеріали;
- біоскло;
- композитні матеріали;
- гібридні матеріали.

2) **носії для клітин (scaffold) та генів**

- біоінженерія, генотерапія.

3) **системи доставки ліків (drug delivery systems)**

4) **біосенсори**

5) **імплантати та протези** (суглобів, судин, клапанів і т. д.)

6) **медичні прилади та вироби** (робототехніка).

Розподіл основних напрямків у галузі медичного матеріалознавства різко змінився за останні 30 років (рис. 1.2).

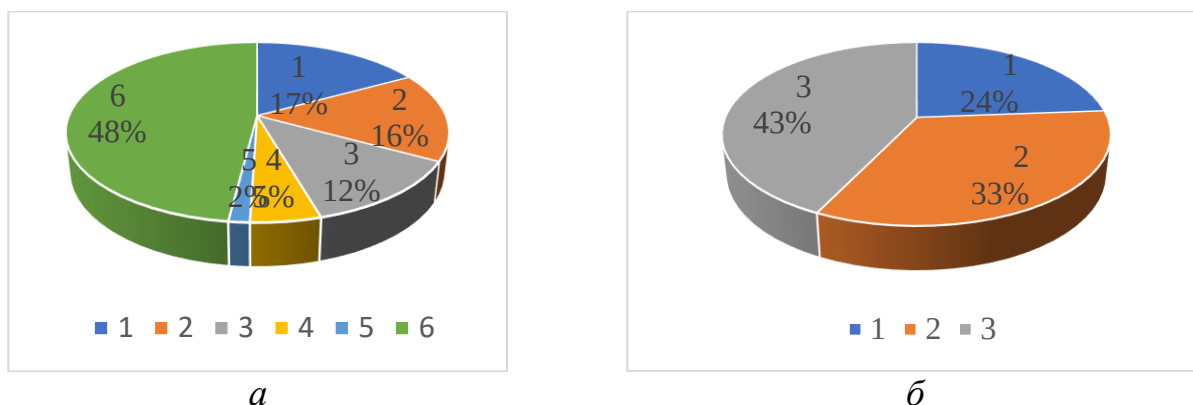


Рисунок 1.2 – Розподіл основних напрямків у галузі медичного матеріалознавства: *а* – 2022 р.; *б* – 1990 р.

а: 1 – фосфати кальцію; 2 – метали; 3 – біосенсори; 4 – біоскло; 5 – вуглець; 6 – полімери. *б*: 1 – кераміка; 2 – полімери; 3 – метали

На сьогодні, завдяки поліфункціональності та конкурентоздатності полімерних матеріалів, їх дослідження та розробка є пріоритетними. Метали поступово втрачають позиції, а біосумісні керамічні матеріали завоюють ринок матеріалів для протезування (рис. 1.2 *а, б*).

Ринок США замісної терапії (суглоби, тканини, органи тощо) оцінюється у 0,5–1,0 трлн. \$. Ринок медичних приладів Європи оцінюється у 145 млрд. євро. Його ріст стимулюють інновації в галузі біоматеріалів, зростаючий ринок імплантаційних пристроїв та пластичної хірургії, а також широке застосування біоматеріалів для лікування поранень і травм.

Одним із багатообіцяючих напрямків є використання біоматеріалів для доставки ліків. Очікується, що в найближчі роки нові винаходи в цій сфері сприятиме зростанню ринку.

Ортопедичне застосування біоматеріалів полягає в розробці замінників кісткових трансплантатів, які включають алотрансплантати, аутоотрансплантати, демінералізовані кісткові матриці, кісткові морфогенетичні білки, матриці на основі клітин та синтетичні замінники кісткової тканини. На ринку біоматеріалів ортопедія має найвищий CAGR за період 2020–2027 рр. Замінники кісткової тканини знаходять найбільше застосування у спондилодезі, фіксації травм, реконструкції суглобів, черепно-щелепно-лицьовій фіксації, фіксації зубів та інших областях.

Сьогодні вважають, що в Азіатсько-Тихоокеанському регіоні найбільший ринок біоматеріалів має Індія (рис. 1.3).

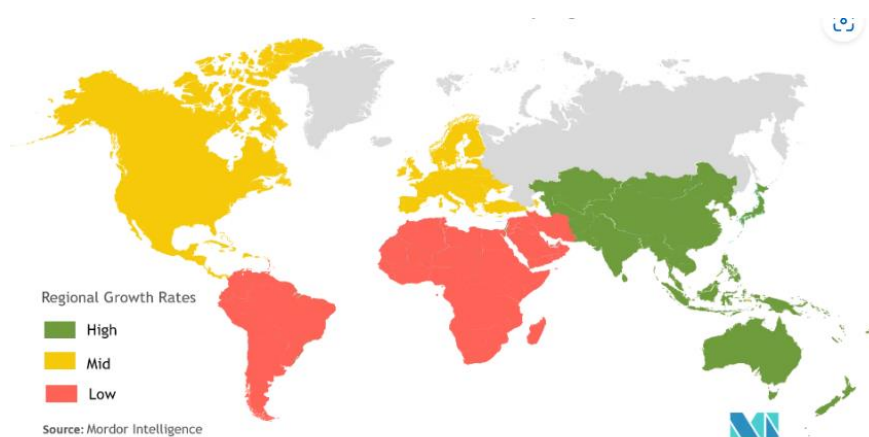


Рисунок 1.3 – Активність ринку біоматеріалів за період 2020–2027 рр.

Об’єм її ринку біоматеріалів зростає швидкими темпами. Значну частку на індійському ринку біоматеріалів займають ортопедичні, стоматологічні та серцево-судинні біоматеріали. Цьому сприяє збільшення числа ортопедичних, стоматологічних та серцево-судинних операцій. Індійський ринок біоматеріалів відчуває зростання попиту на замінники кісткових трансплантатів. Добре відомі на цьому ринку компанії: Koninklijke DSM NV, Corbion NV, Biomet Inc., Noble Biomaterials Inc. та Bayer AG.

1.2 Сучасний стан розвитку матеріалів для тканинної інженерії

1.2.1 Шляхи розвитку та історія питання

Потреба в трансплантації зростає в арифметичній прогресії в усіх країнах. Класична сучасна медицина нездатна вилікувати багато хронічних захворювань – можливі лише корекційні процедури. Знайти сумісного донора для заміни тканин теж складно.

Одним із основних методів відновлення органів й тканин у випадках, коли пересадка власного матеріалу неможлива, залишається його трансплантація від живого донора чи нещодавно померлої людини. Головне в цьому процесі – максимальна біологічна сумісність донора та реципієнта. Але і

в цьому випадку імунна система чинитиме опір й заважатиме приживленню пересаженого органу або тканини. Тому пацієнтам, які перенесли трансплантацію, тимчасово чи довічно призначають спеціальні препарати – імунодепресанти. По суті вони пригнічують власну імунну систему людини. Але, незважаючи на багато зусиль, часто пересаджений орган не приживається.

Наслідуючи принцип «не нашкодь», вчені та лікарі шукають способи відновлення тканин та органів силами власного організму пацієнта. Для цього виник цілий розділ реконструктивної хірургії, заснований на мікрохірургії, та тканинна інженерія, яка з'явилася задовго до неї.

Історія питання. Вперше можливість застосування методів тканинної інженерії у реконструктивній медицині наприкінці XIX ст. встановив американський лікар Лео Льюб. У 1897 році він провів експеримент у ході якого спостерігав, як у згорнутій крові та лімфі відбувалось ділення клітини. Опублікувавши свої спостереження, він не розкрив точних даних дослідження чим зробив своє відкриття ще більш інтригуючим.

Надалі до цієї теми з різних боків намагалися підійти багато вчених, але лише через десять років його колезі та співвітчизнику – вченому Росу Харрісону – вдалося виростити та підтримувати живими нервові волокна та клітини, які були вилучені з тканини ембріона жаби. А вже в 1912 році французький хірург Алексіс Каррель разом із колегами зміг підтримувати життя невеликої ділянки серця курячого ембріона. Цей біоматеріал залишався життєздатним і навіть зростав протягом 24 років!

Основні способи вирощування тканини. З того часу тканинна інженерія просунулась далеко вперед. Зараз для вирощування тканин використовуються різні способи, але одним із основних є скаффолд-технологія, яка знайшла застосування в медичній практиці з 90-х років XX сторіччя.

За цією технологією як зразок беруть клітини живого організму: частину тканини або окремих орган. Потім за допомогою ферментів їх розбирають на окремі клітини та ці клітини розмножують у живильному середовищі протягом 4–6 тижнів. Наступний етап – пересадка одержаних клітин на скаффолд – спеціальну тимчасову матрицю. На цій матриці вирощують тканину, яка призначена для пересадки людині, тобто скаффолд – це своєрідний кур'єр нових клітин тканини. Після відновлення пошкодженої тканини, скаффолд розсмоктується і зникає.

Яскравим прикладом такої роботи є реконструкція сечового міхура американським хірургом Ентоні Аталю. Для роботи був взятий фрагмент тканини сечового міхура розміром з половину поштової марки. Вирощування клітин у лабораторних умовах зайняло чотири тижні. Потім команда науковців створила скаффолд у формі сечового міхура, внутрішню оболонку цього каркасу вкрили вирощеними клітинами «оригінального» органу, а зовнішню – м'язовими клітинами органу. Заготовку розмістили в біореакторі (медичному аналозі печі) для дозрівання. Через 6–8 тижнів повністю сформований орган був пересаджений пацієнту.

Таким же способом Аталі вдалося виростити серцевий клапан й навіть вухо. Для більш складних органів, наприклад, серця, колега Аталі китайський учений Тао Жу розробив техніку, за якої використовуються 3D-принтери. Замість чорнила в картридж заливають людські клітини, з яких протягом години буквально друкується серце, яке за 46 годин готове до використання.

Як каркас застосовуються й донорські органи. Візьмемо печінку: за допомогою спеціальних засобів з неї видаляють усі клітини донора, потім у спустошений «скелет» вводяться клітини пацієнта – зсередини та зовні. Клітини пацієнта – гарантія того, що відторгнення з боку організму не буде.

Незважаючи на вдалі приклади трансплантації тканинна інженерія поки що відноситься до експериментальної науки, але проведені дослідження доводять, що створювати за допомогою даної методики можна все – серцеві клапани, кровеносні судини, печінку, м'язи, вуха та пальці людини. Вчені сподіваються, що нова методика також допоможе впоратися з ще однією гострою проблемою трансплантології – дефіцитом донорських органів.

Регенеративна медицина в Україні. Операції з відновлення шкірних покривів та кісткової тканини стали можливими завдяки технології вирощування стовбурових клітин. Цю технологію розвивають із 2012 року в одній із приватних клінік Києва. Протягом двох років технологія апробувалась, а медустанова проходила етапи отримання ліцензії. І лише в 2014 році стало можливим застосування стовбурових клітин у терапевтичних цілях.

Перші експерименти з вирощування клітин в Україні розпочалися ще у Донецьку у 2000 році. У Інституті невідкладної та відновної хірургії академік Володимир Гусак пролобіював створення лабораторії клітинного та тканинного культивування. У цій високотехнологічній лабораторії, що відповідає американським стандартам GMP, проходили дослідження з вирощування стовбурових клітин. Спочатку лабораторія у Донецьку створювалася з метою вирощування «штучної шкіри» для лікування пацієнтів з тяжкими опіками (одна з найпоширеніших виробничих травм у Донецькій області) та фінансувалася міжнародними організаціями.

Метод клітинної терапії використовувався під час операцій з пересадки шкіри та в лікуванні ішемічної хвороби серця. Стовбурові клітини, вирощені в лабораторних умовах, вводили у спеціальні «голодні» зони міокарда. Коли ці ділянки відновлювали роботу, тобто починали скорочуватися, хірурги розпочали операцію. Такі маніпуляції дозволяли уникнути пересадки серця. Оскільки пересаджувалися власні стовбурові клітини, взяті попередньо у хворого, то пацієнту не потрібно було приймати імунодепресивні препарати.

У Інституті невідкладної та відновлювальної хірургії було проведено не менше 60 унікальних операцій на серці, близько 80 операцій із пересадки шкіри. Тоді ж розпочалися перші експерименти по «вирощуванню» кісток. Для цих операцій використовували кісткові носії (3D–матриці, створені з кісткової крихти), «оброблені» клітинами пацієнта. Через кілька місяців після пересадки вони «вбудовувались» у кісткову тканину. Такі операції вважаються унікальними для пострадянського простору і на сьогодні, за словами

біотехнолога Дмитра Зубова, ніде, крім України, не проводяться. Зараз напрацювання донецьких фахівців набули другого життя у приватній практиці.

1.2.2 Основні напрямки розвитку функціональних матеріалів для реконструктивної медицини

Створення екологічно чистих матеріалів зі спеціальними властивостями є одним із ключових проблем сучасності. Важливу проблему представляє розробка нових матеріалів медичного призначення, що застосовуватимуть для контакту з середовищем живого організму та необхідних для реконструктивної медицини. Затребуваними є й спеціалізовані біосумісні матеріали для нового напрямку, що сформувався в останні роки – клітинної та тканинної інженерії. Це пов'язане з розробкою технологій виробництва штучних органів.

Медичні матеріали включають:

- 1) полімерні, керамічні, металеві, вуглецеві, текстильні, скляні та інші матеріали та їх композити;
- 2) біологічні матеріали (трансплантати);
- 3) гуми, латекси, папір, барвники, лаки, емалі, клеї та інші матеріали, що застосовуються для виготовлення медичних виробів.

Медичний виріб – це будь-який прилад, апарат, пристрій, матеріал, що використовуються самі по собі або в певному сполученні, безпосередньо або опосередковано контактують з організмом людини та призначені для застосування в медичних цілях.

Проблема використання нових матеріалів у різних галузях медицини, окрім фундаментальних питань, пов'язаних з вивченням взаємодії матеріалу з тканинами організму, представляє значний інтерес для практичної медицини. Дослідження в галузі матеріалів медичного призначення є одним з актуальних напрямів, які відповідають завданням та рівню розвитку науки, технологій й техніки України та переліку критичних технологій. Роботи у напрямку технологій створення біосумісних матеріалів» реалізуються на стику медицини, хімії високомолекулярних сполук, біотехнології, біофізики, молекулярної та клітинної біології і вирішують взаємопов'язані завдання:

- розробку нових матеріалів, методів їх модифікації та переробки в спеціалізовані вироби біомедичного призначення;
- вивчення механізму взаємодії біоматеріалів із середовищами та тканинами людини;
- оцінку фізико-хімічних та медико-біологічних властивостей біоматеріалів та виробів з них;
- експериментально-клінічне дослідження та застосування нових матеріалів та виробів.

Освоєння нових біосумісних матеріалів та створення спеціалізованих біомедичних виробів на їх основі є провідним напрямом досліджень в області медицини. Щорічний бюджет медичних центрів у Європі, Японії та США, що займаються проведенням фундаментально-прикладних досліджень у галузі тканинної та клітинної інженерії, становить сотні мільйонів доларів США.

Основний акцент дослідників сьогодні фокусується на пошуку технологій створення біоштучних матеріалів та органів, що є системами з матеріалів штучного або біологічного походження і містять функціонуючі клітини органів та тканин або стимулюють регенерацію відповідних клітин у зоні імплантації.

Особливо гострою є потреба в резорбційних матеріалах, які характеризуються високою біосумісністю. Однак незважаючи на значні грошові вливання розвинених країн у цей напрямок, результати багаторічної праці вчених поки що не призвели до створення штучних тканин, аналогічних за властивостями природній біологічній тканині.

На сьогодні необхідними є біосумісні матеріали для загальної та серцево-судинної хірургії (протезів кровоносних судин, штучних клапанів серця, систем штучного та допоміжного кровообігу), ортопедії та стоматології, розробки лікарських препаратів нового покоління, сорбентів тощо.

Особливу й суттєву проблему становить необхідність створення біоруйнівних матеріалів, здатних імітувати властивості біологічних структур. Це пов'язане з революційними змінами, що відбуваються на даний час у медицині в зв'язку з появою та розвитком нових робіт у галузі трансплантології та штучних органів, що базуються на принципово новому підході до відновлення функцій життєво важливих органів. Вони включають використання технологій генної, клітинної та тканинної інженерії для розробки біоштучних (гібридних) органів та тканин, клонування органів й тканин із власних стовбурових клітин пацієнта *in vitro* (дослівно – у пробірці, тобто за межами живого організму). Призначення таких систем – повністю чи частково, тимчасово чи постійно замінити функції життєво важливих органів та тканин. Кінцевою метою є відновлення структури та функції тканини в місці дефекту.

Для організації та підтримки росту клітин у процесі виготовлення пошкодженої тканини необхідні так звані матриці або матрикси-скаффолди (scaffolds – матриця, носій, підкладка, каркас). Даний напрямок отримав назву «біоімітування», а відповідні матеріали називають «саморегульованими» (self-monitoring), «розумними» (smart) або «інтелегентними» (intelligent).

Сфера застосування таких матеріалів досить широка. Це трансдермальні або імплантовані пристрої з контрольованим й регульованим виходом біологічно активних речовин для лікарської, клітинної та генної терапії; вироби з «пам'яттю форми» для ортопедії та серцево-судинної хірургії; біосенсори; біодеградовані вироби для реконструктивної хірургії; біотехнологічні пристрої для сепарації, очищення та ідентифікації біологічних структур на молекулярному та клітинному рівнях тощо.

Хірургія відноситься до тих медичних наук, які відчувають найбільш гостру потребу в розробці та впровадженні в клінічну практику нових біосумісних біоматеріалів. Насамперед ця потреба відчувається в реконструктивних технологіях, де зараз активно досліджуються не тільки матеріали та вироби для серцево-судинної системи, але й різні хірургічні елементи та ендопротези, високоміцні шовні матеріали, пристрої та засоби для черевної хірургії, травматології та ортопедії, щелепно-лицьової хірургії. Нові

результати у області абдомінальної хірургії, пластиці черевної стінки, запобігання постопераційних спайких процесів, анастомозування та накладення швів на кишківник, реконструкції та протезуванні жовчовивідних шляхів неможливі без використання сучасних матеріалів. Їх розробка є актуальною та затребуваною для реконструктивного остеогенезу.

Серйозною проблемою сучасної відновлювальної хірургії в травматології та ортопедії, щелепно-лицьовій хірургії та стоматології є пластика дефектів кісткової тканини, що утворюються під час хірургічного лікування низки захворювань та пошкоджень кістки. Результати хірургічного відновлення дефектів кісткової тканини більшою мірою залежать від перебігу процесу репаративного остеогенезу. Репаративний остеогенез у посттравматичних дефектах кісткової тканини проходить повільно і триває впродовж місяців або років; у ряді випадків кісткові дефекти загалі не заповнюються кістковою тканиною. Враховуючи високий травматизм й значну кількість ортопедичних операцій, розробка нових методів та матеріалів реконструкції дефектів кісток, лікарських засобів для них є однією з важливих проблем травматології, ортопедії, щелепно-лицьової хірургії та стоматології. Існує потреба й у матеріалах для лікування значних дефектів кістки, які виникають внаслідок хронічних запалень, після видалення кіст, хондром, пухлин.

Таким чином, все вищевикладене обумовлює актуальність продовження пошуку та розробки нових остеопластичних матеріалів для вдосконалення методів усунення кісткових дефектів.

Не менш гострою є потреба в біодеградуючих матеріалах у фармакології. У практиці лікування низки системних, хронічних та тривалих захворювань найбільш перспективним й ефективним способом застосування медикаментів визнані лікарські форми довготривалої дії з контрольованим виходом препаратів. Це так звані засоби «drug delivery control». Ці ліки особливо необхідні в трансплантології під час пересадки донорських і штучних органів, для лікування хронічних інфекцій, у тому числі тих, які виникають у результаті травм або постопераційних ускладнень після хірургічного втручання.

Успіх розробки таких лікарських систем неможливий без наявності адекватного матеріалу, що використовується як матриця для депонування лікарського засобу. Такі матеріали повинні бути абсолютно нешкідливими для організму, мати певні фізико-механічні властивості, руйнуватися без утворення токсичних продуктів, не інактивувати лікарські препарати та не змішуватися з ними в різних фазових станах.

1.2.3 Вимоги до матеріалів біомедичного призначення

Під час контакту біоматеріалу з організмом неминуче виникає взаємодія його біологічного середовища і введеної штучної системи. Тому штучний матеріал має відповідати деяким вимогам:

- його властивості повинні відповідати біохімічним і функціональним характеристикам заміщуваного біологічного об'єкта;
- він повинен відповідати вимогам біосумісності.

«Ідеальний біоматеріал» повинен бути:

- біосумісним;
- нетоксичним;
- оптимальним за механічними властивостями;
- біоінертним або біоактивним залежно від поставлених завдань;
- комфортним для пацієнта;
- простим у застосуванні та видаленні з організму;
- легко відтворюваним та стерилізованим.

Наприклад, для полімерних біоматеріалів виділяють такі їх властивості:

- хімічна структура та склад;
- розподіл повторюваних мономерів у полімері;
- наявність іонних груп;
- існування домішок та дефектів;
- конфігурація;
- молекулярна маса та наявність низькомолекулярних компонентів;
- структура (аморфність або кристалічність, мікроархітектоніка, наявність зон деформацій та внутрішніх напруг);
- умови виготовлення;
- умови стерилізації;
- умови зберігання;
- ефекти пам'яті форми;
- місце введення;
- адсорбовані та абсорбовані компоненти (вода, ліпіди, іони, антитіла);
- фізико-хімічні фактори (іонна сила, рН);
- фізичні фактори (механічна міцність, еластичність, форма, зміни коефіцієнта дифузії тощо);
- механізми розчинення (хімічний, ферментативний, клітинний);
- розмір.

Розвиток серцево-судинної хірургії та трансплантології обумовлює актуальність пошуку матеріалів, придатних для використання в умовах тривалого контакту з кров'ю. Тому сумісність є найважливішою властивістю біоматеріалів. Вимоги до біологічних властивостей матеріалів та виробів, які призначені для контакту з кров'ю, можна сформулювати наступним чином:

- гемосумісні медичні вироби не повинні мати токсичної, алергічної та запальної дії;
- не активувати ферментні системи;
- не мати негативної дії на білкові та ферментні елементи крові, а також органи та тканини;
- не викликати антигенної та канцерогенної відповіді та відхилення системи метаболізму;
- не провокувати розвитку інфекції та не порушувати електролітичного балансу;
- не змінювати своїх медико-технічних властивостей в процесі небажаної кальцифікації та (або) біодеградації.

Показниками відсутності гемосумісності медичних матеріалів та виробів є поява тромбів та тромбоемболій, індукованих їх поверхнею.

Таким чином, вимоги до біоматеріалів різноманітні й багатогранні, тому в кожному окремому випадку необхідно розглядати конкретний зміст, що вкладається в поняття біосумісності стосовно цільового призначення кожного окремого матеріалу.

1.3 Класифікація матеріалів біомедичного призначення

1.3.1 Основні терміни та поняття в біомедичній інженерії

«Біологічна сумісність» – термін, який запропонували японські дослідники Я. Сакураї та Т. Акаїке у 1981 році. Це поняття досить широке та ємне. Серед біосумісних матеріалів відомі, наприклад, матеріали зі значною механічною міцністю для ортопедії, еластичні матеріали для судинних протезів, шовні нитки, які досить швидко повинні резорбуватися й засвоюватися організмом, штучні клапани серця, призначені для тривалого функціонування, антитромбогенні матеріали, а також матеріали, що сприяють швидкому згортанню крові.

У розширеному тлумаченні терміну «біосумісність» слід мати на увазі не тільки взаємне «співіснування» двох субстанцій (штучної та природної), а й те, що штучний матеріал повинен виконувати функції живої матерії. Цілком очевидно, що біосумісність того чи іншого матеріалу або виробу-імплантату визначається не тільки хімічною будовою та структурою, але й морфологією його поверхні та специфікою взаємодії з навколишніми тканинами.

Біосумісними називають матеріали, здатні існувати разом із живими організмами, не завдаючи йому шкоди. За визначенням академіка Н. А. Плате, біосумісними є «полімери, здатні до метаболізму». На конференції з біосумісності, що відбулася в 1994 р. у Великобританії, було запропоновано під **біосумісністю** «розуміти здатність матеріалу, виробу або пристрою виконувати свої функції й не викликати негативних реакцій у організмі «господаря».

Біосумісним є матеріал, який має здатність формувати відповідний відгук організму господаря за специфічного використання. Це термін, сформульований за загального консенсуса матеріалознавців у 1986 році, підкреслює, що **біосумісність** – це не відсутність токсичності, але вимога, щоб матеріал мав контрольовану поведінку. Важливо визнати, що, залежно від умов застосування, матеріал буде або не буде біологічно сумісним.

Згідно Закону України «Про застосування трансплантації анатомічних матеріалів людині» визначені наступні терміни та поняття:

- **анатомічні матеріали** – органи (їх частини), тканини, анатомічні утворення, клітини людини або тварини, фетальні матеріали людини;
- **ауто трансплантація** – пересадка людині власного анатомічного матеріалу;

– **біоімпланти** – медичні вироби, продукти медичного призначення, виготовлені з анатомічних матеріалів людини;

– **імплантація** – спеціальний метод лікування, що полягає у пересадці людині біоімплантатів, ксеноімплантатів і штучно виготовлених замінників органів;

– **імунологічна сумісність** – генетично обумовлена сумісність анатомічних матеріалів різних осіб, що визначається шляхом проведення лабораторних досліджень відповідно до галузевих стандартів у сфері охорони здоров'я;

– **ксеноімпланти** – медичні вироби, що виготовлені з анатомічних матеріалів тварин та використовуються для імплантації;

– **реципієнт** – особа, яка потребує медичної допомоги із застосуванням трансплантації;

– **тканина** – анатомічний матеріал, сформований з груп, подібних за будовою і функціями клітин та міжклітинної речовини;

– **трансплантація** – спеціальний метод лікування, що полягає в пересадці анатомічного матеріалу людини від донора реципієнту й спрямований на відновлення здоров'я людини;

– **трансплант-координатор** – працівник закладу охорони здоров'я, бюро судово-медичної експертизи, спеціалізованої державної установи у сфері трансплантації органів, тканин та клітин, іншого суб'єкта господарювання, що здійснює діяльність, пов'язану з трансплантацією, до посадових обов'язків якого належить здійснення трансплант-координації.

Біоматеріал – нежиттєздатний матеріал, призначений для контакту з живою тканиною для виконання біомедичних функцій. Біоматеріал має бути біосумісним або може бути біодеградуєчим.

Імплантат – виріб з біоматеріалу, який виконує (заміщує) певне структурно-функціональне навантаження живої тканини чи органу.

Біодеградація – процес розкладання нежиттєздатних матеріалів під час контакту з живими тканинами, клітинами та біологічними рідинами.

Біосумісні матеріали (біоматеріали) та пристрої – це матеріали або пристрої, які діють або функціонують гармонійно та узгоджено під час знаходження в контакті або всередині живого тіла, не викликають серйозних захворювань чи ускладнень.

Трансплантація – пересаджування, вживлення, заміщення пошкоджених або відсутніх органів і тканин реципієнтам. У клінічній практиці широкого поширення набула пересадка тканин і частин органів, наприклад, м'язів, судин, нервів, рогівки ока, кісткового мозку тощо.

Термін «**трансплантат**» означає будь-який орган, тканину або частину тіла, що використовується для пересадки для заміни пошкодженої частини тіла. Цим терміном може називатися тільки жива тканина із збереженими органами або клітинними структурами.

Трансплантація – спеціальний метод лікування, що полягає в пересадці реципієнту органа або іншого анатомічного матеріалу, взятих у людини чи у тварини.

Анатомічні матеріали – органи, тканини, анатомічні утворення, клітини людини або тварини.

Гомотрансплантати – анатомічні матеріали людини, призначені для трансплантації.

Біоімпланти – засоби медичного призначення, виготовлені з анатомічних матеріалів померлих людей.

Ксенотрансплантати – анатомічні матеріали тварини, призначені для трансплантації.

Фетальні матеріали – анатомічні матеріали мертвого ембріона (плода) людини.

Донор – особа, у якої за життя або після її смерті взято анатомічні матеріали для трансплантації або для виготовлення біоімплантів.

Реципієнт – особа, для лікування якої застосовується трансплантація.

Особливий вид трансплантології – переливання крові. З числа органів найчастіше здійснюють пересадку нирки, ендокринних залоз (вилочкової), рідше – легень, серця й печінки. Трансплантацію органів застосовують за захворювань даних органів у термінальних станах хворим, які втратили єдиний парний орган (нирку). Так само вона застосовується в експериментальній біології та медицині (онкології). Серед біологічних протезів розрізняють трансплантати і біопротези.

Трансплантати – це клапани біологічного походження, пересаджені без попередньої хімічної обробки, в життєздатному стані або після консервації та стерилізації. Їх зберігають у фізіологічних рідинах й розчинах антисептиків (антибіотиків).

Видові відмінності трансплантації:

- 1) **аутотрансплантація** – пересадка власних органів і тканин організму;
- 2) **ізотрансплантація** – пересадка органів і тканин ідентичних за генетичним типом (пересадка від монозиготних близнюків);
- 3) **сінгенна трансплантація** – пересадка від кровних родичів;
- 4) **алотрансплантація** – пересадка органів або тканин у межах одного і того ж виду, наприклад, «людина – людина»;
- 5) **ксеногенна трансплантація (міжвидова)** – пересадка органів від інших видів, наприклад, людині від свині тощо.

Трансплантація на теж саме місце називається **ортотопічною**, а на інше місце як добавка або помічник – **гетеротопічною**. Під час цього уражений орган зберігають. За трансплантації найчастіше застосовують власні тканини організму, а також можлива пересадка органів і тканин від кровних родичів хворого або від померлих людей, смерть яких настала внаслідок несумісних з життям ушкоджень або травм.

Підбір пар «донор – реципієнт» здійснюють з урахуванням групи крові, тобто за еритроцитарними антигенами системи АВО, резус-фактором (Rh) і

тканинними антигенами (HLA – система). Вони є компонентами клітинної мембрани, які розпізнають чужорідні антигени (білки); у цьому головна роль належить Т-лімфоцитам.

З іншого боку, **«імплантат»** – це ендопротез, який вводиться в організм і не містить живих біологічних компонентів.

Для виготовлення імплантатів можуть використовуватися матеріали як небіологічного (метали, кераміка), так і біологічного (тканини тварин, хітин, корали) походження. Біологічні матеріали повинні бути девіталізовані, тобто оброблені таким чином, щоб видалити біологічні (живі) компоненти, а саме, клітини, їх залишки та антигенні (імуногенні) агенти.

Біосумісним називається імплантат, який є нетоксичним за тривалого знаходження в організмі реципієнта. Біосумісні імплантати діляться на аутогенні, аlogenні, ксеногенні та синтетичні, а також різні їх комбінації і композиції.

Визначення цим основним видам імплантатів:

- **аутогенні (власні) імплантати** – біологічні матеріали, взяті, модифіковані (оброблені або девіталізовані) і пересажені в межах організму одного і того ж пацієнта;

- **алогенні імплантати** – біологічні матеріали, взяті від донора того ж біологічного виду, та які пройшли технологічний цикл обробки або переробки в імплантаційний матеріал;

- **ксеногенні імплантати** – біологічні матеріали, в якості донора яких використана особина іншого, ніж реципієнт, біологічного виду з обов'язковим проходженням технологічного циклу обробки або переробки, видалення антигенних (імуногенних) комплексів;

- **синтетичні (алопластичні) імплантати** – матеріали, синтезовані хімічним шляхом, тим чи іншим способом;

- **біологічні композити (біокомпозити)** – біосумісні імплантаційні конструкції, що складаються з біологічних та синтетичних матеріалів, об'єднаних адекватно до формування необхідної функції (особливо перспективні на даний момент).

Більшість авторів виділяють такі основні вимоги до «якісного імплантату»:

- **біосумісність** (біосумісністю називається комплексна властивість імплантату інтегруватися в живі тканини, не викликаючи патологічних процесів; ця властивість включає в себе такі аспекти, як нетоксичність, стерильність, апірогенність, неімуногенність);

- **здатність до біорезорбції** (біорезорбція вказує на здатність матеріалу спочатку виконувати функцію каркасу-скаффолду, а потім поступово перебудовуватися у власну тканину пацієнта);

- **подібність хімічного складу і архітекtonіки (мікроструктури) до властивостей зони передбачуваної імплантації;**

- **здатність заміщуватися органотиповою тканиною на місці дефекту;**

– пластичність і здатність до моделювання, зручність у виготовленні та використанні;

– кондуктивність за рахунок пористості або сітчастості – здатність забезпечувати міграцію всередину імплантату власних клітин реципієнта (Denner K. et al. експериментально визначили розмір пор кістковопластичних матеріалів, які мають остеокондуктивні властивості – розмір пор повинен становити не менше 100 мкм);

– індуктивність – здатність індукувати диференціювання власних (що мігрували за рахунок хемотаксису) або додатково внесених стовбурових клітин у скаффолди, що заміщують тканини; це може досягатися як за рахунок насичення хімічними індукторами (дексаметазон, ретиноева кислота), так і біологічними індукуючими агентами (наприклад, клітини окістя як біологічний індуктор диференціації клітин в остеогенному напрямку);

– здатність виконувати функцію скаффолда для стовбурових клітин та інших біологічних агентів, тобто забезпечувати форму, бути каркасом і носієм для клітин, які згодом побудують органотипові тканини в місці пошкодження.

Розвиток сучасної хірургії, а особливо розвиток мікрохірургії, пов'язаний із застосуванням сучасного оптичного устаткування, за допомогою якого здійснюється судинний шов під час шунтування кровоносних судин, операції по відновній хірургії тощо. Такі операції проводяться за участю багатьох фахівців (хірургів, анестезіологів, реаніматорів, кардіологів) і залученням складної апаратури, необхідної для трансплантації.

Основними обставинами, що стримують розвиток трансплантології, є біологічна несумісність тканин, яка з'являється в різні терміни після пересадки і проявляється у відторгненні трансплантованого органу. З метою запобігання даного процесу застосовують імунодепресанти (димедрол, антигістамінні препарати, іонізуюче випромінювання), дія яких спрямована на придушення трансплантаційного імунітету, тобто на пригнічення імунної системи реципієнта, що підвищує, в свою чергу чутливість до збудників інфекції і частоту виникнення пухлинних процесів.

1.3.2 Класифікація матеріалів біомедичного призначення

1.3.2.1 Основні види та класифікація біоматеріалів

Матеріали, призначені для контакту з середовищем живого організму, які використовують для виготовлення медичних виробів та пристроїв, одержали назви «біоматеріали». Їх класифікація представлена в таблиці 1.1.

Біоактивні матеріали (БАМ) – матеріали, які призначені для зв'язування їх із біологічними системами з метою підвищення ефективності лікування, утворення або заміщення будь-якої тканини, органу під час виконання тих чи інших функцій організму.

На даний час серед сімейства БАМ виділяють 5 основних категорій:

1) кальційфосфатна кераміка;

- 2) скло та склокераміка;
- 3) біоактивні полімери;
- 4) біоактивні гелі;
- 5) композити.

Таблиця 1.1 – Основні класи біоматеріалів (VI Світовий конгрес з біоматеріалів)

Основні класи біоматеріалів		
Полімери	Композитні матеріали гібридні матеріали (з клітинами та органічними волокнами)	
	біоінертні	біоактивні
	пористі	об'ємні
	резорбуючі	нерезорбуючі

Біоінертні матеріали – матеріали, які слабо взаємодіють з біологічними структурами та рідинами.

Перелік матеріалів, отримання яких актуальне для розвитку та вдосконалення відновлювальної хірургії трансплантології, включає різноманітні матеріали та композити з різними функціональними характеристиками та базовими властивостями.

Великі зусилля витрачені для класифікації та створення бази даних біоматеріалів. Виділяють матеріали для серцево-судинної та тканинної хірургії, урології, ортопедії та стоматології, покриття ранових поверхонь та створення систем доставки лікарських засобів та речовин. Серед них матеріали:

- біологічно сумісні з живим організмом (це матеріали, які після вживлення в організм, перебуваючи в ньому тривалий час, не викликають негативних реакцій. Це силікон, тефлон, полікарбонати, полігліколіди та полілактиди, поліетилен, титан тощо);

- матеріали, які мають антитромбогенні властивості (матеріали, придатні для тривалого контакту з кров'ю, які використовують для виготовлення судинних протезів, клапанів серця, штучного перикарду та легневих діафрагм);

- адсорбенти (матеріали, що використовуються в штучних органах (нирки, легені, серце) – активоване вугілля, цирконій, іонообмінні смоли тощо);

- речовини, що переносять кисень. Це клас речовин типу фторованих вуглеводнів, що застосовуються для розчинення кисню у високих концентраціях, а також системи на основі капсульних покриттів еритроцитів крові тварин і людини або хімічних сполук високомолекулярних речовин з гемомеритроцитів);

- діалізно-дифузійні плівкові матеріали (необхідні для отримання діалітичних рідин, що селективно виводять з організму сечовину, креатинін та інші продукти обміну);

– волокнисті матеріали (мікропористі матеріали з високою ефективністю обміну речовин, що застосовуються в конструкціях штучних органів, наприклад, вінілацетатні волокна (штучна нирка), силіконові капіляри штучних легень);

– матеріали для мікроінкапсулювання, які необхідні для виготовлення мікрокапсул з діаметром порядку мікрон для систем доставки лікарських препаратів, переносників кисню;

– пружно-еластичні матеріали, стійкі до стирання. Матеріали, призначені для створення штучних кісток та суглобів, клапанів серця. Ці матеріали повинні мати комплекс механо-фізичних властивостей, що забезпечують їх збереження при тривалому функціонуванні в умовах механічних навантажень;

– біоклеї для склеювання живих тканин, необхідні для сполучення фрагментів кишечника, кровоносних судин, жовчних протоків та ін.; повинні мати миттєву дію, бути стійкими в умовах рідкого агресивного середовища організму, не продукувати тепла та речовин токсичної природи;

– композиційні матеріали, у тому числі для багаторазового використання. Такі матеріали можуть бути створені поєднанням полімерів єдиного гомологічного ряду, а також синтетичних матеріалів з металами, біополімерів із синтетичними полімерами або металами.

З розвитком серцево-судинної хірургії та трансплантології гостро постало питання актуального пошуку матеріалів, придатних для використання в умовах тривалого контакту з кров'ю, тобто тих, що характеризуються окрім загальної біосумісності, також й гемосумісністю. Наукові дослідження, орієнтовані на вирішення питання біо- та гемосумісності матеріалів, були розгорнуті порівняно недавно, на початку 1960-х років у ході розробок зі створення штучного серця. Широкий фронт робіт у галузі нових біоматеріалів був ініційований в США (National Institute of Health). У 1970–1980 роках основна увага була зосереджена на створенні біосумісних матеріалів із заданими фізико-хімічними та медико-технічними властивостями. Результатом цих досліджень була поява широкого спектру нових біоматеріалів та медичних виробів.

Розвиток медичного матеріалознавства спричинив формування нового напрямку, завдання якого полягає у вивченні взаємодії матеріалів з тканинами живого організму та створення на цій основі спеціальних пристроїв, придатних для задоволення широкого кола завдань з тимчасової хірургії та трансплантології. Одним із ключових завдань цього напрямку є розробка та освоєння нових матеріалів високої функціональності та специфічності, включаючи конструювання матеріальних систем, здатних відтворювати біологічні функції живого. Ці матеріали здатні змінювати свої властивості у відповідь на зміну параметрів довкілля (температури, рН, осмотичного тиску).

Сфери застосування саморегулюючих матеріалів широкі та включають:

- вироби з «пам'яттю форми» для серцево-судинної хірургії та ортопедії;
- біодеградовані шовні нитки, хірургічні елементи, лікарські засоби;
- імплантовані пристрої для лікарської та генної терапії з контрольованим та регульованим виходом біологічно активних речовин;

– біотехнологічні системи розпізнавання, сепарації та очищення різних сполук на молекулярному та клітинному рівні.

Створення саморегулюючих біоматеріалів базується на хімічних і біотехнологічних методах та включає різні підходи, серед яких перспективними визнані такі:

- синтез матеріалів, здатних змінювати свої властивості у відповідь на зміну зовнішнього середовища, а також містять біологічно активні сполуки;
- розробки гібридних матеріалів методами клітинної та тканинної інженерії;
- розробки матеріалів із спеціальними властивостями поверхні для безпосереднього контакту з кров'ю та тканинами організму людини;
- розробки матеріалів на основі оброблених та модифікованих біотканин людини та тварин;
- розробки біодеградованих матеріалів й композитів з контрольованим та регульованим часом біодеградації, в тому числі біополімерів, продуктованих мікроорганізмами.

Освоєння нових матеріалів, що характеризуються окрім біосумісності і функціональності також й руйнуванням *in vivo*, є спеціалізованою проблемою, суттєво складнішою порівняно з труднощами, що виникають у ході розробки матеріалів та систем довготривалого та постійного функціонування *in vivo*. Ендопротези тимчасової дії, заповнивши дефект органу чи пошкодженої тканини в живому організмі і маючи лікувальний ефект, повинні зазнати біодеструкції з одночасним заміщенням тканинним регенерантом.

Основними факторами, що стримують широке застосування біодеструктивних полімерних матеріалів в медицині, є незначний асортимент даних матеріалів, а також невирішена проблема регульованості та контрольованості процесів їх деструкції у живому організмі. Продуктами біодеструкції таких матеріалів можуть бути природні для живого організму речовини, що включаються в метаболізм клітин, наприклад, глюкоза, молочна, гліколева та β -оксимасляна кислоти, або речовини, що не метаболізуються клітинами та тканинами. В останньому випадку такі продукти не повинні бути токсичними, а їх концентрація під час попадання в кровоносне русло не повинна перевищувати встановлений гранично допустимий рівень. У зв'язку з цим стосовно біодеструктивних біоматеріалів запропоновано розрізняти два види біосумісності:

- «пасивну», що супроводжується виділенням продуктів деструкції з організму без завдання шкоди;
- «активну», за якої продукти деструкції залучаються до метаболічних циклів клітин.

Сфери практичного використання біодеструктивних матеріалів і виробів дуже широкі, включаючи склеювання тканинних дефектів, герметизацію паренхіматозних органів за допомогою полімерних плівок, покриття ран та опіків, виготовлення хірургічних шовних ниток та елементів для урології,

ортопедії, стоматології, судинної та тканинної інженерії, а також пролонгацію лікарських засобів.

1.3.2.2 Нанорозмірні біоматеріали

Активно розвивається напрям, пов'язаний з нанотехнологіями. Тим не менш, наноматеріали ще недостатньо вивчені та потребують особливої уваги з боку науковців та практиків.

Відповідно до Урядової Національної нанотехнологічної ініціативи США **нанотехнологія** визначається так: «Дослідження та розвиток технології на атомному, молекулярному та макромолекулярному рівнях у шкалі приблизно від 1 до 100 нм, для забезпечення фундаментального розуміння явища та матеріалів у наношкалі, та створення і застосування структур, приладів та систем, що мають нові властивості та функції завдяки своєму маленькому та/або середньому розміру» (табл. 1.2).

Наноіндустрія – проектування та виробництво структур, пристроїв та систем з формою та розміром у нанометровому (10^{-9} м) масштабі.

Штучний матеріал, у тому числі нанорозмірний, може застосовуватися в таких сферах:

1) матеріали, що імплантуються (імплантати) – повинні відповідати біологічній тканині. На межі «тканина – імплантат» має бути повна структурно-функціональна відповідність («ідеальний імплантат»), що важко здійснити на практиці;

2) системи цілеспрямованої доставки та вивільнення ліків та біомолекул;

3) прилади, що імплантуються;

4) хірургічні інструменти та роботи;

5) діагностичні прилади.

Таблиця 1.2 – Шкала нанорозмірних структур у живій та неживій природі

Приблизні розміри наноматеріалів	Зразки розмірів біологічних структур
Наночастинки (1–100 нм) Дендрімер (10 нм) Квантова точка (для CdSe) (8 нм) Фуллерен (C ₆₀) (1 нм) Атом (0,1 нм)	ДНК (ширина – 2 нм) Протеїн (5–50 нм) Вірус (75–100 нм) Матеріали, що поглинаються клітинами (< 100 нм) Бактерія (1–10 нм) Лейкоцит (10000 нм)

З урахуванням прагнення сучасної науки до нанорозмірної шкали біоматеріалів можна дати такі визначення:

– **інструменти** (інструменти нанотехнології включають мікроскопічну техніку та обладнання, яке дозволяє користувачеві візуалізувати об'єкти, такі як клітини, бактерії та віруси, маніпулювати ними в наношкалі, та визначати

окремі молекули для найкращого розуміння сутності науки. До таких інструментів належить атомносиловий мікроскоп (АСМ), растровий тунельний мікроскоп, програмне забезпечення для молекулярного моделювання та різні виробничі технології);

– наноматеріали, які можна розділити на три основні групи:

1) необроблені матеріали (наночастинки та нанокристалічні матеріали, які легко виготовляються й можуть замінювати менш ефективні вихідні матеріали). Необроблені матеріали можна використовувати як біосумісні матеріали або покриття для інкапсуляції лікарських препаратів, заміщення кістки для протезів та імплантатів.

2) наноструктурні матеріали (перетворена форма необроблених матеріалів, що забезпечує спеціальну форму чи функціональність). Зразками наноструктурних матеріалів є квантові точки (наноструктури, які змушують атоми займати дискретні енергетичні рівні, як наприклад, у біологічних маркерах), й дендримери (розгалужені полімери, що використовуються для доставки лікарських речовин, фільтрації та хімічних маркерів);

3) нанотрубки та фулерени. Це вуглецеві структури, які в 100 разів міцніше за сталь, з кращими, ніж у міді провідними властивостями, які можуть бути використані у деяких галузях медицини. Оскільки вони знаходяться на стадії розробки, область застосування нанотрубок та фулеренів обмежується штучними м'язами, ін'єкційними голками для окремих клітин і системами доставки лікарських препаратів.

– **прилади** (з нанотехнологією зазвичай пов'язані з двома класами мініатюрних приладів:

1) наноприлади. У той час як наноприлади все більш стають доступними для застосування в лабораторії. Наноприлади, ймовірно, будуть застосовуватися тільки в майбутньому;

2) мікроприлади (до них відносяться мікроелектромеханічні системи (MEMS), мікрорідини, мікроланцюжки). Ці мікротехнології мають багатостороннє медичне застосування. Наприклад, біологічні сенсори та детектори для визначення слідової кількості бактерій, хвороботворних організмів, що передаються повітряно-крапельним шляхом, біологічних факторів та ознак захворювань; мікрофлюїдна «лабораторія на чіпі» для дослідження ДНК та імплантовані системи нагнітання рідини (флюїди); прилади MEMS, що містять мініатюрні рухомі частини, – для серцевих пейсмейкерів (водіїв ритму) та хірургічної апаратури.

– інтелектуальні матеріали та машини. Це одна з найбільш цікавих та суперечливих сфер нанотехнології, яка включає безліч видів досліджень, багато з яких вважаються нездійсненними. Далекі ідеї, такі як маленькі роботи, названі panorobots або panobots, які сконструйовані таким чином, щоб їх можна було вводити в тіло людини для боротьби з інфекцією чи небажаними клітинами.

Інше можливе застосування – інтелектуальні матеріали, які можуть «відчувати» зовнішні стимули та змінювати їх характеристики для адаптації до змін навколишнього середовища, молекулярні механізми, які можуть

конструювати матеріали атом за атомом, та молекулярні транслятори (збирачі), які можуть забезпечити масове виробництво молекулярних механізмів. Фактично, у цій галузі не існує проекту, наближеного до комерціалізації.

Впливу біоматеріалів, включаючи нанорозмірні матеріали, на біологічні структури є наступним:

- 1) прямий вплив через фізичні та механічні властивості поверхні;
- 2) опосередкована дія через продукти їх деградації.

Нові революційні відкриття в біокераміці та її властивостях пов'язані з нанобіоматеріалами, а також з лікуванням різних станів від остеопору до хірургічної стоматології. Ці дослідження зумовлені старінням населення світу, та потребою у відновлювальних та репаративних методах лікування. Як наслідок цієї демографічної зміни, дослідження нанобіокераміки для застосування в охороні здоров'я розвиваються значними темпами. Інноваційним напрямком є впровадження нанобіокерамік, включаючи кремнеземвісні, кальцій фосфати, біоскло та склокераміку.

Питання для самоконтролю до розділу 1

1. Визначити основні аспекти медичної таксономії.
2. Проаналізувати розподілення основних напрямків в галузі медичного матеріалознавства за останні 30 років.
3. Проаналізувати активність ринку біоматеріалів та основні напрямки за період 2020–2027 рр.
4. Навести основні терміни та поняття в біомедичній інженерії.
5. Визначити видові відмінності трансплантації.
6. Визначити основні класи біоматеріалів.
7. Проаналізувати основні тенденції розвитку сучасного медичного матеріалознавства.
8. Проаналізувати історію створення тканинно-інженерних конструкцій.
9. Визначити основні задачі держави при забезпеченні соціальних норм суспільства.
10. Дати визначення поняттю «Тканинна інженерія».
11. Навести сучасні уявлення про тканинну інженерію.
12. Висвітлити основні засади тканинної інженерії.
13. Проаналізувати основні способи вирощування тканини.
14. Проаналізувати розвиток регенеративної медицини в Україні.
15. Визначити пріоритетність напрямку критичних технологій в Україні, зокрема, «Технології створення біосумісних матеріалів».
16. Обґрунтувати необхідність створення біоруйнівних матеріалів, які здатні імітувати властивості біологічних структур.
17. Яким чином може бути вирішена проблема пластики дефектів кісткової тканини для сучасної відновлювальної хірургії в травматології та ортопедії, щелепно-лицьовій хірургії та стоматології.

18. Проаналізувати ефективність конструювання лікарських систем «drug delivery control».

19. Визначити основні напрямки розвитку функціональних матеріалів для реконструктивної медицини.

20. Проаналізувати потреби реконструктивної медицини у функціональних матеріалах.

21. У яких напрямках реалізуються дослідження щодо розробки матеріалів для реконструктивної медицини?

22. Визначити вимоги до біологічних властивостей матеріалів та виробів, які призначені для контакту з кров'ю.

23. Визначити необхідність впровадження резорбційних матеріалів.

24. Проаналізувати перспективність застосування «біоімітування» у процесі реконструкції пошкодженої тканини.

25. Визначити важливість створення біодеградуючих матеріалів для фармакології.

26. Вказати особливості застосування на практиці лікування низки системних, хронічних й тривало поточних захворювань «drug delivery control».

27. Визначити основні види біоматеріалів для відновлювальної хірургії і трансплантології.

28. Проаналізувати вимоги до матеріалів біомедичного призначення.

29. Визначити термін «біосумісність матеріалів».

30. Визначити основні фактори, що стримують широке застосування біодеструктивних полімерних матеріалів

31. Визначити основні хімічні підходи при створенні саморегулюючих біоматеріалів.

32. Визначити основні біохімічні підходи при створенні саморегулюючих біоматеріалів.

33. Визначити сфери застосування саморегулюючих матеріалів.

34. Визначити основні сфери практичного використання біодеструктивних матеріалів.

35. Яким характеристикам повинен відповідати “ідеальний біоматеріал”?

36. Основні напрямки застосування нанорозмірних матеріалів біомедичного призначення.

37. Навести типи біоматеріалів за нанорозмірною шкалою.

38. Проаналізувати механізми впливу біоматеріалів, включаючи нанорозмірні матеріали, та біологічні структури.

39. Навести приклади мініатюрних приладів медичного застосування.

40. Навести характерні ознаки інтелектуальних матеріалів медичного призначення.

41. Навести шкалу нанорозмірних структур у живій та неживій природі.

42. Визначити перспективність застосування наноструктурованих біоматеріалів.

43. Проаналізувати інноваційні підходи при впровадженні наноматеріалів для медичної біоінженерії.

РОЗДІЛ 2 КЛІТИННІ ТЕХНОЛОГІЇ ТА МАТЕРІАЛИ У БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СИСТЕМАХ

2.1 Сучасні клітинні технології у тканинній інженерії

Регенеративна медицина й тканинна інженерія є міждисциплінарними галузями, які включають застосування інженерних принципів та біологічних наук для створення функціональних тканин й органів. Цей процес включає використання стовбурових клітин, біоматеріалів та інших передових технологій для розробки складних тканинних структур. Основною метою цього підходу є створення тканин і органів, які можуть імітувати структуру і функції природних тканин в організмі.

Тканинну інженерію можна розділити на три види: клітинні, безклітинні та гібридні. У *клітинних методах* стовбурові клітини використовують для створення функціональних тканин й органів. У *безклітинних методах* тканини використовуються для створення каркасів, які можуть бути засіяні стовбуровими клітинами. У *гібридних методах* комбінація клітин і каркасів використовується для створення функціональних тканин і органів.

2.1.1 Сучасне уявлення про клітинні технології

Майбутнє медицини сьогодні безпосередньо пов'язують із розвитком клітинних технологій. Ця технологія дозволяє, не змінюючи пошкоджений орган, «оновлювати» його клітинний склад. Таке «оновлення» структурно-функціональним елементом органу зможе вирішувати ті ж завдання, що й органна трансплантація. Водночас ця технологія набагато розширює коло різних категорій пацієнтів. Основою для розвитку клітинних технологій є стовбурові клітини, здатні, залежно від мікрооточення, перетворюватися на клітини різних органів і тканин. Одна така клітина може дати безліч функціонально активних нащадків. У світі активно розробляють підходи до нарощування стовбурових клітин, а також інтенсивно досліджують можливості їхньої генетичної модифікації. Список хвороб, для лікування яких клітинні технології вже використовуються або їх застосування планується у найближчому майбутньому, швидко зростає.

Стовбурові клітини – це основні, неспеціалізовані клітини, які мають величезний потенціал для розмноження, а також виняткову здатність перетворюватися на спеціалізовані клітини, утворюючи таким чином тканини. Завдяки цим властивостям вони використовуються протягом багатьох років у медицині, дозволяючи відновлювати або замінювати собою пошкоджені клітини. Стовбурові клітини знаходяться, зокрема, у пуповинній крові.

Першоджерелом стовбурових клітин був кістковий мозок (трансплантація кісткового мозку – це, власне, трансплантація стовбурових клітин з кісткового мозку), але на даний час для лікування все частіше використовуються стовбурові клітини з пуповинної крові. Дані методи збору та використання

стовбурових клітин прийняті та схвалені католицькою церквою, на відміну від так званих ембріональних стовбурових клітин. Іншим джерелом клітин є периферична кров, отримана від донорів після попередньої фармакологічної мобілізації.

Будучи трансплантованими, алогенні стовбурові клітини здатні приживлятися та диференціюватися залежно від мікрооточення. Ці клітини здатні значно підвищити адаптивні можливості організму за рахунок посилення процесів фізіологічної та репаративної клітинної регенерації. За дотримання певних умов алогенна клітинна трансплантація може викликати імунні реакції, які полягають у відторгненні донорських клітин. Це передбачає можливість застосування трансплантаційних клітинних технологій без використання імуносупресорної терапії.

Важливою з медичного погляду є здатність низькодиференційованих клітин гальмувати, а в деяких випадках реверсувати розвиток грубоволокнистої сполучної тканини. Таке гальмування створює важливі додаткові передумови для ефективного поповнення клітинних втрат організму новими функціонально повноцінними клітинами. Трансплантація низькодиференційованих клітин незрілої кровотворної тканини у дорослий організм може сприяти відновленню кровотоку в ішемізованих органах і тканинах.

Цей ефект пояснюється наявністю у цій тканині незрілих попередників ендотеліальних клітин, здатних генерувати ріст нових кровотворних судин. У неврології трансплантаційна клітинна технологія була вперше застосована під час лікування хвороби Паркінсона. Предметом дослідження та клінічного застосування є також протипухлинна активність низькодиференційованих кровотворних клітин. Важливим компонентом такої активності є здатність цих клітин прямо супресувати пухлинний ріст. Є дані про антиатеросклеротичну активність низькодиференційованих клітин. Один із проявів цієї активності – зниження сировотового рівня атерогенних ліпопротеїнів.

Результатом трансплантації низькодиференційованих клітин, отриманих з донорської незрілої кров'яної тканини, є значне підвищення регенераторних та адаптивних можливостей організму. Викликане цими клітинами «оновлення» організму, мабуть, може перешкоджати розвитку процесів, що ведуть до старіння організму. Звідси впливає перспективність та доцільність використання клітинних технологій у лікуванні цілого ряду захворювань, обумовлених старінням організму.

Велика увага приділяється клітинним технологіям, які засновані на трансплантації стовбурових клітин, отриманих від самого хворого. Переваги цих технологій полягають у доступності відповідного неіммуногенного клітинного матеріалу (прийнятний джерело – кістковий мозок). Отримані експериментальні дані, що вказують на перспективність застосування аутологічних кістковомозкових стовбурових клітин у лікуванні тяжких неврологічних та серцево-судинних розладів. Таким чином, розвиток і впровадження клітинних технологій покликане кардинально змінити ситуацію з

лікуванню цілого ряду захворювань, практикована медикаментозна терапія яких малоефективна.

2.1.2 Клітинні технології та тканинна інженерія

Тканинна інженерія (ТІ), як дисципліна, розпочала свою історію у першій половині XX століття. Фундаментом для її заснування стали теоретичні та практичні розробки зі створення «штучних» органів й тканин та роботи з трансплантації клітин і біологічно активних компонентів на носіях для відновлення пошкоджень у різних тканинах організму.

ТІ є однією з наймолодших галузей у медицині, що базується на принципах молекулярної біології та генної інженерії. **Тканинна інженерія** – це міждисциплінарна галузь, що поєднує в єдине ціле методологію наук про життя та медицину з основами інженерних дисциплін.

Тканинна інженерія (у сукупності з регенеративною медициною, яка заснована на використанні стовбурових клітин) – міждисциплінарна наукова галузь, що має за плечима більше ніж 20-річну історію розвитку.

Основні об'єкти тканинної інженерії – це клітини та матрикси.

Метою тканинної інженерії є конструювання поза організмом живих функціональних компонентів, які можуть бути використані для регенерації пошкоджених тканин та/або органів. Хоча ця галузь вважається відносно новою, перший документований доклад про інжиніринг тканин з'явився в 1933 році, коли пухлинні клітини були поміщені в полімерну мембрану й імплантовані свині. Тканинна інженерія орієнтована на створення конструкцій, які забезпечують відновлення, зміцнення і поліпшення функцій пошкоджених органів та тканин.

Концепція тканинної інженерії заснована на принципах та методах інженерії та використовує новітні досягнення матеріалознавства, хімії, біології та біоінформатики для розробки біологічних замінників, які відновлюють, зберігають та покращують функції пошкоджених тканин (рис. 2.1).



Рисунок 2.1 – Тканинна інженерія суглобового хряща

Важливим є узагальнення та регламентації керуючих впливів на життєдіяльність клітин у тканинно-інженерних конструкціях. Для зручності основні факти зведені до таблиці 2.1.

Тканинно-інженерні конструкції повинні характеризуватися біоміметичними властивостями, тобто бути біосумісними, мати адекватні фізико-хімічні характеристики та з часом заміщуватися власними тканинами організму.

Таблиця 2.1 – Характеристика основних джерел клітин для тканинної інженерії хряща

Джерело отримання	Застосування для тканинної інженерії хряща	
	Переваги	Недоліки
Хрящ іншої людини або тварини	Висока апробація на практиці, відповідність всім вимогам до клітинних технологій	Імунна відповідь та перенесення інфекційного матеріалу, ризик дедиференціювання
Власний хрящ		Обмежена доступність, ризик дедиференціювання клітин за культивування
Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК)		
Власні тканини: кістковий мозок, жирова тканина, синовіальна оболонка, окістя, шкіра тощо	Доступність, висока проліферативна активність та здатність до хондроіндукції	Формування змішаних тканин при відхиленні від хондрального диференціювання, необхідність кількох керуючих впливів, недостатня клінічна апробація
Ембріональні стовбурові клітини		
Алогенний ембріональний матеріал	Легкість отримання великих об'ємів клітин після керованої проліферації та диференціювання	Проблеми алогенності, можливість некерованого росту з формуванням тератом та злоякісних пухлин, неврегульованість етичних та правових питань
Інші види клітин: дермальні фібробласти		
Власна шкіра	Доступність та відносна малоінфазивність	Досить складна процедура селекції клітин, схильних до індукції хондрального забору матеріалу

З перелічених джерел клітин на сьогодні клінічно найбільш апробовані технології, що використовують пересадку аутогенних хондроцитів людини, а максимальний прорив очікується після завершення клінічних апробацій й

широкої експансії методик, заснованих на керованій хрональній диференціації аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин (далі – МСК). Зусилля дослідників й розробників у даній галузі в даний час спрямовані на оптимізацію умов культивування МСК, управління механізмами їх хондрогенного диференціювання за допомогою факторів росту та механічних стимулів, регенерації у складі біоміметичних конструкцій та отримання вагомих доказів при клінічних випробуваннях.

Матеріали, які застосовуються в тканинній інженерії для створення біоімплантів, повинні характеризуватися спектром спеціальних властивостей й надавати тканинно-інженерним конструкціям характеристики, властивості живих тканин:

- 1) здатність до самовідновлення;
- 2) здатність підтримувати кровопостачання;
- 3) здатність змінювати будову та властивості у відповідь на фактори навколишнього середовища, включаючи механічне навантаження.

Імпланти, як правило, мають обмежений термін служби, тому для забезпечення можливості довгострокового їх функціонування під час реконструкції дефекту органу або тканини тканинно-інженерні матрикси повинні виконувати не стільки функцію заміни пошкодженої тканини, скільки забезпечити можливість для її регенерації.

Міждисциплінарний підхід у тканинній інженерії спрямований, у першу чергу, на створення нових біокомпозиційних матеріалів для відновлення втрачених функцій окремих тканин або органів в цілому. Принцип цього підходу полягає у розробці та застосуванні у ході імплантації в пошкоджений орган або тканину носіїв з біодеградуючих матеріалів, які використовують у поєднанні з донорськими клітинами та/або з біоактивними речовинами. На першому етапі одержують донорські, наприклад, мезенхімальні клітини кісткового мозку (або використовують клітини з банку клітинних культур), далі клітини культивують *in vitro* на підкладці (каркасі, матриксі) (scaffold) з біодеградуваного та біосумісного матеріалу, а потім конструкцію імплантують у місце дефекту кісткової тканини (рис. 2.2).

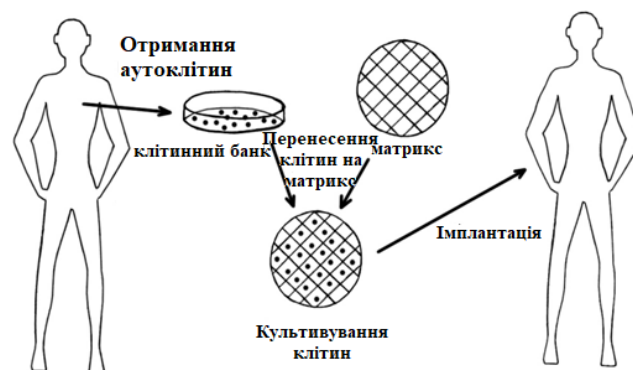


Рисунок 2.2 – Методологія клітинної та тканинної інженерії

Техніка отримання біоактивних імплантатів та біоштучних органів включає:

1) виготовлення біосумісних та біоабсорбованих конструкцій (інкубаторів) (scaffolds) для культивування аутологічних клітин пацієнта або клітин, взятих з банку;

2) вирощування клітин та формування тканин *in vitro*;

3) імплантацію отриманих конструкцій пацієнту.

Для успішної індукції тканегенезу у місці імплантації необхідно створити високу початкову концентрацію клітин (до 10^7 – 10^8). Просте введення суспензії клітин найчастіше виявляється малоефективним, тому виникає серйозна проблема пошуку адекватного носія для закріплення трансплантованих клітин в організм реципієнта. Найбільш відповідальним етапом використання культивованих клітин є трансплантація їх у зону ушкодження, яка залежить від того, яка частина клітин потрапить у зону дефекту; чи є адгезія культивованих клітин на носії, чи збережуть вони активний функціональний стан. Однією з проблем є вибір адекватного носія для клітин, оскільки для реалізації своїх потенційних властивостей клітини, що культивуються, повинні певний час перебувати у фіксованому до носія стані. Це може бути пов'язане з гістогенетичною властивістю даних клітин виявляти свої проліферативні властивості під час організації в складні тривимірні структури.

Проблема, що стоїть перед тканинною інженерією, полягає в тому, щоб оптимізувати виділення, розмноження та диференціювання клітин, сконструювати каркаси (матрикси) або системи доставки, що сприяють підтримці та координації росту тривимірних тканин у лабораторії.

Одна з ідеальних стратегій тканинної інженерії полягає у заборі стовбурових клітин у пацієнта, подальшому розмноженні їх у клітинній культурі та висіванні цих клітин на матрикси. Стовбурові клітини можуть дати початок безлічі типів спеціалізованих зрілих клітин у результаті процесу, так званого диференціювання, якщо на них впливати конкретними біологічними стимулами.

Матрикси (каркаси) повинні виступати як шаблон й стимул для розмноження й диференціювання стовбурових клітин у спеціалізовані клітини, що генерують специфічну нову тканину. Тканина може бути вирощена на матриксах, які після імплантації в організм господаря поступово (у міру зростання нової тканини) повністю зникнуть (резорбуються) і в місці дефекту залишиться тільки нова тканина. Можна також імплантувати «біокомпозит», що складається з матриксу з вже частково сформованою новою тканиною. Так або інакше після імплантації тканинно-інженерна конструкція повинна зберегти свої структуру та функції протягом періоду часу, необхідного для відновлення нормально функціонуючої тканини у місці дефекту та інтегрування з навколишніми тканинами.

Оцінки й обговорення ефективності доцільно проводити з точки зору «промислового застосування» стовбурових клітин як біоматеріалу у ролі терапевтичного агента, а не їхніх біологічних властивостей у «рідному» живому

організмі. Але у зв'язку з тим, що типів стовбурових клітин багато, а їхні властивості та перспективи застосування – різні, оцінити «ефективність» лікарського засобу тільки за згадкою терміну стовбурова клітина – Класифікація стовбурових клітин також цікава тема, адже ми маємо дві системи: за ступенем широти перетворення (потентності) та за локацією чи джерелом отримання:

- ранні (зигота) – тотипотентні;
- ембріональні (бластоциста) – плюрипотентні;
- фетальні (на внутрішньоутробному етапі) – плюри/мультипотентні;
- неонатальні (пуповинна кров, тканина пуповини) – мультипотентні;
- дорослі (кістковий мозок, стромально-васкулярна фракція жирової тканини та багато інших джерел) – мульти/оліго/уніпотентні;
- індуковані (лабораторно перетворені спеціалізовані клітини) – плюрипотентні.

2.1.3 Перспективи та етичні проблеми застосування стовбурових клітин у реконструктивній технології

Існує велика кількість послуг, пов'язаних із *кріозберіганням*, тобто низькотемпературним замороженням біоматеріалів, найчастіше – неонатальних. Банки таких матеріалів бувають публічними та приватними (табл. 2.2).

Банки не можна порівнювати з клініками, вони лише зберігають, а не застосовують матеріал. Якщо, звісно, мова не йде про великий медичний комплекс у складі якого є і банк, і клініка, чи про якусь окрему співпрацю. Банки (і публічні, і приватні) також часто підтримують наукову діяльність у відповідних установах (рис. 2.3).

Не можна не відзначити, що щодо застосування та виділення стовбурових клітин, особливо ембріональних, все ще не припиняються суперечки про те, чи можуть використовуватися «дорослі» стовбурові клітини замість клітин ES.

Для питання, яке джерело стовбурових клітин краще, сьогодні вичерпової відповіді немає. Щодо оцінки вибору та переваг «дорослих» або ембріональних стовбурових клітин, їх стабільності, потенціалу диференціювання, а також ризиків передачі шкідливих патогенів, генетичних мутацій, неконтрольованого диференціювання аж до злоякісних пухлин, сьогодні немає доказової бази.

Після створення методів генної інженерії, рекомбінантних технологій перенесення ДНК між клітинами різних видів, завершення програми «Геном людини», отримання перших ліній ЕСК людини виникла нова біоетика фундаментальних процесів, що стоїть біля витоків індивідуального життя. Ці нові реальності біоетики знайшли відображення у документі ЮНЕСКО: «Біоетика: міжнародні аспекти» (2001).

Таблиця 2.2 – Публічні та приватні банки зберігання біоматеріалів

Публічне	Приватне
Матеріали надаються добровільно й безкоштовно для донора з відповідним юридичним супроводом	Забирання, обробка та зберігання матеріалів — платні (часто високі ціни)
Неякісні чи сумнівні матеріали утилізуються чи йдуть на дослідження (контролюється стерильність, об'єм зразка, кількість клітин)	Інколи справжню якість зразка дізнатись неможливо або недостатньо якісний зразок вмовляють зберігати «про всяк випадок»
Акцент на наукових дослідженнях та меті допомогти тим, кому зразок справді потрібен	Акцент на емоціях та спекуляція на майбутньому: «своє», «єдиний шанс», «колись вчені придумають спосіб застосувати/збільшити кількість клітин» тощо
Алогенні трансплантації з можливістю обрати оптимального донора та/або зробити комбінований трансплантат з кількох зразків	Аутологічні трансплантації з вкрай низькою вірогідністю застосування або спроба врятувати близького родича
Втрачається «ексклюзивність», але у деяких банках є опція позачергового отримання зразка (вже донорського) для тих, хто надав свій матеріал	«Біострахування» й футуризм

Документ резюмує підсумки чисельних досліджень за такими стратегічними напрямками:

а) еволюція базисних концепцій та принципів біоетики (гідність, автономія, самоцінність особистості та прав з екстраполяцією на внутрішньоутробному періоді розвитку людини);

б) етика та наукові дослідження з клітинами зародка (передімплантаційна діагностика захворювань);

в) використання геномних даних для діагностики та лікування (розробка нових біотехнологій отримання зародкових клітин);

г) генетично-модифіковані зародки, клітини, лінії ЕСК;

д) донорство та пересадка зародкових клітин, включаючи ЕСК;

е) створення універсальних основ біоетики та підготовка глобальних документів, що регламентують діяльність вчених у цих галузях біології та медицини.

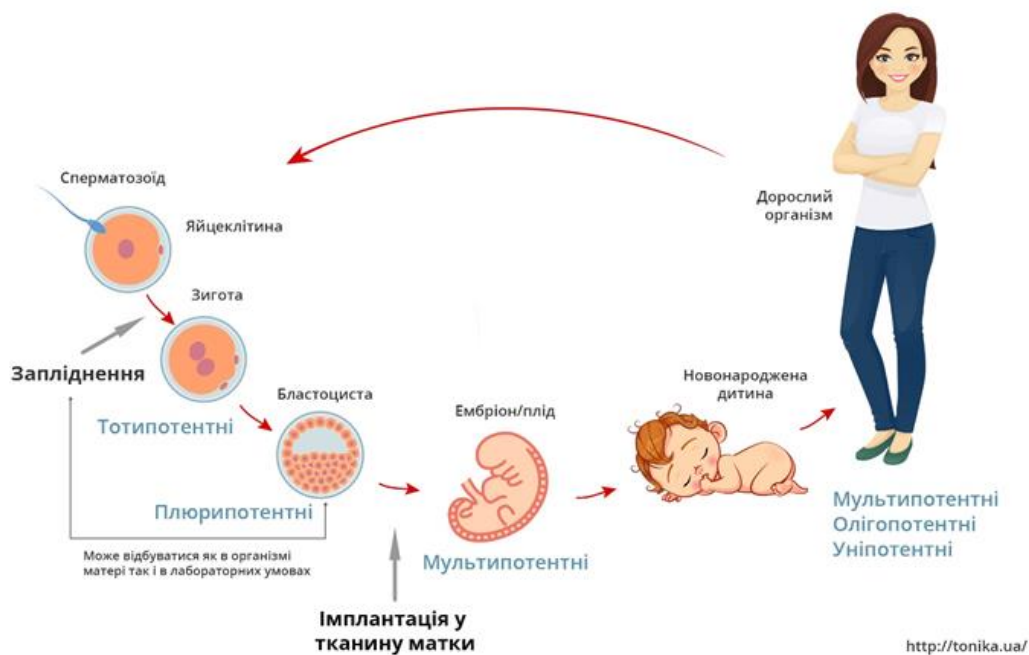


Рисунок 2.3 – Схема розвитку людини та різноманіття стовбурових клітин

У прийнятій ЮНЕСКО «Універсальній декларації про геном людини та права людини» (1999) у статті 11 говориться: «Практика, яка суперечить людській гідності як репродуктивне клонування людини не дозволяється».

Держави та компетентні міжнародні організації закликаються розпочати кооперацію в ідентифікації зловживань та розробці необхідних заходів на державному/міждержавному рівні для виконання принципів декларації». У статті 12 Декларації постулюється: «Свобода наукових досліджень, необхідних для прогресу знань, є частиною свободи думки. Практичний додаток знань геному людини має бути спрямований на зменшення людських страждань, покращення здоров'я як індивідів, так і всього людства». Розробки з геномом ЕСК є частиною цієї загальної стратегії.

В Україні поводження зі стовбуровими клітинами визначається Законом України «Про застосування трансплантації анатомічних матеріалів людині. Стаття 15. Особливості донорства гемопоетичних стовбурових клітин та інших здатних до регенерації (самовідтворення) анатомічних матеріалів» [7].

У Німеччині закон забороняє отримання ЕСК, але дозволяє працювати вченим із імпортованими лініями ЕСК. У 2002 році Німеччина та Франція виступили з ініціативою в ООН щодо глобального мораторію на експерименти з репродуктивного та терапевтичного клонування людини. У Швейцарії закон забороняє експерименти з ранніми зародками, включаючи терапевтичне клонування стовбурових клітин із бластоцист.

У Франції дозволено працювати з вже створеними ЕСК людини та отримувати нові лінії з метою терапевтичного клонування органів та тканин

хворої людини. Заборонено репродукційне клонування. На даний час Франція та Німеччина ініціювали дискусію в ООН щодо підготовки міжнародної конвенції, що забороняє репродукційне та терапевтичне клонування плуріпотентних клітин в обхід статевого процесу.

В Ізраїлі прийнято закон про тимчасовий п'ятирічний мораторій на репродуктивне клонування. Закон не регламентує дослідження з ЕСК із метою терапевтичного клонування та створення банків клітин для трансплантації.

У Великій Британії, Бельгії та Швеції дозволені експерименти з ЕСК для терапевтичного клонування клітин хворої людини. Закон дозволив створення першого банку ЕСК. Дозволено створення та клонування передімплантаційних зародків (до 14-го дня розвитку) для ізолювання ліній ЕСК. Репродукційне клонування заборонено. Ліцензії на роботу з ранніми зародками та ЕСК видаються спеціальною державною комісією.

У Японії з червня 2001 року діє закон про заборону репродуктивного клонування, але дозволені експерименти із зародками, що залишаються після процедури штучного запліднення. Репродукційне клонування карається 10 роками в'язниці та штрафом 90 000 дол. США. Закон дозволяє клонувати передімплантаційні зародки для виділення ЕСК та створення банків клітин для трансплантації на їх основі.

У США держфінансування поширюється лише на офіційно зареєстровані лінії ЕСК. Створювати чи руйнувати ранні зародки заборонено. Дві третини населення підтримують роботи з ЕСК, які спрямовані на лікування пацієнтів, що нині живуть. В Індії та Китаї активно ведуться дослідження як щодо отримання ліній ЕСК людини, так і розробки отримання ЕСК з інших біоджерел.

Біоетика відіграє важливу роль м'якого буфера, що дозволяє розвивати науку на максимальному прирості корисних знань з мінімальними помилками та зловживаннями. Зловживання породжуються не наукою, а бізнесом навколо науки.

Слід зазначити, що наявні сьогодні на озброєнні медиків варіанти реконструктивної медицини (трансплантація; імплантація; тканинна інженерія) не вільні від обмежень й представляють собою компроміс. У кожному конкретному випадку доводиться приймати рішення щодо того, який варіант краще використовувати для пацієнта.

Це рішення приймають лікар, пацієнт та родичі, найчастіше в рамках обмежених ресурсів. При цьому виникають проблеми етичного характеру. У міру розширення спектру сучасних реконструктивних технологій у медицині дедалі більш скрутним стає визначати, яка з можливих альтернатив найбільш придатна для конкретного випадку.

Як пише у своєму огляді Хенч: «...перш ніж імплантати та трансплантати стали доступними, рішення стоматолога або хірурга, а також пацієнта було простим. Якщо болить зуб, його видаляють. Якщо болить стегно, його намагаються замінити. Якщо зупинилося серце, настає смерть. Одна проблема – одне рішення».

Сьогоднішня медицина пропонує значно більше альтернативних варіантів, не всі з яких мають однакову цінність з точки зору ризику, вигоди та вартості. Тому наявність альтернативних варіантів створює невизначеності, етичні та моральні дилеми. Так, ймовірність виходу з ладу штучного протезу або органу створює невизначеність у виборі стратегії лікування; виникає питання, лікувати, наприклад, хворий суглоб чи замінити його протезом?

У разі вибору варіанта хірургічної заміни суглоба стегна протезом завжди є ймовірність того, що хворий погано перенесе (або взагалі не перенесе) операцію, і що протез виявиться «невдалим». Наприклад, протези стегна з великим успіхом імплантовані мільйонам пацієнтів; однак існує ймовірність невдачі, яка потребує повторної операції, яка становить близько 3–5 % протягом перших 3–5 років після імплантації та зростає до 10–15 % після закінчення 10–15 років. Сумарний ефект цих невдач великий, наприклад, приблизно з 40 тис. імплантацій стегна на рік у Великій Британії понад 5 тис. становлять повторні операції.

Рівень розвитку сучасного суспільства спричинив існування двох етичних проблем:

1) технократичне суспільство стимулює у людей бажання жити довго. Проте ресурси, необхідні для підтримки якості життя, обмежені. Дисбаланс між бажаннями та наявними ресурсами створює гострі етичні дилеми;

2) друга етична проблема дилема полягає в тому, яким чином досягти балансу між кількістю та якістю життя.

На сьогодні багато ситуацій, пов'язаних з використанням нових біоматеріалів, штучних органів та тканинної інженерії, мають невизначений характер з погляду моральної оцінки.

Прикладом може бути ситуація з імплантатами марки «Bioglass». Виявилось, що в результаті використання цих матеріалів та конструкцій протягом різного часу склалася різна за наслідками ситуація. Перша – президент компанії, що має право на комерціалізацію технології імплантації, зібрав мільйони доларів та вивів на ринок два вироби, які принесли користь тисячам людей. Однак згодом він вкрав у компанії декілька мільйонів доларів та був відправлений у федеральну виправну колонію. Друга ситуація – співробітник іншої компанії, також отримав юридичні права на комерціалізацію технології «Bioglass», нічого не вкрав, але він не випустив на ринок матеріал, через що тисячі людей не змогли скористатися цією технологією. Третя ситуація – ще одна людина розробила аналогічний біоактивний матеріал та використала його для імплантатів; вона продала свою компанію, але за декілька років більшість імплантатів вийшла з ладу. Четверта ситуація – був виведений на ринок медичний матеріал, клінічна безпека та ефективність якого були підтверджені лише у трьох клінічних випадках застосування; вже у четвертому випадку застосування матеріал імплантат зруйнувався, викликав сильний біль у тисяч пацієнтів та привів до корпоративного банкрутства та величезних страждань людей. Яка з цих чотирьох осіб була найморальнішою людиною? На це питання важко відповісти через існування великих невизначеностей.

Наступне можливе джерело невизначеностей та ризиків пов'язане з нарощуванням масштабів заміни органів, що вийшли з ладу, та їх елементів. Це призводить до того, що кількість випадків з негативними наслідками зростає, це природно, тому що ймовірність успіху у великій групі населення зменшується зі збільшенням кількості варіантів і випадків. Якщо імплантат виходить з ладу, між пацієнтом і хірургом, госпіталем та виробником або всіма учасниками процесу може виникнути конфлікт. Однак пацієнт, який побажав поставити собі імплантат, був поінформований щодо можливих ризиків і від нього була отримана обов'язкова в цьому випадку письмова згода, тобто принцип поваги автономії пацієнта був дотриманий. Однак згодом може виникнути конфлікт, оскільки у пацієнта може скластися думка, що щодо нього було порушено принцип справедливості. Пацієнта та його родичів не цікавить статистика, а також те, що 85 або 95 % аналогічних випадків, у яких застосовувалося таке лікування, мали успішні результати. Їх турбує лише те, що їхній випадок виявився невдалим. Таким чином, конфлікт буде пов'язаний з необґрунтованим очікуванням рівних наслідків дії замість рівного виконання дії. Різниця в результатах лікування, порівняно з очікуваннями, може невірно сприйматися пацієнтом як несправедливість.

Які ж причини необґрунтованих очікувань успіху імплантату?

Людська природа полягає в тому, що людина хоче того ж самого, що і інші. Це очікування є живильним середовищем ринкової економіки. Те саме справедливе для імплантатів. Люди дізнаються в засобах масової інформації, від свого лікаря чи друзів про перспективність лікування з використанням імплантатів, тому вони думають тільки про зникнення джерела болю та дискомфорту, і не замислюються, що будь-яка операція – це ризик та можливість виходу імплантату з ладу. Це призводить до необґрунтованих очікувань і висновку у разі невдачі, що з людиною обійшлися несправедливо.

Розвиток нових технологій та засобів лікування посилюють проблему, оскільки нові розробки в галузі імплантатів рекламуються як чудові, навіть коли немає довгострокових даних для великих груп пацієнтів.

Швидке вдосконалення реконструктивних технологій приведе до того, що вибір стає дедалі ширшим. Це призводить до ще однієї ситуації, що веде до невизначеності, здатної породжувати конфлікт. У міру того як усе більше людей хочуть поставити собі і справді ставлять імплантати, потенціал для прибутку зростає пропорційно. Оскільки надається все більше варіантів вибору, то стає все більш ймовірним, що виріб рекламуватиметься заради своєї новизни та іміджу, а не заради статистично обґрунтованого вдосконалення благодіяння протягом тривалого періоду використання.

Зростаючий економічний тиск починає диктувати впровадження нових імплантатів за мінімальних стандартів їх випробувань тільки для того, щоб запропонувати населенню щось нове. Коло досліджень, необхідних для забезпечення довгострокової надійності, найчастіше виключається із процедури тестування нового виробу для того, щоб воно швидше потрапило на ринок.

Тому кількість імплантатів зростає, однак не гарантується, що їх застосування принесе обов'язкову довготривалу користь. Це призводить до подорожчання медичних послуг внаслідок збільшення кількості повторних операцій.

Специфічні етичні проблеми з приводу біоматеріалів та імплантатів полягають у обов'язковості проведення повного комплексу випробовувань для уникнення можливих довгострокових ускладнень та повторних операцій. Статистичні дані, які можуть бути використані для прогнозування результатів лікування, повинні складатися професіоналами для всіх без винятку імплантатів на підставі результатів всього комплексу необхідних, у тому числі довгострокових випробувань. Пацієнти повинні бути поінформовані про очікувану користь операції та можливі негативні наслідки. Це один із способів протидіяти хибно очікуваним результатам. Сьогодні оптимальним є забезпечення успіху під час імплантацій на рівні 85–95 %, що стабільно зберігається протягом 10–20 років.

Етичні принципи визначають необхідність відповідності імплантатів та пристроїв високому стандарту успіху, тому що в іншому випадку може бути порушений основний принцип медицини «перш за все не завдавати шкоди».

2.2 Сучасні тенденції створення клітинних матриць

2.2.1 Основні критерії конструювання клітинних матриць

Ідеальні матрикси, що задовольняють всі необхідні властивості тканини, на жаль, поки що не створені, їх ще належить розробити. У ході конструювання матриці слід оцінювати властивості, виходячи з таких критеріїв.

По-перше, для того, щоб виконати свою функцію (регенерувати пошкоджену тканину), матриця повинна мати структуру, яка діє як шаблон або матриця для росту тканини у трьох вимірах та стимулює новий ріст у формі, яка задана каркасом. Конструкцією шаблону є структура, що копіює структуру тканини організму господаря.

По-друге, для того, щоб дозволити тканині рости у трьох вимірах, шаблон має бути пронизаний мережею великих пор (макропор). Пори повинні бути поєднані одна з одною, а отвори між порами повинні мати діаметр понад 100 мкм. Взаємопов'язана мережа необхідна для того, щоб забезпечити клітинам здатність мігрувати матриксом й сприяти росту тканини. В умовах культури клітин *in vitro* й росту тканини мережа пор повинна забезпечувати доставку компонентів середовища до всіх клітин, забезпечуючи їх корисними поживними речовинами. Після того як тканинно-інженерна конструкція (матрикс + клітини) буде імплантована, динаміка матеріалу матриксу повинна забезпечити формування розвиненої по всьому об'єму системи взаємопоєднаних пор. Це необхідно для того, щоб у всьому об'ємі матриці циркулювали кров та тканинна рідина для забезпечення клітин та тканин поживними речовинами. Нарешті ідеальні матрикси повинні стимулювати ріст кровоносних судин (ангіогенез) всередині мережі пор. Так, мінімальний

діаметр отвору для ангіогенезу та для врощування кістки у випадках застосування інжинірингу кісткової тканини становить близько 100 мкм.

По-третє, для створення оптимального матриксу, окрім необхідної зміни пористості, слід забезпечити необхідні структуру та властивості поверхні. Функціональні клітини повинні прикріплюватися до матриці, щоб сформувати позаклітинну матрикс. Поверхнева текстура або шорсткість поверхні в нанометричному масштабі впливають на функціональну активність клітин.

По-четверте, необхідна властивість ідеальних матриксів – це здатність до біоруйнування. Продукти руйнування (розпаду) матеріалу матриксу повинні являти собою нетоксичні продукти, які виводяться з організму або метаболізуються в ньому. Швидкість розпаду матриксу має бути контрольованою та відповідати швидкості утворення нової тканини у місці дефекту. Полімери, що руйнуються, й гідрогелі – найчастіше використовуються як матеріали для виготовлення резорбованих матриксів.

По-п'яте, ідеальні каркаси також повинні активувати клітини тканини для саморегенерації, оскільки вони повинні функціонувати як системи доставки та контрольованого виходу речовин, що активують клітини. У матеріал матриксу можна включати біологічно активні сполуки, фактори росту клітин; лікарські препарати.

По-шосте, механічні властивості матриксу повинні відповідати механічним властивостям тканини організму-господаря. Структура та міцність каркасів, що розсмоктуються, повинні також зберігатися до тих пір, поки не буде регеноеровано достатньо тканини організму-господаря.

Матрикси для тканинної інженерії повинні розроблятися відповідно до вимог, передбачених Міжнародною організацією стандартів (ISO), а також конкретних державних та галузевих стандартів. Доцільно при розробці матриксів використовувати матеріали, які вже сертифіковані та допущені до застосування у клініці.

Основними характеристиками біологічно сумісних матриксів для створення тканинно-інженерних конструкцій повинні бути:

- відсутність цитотоксичності;
- підтримання адгезії, фіксації, проліферації та диференціювання, розміщених на їх поверхні клітин;
- відсутність запальної реакції на матеріал;
- імунна відповідь;
- достатня механічна міцність відповідно до призначення;
- біорезорбція метаболічними шляхами.

Всі необхідні властивості матриксу визначаються властивостями вихідного матеріалу та технологією його переробки. Тому ключовою проблемою для успіху створення ефективних біоконструкцій є наявність адекватного біодеградуючого та біосумісного матеріалу.

Однією зі складних проблем є вибір адекватного носія для культури клітин. Швидка деградація носія-підкладки сприяє вимиванню клітин разом з транссудатом з рани, тому тканезаміщаючі імпланти повинні мати

продовжений термін біодеградації. Матрикси можуть бути отримані з біологічних тканин за допомогою видалення клітинних компонентів таким чином, щоб збереглася його тривимірна структура, наскільки можна з усіма чинниками росту.

Розроблений як штучна матриця матеріал тканинної інженерії відіграє важливу роль у відновленні кісткової тканини. Загалом, процес тканинної інженерії починається з виготовлення біологічно сумісного каркасу, який підтримуватиме живі клітини для їх прикріплення, проліферації та диференціації, і таким чином сприяють регенерації тканин *in vitro* та *in vivo*. В ідеалі, каркас тканинної інженерії має бути біосумісним, біологічно розкладаним, високопористим та механічно надійним. Кістка є васкуляризованою тканиною, тому інженерна конструкція повинна характеризуватися взаємопов'язаною пористістю для васкуляризації. Відповідна механічна міцність є ще одією важливою вимогою до імплантатів у місцях, які мають навантаження. Конкретні критерії ідеального каркасу в інженерії кісткової тканини узагальнені в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3 – Критерії для створення ідеального каркасу для інженерії кісткової тканини

Критерії	Вимоги
Біосумісність	Підтримувати та сприяти прикріпленню клітин, проліферації та диференціації, ініціювання регенерації тканин як <i>in vitro</i> , так і <i>in vivo</i>
Остеопровідність	Стимулювати прилягання та ріст кісткової тканини
Здатність до біологічного розкладання	Мати здатність до фізіологічного розкладання, яка визначається рівнем резорбції
Механічні властивості регенерація	Підтримувати належну механічну стабільність тканини
Пориста структура	Характеризуватися пористістю (90 об. %) та взаємопов'язаним каркасом з діаметром пор від 300 до 500 мкм. Це дозволить клітинам проникнути в структуру пор та сприяти формуванню нової кістки, а також її васкуляризації, доставляти поживні речовини в каркас й транспортувати небажані метаболіти поза каркасом
Виготовлення	Бути технологічними та машинооброблюваними: можливість виготовляти каркаси складної форми, які відповідають дефектам кістки окремих пацієнтів із застосуванням невагтисного обладнання та доступних матеріалів.
Комерціалізація	Мати прийнятну ціну та високий рівень комерціалізації

2.2.2 Методи створення клітинних матриць у тканинній інженерії кістки

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, щорічно у світі відбувається близько 50 млн. не смертельних травм, що призводять до проблем опорно-рухового апарату. Значна кількість кісткових травм лікується оперативним шляхом, тобто шляхом імплантації в організм металоконструкцій або кістково-пластичних матеріалів. Такий підхід пов'язаний з незручностями для хворого, тривалий за часом, а головне – не гарантує позитивного результату. Так, причиною помилкового суглобу, по суті дефекту кістки, у 42 % випадків є дефект хірургічного втручання.

Регенеративна медицина пропонує метод альтернативної імплантації металу в організм. Головною перевагою запропонованого підходу є теоретична можливість повного відновлення анатомічної цілісності кістки. Основою методу є три складові: мультипотентні клітини, остеогенні фактори, здатні направити клітини по кістковому шляху розвитку, та матриця – носій та підкладка клітин.

На даний момент відомо, що для культивування клітин найбільш ефективними є підкладки, що імітують натуральний позаклітинний матрикс кістки. Таким чином, вчені зіткнулися з проблемою створення матриць з поверхнею, структурованою на мікро- й нанорівнях, подібно до природного позаклітинного матриксу. Крім цього, до матриць висувається ще ряд вимог, зумовлених необхідністю виконання функцій заміщуваних ними органів, а також властивостей, що дозволяють їх використовувати.

Розмір більшості клітин коливається від 2 до 120 мкм. В останніх дослідженнях показано, що найкращі умови для життєдіяльності клітин створюються, коли розміри структур підкладки співставні з розмірами самих клітин. Таким чином, метод створення матриць для культивування клітин повинен забезпечувати можливість структурування кінцевого продукту на нано- та мікрорівнях та можливість використання матеріалів найбільш придатних для створення аналога кісткової тканини. Серед апаратних методів, здатних виконати поставлену задачу, можна виділити електроспінінг, імпринт-літографію та 3D-друк [16].

Електроспінінг. Апарат електроспінінга складається з голки, через яку подається розчин полімеру, і з колектора, куди збирається полімер. Усі складові апарату (голка, струмінь, колектор) є елементами одного електричного кола. Сутністю процесу електроспінінгу є подолання напругою електричного поля сил поверхневого натягу розчину полімеру на кінці голки. У міру зростання напруги електричного поля на кінці голки спочатку утворюється конус Тейлора – конусоподібна крапля полімеру. Як тільки напруги достатньо, з верхівки конуса в напрямку колектора спрямовується струмінь полімеру, діаметр якого залежить від безлічі умов. Перебуваючи в повітрі, частина розчинника випаровується, і на колекторі збирається більш чистий полімер у вигляді хаотично або спрямовано розміщених фібрил (рис. 2.4). Даний метод не тільки технічно простий, але і має ряд переваг.

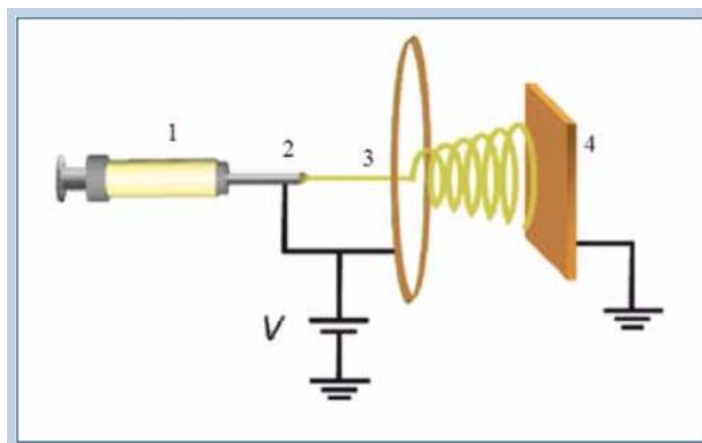


Рисунок 2.4 – Схематичне зображення процесу електроспінінга:

1 – шприц з розчином полімеру; 2 – голка й конус Тейлора, що утворюється на ній; 3 – струмінь розчину полімеру; 4 – приймальний колектор

За допомогою електроспінінга можливе структурування матриць на нано- та мікрорівнях, а також створення як паралельних, так і різноспрямованих фібрил, навіть в одній конструкції (рис. 2.5).

Так, для електроспінінга показана можливість використання практично будь-яких матеріалів при синтезі. Серед них синтетичні біодеградуючі полімери: полілактид-когліколід, поліетиленоксид, полікапролактон, полілактид, білки природного позаклітинного матриксу – хітозан, колаген I типу, желатин, еластин, неорганічні сполуки позаклітинного матриксу кістки – β -трикальційфосфат, гідроксиапатит, а також вуглецеві нанотрубки. Основним питанням залишається вибір універсального нетоксичного розчинника для заготовки композитних розчинів, які надалі піддають процесу електроспінінгу.

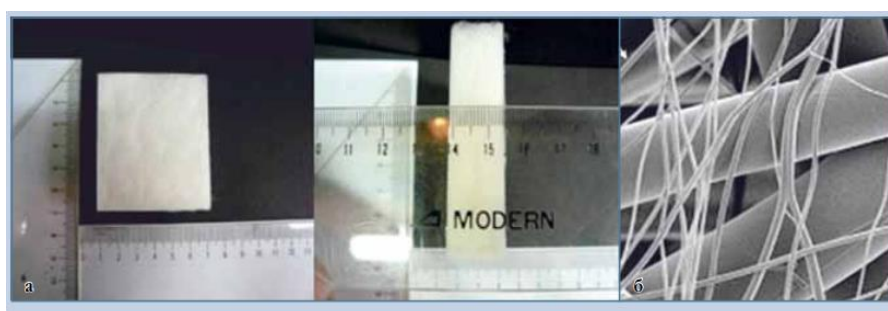


Рисунок 2.5 – Приклад матриці, яка сформована методом електроспінінгу:

а – макровид препарату; б – мікроструктура препарату

Імпринт-літографія. Імпринт-літографія полягає у нанесенні відбитка штампом довільної форми на плівку з бажаного матеріалу. Даний метод дозволяє швидко отримувати значну кількість плоских клітинних матриць із 3D-структурованою поверхнею (рис. 2.6).

Під час комбінування множини подібних плівок можливе отримання об'ємної конструкції. Дозвільна здатність методу починається від десятків

нанометрів. Нанесений штампом відбиток може бути будь-якої форми, що вкрай вигідно у ході імітування мікроархітекtonіки кісткової тканини.

Показана можливість використання полілактиду та полікапролактону для отримання клітинних матриць методом імпринт-літографії та можливість застосування даних матриць для культивування клітин.

У зв'язку зі складністю формування досить об'ємних конструкцій зі структурованих плівок, а також з відсутністю даних про можливість застосування композитних матеріалів імпринт-літографія не набула широкого поширення при виробництві тканинно-інженерного аналога кісткової тканини.

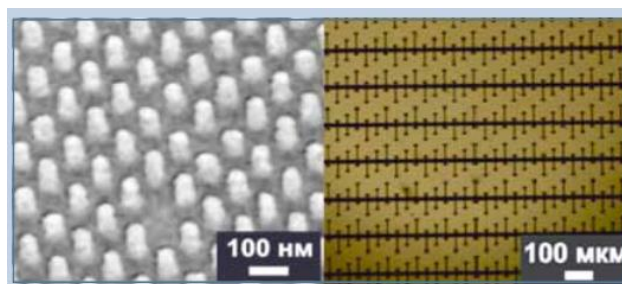


Рисунок 2.6 – Приклади матриць, сформованих методом імпринт-літографії: матриці є плівки з довільно структурованою поверхнею

3D-друк. У той час як мікроархітекtonіка матриць, створених за допомогою електроспінінгу та імпринт-літографії, піддається контролю, їх макроархітекtonіка обмежена методом створення і в більшості випадків представлена плівкою. 3D-друк, забезпечуючи достатньо повний контроль за макроархітекtonікою кінцевої конструкції, здатний створювати персоналізовані матриці за допомогою комп'ютерних методів візуалізації – МСКТ та МРТ. Таким чином, з появою 3D-друку з'явилася можливість контролю будови матриць на макро- та мікрорівнях.

Зазвичай процес 3D-друку включає наступні кроки: створення комп'ютерної 3D-моделі із заданою мікро- і макроархітекtonікою, перенесення моделі на апарат 3D-друку, друк.

Існує кілька технологій 3D-друку, які відрізняються методами створення конструкції та матеріалами, що використовуються для виробництва.

Експериментальні дослідження матриць, сформованих методами 3D-друку, представлені на рисунку 2.7. та характеризуються рядом послідовних операцій:

1) **склеювання порошкового матеріалу.** Суть методу полягає в нанесенні клеючого розчину на шар порошку тільки у місцях проекції майбутньої конструкції. Після нанесення одного шару зверху насипають новий шар порошку, який так само піддається склеюванню лише у місцях проекції майбутньої фігури. Так, шар за шаром створюється склеєна конструкція, оточена несклеєним порошком. Дана технологія має роздільну здатність 300 мкм. Однією з її переваг є можливість створення великих сполучених між собою пор, що сприяє інфільтрації конструкції клітинами. Сам процес

відбувається за кімнатної температури, що робить можливим додавання у конструкцію біологічних агентів, наприклад, білків. Як порошок використовують синтетичні полімери (полікапролактон, полілактид, полілактидкогліколід) з органічним розчинником або желатин чи декстран з водою як клеючі матеріали. Як порошок для даного методу широке поширення отримав гідроксиапатит. У ході додавання до гідроксиапатиту та склеювання його синтетичним полімером можливе створення кераміки з пористістю до 90 %. Такі конструкції демонструють виражені остеокондуктивні властивості. Перевагою методу є можливість використання широкого спектру матеріалів, недоліком – низька роздільна здатність друку.

2) **екструзійна технологія.** Екструзійні 3D-принтери створюють пошарову модель за допомогою нанесення розплавленого термопластику. Головні критерії для матеріалів у даного виду друку – температура плавлення та реологія розплавленого пластику. За допомогою даної технології вдається контролювати розміри елементів у шарі, відстань між елементами, а також товщину шару. Це дозволяє створювати конструкції із заданим розміром пор, сполученням між порами та бажаною мікроархітектонікою. Ключова перевага методу полягає у можливості створення структур з досить високою пористістю без достатньої втрати механічної міцності. Складність методу полягає в необхідності нагрівання матеріалів до температури плавлення, що унеможливорює застосування цілих класів матеріалів, нестабільних при нагріванні, наприклад, білків.

Найбільше застосування для друку біосумісних об'єктів за допомогою даної технології отримав полікапролактон у зв'язку з низькою температурою плавлення (близько 60 °C) й високою термічною стабільністю. Друк за допомогою полілактидкогліколіду більш складний, оскільки для отримання необхідної реології розплавленого полімеру необхідна температура 110–140 °C. Для отримання композитних матеріалів методом показана можливість додавання колагену, трикальцій фосфатів, гідроксиапатиту та желатину.

3) **стереолітографія.** Основа методу полягає в полімеризації фотополімеру за допомогою ультрафіолету. Шар створюється, коли проектор засвічує ванну з фотополімером лише в місцях проекції майбутньої фігури. Далі опора опускається й засвічується новий шар. Наприкінці готовий об'єкт залишається в оточенні неполімеризованого розчину фотополімеру. Метод досяг високої роздільної здатності друку (біля 1–2 мкм), що дозволяє створювати об'єкти з вкрай складною внутрішньою будовою. Недоліком методу є незначна кількість біосумісних фото полімерів, які можна застосовувати. Показана можливість застосування поліпропіленфумару в стереолітографії. У рідкому фотополімері заздалегідь розмішували живі клітини для інкапсуляції їх у матрицю, що можна назвати біодруком. Можливе додавання багатьох ад'ювантів у розчин фотополімерів, наприклад кісткового морфогенетичного білка (BMP).

4) **3D-друк (біоплоттинг).** Ця технологія заснована на ін'єкції розчину зі шприцу в рідкий приймальний колектор, густина якого збігається з густиною

розчину у шприці. Колектор може містити полімеризуючі речовини. Процес може бути виконаний як за кімнатної температури, так і за підвищеної. Даний метод особливо підходить для створення м'яких матриць із гідрогелів. Першими були використані натуральні полімери, такі, як агар, желатин, полімеризуючою речовиною виступав Ca^{2+} . Перевагами методу є використання значної кількості біосумісних матеріалів й низька температура процесу.

Недоліки полягають у неможливості створення досить твердих конструкцій у зв'язку з використанням гідрогелів, а отже, і у неможливості формування складної мікроархітекτονіки конструкцій. Роздільна здатність методу 400 мкм. Біоплоттинг повторює цей метод, але до розчинів полімерів також додають суспензії клітин, наприклад, в альгінатовому гелі. Ця технологія дозволяється досягти рівномірного розподілу клітин сигнальних молекул у конструкції, що особливо важливо для подальшого формування тканини. Біоплоттинг може бути використаний з полілактидомкогліколідом, трикальційфосфатами, хітозаном, гідроксиапатитом, колагеном, полікапролактоном. Слід зазначити, що в перерахованих роботах спостерігається збереження життєздатності клітин, що пройшли через процес біодруку, позаалежно від виду використаного матеріалу.

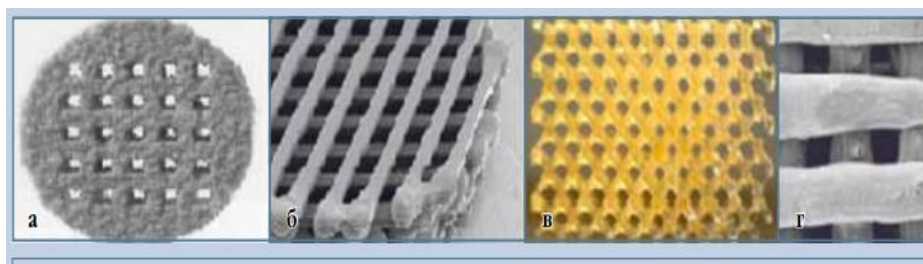


Рисунок 2.7 – Матриці, сформовані за допомогою 3D-друку:
а – склеювання порошкового матеріалу; б – екструзійний метод;
в – стереолітографія; г – біоплоттинг

Поєднання методів. Слід відзначити перспективність поєднання різних методів, таких, як електроспінінг та 3D-друк під час виробництва однієї конструкції. Даний підхід доцільний у зв'язку зі складною будовою кістки як органу, який містить не тільки кісткову тканину, а й окістя, ендост, нерви, судини, кістковий мозок. Для відтворення настільки складної структури, ймовірно, знадобляться як об'ємні конструкції, отримані методами 3D-друку, так і плівки зі структурованою поверхнею, отримані шляхом електроспінінгу та/або імпринт-літографії. Розвиток технологій 3D-друку необхідний для підвищення роздільної здатності, ускладнення форми, збільшення міцності конструкцій. Таким чином, стане можливим створення зразку, який найбільш ефективно імітує природню позаклітинну матрицю.

2.3 Біоматеріали для тканинної інженерії

Міждисциплінарний підхід у тканинній інженерії спрямований насамперед на створення нових біокомпозиційних матеріалів та відновлення

втрачених функцій окремих тканин чи органів. Основні принципи підходу полягають у розробці та застосуванні під час імплантації у пошкоджений орган або тканину носіїв з біодеградуючих матеріалів, які використовуються у поєднанні або з донорськими клітинами та/або біоактивними речовинами.

Наприклад, за лікування рани це можуть бути колагенові покриття з аллофібробластиками, а в судинній хірургії – штучні судини з антикоагулянтами. Крім того, однією з серйозних вимог до такого роду матеріалів-носіїв є і те, що вони повинні забезпечувати надійну підтримуючу, тобто опорну та/або структуроутворюючу функцію у пошкодженій ділянці тканини або органу.

Отже, одним з основних завдань ТІ в галузі лікування кісткових патологій є створення штучних композитів, що складаються з ало- та/або ксеноматеріалів у поєднанні з біоактивними молекулами (кісткові морфогенетичні білки, фактори росту тощо) та здатні індукувати остеогенез. Такі матеріали повинні мати ряд необхідних властивостей кістки.

По-перше, вони повинні виконувати та підтримувати (scaffold) об'єм дефекту. По-друге, мати остеодуктивність, тобто активно спонукати остеобласти і, можливо, інші мезенхімальні клітини до формування кістки. І, по-третє, мати високі показники біосумісності, тобто бути біодеградованими і не викликати у реципієнта запальних реакцій. Остання якість досягається в матеріалі лише за рахунок зниження його антигенних характеристик.

Сукупність усіх цих властивостей дозволяє таким матеріалам паралельно з опорною (остеокондуктивною) функцією, забезпечувати і біоінтеграцію – проростання клітин та судин у структури імплантату.

Відомо, що підтримуючий ефект забезпечується, як правило, його структурними особливостями. Для біоматеріалів цей показник зазвичай пов'язаний з архітектонікою нативної тканини, з якої він отриманий. Для кістки, основними параметрами її структурної міцності є твердо-еластичні характеристики кісткового матриксу та величина пор у ньому.

Вибір та конструювання кісткового матриксоподібного біоматеріалу в першу чергу визначаються складом кісткової тканини. Позаклітинна матриця кістки – це композит, який головним чином містить гідроксиапатит (ГАП, біологічна кераміка), вбудований у колагенову матрицю (біологічні полімери) і вода. У таблиці 2.4 наведені дані щодо складу природної кісткової матриці.

Не дивно, що біоматеріали, що застосовуються в інженерії кісткової тканини, в основному виготовлені з природних або синтетичних полімерів, кераміки або їх композитів, призначені для імітації складу та структури природної кістки.

Для виготовлення матриць використовують біостабільні та біодеградовані матеріали неорганічної та органічної природи (метали/сплави, полімери, кераміку, гідроксиапатити, композитні матеріали, корали, колаген, желатин, еластин, фібрoneктин, альгінат, хітозан тощо) (табл. 2.5).

Таблиця 2.4 – Склад природної кісткової матриці

Композиція	Вміст й функція
Біологічна кераміка	Гідроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ становить приблизно 70 % ваги кістки. Це неорганічний компонент забезпечує компресію, жорсткість до кісток
Біологічний полімер	Приблизно одна третина ваги кістки складається з органічної речовини, яка містить переважно колаген І типу та основну речовину. Тип І колагенові волокна еластичні й гнучкі, а отже витримують розтягування, скручування та згинання. Кістковий колаген дещо відрізняється від колагену м'яких тканин того самого типу, що має велику кількість міжмолекулярних перехресних зв'язків. Основна речовина містить протеогліканові агрегати та декілька специфічних структурних глікопротеїнів

Матеріали, що використовуються для створення матриць, можуть мати біологічне або синтетичне походження. До перших відносять альгінат натрію, гідроксиапатит, желатин, колаген, серіцин, фіброїн, хітозан та ін.

Серед штучно синтезованих сполук найбільшого поширення набули полілактид (polylactic acid, PLLA), сополімер молочної та гліколевої кислот (poly(lactic-co-glycolic) acid), PLGA), поліетиленгліколь (polyethylene glycol, PEG) та ін.

Слід зазначити, що ці сполуки не задовольняють всьому спектру вимог, тому доцільно використовувати їх комбінації, що дозволяє знаходити баланс між механічною міцністю структури матриці, швидкістю її деградації в організмі та стимуляцією проліферації хондроцитів. Так, у випадку альгілату натрію доведена ефективність його поєднання з колагеном, гіалуроновою кислотою та комплексом гідроксиапатиту та хітозану. Комбінація хітозану, гіалуронової кислоти та безклітинного матриксу (хрящова тканина, що зазнала кількох циклів заморожування-розморожування та опромінення γ -квантами) виявилася ефективною для стимуляції вироблення глікозаміногліканів і колагену після ін'єкції в колінний суглоб щурів. Якщо в якості матриксу використовується гідрогель, має значення концентрація речовини, взятої за основу, у водному розчині, яка може значно відрізнятися: від 0,5 % для гіалуронової кислоти до 20 % для фіброїну. У випадку найчастіше застосовуваного носія – альгілату натрію, зазвичай використовують концентрації від 1,2 до 2,0 %.

Формування матриць з біодеградуючих полімерів є особливо ефективним. У зв'язку з тим, що матрикс, який імплантується на основі біодеградуваного матеріалу з функціонуючими клітинами діє як тимчасовий каркас, це сприяє формуванню зрілої тканини. Використання біодеградуваних матриксів є найбільш доцільним. За використання неруйнівних матриксів можуть мати місце ускладнення, пов'язані з тривалою присутністю чужорідного матеріалу.

Таблиця 2.5 – Характеристика основних матеріалів для виготовлення скаффолдів у тканинній інженерії хряща

Матеріал	Застосування для тканинної інженерії хряща	
	Клітини	Рівень розробки
Природні поліцукри		
Альгінат	Хондроцити, МСК, ембріональні стовбурові клітини	Експерименти <i>in vivo</i>
Агароза		Експерименти <i>in vivo</i>
Гіалуронат		Клінічні випробування (Hyaff-11)
Хітозан		Клінічні випробування (BST-CarGel)
Природні білки		
Колаген	Аутологічні хондроцити, МСК	Клінічні випробування (MACI®, Genzyme)
Фібрин	Аутологічні хондроцити	Клінічні випробування у складі комбінацій матеріалів
Синтетичні матеріали		
Полігліколеві, полімолочні кислоти та їх сополімери	Практично всі джерела клітин	Клінічні випробування
Полікапролактон та поліетиленгліколі		Експерименти <i>in vivo</i>
Наноструктуровані матеріали		
Модифіковані природні та синтетичні полімери в вигляді гелів, нановолокон або нанопористих губок	Аутологічні хондроцити та МСК	Експерименти <i>in vivo</i>

Розглянемо більш детально основні матеріали, які застосовуються для створення тканинно-інженерних конструкцій.

2.3.1 Біополімери природного походження

Багато дослідницьких зусиль вкладено у розробку матриць з біополімерів природного походження, в тому числі колагену, демінералізованих матеріалів на основі ЕСМ, хітозану і його похідних для інженерії кісткової тканини.

Матеріали на основі позаклітинної матриці (ЕСМ, Extracellular matrix) – використовувалися як каркаси для інженерії кісткової тканини, забезпечуючи

відповідне мікросередовище з біофізичними та біохімічними сигналами для прикріплення, проліферації та диференціювання клітин.

Завдяки відмінній біосумісності, природні похідні біополімери зазвичай не викликають значних запальних реакцій під час імплантації в організм. Колаген і дегенеровані білки ЕСМ (наприклад, желатин) давно привернули увагу як біоматеріали, що використовуються для кісткової тканинної інженерії завдяки їхнім перевагам, таким як висока біосумісність, здатність до біологічного розкладання та зв'язування з клітинами. Однак існують серйозні побоювання, пов'язані з імуногенністю, швидкою деградацією та низькими механічними властивостями колагену. Для мінімізації цих недоліків був розроблений хімічно зшитий колаген, поєднаний з синтетичними полімерами.

Хітозан і його похідні є іншою групою природних біополімерів. Вони були широко досліджені у інженерії кісткової тканини завдяки гідрофільності поверхні, яка сприяють прикріпленню клітин, проліферації та диференціації. Крім посилення остеопровідності (процес, у який відбувається ріст кістки на поверхні біоматеріалу) *in vivo*, хітозан також виявляє здатність захоплювати фактори росту у місці рани. Розглянемо основні види природних полімерів.

2.3.1.1 Фіброїн шовку та желатин

Фіброїн – фібрилярний білок, що виділяється павукоподібними та деякими комахами і становить основу ниток павутини та коконів комах, зокрема, шовку тутового шовкопряда *Bombyx mori* (рис. 2.8).

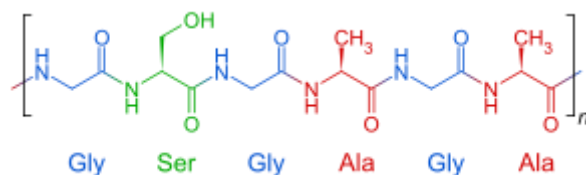


Рисунок 2.8 – Первинна структура фіброїну

Фіброїн шовку тутового шовкопряда *Bombyx mori* є одним із найбільш перспективних природних полімерів для тканинної інженерії.

Скаффолди на основі фіброїну успішно підтримують регенерацію кишківника, відновлення нервової та кісткової тканини. Фіброїн є фібрилярним білком з великою кількістю повторень первинної структури. Вторинна структура фіброїну являє собою антипаралельні β-шари, об'єднані водневими зв'язками. Аморфні ділянки білка утворюють α-спіралі, частка яких зростає під час гідратації фіброїну. Механічні властивості та швидкість біодеградації виробів з фіброїну шовку можна контролювати, змінюючи частку β-шарів у його структурі. У третинній структурі фіброїну виділяють два ланцюги: важкий і легкий з молекулярною масою 390 й 26 кДа, відповідно, які присутні у відношенні 1:1 та поєднані одним дисульфідним зв'язком. Така структура фіброїну шовку забезпечує наявність вільних хімічних груп, які можуть бути

використані для створення кон'югатів та композитів з покращеними властивостями.

У результаті вивчення впливу структури конструкцій, природи та складу використовуваних полімерів на адгезію та проліферацію клітин проведено порівняння активності адгезії та проліферації фібробластів лінії 3T3 на скаффолдах з фіброїну шовку та желатину, виготовлених двома різними способами: методом електроспінінгу та методом поливу (рис. 2.9 –2.12).

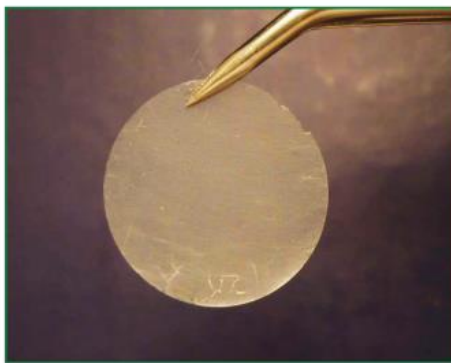


Рисунок 2.9 – Зовнішній вигляд скаффолду з фіброїну шовку на склі, отриманий методом електроспінінгу; діаметр скла – 2 см

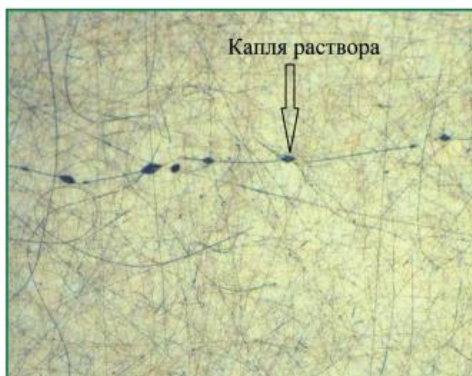


Рисунок 2.10 – Дефект волокна, викликаний неправильним підбором параметрів напilenня (фіброїн шовку)

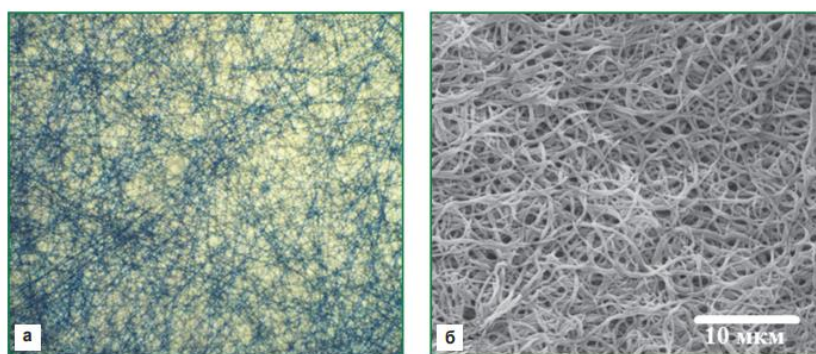


Рисунок 2.11 – Структура скаффолду з фіброїну шовку. Зображення волокон фіброїну шовку, одержане методом світлової мікроскопії (а) та методом скануючої електронної мікроскопії (б)

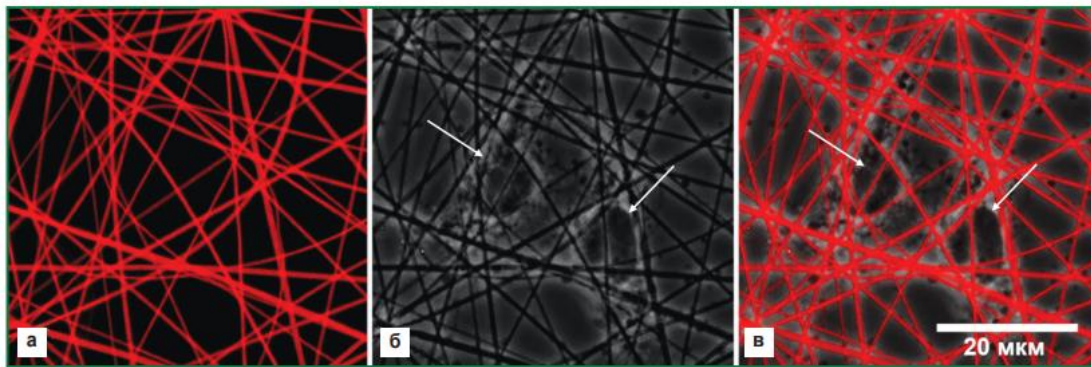


Рисунок 2.12 – Фібробласти лінії 3ТЗ на скаффолдах з фіброїну шовку, отримані методом конфокальної скануючої мікроскопії:

а – скаффолд з фіброїну шовку, забарвлений барвником TRITC;

б – те ж саме, але за наскрізного освітлення;

в – накладання зображень *а* та *б*; білими стрілками позначені клітини

На відміну від скаффолдів, виготовлених методом електроспінінгу, конструкції, одержувані методом поливу, характеризуються відсутністю пористості. Адгезію оцінювали через 12 годин після початку експерименту. Визначено, що кількість фібробластів лінії 3ТЗ, що прикріпилася до різних зразків скаффолдів, суттєво не відрізнялася. Проліферацію клітин оцінювали на 3 та 5 добу експерименту. Кількість клітин на скаффолдах, виготовлених з желатину методом електроспінінгу, на 3 добу експерименту була незначно більшою, ніж на покриттях аналогічного складу, отриманих методом поливу, однак на 5 добу експерименту показала статистично значущі відмінності проліферативної активності клітин між розглянутими зразками. Це може пояснюватися тим, що желатин є продуктом денатурації колагену, містить у своїй структурі послідовність RGD, яка зв'язується з рецепторами-інтегринами на мембранах фібробластів, тим самим запускаючи їхню проліферацію. Таким чином, у даному випадку відмінності в пористості виробу не впливають на проліферативну активність клітин.

Желатин характеризується високою здатністю до підтримки проліферативної активності клітин. Навпаки, проліферативна активність клітин на скаффолдах, виготовлених із фіброїну шовку двома різними методами, істотно відрізнялася і була вищою на виробках, отриманих методом електроспінінга, оскільки такі конструкції характеризуються високою пористістю і волокнистою структурою, що створює сприятливі умови для проліферації фібробластів, оскільки імітує архітектуру нативного позаклітинного матриксу. Зменшення проліферативної активності клітин на скаффолдах, отриманих методом електроспінінгу, на 5 добу експерименту можна пояснити контактним гальмуванням. Кількість клітин на виробках з желатину збільшувалася протягом експерименту, а розподіл клітин у зразках був рівномірним, що також підтверджує здатність желатину підтримувати проліферацію клітин. Отже, використання желатину як матеріалу для культивування клітин та виготовлення конструкцій для тканинної інженерії

значно підвищує рівень клітинної адгезії, запускає проліферацію та диференціювання остеогенних клітин, діючи як натуральний компонент позаклітинної матриці.

У той же час недостатні для здійснення хірургічних маніпуляцій значення механічних характеристик виробів з желатину обмежує можливе застосування останніх. Крім цього, використання желатину обмежується його високою розчинністю у воді та швидкою біорезорбцією в організмі. У той же час фіброїн шовку характеризується унікальними механічними властивостями, проте проліферативна активність клітин на виробих з фіброїну шовку нижча, ніж на виробих із желатину.

Одним з можливих шляхів вирішення даної проблеми є створення композитних матеріалів з покращеними адгезійними властивостями та оптимальними значеннями механічних показників. Тому необхідним є пошук оптимального співвідношення желатину та фіброїну в складі композиту, який би забезпечував адгезію та проліферацію клітин, але дозволяв уникати швидкої резорбції волокна. На взятих групах зразків з різним масовим співвідношенням фіброїну шовка й желатину: (3:1, 1:1, 1:3) через 12 год після початку експерименту виявлена успішна і приблизно однакова адгезія фібробластів.

Проліферативна активність клітин на різних зразках оцінювалася на 3 та 5 добу експерименту. На 3 добу експерименту відбулося збільшення проліферативної активності клітин на зразках, які містять желатин, на 5 добу встановлене збільшення кількості клітин на всіх композитних покриттях. Відзначена пряма залежність проліферативної активності клітин від вмісту желатину у зразку. Однак на скаффолдах із желатину кількість клітин на 5 добу експерименту не змінилася порівняно з 3 добою. Це можна пояснити тим, що зразки, отримані з желатину без композитної добавки, фіксували 0,3 % розчином глютарового альдегіду, щоб уникнути порушення їхньої структури внаслідок розчинення желатину під час експерименту.

Відомо, що глютаровий альдегід є токсичним для клітин і негативно впливає на проліферацію клітин у виробі. Найбільша проліферативна активність клітин була виявлена на скаффолдах з масовим співвідношенням фіброїну та желатину 1:3. Кількість клітин на цих зразках була в 2,5 рази більша, ніж на покриттях з чистого желатину, та в 5 разів більша, ніж на покриттях з фіброїну шовку.

Досягнення цього ефекту може бути пов'язане з тим, що таке поєднання полімерів забезпечує оптимальний розподіл на поверхні волокна амінокислотної послідовності RGD у складі желатину, а також утворення нерозчинного високопористого скаффолду за рахунок наявності фіброїну шовку в композиті. Крім того, на ефективність адгезії, життєздатність, швидкість проліферації та міграції клітин впливає заряд поверхні субстрату. Введення желатину до складу плівок на основі фіброїну, який має негативний заряд за нейтрального рН може дозволити поліпшити ефективність адгезії клітин до такого субстрату.

Так, пористі скаффолди та мікрогелі з рекомбінантного аналога спідроїну – структурного білка шовку павутини, що характеризується позитивним рядом за фізіологічних значень рН, є прекрасним субстратом для адгезії та проліферації клітин *in vitro*, а також індуюють нейро- та ангіогенез *in vivo*, що дуже важливе для регенерації різних типів тканин.

2.3.1.2 Хітозан

Хітин представляє інтерес як джерело глюкозаміну, який використовується організмом людини для синтезу важливих функціональних біополімерів, таких як глікопротеїни та поліцукри. Завдяки високій механічній міцності, хітин використовується для отримання волокон та плівок, водночас цей полімер характеризується радіаційною стійкістю.

Хітин – азотовмісний полісахарид, який хімічно дуже схожий з целюлозою, лише замість гідроксила (–ОН) на кожному кільці (мономері) із шести атомів карбону розташована аміногрупа, в якій один з двох атомів гідрогену заміщений на ацетильну групу. Вперше був виділений із зовнішніх оболонок тарантулів (рис. 2.13).

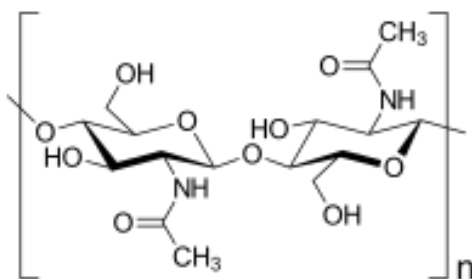


Рисунок 2.13 – Хімічна структура хітину

Хітин – один з найбільш розповсюджених у природі полісахаридів. За поширенням його вважають другою після целюлози органічною речовиною живого світу. Щороку на Землі в живих організмах утворюється і розкладається близько 10 Гт хітину. Хітин є основним компонентом зовнішнього скелету членистоногих: панцирів раків, крабів, креветок, скорпіонів, кутикул комах. У клітинних стінках грибів він виконує захисну й опорну функції, забезпечуючи жорсткість клітин. Також хітин утворюється в організмах різноманітних червів, кишковопорожнинних, кнідарій та ін.

Однак для застосування більш цінним у практичному відношенні є його дезацетилюване похідне – хітозан. **Хітозан** – гідрофільний катіонний біополімер, який отримують дезацетилюванням хітину в досить жорстких умовах. Фрагмент хітозану являє собою блок із залишків двох моносахаридів, а саме 3-(1-4)-зв'язаних залишків D-глюкозаміну та N-ацетил-D-глюкозаміну (рис. 2.14). Як і хітин, хітозан є аморфно-кристалічним полімером, для якого також характерне явище поліморфізму, причому кількість структурних модифікацій за переходу від хітину до хітозану збільшується до 6.

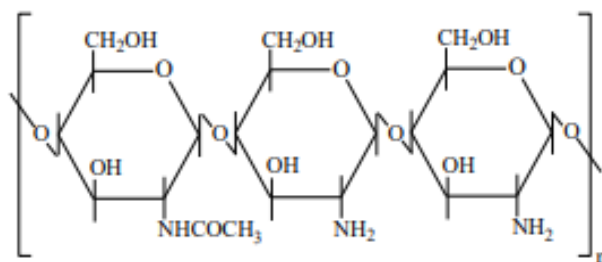


Рисунок 2.14 – Хімічна структура хітозану

Хітозан характеризується різноманітними фізико-хімічними та біологічними властивостями, що обумовлює його використання в таких сферах, як очищення води та стічних вод, сільське господарство, виробництво тканин й текстилю, косметика та обробка харчових продуктів. Крім того, відсутність токсичності й алергеності, біосумісність та здатність до біорозкладання та біологічна активність обумовлюють його привабливість як речовини для різноманітних застосувань як біоматеріал у фармації та медицині, де він використовується для системної та локальної доставки ліків й вакцин.

Хелатні властивості хітозану та висока функціональність підкреслюють його цінність в харчовій промисловості, для зв'язування й видалення певних речовин, таких як барвники і жири, з харчових продуктів. Антибактеріальні та протигрибкові властивості хітозану використовують при зберіганні продуктів. Природне походження та нетоксичність хітозану дозволяють широко використовувати його в сільському господарстві, не спричиняючи забруднення довкілля.

Хітозан, як природний полімер, став дуже поширеним матеріалом для розробки похідних сполук з поліпшеними або новими властивостями. Крім перспективних біологічних матеріалів на основі хітозану, з нього отримують сорбенти, які використовують для:

- очищення крові;
- виведення важких металів та радіонуклідів.

Мішенню антимікробної дії хітозану є клітинна оболонка бактерій, де хітозан порушує нормальні функції мембрани, шляхом стимулювання витоку внутрішньоклітинних компонентів, а також шляхом пригнічення транспорту поживних речовин в клітину.

Антимікробна активність хітозану добре відома для різних бактерій й грибів й її пов'язують з його полікатіонною природою. З іншої точки зору, хітозан, зв'язуючись з ДНК, пригнічує синтез РНК в ядрах мікроорганізмів, втручаючись в її синтез, синтез білків і в кінцевому підсумку, гальмує ріст бактерій.

На антимікробну активність хітозану впливають температура й рН середовища, в якому протікає реакція, фаза росту бактерій клітини, а також наявність солей, здатних утворювати комплекси з хітозаном. Антимікробна і протигрибкова активність хітозану пов'язана з позитивно зарядженими

аміногрупами, які реагують з негативно зарядженими групами ліпополісахаридів і білків на поверхні мікробних клітин, що призводить до руйнування клітинної мембрани і пошкодження клітинної стінки бактерій.

Значення рН нижче рКа хітозану ($< 6,3$) призводять до утворення полікатіонної сполуки, яка здатна взаємодіяти з негативно зарядженими групами на поверхні мікробних клітин. Хітозан при рН вище 7 втрачає свої антимікробні властивості через відсутність протонованої аміногрупи й низької розчинності.

Отже, в кислому середовищі хітозан характеризується високою розчинністю й здатністю реагувати з негативно зарядженими поверхнями бактеріальних клітин.

Комплекси хітозану з деякими металами (в основному зі сріблом, цинком та міддю) мають широкий антибактеріальний спектр й більш ефективно діють на деякі грамнегативні бактерії, включаючи кишкову паличку.

На антибактеріальну активність хітозану також впливають:

а) «вік» бактеріальної клітини (фаза її росту), що пов'язують зі змінами мембранного потенціалу на поверхні клітин. Отже, найбільш сприйнятливі до антибактеріальної дії хітозану «молоді» клітини, а найменш сприйнятливими є клітини, які вже входять в стаціонарну фазу розвитку;

б) температура, також впливає на взаємодію бактерій з хітозаном. Найбільш оптимальною є температура в діапазоні 4–37 °С. Більш низькі або більш високі температури можуть викликати зміни в структурі поверхні комірки;

в) наявність солей натрію, кальцію або магнію може мати негативний вплив на антимікробну активність хітозану, утворюючи комплекси з полімером, зменшуючи його кількість і, таким чином, послаблюючи взаємодію між хітозаном і клітинною стінкою;

г) ступінь дезацетилювання хітозану та його молекулярна маса. Вважають, що високомолекулярний хітозан здатний утворювати полімерну плівку зі стінкою мікробної клітини, яка перешкоджає транспорту поживних речовин і загибелі бактеріальних клітин. Оптимальна молекулярна маса хітозану високої антимікробної активності становить близько 92 кДа.

На грампозитивних бактеріях через більшу товщину клітинної стінки високомолекулярний хітозан виявляє кращий бактерицидний ефект, утворюючи оболонку, яка інкапсулює бактеріальні клітини. У бактерій набагато тонші клітинні стінки, тому низькомолекулярний хітозан діє найбільш ефективно, проникаючи в клітини і руйнуючи їх генетичний матеріал.

Хітозан активний проти грамнегативних і грампозитивних бактерій, а також міцеліальних грибів й дріжджів.

У медичній сфері хітозан використовувався як фізіологічний матеріал завдяки своїм протипухлинним, імуномодуючим, антимікробним й антихолестеринемічним властивостям. Виявлено, що ці характеристики залежать від хімічної структури і молекулярної маси полімеру. У фармацевтичному виробництві хітозан використовується як наповнювач в

пігулках, носій ліків з контрольованим вивільненням для поліпшення розчинення певних ліків та маскування гіркого смаку розчинів, для внутрішнього вживання. Хітозан також використовується для лікування ожиріння, бо він знижує вміст жиру в організмі, гальмуючи його всмоктування в дванадцятипалій кишці й збільшує екскрецію ліпідів, що сприяє зниженню маси тіла. Він використовується для лікування ускладнень, що виникають у пацієнтів з нирковою недостатністю, включаючи високий рівень холестерину та для боротьби з безсонням. Хітозан пришвидшує згортання крові. Його використовують у пов'язках як засіб з гіпоалергенними, антибактеріальними та знеболюючими властивостями завдяки чому, рани швидко загоюються.

У спробі допомогти «донорській тканині» прижитися, пластичні хірурги застосовують хітозан безпосередньо в тих місцях організму, звідки взяли тканину, для пересадки. Деякі вчені дійшли до висновку, що для деяких тварин застосування хітозану та його похідних показало позитивні результати при виправленні дефектів кісток.

Було знайдено цікаве застосування хітозан-кальцій-фосфатного цементу. Хітозан гліцерофосфат змішували з кальція фосфатом й цитратною кислотою, утворюючи ін'єкційну самозастигаючу систему для відновлення кісток.

Хітозан це також новий біоматеріал для стоматологічних застосувань, починаючи від реставраційної стоматології та закінчуючи тканинними каркасами для альвеолярного відростка і комплексного лікування парадонту. Застосовують хітозан безпосередньо для лікування ясен, щоб позбутися запалення, яке може привести до втрати зубів, або у складі жувальних гумок запобігання карієсу. Поширеною хірургічною процедурою є лікування грижі з використанням звичайних протезів. Однак вони викликають утворення перитонеального інтерфейсу, що не зовсім бажано. Доведено, що нові біоматеріали з хітозаном є чудовими засобами з точки зору регенерації черевної порожнини та сприяють швидкому відкладенню колагену, що має вирішальне значення для механічної поведінки регенованої тканини.

Тривалий час для лікування хвороби Паркінсона використовували психodelічний препарат, який викликає вивільнення лактатдегідрогенази. Потім вчені виявили, що цей ефект може викликаний хітозаном, що збільшує життєдатність клітин за рахунок пригнічення потенціалу мітохондріальної мембрани. Хвороба Альцгеймера викликає загибель холінергічних нейронів, відкладення амілоїду, ацетилхоліну, порушення динамічної рівноваги між іонами металів. Хітозан має позитивний вплив на нейрони, оскільки він пригнічує запалення. На відміну від нього сучасні синтетичні засоби неефективні. Встановлено, що перацетильовані хітозанові олігоцукри знижують вивільнення лактатдегідрогенази та активних форм кисню, а також ослаблюють зниження мітохондріального мембранного потенціалу.

Унікальні якості хітозану такі як, біосумісність, неканцерогенність, антиоксидантність, бактерицидність, нетоксичність, неалергенність, гемостатичність знайшли широке застосування в терапевтичній, хірургічній та ортопедичній стоматології та імплантології. У щелепно-лицьовій імплантології

під час нанесення на титанові імпланти хітозан сприяє прискоренню остеоінтеграції. Відомо, що водорозчинний, біосумісний та біодеградуєчий полімер хітозан та продукти його розпаду можуть стимулювати синтез глікозаміногліканів, необхідних для функціонування суглобного хрящу.

Новим підходом для поліпшення остеоіндуктивних властивостей поряд з підвищенням біорезорбції є використання модифікованих гідроксиапатиту, наприклад, карбонатгідроксиапатиту $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$ (КГАП), який більш чітко відтворює склад кісткової тканини порівняно з немодифікованим ГАП і характеризується підвищеною біорезорбцією внаслідок мікровикривлень, які виникають під час входження карбонат-іону в структуру апатиту. Наявність у складі склокристалічних матеріалів карбонатгідроксиапатиту В-типу дозволить суттєво підвищити їх біологічну активність за рахунок наближення їх складу до складу молодшої кістки. Збільшення вмісту CO_3^{2-} іонів і зменшення температури синтезу приводить до зменшення розміру кристалів КГАП і зростання початкової швидкості його розчинення і розчинності; різноспрямована дія факторів розміру кристалів і ступеня заповнення А-позицій приводить до немонотонної зміни швидкості розчинення внаслідок збільшення вмісту CO_3^{2-} іонів.

Одержання КГАП в структурі склокристалічних матеріалів можливе, зокрема під час введення до їх складу карбонатвмісних органічних компонентів. Для створення функціональних матеріалів з метою заміщення кісткових дефектів доцільно використовувати дешеві, технологічні та безпечні компоненти, зокрема замінити білок на імуноінертний полісахарид хітозан, який характеризується біосумісністю та антибактеріальними властивостями. Введення хітозану до складу фосфатів кальцію також дозволить вирішити проблему раціонального використання хітину – природної сировини морів та океанів. Отриманий з водяного розчину при низькій температурі з додаванням хітозану нанокристалічний карбонат-апатит може бути використаний для заміщення кісткових дефектів з активацією біорезорбції карбонат-апатиту.

Перспективним напрямком сучасного матеріалознавства є створення біоактивних карбонатвмісних керамічних та склокристалічних матеріалів СКМ зі скороченими термінами зрощування, які можна використовувати за змінних навантажень кісткового скелету. Біоактивні імпланти на основі карбонатгідроксиапатиту одержують шляхом синтезу окремих матеріалів або введенням карбонатної групи в структуру ГАП карбонатвмісними органічними компонентами. Відомо, що композити, одержані на основі ГАП та хітозану, характеризуються високою біосумісністю та антибактеріальною активністю, пластичністю, високою адгезією та мають виражений гемостатичний ефект та використовуються у кістковому ендопротезуванні як ортопедичні біоматеріали з підвищеною резорбцією. Однак використання біоактивної кераміки на основі КГАП обмежується її низькими механічними властивостями.

Введення хітозану до складу СКМ не тільки дозволяє наблизити їх склад до складу молодшої кістки за рахунок кристалізації КГАП у їх складі, а також зменшити собівартість імплантатів та підвищити технологічність процесу їх

одержання шляхом зниження температури термообробки та заміни вартісних синтетичних компонентів вітчизняними природними сировинними матеріалами, що є важливим фактором для забезпечення конкурентоспроможності продукту. Використання хітозану як носія карбонатних груп у складі фосфатів кальцію також дозволить вирішити проблему раціонального використання хітину. Для одержання карбонатвмісних склокристалічних матеріалів до складу склокристалічного матеріалу додають полісахариди хітозан. Введення такої кількості полісахаридів призведе до заміщення іонів PO_4^{3-} на іони CO_3^{2-} та утворення КГАП В-типу, що є необхідним для формування молодшої кістки.

Відомо, що за нагрівання солей хітозанів у інтервалі 50–400 °C видаляється сорбована вода, відбувається дегідратація сольових груп та N-ацетилювання аміногруп, що характерно для хітину, (можлива також поява аміногруп); зменшується розмір кристалів, підвищується однорідність аморфної фази, збільшується зшивання макроціпків.

Температурні перетворення мінеральної складової композиційних біоматеріалів на основі хітозану та апатиту дозволили встановити, що утворення і міграція карбонатних іонів пов'язані з піролітичним розкладанням хітозану і термоактивованим захопленням продуктів цього розкладання кристалічною решіткою ГАП. Заміщення в структурі ГАП фосфат-іонів карбонат-іонами супроводжується утворенням вакансій у катіонній підгратці. У ході вивчення термічної стійкості КГАП було виділено три зони, які відповідають визначеним процесам, що протікають у ході нагрівання КГАП. Відмічено включення карбонат-іонів у решітку ГАП за 500 °C. Однак, інтенсивність ліній іонів CO_3^{2-} зменшується зі збільшенням температури та повністю зникає за 900 °C. За температури > 1000 °C ГАП втрачає іони та перетворюється на оксигідрооксиapatит. Введення імуноінертного полісахариду хітозану до складу резистивних кальційсилікофосфатних склокристалічних матеріалів дозволить підвищити рівень їх резорбції та забезпечити формування апатитового шару на поверхні в умовах дії фізіологічного розчину та одержати біоактивні склокристалічні матеріали за одностадійним режимом за зниженої температури термообробки за 850 °C. Одержані біоактивні композиційні склокристалічні матеріали з поліцукрами можуть бути використані для заліковування кісткових дефектів та у як резорбуючий компонент у складі поверхнево-активних склокристалічних матеріалів для одержання ендопротезів у ортопедії та хірургії на навантажуваних ділянках кісткової тканини.

2.3.1.3 Колаген

Найбільш відомим із сучасних природних біоматеріалів є колаген. Його широке застосування в медицині пов'язане з розвитком реконструктивної хірургії та пошуком нових матеріалів, що виконують каркасну та пластичну функції під час регенерації тканин (рис. 2.15).

Колаген (від фр. *collagène*, утвореного від грец. κόλλα [колла] – «клей» + γένης – «твірний») – головний білок сполучної тканини тварин (до 25 % від маси білків організму). Колаген це глікопротеїн, фібрилярний білок, що становить основу сполучної тканини організму (сухожилля, кістка, хрящ, дерма тощо) й забезпечує її міцність і еластичність. Колаген відсутній у рослин, бактерій, вірусів, найпростіших та грибів.

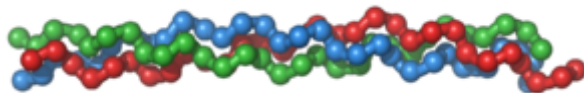


Рисунок 2.15 – Структура колагену

Колаген – найбільш поширений білок у нашому організмі. Він знаходиться в сполучних клітинах та має велике значення для людини. Завдяки колагену в клітинах виробляються волокна, які й поєднують усі тканини організму. Всередині кожного з нас щодня продукується велика кількість такого білку. Але з кожним прожитим роком кількість його в організмі меншає. Тому потрібно постійно поповнювати запас речовини. Колаген впливає на еластичність шкіри, роботу суглобів, нігті, волосся, міцність зубів.

Колаген використовують у медицині та косметології. Щоб якомога довше залишатися красивою й зберегти свою шкіру молодою та підтягнутою, жінки все частіше звертаються до засобів по догляду за обличчям, які містять колаген. Такий білок підтримує форму та пружність шкіри, допомагає засвоєнню поживних речовин та утримує водний баланс усіх тканин організму. Він зміцнює зв'язки та сприяє збільшенню гнучкості самих суглобів.

Є три види синтетичного колагену, які найбільше підходять людині: тваринний, морський та гідролізований. Перший та другий види – найбільш засвоювані та доступні. Третій синтезують, об'єднуючи окремі частинки амінокислот. Такі препарати досить вартісні через складну технологію. До основних переваг колагену як пластичного біоматеріалу слід віднести його низьку токсичність та антигенність, високу механічну міцність та стійкість до тканинних протезів. Джерелами отримання колагену при виготовленні виробів для пластичної хірургії служать тканини, багаті на цей білок – шкіра, сухожилля, перикард та кістка.

Широке поширення в медичній практиці набув розчин шкірного колагену, що випускається фірмою Collagen Corp. (Palo-Alto USA), під назвами «Zyderm» та «Zyplast». На основі цього колагену розроблені різні вироби медичного призначення, такі як імпланти, покриття для ран, хірургічні нитки для ушивання ранових поверхонь тощо.

У 70-х роках ХХ століття було вперше отримано дані про вплив колагенових трансплантатів на репарацію кісткової тканини. Було встановлено, що колагенові імпланти сприяють проліферації фібробластів, васкуляризації прилеглих тканин і, мабуть, індують формування нової кісткової тканини з її перебудовою. Як швидкий біодеградуєний матеріал колаген був застосований і у вигляді гелю для відновлення кісткових дефектів. Отримані результати також

дозволили припустити, що препарати на основі колагену здатні стимулювати регенерацію кісткової тканини.

Одночасно для заміщення дефектів кісткової тканини були розпочаті дослідження та щодо застосування біокомпозиційних матеріалів, що містять одночасно колаген та гідроксиапатит (ГАП).

Так, для щелепно-лицьової хірургії та хірургічної стоматології були розроблені композиції «Alveloform» та «Bigraft», що містять очищений фібрилярний шкірний колаген та частинки ГАП (фірма Collagen Corp., Palo Alto, USA). Дані матеріали були застосовані для відновлення альвеолярного гребеня під час хірургічного лікування хворих на пародонтити.

Гістологічні та ультраструктурні дослідження довели, що композиція «колаген – ГАП» позитивно впливає на регенерацію кістки гребеня, але ці матеріали виконують головним чином каркасну функцію, тобто проявляють остеокондуктивні властивості. Пізніше до таких висновків дійшли й інші дослідники і на даний час цієї точки зору дотримується більшість вчених.

За даними іншої групи дослідників біокомпозиційні матеріали, що містять шкірний колаген «Ziderm» та синтетичний ГАП, мають певні остеогенні властивості. Так, Katthagen та співавтори (1984), вивчаючи дію матеріалу «Колапат», що містить шкірний колаген типу 1 і частинки високодисперсного ГАП на процес відновлення кісткових дефектів стегнової кістки у кроликів, встановили, що регенерація кісткової тканини у дослідних тварин протікала в 5 разів швидше. Ці експериментальні результати лягли в основу подальшого застосування матеріалу «Коллапат» у клінічній практиці.

Загальновідомо, що найбільш ефективним для трансплантації та подальшої біоінтеграції є аутоотрансплантати, які виробляються з власних тканин пацієнта і цим повністю виключаються основні імунологічні та більшість інфекційних ускладнень під час пересадки. Однак такі матеріали отримують безпосередньо перед трансплантацією, інакше клініка повинна мати кістковий банк для зберігання цього матеріалу, що присутнє лише у дуже великих медичних установах через високу вартість приготування та зберігання даних матеріалів. Крім того, можливості отримання значних кількостей автоматеріалу обмежені його забором, тому що донор піддається серйозному оперативному втручанню. Усе це суттєво обмежує широке застосування аутоотрансплантатів.

Отже, в галузі лікування кісткових патологій перед ТІ стоїть реальне завдання щодо створення біокомпозиційних матеріалів, застосування яких забезпечить вирішення багатьох проблем з трансплантації клітин та стимуляції формування кістки в місцях її пошкодження, так і зниження трудових й фінансових витрат під час усунення кісткових пошкоджень хворих різного профілю.

На даний час зусиллями ряду дослідників, що працюють в галузі ТІ, розроблені та впроваджені композиційні матеріали, до складу яких входять як нативні клітини кісткового мозку, так і стромальні клітини остеогенні-попередники, вирощені в моношарових культурах кісткового мозку.

2.3.1.4 Целюлоза

Целюлоза $(C_6H_{10}O_5)_x$ – природний полімер, поліцукор, волокниста речовина, головна складова частина оболонки рослинних клітин (рис. 2.16). Вона є найбільш поширеним поліцукром у природі і є основним компонентом стінок клітин вищих рослин і є повторюваним залишком β -глюкози. Як і колаген, целюлоза характеризується високою біосумісністю, здатністю до клітинної адгезії, високим рівнем гідрофільності. Даний матеріал має значний поріг міцності під час розтягування і легко піддається механічній обробці.

Головними недоліками целюлози є низька біодеградація внаслідок відсутності у людини специфічних ферментів гідролаз для її розщеплення і висока щільність розташування нанофібрил, що обмежує заселення скаффолду потрібними клітинами. Для усунення цих недоліків у ТІ використовують похідні целюлози, що містять карбоксиметилцелюлозу, гідроксиетил целюлозу, гідроксипропілцелюлозу, гідроксипропілметилцелюлозу та ацетат целюлози.

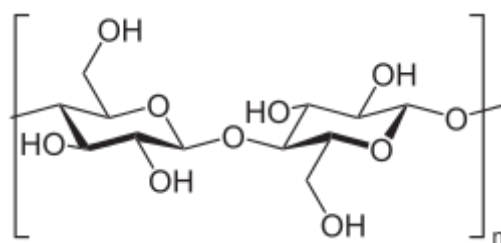


Рисунок 2.16 – Хімічна структура целюлози

Сьогодні бактеріальну целюлозу вважають універсальним матеріалом майбутнього і вже зараз її використовують у хірургії та промисловості. Завдяки своїм відмінним фізичним і хімічним властивостям бактеріальна целюлоза має багато нових застосувань. Внаслідок її схожості зі структурою позаклітинної матриці, біоматеріали на основі бактеріальної целюлози широко досліджувалися для біомедичних застосувань, таких як тканинна інженерія та доставка ліків. Останні досягнення в галузі нанотехнологій направлені на модифікацію бактеріальної целюлози і створення композитів на її основі для різних застосувань: перев'язки ран, штучної шкіри, інженерії судинних тканин, регенерацію кісткової тканини, доставки ліків і т. д.

Одним із головних продуцентів цього чудового матеріалу є бактерія *Glucanoacetobacter xylinum*. Бактеріальна целюлоза має низку переваг порівняно з її рослинним аналогом. Мікробіологічну целюлозу здатні синтезувати представники роду *Agrobacterium*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Sarcina*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes* та *Mycodema*. Але класичним виробником цього матеріалу вважається бактерія *Glucanoacetobacter xylinum*. Ця грамнегативна паличкоподібна строго аеробна бактерія може використовувати як субстрат різні джерела вуглецю та азоту. Продуковані нановолокна більш довгі, широкі та міцні, ніж волокна рослинної целюлози. Отриманий матеріал відрізняють підвищена еластичність та відсутність домішок геміцелюлоз та лігніну, які завжди зберігаються навіть

після ретельного очищення матеріалу рослинного походження. Бактеріальна целюлоза утворює досить міцну гелеву плівку з певною структурою з кристалічних мікрофібрил. Така структура дозволяє утримувати недоступну для рослинної целюлози кількість води. Якщо в ході біосинтезу додати желатин, то утворюється щільна та однорідна плівка з покращеною оптичною прозорістю та підвищеною гігроскопічністю.

Продукт життєдіяльності *Gluconoacetobacter xylinum* використовують у медицині для виробництва штучної шкіри. Бактеріальна целюлоза відіграє активну роль у стимулюванні регенеративних процесів, допомагаючи відновленню базальної мембрани та прискорюючи епітелізацію та рубцювання ран. Якщо таку плівку змочити фізіологічним розчином, вона набуває прозорості, еластичності і щільності – властивостей, які притаманні людській шкірі. Крім того, вона має селективну проникність для газів і пари, залишаючись бар'єром для води та бактерій. Завдяки таким властивостям, гель-плівка бактеріальної целюлози може бути матрицею-носієм практично для будь-яких ліків. З неї створюються біофільтри, що іммобілізують мікроорганізми та ферменти для зовнішнього та внутрішнього застосування в медицині. Така плівка може бути використана як штучний хрящ, прекурсор кісткової тканини і як універсальне покриття за різних видів травм. Якщо до волокна бактеріальної целюлози додати крохмаль, то утвориться продукт, структурою схожий на піну. Отримані колагенові каркаси біологічно активні і підходять для клітинної адгезії, тому вони можуть бути використані для ранової пов'язки або штучної тканини.

2.3.1.5 Фібронектин

Фібронектин – один з ключових білків міжклітинної матриці, структурний глікопротеїн, що синтезується й виділяється в міжклітинний простір багатьма видами клітин. Фібронектин – речовина, що формує фібрилярні структури сполучної тканини.

Це еволюційно найбільш давній білок, який є поліфункціональним регулятором практично всіх клітин тварин й людини. Фібронектин міститься в цереброспінальній й синовіальній рідині, а також на поверхні фібробластів, базальної мембрани, в міжклітинній матриці. Молекула фібронектину представлена двома поліпептидними субодинами, які сполучені дисульфідними зв'язками (рис. 2.17). У фібронектіні містяться п'ять доменів, які зв'язуються з інтегрином клітин, колагеном, фібрином, гепарином та іншими компонентами внутрішньоклітинної матриці.

Фібронектин здатний зв'язувати колаген, протеоглікани, гіалуронову кислоту, вуглеводи плазматичних мембран, гепарин, фермент трансглютаміназу й, відповідно, може виконувати інтегруючу функцію в організації міжклітинної речовини, а також збільшувати клітинну адгезію за рахунок здатності зв'язуватися з трансмембранними інтегринами. Контрольована швидкість

біодеградації, відсутність токсичності та запальних реакцій дозволяють використовувати фібронектин у тканинній інженерії.

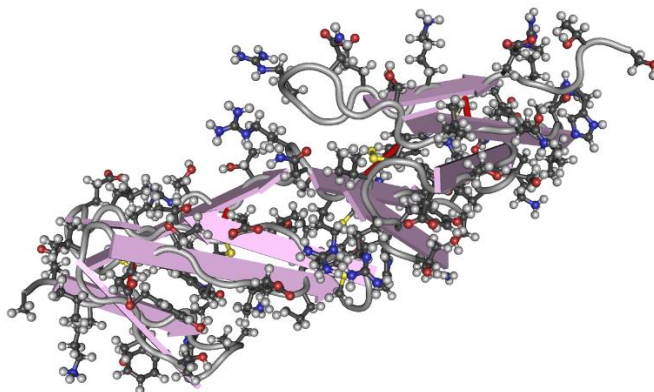


Рисунок 2.17 – Доменна структура фібронектину

Існують 2 форми глікопротеїду: розчинна (плазменна) й нерозчинна (тканева):

розчинний фібронектин плазми (який раніше називали «холоднорозчинним глобуліном», або СІg) є білковим компонентом плазми крові (300 мкг/мл) й виробляється в печінці гепатоцитами;

нерозчинний клітинний фібронектин є основним компонентом позаклітинного матриксу. Він секретується різними клітинами, в першу чергу фібробластами, як розчинний білковий димер, а потім збирається в нерозчинну матрицю в складному клітинно-осередкованому процесі.

За даними ряду авторів, тканинний фібронектин входить до складу базальної мембрани багатошарового плоского епітелію слизової оболонки роту, власної пластинки слизової оболонки роту, сполучної тканини періодонта, пульпи, часто розташованої в навколоклітинному просторі остеоцитів, стінок кров'яних судин, окістя, ендоості та періодонтальної зв'язки. Рецептор фібронектину присутній на фібробластах, остеобластах, цементобластах.

Джерелами тканинного й плазменного фібронектину є нейтрофіли, макрофаги, тромбоцити, фібробласти, на поверхні яких він розміщений у вигляді комірчастої мережі, епітеліальних клітин, моноцитів, тканинних базофіл.

Функції фібронектину дуже різноманітні. Відома його участь у процесах регенерації, фагоцитозу, синтезу колагену, згортання крові та регуляції міжклітинних взаємодій. Плазменний фібронектин у значній мірі визначає фагоцитарну функцію ретикулоендотеліальної системи в захисті від інфекції, він відіграє важливу роль у очищенні крові від продуктів розпаду колагену. Його знижений вміст у крові послаблює фагоцитоз, порушує клітинну взаємодію, сприяє порушенню інших імунологічних функцій, що веде до імунодефіциту.

Основна функція фібронектину – зв'язування клітин з міжклітинними речовинами. Він сприяє адгезії і формуванню епітеліальних й мезенхімальних

клітин, стимулює проліферацію та міграцію, контролює диференціацію та підтримання клітин цитоскелета. Фібронектин, взаємодіючи з колагеном, регулює збір колагенових фібрил.

Значною є роль фібронектина у регенерації та заживленні ран. У період спалення фібробластів під дією цитокінів, які виділяються макрофагами, вони проліферують й мігрують до місця пошкодження. Зв'язок з фібрилярними структурами вони здійснюють через фібронектин, який утворює шляхи для міграції клітин. Фрагменти цього глікопротеїду також є одними з хемоатрактантів для макрофагов, які мігрують у вогнище запалення. Макрофаги в процесі відновлення в щелепно-лицьовій частині починають інтенсивно синтезувати фібронектин й глікозоаміноглікани. Фібробласти, що знаходяться в тканинах келоїду, синтезують в чотири рази більше фібронектину і мають більшу кількість його рецепторів, аніж у здоровій тканині.

2.3.1.6 Альгінат й агароза

Альгінат й **агароза** – лінійні поліцукри, що виділяються з червоних і бурих водоростей [35]. Зазвичай ці поліцукри використовують разом для покращення механічних та адгезивних властивостей (рис. 2.18).

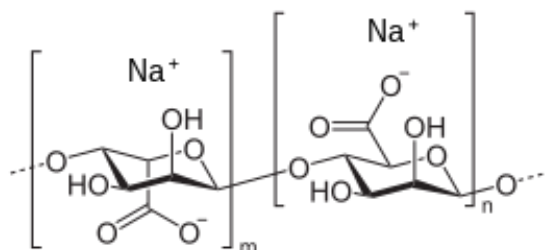


Рисунок 2.18 – Хімічна структура альгінату

Альгінат ($C_6H_7O_6Na)_n$) є поєднанням таких мономерів, як β -D-маннууронова кислота та α -L-гіалуронова кислота, а агароза складається з β -D-галактопіранози та 3,6-ангідридо- α -1-галактопіранози. За присутності двовалентних катіонів, таких як Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} та Sr^{2+} , ці полісахариди піддаються іонотропному гелеутворенню. Матеріал має добру біосумісність, пористість, оптимальну для клітинної міграції та доставки поживних речовин, а також підтримки хондрогенного диференціювання. Проте біодеградація альгінату та агарози є досить повільним та мало контрольованим процесом.

Солі альгінової кислоти – альгінати, зокрема альгінат натрію та калію, у воді утворюють колоїдні розчини, на відміну від нерозчинної альгінової кислоти. У бурих водоростях альгінові кислоти містяться в формі розчинних і нерозчинних солей – альгінатів калію, натрію, магнію, кальцію.

Альгінат взаємодіє з хітозаном, виступаючи як протиіон, утворюючи поліелектролітні комплекси (ПЕК). ПЕК утворюються мимовільно і не вимагають агресивних зшиваючих середовищ і агентів. Недолік методу утворення ПЕК полягає у його залежності від pH.

Хітозан є слабкою кислотою, альгінат – слабка основа, тому за зміни рН комплекси можуть розпадатися. Якщо передбачається використання кон'югатів у широкому діапазоні рН, необхідно розробити метод міцнішого зв'язування комплексів.

Широке використання альгінатів обумовлено їхньою високою сприйнятністю організму та нешкідливістю, вони включені в групу сполук, визнаних безпечними (GRAS). Альгінати не змінюють водно-сольового балансу, не поглинають у кишечнику сірководень, необхідний для перистальтики, не зазнають метаболічних перетворень в організмі, не токсичні та виводяться з організму протягом 24–48 годин.

Під час перорального введення альгінату не спостерігалось виникнення специфічних імунних реакцій, таким чином, альгінат є нетоксичним і біологічно розкладається носієм у ході перорального застосування. Незважаючи на велику кількість досліджень у галузі біосумісності альгінату, існують деякі розбіжності з цього приводу. У разі внутрішньовенного введення для більшості комерційних альгінатів була зареєстрована індукція зовнішньої імунної реакції та фіброз, тоді як інші звіти показують відсутність імунної реакції на введені імплантати з альгінату.

Комерційно доступні альгінати, очищені методом електрофорезу у вільному потоці, не провокували специфічні реакції принаймні протягом трьох тижнів після імплантації в черевну порожнину гризунів. Таким чином, можна припустити, що імунна відповідь на внутрішньовенні ін'єкції була визвана токсичними домішками у комерційних препаратах.

Агароза широко використовується в біомедичних цілях завдяки її контрольованим властивостям гелеутворення, розчинності у воді, регульованим механічним властивостям й неімуногенним властивостям. Агароза, виходячи з її жорсткості та функціональних груп, може підтримувати клітинну адгезію, проліферацію та активність. Агароза має регульовану водоадсорбційну здатність, що забезпечує клітинам відповідне мікрооточення для клітинної активності.

Гідрогелі на основі агарози знайшли широке застосування в дослідженні реакції механічного навантаження для хондроцитів й мезенхімальних стовбурових клітин (МСК). Агароза набула широкого спектру застосувань, таких як доставка ліків, терапія раку, тканинна інженерія та регенеративна медицина, а також діагностика захворювань, контроль і лікування. Її використовували для тканинної інженерії, включаючи нервову систему, формування кісток, регенерацію серця, загоєння ран і прикріплення до таких тканин, як шкіра, мозок й рогівка. Властивості агарози можна регулювати концентрацією, функціоналізацією та змішуванням для імітації бажаної ефективності тканини. На рисунку 2.19 показано ефективність агарозного гелю для різних тканин і клітин.

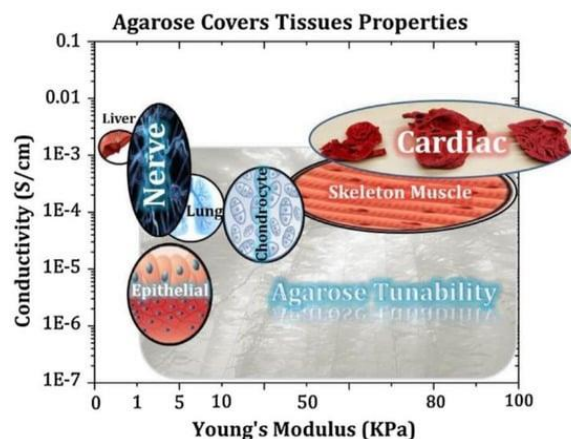


Рисунок 2.19 – Провідність і модуль Юнга біоматеріалів на основі агарози [42]

2.3.1.7 Гіалуринова кислота

Гіалуринова кислота (ГК) – природний лінійний полісахарид, що має унікальні біологічні та фізико-хімічні властивості (рис. 2.20). Гіалуринова кислота присутня в різних сполучних тканинах тварин, таких як шкіра та хрящі. Особливо багаті гіалуриновою кислотою пуповина, синовіальна рідина, склоподібне тіло та шкіра. У шкірі та хрящі роль гіалуринової кислоти полягає в зв'язуванні води та підтримуванні тону та пружності тканини. У міжтканинних рідинах в'язкий розчин гіалуринової кислоти служить пом'якшуючим компонентом, створюючи для клітин захисне середовище.

У складі живих організмів гіалуринова кислота переважно знаходиться в формі гіалуронатів. Виділяють та використовують її, як правило, у вигляді натрієвої солі гіалуринової кислоти – гіалуронату натрію.

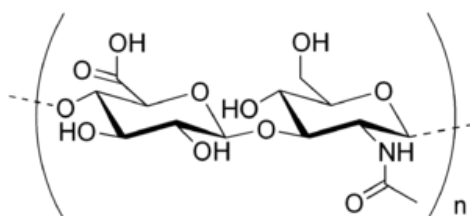


Рисунок 2.20 – Хімічна структура гіалуринової кислоти

Гіалуринова кислота має хорошу біосумісність й не викликає реакції стороннього тіла чи алергічної реакції за імплантації. Ці властивості дозволяють використовувати її в різних галузях медицини, наприклад, хірургії, дерматології, офтальмології, а також у косметології та косметичній хірургії. Сферу застосування виробів на основі ГК можна значно розширити, змінивши її фізико-хімічні властивості та підвищивши стійкість до деполімеризації і одночасно зберігаючи її біосумісність з тканинами організмів ссавців.

Нові біоматеріали на основі ГК можуть бути отримані за допомогою різноманітних реакцій щодо функціональних груп полімеру. Хімічно модифікована гіалуринова кислота в організмі піддається деградації з меншою швидкістю, а зшиті молекули залежно від типу хімічної модифікації та ступеня

перехресного зшивання утворюють щільні гідрогелі, що підтримують заданий об'єм і форму, або нерозчинні пластичні матеріали. У той же час вони зберігають біосумісність природного гіалуронату. Існують різні типи модифікації. Відомий, наприклад, спосіб зшивання ГК з використанням гідрофобного зв'язування або іонного зв'язування, яке полягає у введенні в неї нуклеофільного реагенту.

ГК бере участь у виникненні, збереженні та зникненні запалення. Вона зменшує простагландин, який активно відповідає за запалення та біль, і, отже, покращує властивості колагену й сприяє кращому загоєнню та відновленню тканин. За наявності ГК відбувається деполаризація запальних й больових процесів, які змінюють архітектуру тканин і перешкоджають метаболічному обміну. Роль ГК як протизапального засобу полягає в дії білкового комплексу, який є інтер-альфа-інгібітором. ГК є великою та гнучкою молекулою, яка може займати значний об'єм із великою кількістю вільних просторів і є впливовою в місцях, де виражена проліферація клітин. ГК втручається в процеси росту та ремоделювання, що забезпечують гідратацію, і забезпечує пластичні властивості слизової оболонки. Ферменти, які спеціально розщеплюють ГК, – це гіалуронідази або гіалурооглікозамінідази, які філогенетично збереглися від бактерій.

ГК може виступати в якості містка для центральних білків, таких як протеїн хряща, агрекан й версикан, і є основою для великих протеогліканових комплексів. Він регулює клітинну міграцію та проліферацію шляхом приєднання до поверхневих рецепторів, таких як CD44, і є рецептором гемаглютиніну (НА), який експресується в лейкоцитах, епітеліальних клітинах, фібробластах й м'язових клітинах. Вона зберігає свою структуру та структуру тканини завдяки взаємодії між клітинами та адгезії до клітинної матриці. Ізоформи CD44 беруть участь у початковому зв'язуванні лейкоцитів з ендотеліальними клітинами, активованими процесами запалення та болю. Зв'язування НА з рецептором CD44 опосередковує початкову адгезію запальних клітин до судини, що забезпечує екстравазацію, а не запалення. Позаклітинно ГК синтезується ферментами, розташованими на поверхні клітини без будь-якого ковалентного зв'язку з ядром білка та ГК-синтетазами.

2.3.2 Синтетичні полімери

2.3.2.1 Полієфіри

Хоча біополімери природного походження мають переваги, їх використання може бути обмежено через низькі механічні властивості та високу швидкість деградації. Після спроб використання природних полімерів як каркасів, увагу було приділено синтетичним полімерам. Крім того, що вони біосумісні й біорезорбційні, синтетичні полімери мають переваги перед біологічно отриманими біополімерами.

Синтетичні полімери мають контрольовану швидкість деградації, передбачувані та відтворювані механічні властивості, а також простоту виготовлення завдяки індивідуальним формам й розмірам. Крім того, синтетичні полімери мають тривалий термін зберігання й їх можна стерилізувати. Однак вони можуть мати недоліки, наприклад, викликати стійкі запальні реакції за ерозії, бути механічно невідповідними або нездатними інтегруватися з тканинами господаря. Ці недоліки можна подолати шляхом вибору відповідних синтетичних біополімерів й шляхом модифікації та функціоналізації їх структур до специфіки тканинної інженерії. Синтетичні поліефірні полімери, що розкладаються, мають широке розповсюдження та використовуються як будівельні матеріали в інженерії кісткової тканини. Поліефіри характеризуються складноефірними функціональними групами вздовж їх остову, які утворюються шляхом конденсаційної полімеризації між карбоксильною й гідроксильною групою мономерів-попередників.

Двома широко використовуваними мономерами є молочна та гліколева кислоти. Вони є ендogenousними для метаболізму людини. Поліефіри можуть розкладатися шляхом гідролізу до природніх продуктів метаболізму. Досліджені насичені полі(а-гідрокси)ефіри, такі як полімолочна кислота (PLA), полігліколева кислота (PGA), полікапролактон (PCL) та їх сополімери.

Серед цих стереоізомерів PCL представляє особливий інтерес для виготовлення матриць кісткової тканини, оскільки характеризується гарною біосумісністю *in vivo* та високою остеоіндуктивністю. PGA використовується як будівельний матеріал завдяки її відносно гідрофільній природі. PLA та PGA зазнають об'ємної ерозії внаслідок гідролізу ефірних зв'язків у продукти розпаду.

PGA швидко деградує у водному розчині *in vivo* та повністю розсмоктується протягом 4–6 місяців, що призводить до її передчасного механічного руйнування. Тому використання PGA обмежене для виготовлення каркасів у кістковій інженерії. Швидкості деградації PLA й PGA можуть бути визначені в наступному порядку: PGLA > PGA > PDLLA > PLLA.

Зниження швидкості деградації PCL схожа на PLA і PGA, але вони мають набагато меншу швидкість деградації, в першу чергу, завдяки своїй високій кристалічності. Завдяки здатності сприяти росту остеобластів й підтримувати свій фенотип, каркас PCL використовувався як довготривалий імплантат у інженерії кісткової тканини. Фізичні властивості поліефірів, які обговорюються, перелічені у таблиці 2.6.

Ці поліефіри залишаються популярними з різних причин, переважно завдяки високій біосумісності й здатності до біологічного розкладання. Кислотні продукти розкладання полімеру можуть бути метаболізовані різними фізіологічними шляхами тканини. Завдяки властивості деградації ці полімери використовуються в медичних пристроях, схвалених Управлінням з харчових продуктів і медикаментів США (FDA) для клінічного використання на людях, наприклад у хірургії швів. Однак виділення кислотних продуктів розпаду може викликати серйозну запальну реакцію в організмі.

Таблиця 2.6 – Механічні властивості та тривалість деградації синтетичних аліфатичних поліефірів

Полімери	Розтягуюча або стискаюча міцність (МПа)	Модуль пружності	Тривалість деградації (міс.)
PDLLA:	Гранули 35–150 Плівка або диск: 29–35	Плівка або диск: 1,9–2,4	12–16
PLLA:	Гранули: 40–120 Плівка або диск: 28–50 Волокно: 870–2300	Плівка або диск: 1,2–3,0 Волокно: 10–16	>24
PGA	Волокно: 340–920	Волокно: 7–14	6–12
PLGA	41,4–55,2	1,4–2,8	Регульований
PCL	10–15	0,15–0,33	>24
P3HB	25–45	1,5–1,8	Дуже повільно

З 1990 років почали використовуватись інші види аліфатичних поліефірів: полігідроксіалканоати (РНА), зокрема полі-3-гідроксибутират (РЗНВ), сополімер 3-гідроксибутирату та 3-гідроксивалерат (РНВВ), полі-4-гідроксибутират (Р4НВ), сополімери 3-гідроксибутирату та 3-гідроксигексаноату (РНВННх) та полі-3-гідроксіоктаноату все частіше досліджуються як матеріали для створення каркасів для застосування в тканинній інженерії завдяки їх високій біосумісності.

Це натуральні термопластичні поліефіри з широкою кінетикою біодеградації, яку можна регулювати за допомогою термообробки, і це робить РНА привабливими як біоматеріали для більш широкого застосування в медичних пристроях. Механічні властивості РНА можуть регулюватися шляхом змішування з іншими полімерами або неорганічними матеріалами, щоб відповідати конкретним вимогам різних застосувань.

РЗНВ є міцним, крихким полімером і важливим елементом сімейства РНА. Цей полімер розкладається без залишків небажаної хронічної запальної реакції впродовж року після імплантації. Обмеженням використання деяких РНА полягає у їх неефективному промисловому виробництві й трудомісткості процесу очищення від бактеріальних культур, які вимагають відповідної системи екстракції.

Отже, проблема їхньої корисності полягає в тому, щоб знизити собівартість продукції в процедурі вилучення у промислових масштабах. Загалом, члени сімейства РНА деградують повільніше, ніж PLA (як правило, цей строк перевищує три роки). Цей низький рівень деградації перешкоджає їх застосуванню у відновленні кісток, які зазвичай загоюються протягом декількох місяців.

2.3.2.2 Еластомери

За останні 10 років опубліковано ряд наукових статей щодо розробки та клінічного застосування синтетичних біодеградуєчих еластомерних біоматеріалів для тканинної інженерії. Поширення набули еластомерні полімери (еластомери), оскільки вони можуть забезпечити механічну стабільність й стійку еластичність тканин та органів без механічного подразнення.

Серед багатьох еластомерних полімерів слід відмітити полігліцеринсебацат (PGS) який є міцним, синтетичним еластомером з поперечними зв'язками, здатний до біорозкладання, який широко вивчений як матричний біоматеріал у тканинній інженерії та регенеративній медицині.

Синтезують полімер за допомогою реакції поліконденсації (естерифікації) гліцерину та себацінової кислоти, утворюючи полімер, який можна одержати у вигляді розплаву або розчину в органічному розчиннику. Потім преполімер реагує з утворенням тривимірного нещільно зшитого полімеру. Модуль Юнга PGS знаходиться в діапазоні 0,056–1,2 МПа, а відносне подовження за розриву – від 41 до 448 % залежно від умов синтезу.

PGS має широкий діапазон кінетики деградації, який можна змінювати. Крім того, він показав високу біосумісність з кількома типами клітин. Дослідження впливу умов синтезу на механічні властивості та цитосумісність PGS, показали, що модуль і межа міцності на розрив збільшується з тривалістю затвердіння. Крім того, життєздатність клітин мишачих фібробластів була кращою для зразків PGS. Оцінка *in vivo* показала, що PGS має сприятливу реакцію тканин зі значно меншим запаленням порівняно з полі(α-гідроксикислотою) (PLGA). Крім того, багато досліджень показали, що цей еластомер має гарну біосумісність *in vivo* у тканинній інженерії.

Вважають, що швидка деградація PGS обмежує їх застосування для використання як будівельних матеріалів в тканинах, тривалість загоєння яких складає декілька місяців або років. Щоб подолати ці обмеження, створюють композит з біокерамікою PGS. Це може бути потенційною стратегією. Наприклад, дослідження композитів PGS Bioglass показали, що додавання наповнювача Bioglass до PGS може контролювати кінетику деградації, яка не залежить від механічних властивостей композитів. На додаток, композити мають значно покращену біосумісність порівняно з чистим PGS.

2.3.2.3 Системи адресної доставки лікарських агентів на основі полімерів

Розробка нових ефективних систем доставки лікарських засобів є актуальною задачею сучасної біотехнології. Зараз розроблені і введені в практику ряд систем доставки лікарських засобів, які дозволяють значно покращити адресність і зменшити можливі побічні ефекти. Актуальними є розробки, в яких використовуються синтетичні та природні полімери

(полімерні міцели, дендримери, наногелі, нанокапсули, нано- і мікрочастинки) й ліпосомні системи (табл. 2.7).

Таблиця 2.7 – Природні та синтетичні полімери, а також їх комбінації, які використовуються для засобів доставки лікарських засобів

Природні полімери	Синтетичні полімери	Комбінації природних й синтетичних полімерів
Аніонні полімери: гіалуронова кислота альгінова кислота Катіонні полімери: хітозан, полілізин Амфіфільні полімери: колаген, желатин, фібрин Нейтральні полімери: декстрин, пуллулан	Поліетиленгліколь, поліпропіленгліколь, полімолочна кислота, сополімери молочної й гліколевої кислоти, пполікапролактон, полігідроксibuтират, полівінілацетат, поліфосфазени, поліфосфоефіри	Пегильовані пептиди й полісахариди, колаген-акрилат, альгінат-акрилат, Сополімери полі(нізопропілакриламід) з поліцукрами (гіалуронової кислоти, декстринами)

2.3.3 Застосування синтетичних неорганічних матеріалів для тканинної інженерії

2.3.3.1 Основні види біокераміки для кісткової тканини та їх застосування

Регенерація кісткової тканини є одним із найбільш складних і унікальних типів відновлення тканин. Вона досить тривала (порівняно, наприклад, із м'якими тканинами), однак забезпечує повну ідентичність пошкодженої ділянки із нормальною кісткою. Остеопластичний матеріал має мати наступні властивості: біосумісність; здатність до резорбції та поступового заміщення кістковою тканиною, до швидкої інтеграції з нею, до остеокондуктивності та остеоіндуктивності; відносну простоту введення в місце дефекту та можливість моделювання під час оперативного втручання.

Остеопластичні матеріали класифікують за походженням на **біогенні** (ауто-, ало- і ксенотрансплантанти) та **синтетичні**, за здатністю впливати на остеогенез – на **остеоіндуктивні** (індукція диференціації клітин в остеогенні), **остеокондуктивні** (створення умов для адгезії та зв'язування остеогенних клітин, виконують роль матриці, забезпечують неоваскуляризацію), **остеоінтеграційні** (забезпечують прямий структурно-функціональний зв'язок між кісткою і трансплантантом); **остеонейтральні** (для заповнення афункціональних просторів, інертні та нерезорбційні).

Протягом останніх років у використанні кераміки відбулася революція, яка покращила якість життя людини. Такою революцією стала розробка спеціальних керамік для відновлення та реконструкції хворих, пошкоджених

або видалених частин тіла. Кераміка, що використовується з цією метою, називається **біокерамікою**. Цей напрямок почав розвиватися з 1960-х років, після того як з'ясувалося, що металеві та полімерні імплантати мають суттєві недоліки. У більшості випадків клінічне застосування біокераміки пов'язане з відновленням скелетної системи, що складається з кісток, суглобів і зубів, та нарощуванням як твердих, так і м'яких тканин організму. Кераміка також використовується для заміни частин серцево-судинної системи, наприклад серцевих клапанів. Біоскло спеціального складу використовується з терапевтичною метою в терапії пухлинних захворювань. Кераміка – перспективний кандидат у біоматеріали: вона міцна, не піддається корозії, не вступає у хімічні реакції. Крім того, кераміка не стирається, що важливо для штучних суглобів, має відносно низьку густину ($2\text{--}4\text{ г/см}^3$), а також має біосумісність і навіть деяку біоактивність (поверхня керамічних імплантатів може адсорбувати біологічні молекули). Але є і мінуси: керамічні матеріали крихкі та легко руйнуються, до того ж важко зробити керамічний виріб складної форми. Керамічні імплантати за порошковою технологією.

Біокераміка за характером фазового складу поділяється на:

- монокристали (сапфір);
- полікрystalли (оксид алюмінію або гідроксилапатит);
- скло (наприклад, Bioglass®);
- склокераміка (наприклад, А/В склокераміка);
- композити (наприклад, «поліетилен – гідроксилапатит»).

За типом міжфазної відповіді керамічні імплантати класифікуються залежно від їх біологічної активності (табл. 2.8).

Таблиця 2.8 – Класифікація керамічних імплантатів залежно від типу міжфазної відповіді

Характеристика міжфазної відповіді	Характеристика кераміки	Приклад кераміки
Імплантат прикріплюється за допомогою кісткової тканини, формується на його шорсткій поверхні	Щільна, непориста, майже біологічно інертна кераміка	Al_2O_3 (моно- та полікрystalлічна)
Біологічна фіксація за рахунок вrostання кістки в пори імплантату	Пориста біоінертна кераміка	Al_2O_3 (пориста полікрystalлічна), біопокриття з ГАП-пористих металів
Біологічно активна фіксація за рахунок хімічного зв'язування з кісткою	Щільна, непориста, поверхнево-реактивна кераміка	Біоактивне скло, біологічно активне склокераміка, ГАП
Резорбція імплантату з поступовим заміщенням кістковою тканиною	Щільна, непориста або пориста кераміка, яка розсмоктується	Кальцію сульфат (гіпс), фосфати кальцію

Комерційні кальцій-фосфатні (КФ) матеріали поділяються на кераміку, некерамічні матеріали, матеріали з натуральних продуктів та склокераміку.

Біоактивна кераміка представлена наступними видами:

1) кальцій-фосфатна (оксидна) кераміка:

- гідроксиapatит;
- β -трикальційфосфат;
- біфазні кальцій фосфати (суміш ГАП та β -ТКФ, 60/40);
- фторапатит;

2) кальцій-фосфатні матеріали з природних продуктів:

- гідроксиapatит на основі коралів;
- гідроксиapatит на основі бичачих кісток;

3) склокераміка та скло на основі:

- системи $P_2O_5-SiO_2-Na_2O$;
- системи $P_2O_5-SiO_2-Na_2O-CaO$;
- системи $P_2O_5-SiO_2-CaO$;
- системи $P_2O_5-TiO_2-CaO(+GA)$;
- система $P_2O_5-SiO_2-CaO-Nb_2O_5(+Al_2O_3)$.

Біокераміка випускається у різній формі (табл. 2.9). Важливий вплив на характер поведінки в організмі має не тільки фазовий склад кераміки, але й вид та форма виробів.

Таблиця 2.9 – Форма, фази та функції біокераміки

Форма	Фаза	Функція
Порошок	Полікристал Скло	Заповнення проміжків між імплантатом й тканиною, терапевтичне лікування, регенерація тканин
Покриття	Полікристал Скло Склокераміка	Зв'язування тканин, попередження утворення тромбів, захист від корозії
Об'ємна	монокристал, полікристал, скло, склокераміка, композит (багатофазна кераміка)	Відновлення та нарощування тканин, заміна нефункціонуючих частин

Використання різних форм кераміки залежить від необхідних властивостей та функцій. Зокрема, монокристали сапфіру використовуються як стоматологічні імплантати завдяки своїй високій міцності.

Апатитволастонітова склокераміка використовується для заміни хребців завдяки високій міцності та здатності зв'язуватися з кісткою.

Біоскло має низьку механічну міцність, але воно швидко зв'язується з кістками, тому застосовуються для прискорення відновлення кісткових дефектів.

Кераміка широко використовується в стоматології як відновлювальний матеріал, фарфорово-скляні коронки, іономірні цементи зі скляним

наповнювачем тощо. Дослідження кераміки як імплантатів почалося порівняно недавно.

Застосування різних видів неорганічних матеріалів залежить від їх реакційної здатності. Розглянемо реакційну здатність керамічних матеріалів в живому середовищі та її залежність від структури та складу.

2.3.3.2 Реакційна здатність біокерамічних матеріалів

За реакційною здатністю керамічні матеріали поділяються на наступні класи:

1) **інертна біокераміка.** Не вступає в хімічну взаємодію навіть через декілька тисяч годин, проведених в екстремальних умовах (кислі або лужні середовища, присутність неорганічних, органічних та біологічних молекул), наприклад, Al_2O_3 або ZrO_2 . Біоматеріали цієї групи не утворюють будь-яких хімічних зв'язків із тканинами живого організму;

2) **біокераміка з малою реакційною здатністю.** Скло на основі системи $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaF}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$. Воно утворює зв'язки з білками, у тому числі за рахунок хемосорбції;

3) **біокераміка із середньою реакційною здатністю.** Скло на основі системи $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaF}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$. На відміну від попереднього, скло на основі оксиду кальцію не тільки утворює зв'язки з білками, але є джерелом іонів кальцію (відбувається його вилуговування);

4) **біокераміка, що повністю засвоюється живим організмом.** Наприклад, гідроксилапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ або кальцію фосфат $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Така біокераміка дуже реакційноздатна й через декілька років після імплантації місце протеза займає утворена кісткова тканина. В принципі це і є ідеальний тип штучного імплантату, оскільки в цьому випадку проблеми міцності та біосумісності не виникають взагалі. Недолік полягає в тому, що в ході «розсмоктування» в кров, лімфу та тканинні рідини переходить значна кількість матеріалу, що може негативно позначитися на здоров'ї людини. Іншою проблемою застосування біоактивних фосфатів кальцію є їх низька механічна міцність та пов'язана з цим неможливість їх застосування на навантажених ділянках кісткової тканини.

Для покращення фізико-хімічних та біологічних властивостей фосфатів кальцію необхідно: посилити біомеханіку та біосумісність матеріалів; запобігти негативному впливу на організм (поліпшити біологічну інертність); надати виробу біоактивних властивостей, що стимулює утворення нової кісткової тканини.

Відповідно до реакції організму, всі види біосумісної кераміки можна розділити на чотири основні групи (табл. 2.10).

Таблиця 2.10 – Типи взаємодії тканини з біокерамічними біосумісними протезами

Тип імплантату	Тип кріплення до кісткової тканини	Приклад біокераміки
Інертний	Механічне взаємне зчеплення (морфологічна фіксація)	Оксид алюмінію Al_2O_3 , діоксид цирконію ZrO_2
Пористий	Вростання тканини в пори (біологічна фіксація)	Гідроксиапатит (ГАП), пористий метал із ГАП покриттям
Біоактивний	Поверхнєве зв'язування з тканиною (біоактивна фіксація)	Біоактивне скло, біоактивна склокераміка, ГАП
Резорбційний	Заміщення тканинами (біоактивна фіксація)	Трикальцій фосфат, біоактивне скло

2.3.3.3 Біоінертна кераміка

Біоінертність – здатність матеріалу протягом тривалого часу зберігати сталість свого складу та структури завдяки відсутності локальної та системної взаємодії з організмом або його мінімальної хімічної, електрохімічної і поверхнево-каталітичної дії.

Біоінертна кераміка практично не зазнає хімічних змін у фізіологічних умовах живого організму, зберігає свої фізичні та механічні властивості. Навколо біокераміки, особливо з гладкою поверхнею, утворюється фіброзна капсула, за допомогою якої організм захищається від стороннього тіла (біологічний відгук). Товщина та клітинний склад капсули є мірою біосумісності матеріалу.

Закріплення імплантату з біокераміки в організмі здійснюється за рахунок механічної фіксації та остеointegraції. Якщо потрібна висока міцність, використовуються монолітні імплантати або цемента. Якщо висока міцність не потрібна, може бути використаний пористий інертний матеріал з розмірами пор 100–150 мкм, які гарантують проростання тканини.

Кераміка на основі TiO_2 , Al_2O_3 , ZrO_2 характеризується компенсованими хімічними зв'язками та не вступає в електрохімічну взаємодію з організмом, зберігає сталість хімічного складу та властивостей імплантату. Це дозволяє виключити післяопераційне втручання та відкласти у часі реакцію організму на імплантат.

Біокераміка не має конкурентів як матеріал для штучних протезів, для яких неприйнятна навіть часткова резорбція, наприклад для протезів зубів, тіл хребців або пар тертя імплантатів тазостегнових суглобів. Для виготовлення таких імплантатів необхідні матеріали, що не вступають у взаємодію з біологічним середовищем.

Біоінертна кераміка на основі оксидів алюмінію та цирконію порівняно з ГАП та кальцій-фосфатними матеріалами має більш високі міцнісні

властивості. Алюмооксидна та цирконієва кераміки входять до реєстру матеріалів, що регламентуються стандартом ISO, як матеріали для протезування кісткової тканини.

Оксид алюмінію високої густини та чистоти, з середнім розміром частинок менше 4 мкм – самий відомий біоінертний керамічний матеріал (рис. 2.21, а). Матеріал був розроблений як альтернатива металевим сплавам для імплантатів хребта та несучих частин протезів суглобів. Матеріал відрізняється відмінною біосумісністю, високим опором корозії, низьким коефіцієнтом тертя та гарними механічними властивостями, такими як висока міцність та зносостійкість, утворює дуже тонку фіброзну капсулу.

Таблиця 2.11 – Склад, структура та властивості біоінертних матеріалів на основі особливо чистого оксиду алюмінію за ISO 6474

Показник	Матеріал класу	
	А	В
Середня густина, г/см ³	Не менше 3,94	Не менше 3,90
Хімічний склад, %: Al ₂ O ₃ MgO Домішки (R ₂ O + CaO + SiO ₂)	Не менше 99,5 Не більше 0,3 Не більше 0,1	
Середній розмір кристалів, мкм	Не більше 4,5	Не більше 7,0
Стандартне відхилення, мкм	Не більше 2,6	Не більше 3,5
Середня міцність за вигину, МПа	Не менше 250	Не менше 150
Зносостійкість, мм ³	Не більше 0,01	Не нормуються

За даними Міжнародної організації зі стандартизації (ISO 6474), чистота оксиду алюмінію, який використовується в медицині, повинна бути вища за 99,5 %. Сума домішок (SiO₂, Na₂O, K₂O, CaO) має бути нижчою за 0,1 ваг. % для уникнення значного збільшення зерна під час спікання (табл. 2.11).

Порівнюючи керамічні матеріали на основі оксиду алюмінію й діоксиду цирконію з погляду їх використання у протезуванні, слід зазначити, що намітилася стійка тенденція до заміни алюмооксидної кераміки в протезах кісткової тканини цирконієвою керамікою. Незважаючи на високу міцність алюмооксидної кераміки, цирконієва кераміка має більш високу в'язкість руйнування, що забезпечується трансформаційним зміцненням під навантаженням. Міцність і в'язкість керамічних матеріалів залежать від розміру зерен і концентрації стабілізуючих добавок (табл. 2.12).

Цирконієва кераміка стала популярною альтернативою алюмінію як структурний компонент біоінертної кераміки, оскільки має більшу стійкість до руйнування (більша в'язкість руйнування) у вигляді монолітної кераміки. Діоксид цирконію винятково інертний у фізіологічному середовищі та має дуже добру статичну міцність (рис. 2.21, б). Кристалічні біокерамічні матеріали

цирконію радіоактивні, і хоча виявлена активність мала, необхідна оцінка довгострокових наслідків її дії.

Таблиця 2.12 – Вимоги до біокераміки на основі оксидів алюмінію та цирконію

Властивість	Кераміка на основі	
	Al_2O_3	ZrO_2
Хімічний склад	$\text{Al}_2\text{O}_3 > 97$ мол. %	$\text{ZrO}_2 - 97$ мол. %, $\text{Y}_2\text{O}_3 - 3$ мол. %
Густина, г/см^3	$> 3,92$	$> 6,0$
Розмір зерна, мкм	$< 7,00$	$< 0,6$
Міцність на вигин, МПа	$> 400,00$	$> 800,0$
Параметр тріщиностійкості, $\text{МПа} \cdot \text{м}^{1/2}$	3,5	9,0–11,0

Останнім часом ортопедична спільнота повідомляє про невдачі після імплантації цирконієвих протезів через швидке заростання тріщин на імплантатах за низькотемпературної гідратації. Розпочато дослідження з новим поколінням нанокомпозитів алюмінію та цирконію, що мають високу стійкість до поширення тріщин, які можуть дати можливість збільшити термін служби та надійність керамічних імплантатів (рис. 2.21, в).

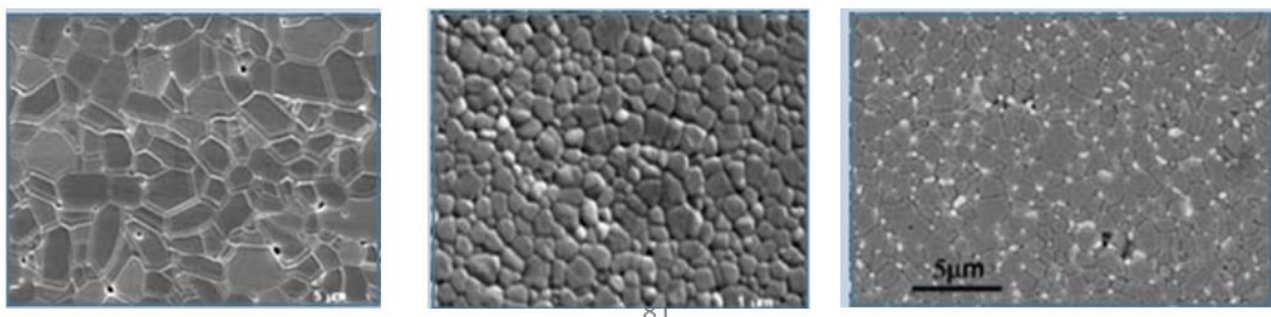


Рисунок 2.21 – Мікроструктура біоінертних матеріалів: *а* – мікроструктура оксиду алюмінію, обробленого за 1500 °С; *б* – типова мікроструктура тетрагонального цирконію, що містить 3 мол. % іттрію; *в* – мікроструктура алюмінієвого цирконієвого нанокомпозиту, містить 10 мол.% цирконію: темна фаза – алюміній, світла фаза – цирконій

У протезуванні використовується два виду цирконієвої кераміки, у яких стабілізуючими добавками служать оксиди магнію MgO (9 мол. %) та ітрію Y_2O_3 (3 мол. %). Кераміка на основі діоксиду цирконію саме цих складів найбільш стійка до стерилізації опроміненням або обробкою парою в автоклаві, а також до дії біологічно активного середовища. Випробування *in vivo* показали, що протези з цирконієвої кераміки зберігають біосумісність протягом десятків років.

Технологічні способи одержання керамічних матеріалів впливають на властивості імплантатів. Мікроструктура біокераміки залежить від розміру зерна. Можливі способи отримання керамічних матеріалів такі:

- 1) спікання;
- 2) гаряче пресування;
- 3) плазмохімічний метод;
- 4) холодне пресування зі спіканням у вакуумній або атмосферній печі;
- 5) лиття з термопластичних шлікерів.

Для розуміння подібності та відмінностей даних способів наведемо їх коротку характеристику.

Отримана **методом спікання** кераміка має крупнозернисту структуру (розмір зерна може досягати сотень мікрон) й вкрай низькі характеристики міцності, що обмежує сферу її застосування. Відомо, що за зменшення розміру зерна до величин порядку 1–5 мкм відбувається зменшення пористості та збільшення межі міцності. Отримання дрібнозернистої кераміки традиційними методами спікання має ряд складнощів. За високих температур спікання (до 2000 К) відбувається значне збільшення розміру зерна, запобігти якому можливо за допомогою методу гарячого пресування, в якому об'єднані операції пресування та спікання.

Методом **гарячого пресування** можна виготовити високоміцний матеріал за використання високодисперсних порошків як вихідної сировини. Для корундових матеріалів, отриманих методом гарячого пресування з високодисперсних порошків, значення межі міцності за триточкового згину вдвічі вища значень межі міцності цих матеріалів, отриманих звичайним спіканням. Межа міцності за згинання для кераміки з частково стабілізованого діоксиду цирконію знаходиться в межах 500–2500 МПа й залежить від підготовки вихідного порошку, методу та режиму одержання кераміки. Високі значення межі міцності за згинання (2000–2500 МПа) та тріщиностійкості (не менше 15 МПа·м^{1/2}) отримані для керамічних матеріалів на основі кераміки із частково стабілізованого діоксиду цирконію, виготовленої методом гарячого пресування. Метод спікання на повітрі дозволяє отримувати матеріали зі значно нижчими значеннями межі міцності за згинання (800–1000 МПа).

Плазмохімічний метод виділяється тим, що дозволяє за рахунок високої швидкості охолодження продуктів реакції отримувати високотемпературні фази, у тому числі в нерівноважному стані, наприклад, тверді розчини з низькою розчинністю у рівноважних умовах одного компонента в іншому.

Холодне пресування та спікання. Операція формування призначена для надання певної форми, розмірів та механічної міцності заготовок із порошків. Формування необхідне для виготовлення виробів, які повинні володіти комплексом заданих функціональних й механічних властивостей. Як правило, це може бути досягнуто застосуванням тиску на заготовки тим чи іншим способом. Остаточні властивості одержуваних виробів багато в чому залежать від густини сформованих заготовок та розподілу густини за об'ємом. Загальна відносна густина заготовок та характер розподілу густини за об'ємом залежать

від способу формування (пресування), прикладеного тиску, середнього розміру зерен чи частинок порошку, наявності мастил за формування в прес-формах.

У ідеальному випадку порошки з частинок із вузьким розподілом за розмірами повинні ущільнюватись таким чином, щоб розміри пор між ними не перевищували розміру однієї частинки. Така регулярна мікроструктура заготовки скорочує час спікання та забезпечує більш рівномірне усадження. Високий ступінь регулярності та дисперсності структури необхідно зберігати протягом всього процесу ущільнення.

Пресування може бути одностороннім та двостороннім. Одностороннє пресування застосовують тільки для формування виробів простої форми, у яких відношення висоти та ширини перерізу становить не більше одиниці, а сама висота – не більше 0,02 м. У всіх інших випадках використовують різні схеми двостороннього пресування: стаціонарну прес-форму з двома пуансонами, плаваючу матрицю, рухомий верхній пуансон та матрицю. Тиск пресування порошків на основі ZrO_2 зазвичай не перевищує 100–200 МПа.

Порошки складних оксидів складаються, як правило, з високодисперсних частинок, є низькотекучими, мають низьку пластичність. Під час формування їх заготовок, зокрема методом пресування, часто виникає потреба у застосуванні пластифікаторів або сполучних речовин, зазвичай органічної природи. Введення різних органічних добавок у прес-порошки сприяє оптимізації передачі тиску за пресування. Основного значення набуває склад застосовуваних добавок, оскільки пориста структура матеріалів в кінцевому підсумку визначає властивості спеченого матеріалу.

Переваги даного методу формування: принципова простота реалізації, можливість автоматизації та механізації з високою продуктивністю (2–3 тис. деталей на годину), висока відтворюваність розмірів заготовок, видалення пластифікатора не вимагає проведення окремої операції. Однак є певні недоліки: неоднорідність розподілу густини, можливість появи розшарування заготовок за рахунок зниженої щільності центральної частини, неможливість виготовлення виробів високого класу точності без механічної обробки та неможливість одержання складних форм заготовок. З застосуванням методу холодного пресування не можна пресувати вироби з тонкими стінками та різкими перепадами за висотою й поперечним перерізом, а застосування механічної обробки виробів збільшує вартість процесу. За нагрівання в вакуумних або атмосферних печах зі зростанням температури, що підводиться до керамічного порошкового матеріалу, відбувається зменшення площі поверхні, що ініціює процес спікання.

Гаряче пресування. Метод гарячого пресування в порошковій металургії для отримання композиційних матеріалів використовують у тих випадках, коли отримання щільного виробу звичайним методом пресування з наступним спіканням виявляється неможливим. Зазвичай метод гарячого пресування використовують для отримання матеріалів, що містять порошки тугоплавких сполук або металеві волокна, пружна дія яких призводить до руйнування заготовки, спресованої за кімнатної температури.

Гаряче пресування порошків на основі ZrO_2 , як правило, проводять за температури 1770 °C під тиском 10 МПа, досягаючи густини вище 90 % від теоретичної. Порошок ZrO_2 – крихкий матеріал, тому його ущільнення під час пресування здійснюється фрагментарно, тобто частки порошку ZrO_2 у процесі ущільнення розбиваються на більш дрібні частки.

За допомогою методу гарячого пресування можна отримувати кераміку з високими фізико-механічними характеристиками не тільки на основі діоксиду цирконію та оксиду алюмінію, а й на основі інших тугоплавких сполук.

Основна перевага методу гарячого пресування – суміщення операцій пресування та спікання. Процес здійснюється за різних температур, що залежать від властивостей матеріалу. Використання графітових прес-форм у разі пресування ZrO_2 призводить до забруднення матеріалу вуглецем, знижує його міцність. Застосування цього методу під час виготовлення виробів на основі ZrO_2 обмежується складністю технологічного процесу, високою вартістю та неможливістю виробляти тонкостінні вироби.

Незважаючи на явні переваги керамічних матеріалів з точки зору біохімічної сумісності з організмом порівняно з металами та високомолекулярними сполуками, що застосовуються на сьогоднішній день для реконструкції опорно-рухового апарату, існують фактори, що обмежують використання керамік, у більшому ступені з розвиненою пористою структурою, у протезуванні кісткових тканин.

Основний недолік біоінертної кераміки – низька довговічність внаслідок екранування механічних навантажень, що призводять до резорбції кісткової тканини, що прилягає до імплантату, та втрати останнього. Проте подібні матеріали, мабуть, не мають на сьогодні альтернативи як замітники тазостегнового суглоба та імплантатів для хірургії хребта. Тому більшість досліджень зосереджені на створенні біоактивних матеріалів для заміщення кісткової тканини з підвищеними механічними властивостями.

2.3.3.4 Аналіз основних видів біоактивних матеріалів

Біоактивність характеризує здатність матеріалу до біодеградації, оскільки саме в результаті цього процесу звільняються іони, які утворюють хімічний зв'язок між імплантатом і мінеральним компонентом кістки. Таким чином, біоактивність кістково-пластичного матеріалу свідчить про його потенційну спроможність до остеоінтеграції.

Тип та інтенсивність кісткоутворення відіграють важливу роль у забезпеченні міцності зв'язку, що утворюється між кісткою і біоматеріалом, у значній мірі залежать від властивих матеріалу властивостей.

З точки зору впливу на процес репаративної регенерації кістки, з урахуванням складу матеріалу та механізмів регенерації, імплантати оцінюють за такими параметрами:

– **остеогенність** – здатність матеріалів до формування кістки за рахунок остеогенних клітин (остеобластів чи попередників остеобластів) під час

імплантації у кісткове ложе (аутологічна губчаста або кортикальна кістка, аутологічний кістковий мозок);

– **остеокондуктивність** – здатність служити каркасом, решітками або матрицею, підтримуючи вrostання нової кістки з боку кісткового ложа (аутологічні, алогенні та ксеногенні імпланти, кераміка, полімери тощо);

– **остеоіндуктивність** – здатність за рахунок остеоіндуктивних протеїнів, що входять до складу, стимулювати й підтримувати поділ (мітогенез) недиференційованих периваскулярних клітин в остеопротеніраторні клітини (аутологічна губчаста або кортикальна кістка, демінералізований кістковий трансплантат, тканинно-інженерні конструкції або тканинні еквіваленти).

Остеокондуктивність мають як біоінертні, так і біологічно активні матеріали, а остеоіндуктивність більшою мірою властива біоактивним матеріалам.

Біоактивність кальцій-фосфатних матеріалів обумовлена присутністю в їх складі CaO й P_2O_5 з молярним співвідношенням, близьким до 1,67, характерним для гідроксиапатиту, що становить основу мінеральної частини кістки. Під час дослідження фосфатів кальцію із співвідношенням $\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5$ від 0,5 до 2,0 встановлено, що практично всі вони характеризуються здатністю зв'язуватися з кісткою без капсулювання сполучною тканиною, але максимальна швидкість росту кісткових кліток спостерігається за присутності гідроксиапатиту (1,67) і вітлокіту (1,5). На поверхні матеріалів, які містять мета- і пірофосфати кальцію, зростання нової кістки йде повільніше (табл. 2.13).

Одним з найцікавіших керамічних матеріалів для заміщення твердих тканин є фосфати кальцію (передусім, гідроксиапатит (ГАП) та трикальційфосфат (ТКФ)).

Термін апатит вперше застосував щодо мінералів Werner в 1788 р. Зараз він позначає сімейство кристалів із формулою $\text{M}_{10}(\text{RO}_4)_6\text{X}_2$, де М – зазвичай кальцій, R – фосфор, а X – гідроксид або галоген, наприклад, фтор. Тільки у 1926 р., у зв'язку з розробкою хімічних та рентгенодифракційних методів аналізу, вдалося довести, що неорганічна частина кісткового матриксу включає до свого складу різні форми гідратованих фосфатів кальцію в переважанням гідроксиапатиту.

На сьогодні одним з найбільш перспективних матеріалів – поверхнево-активна склокераміка, що утворює хімічні зв'язки з тканинами організму. Основний компонент у ній – оксид кремнію, але, окрім нього, обов'язково повинні міститися оксиди натрію, кальцію та фосфору. Перевага подібної кераміки не лише у високій механічній міцності (всі хімічні реакції відбуваються тільки на поверхні), але й у можливості нанесення поверхневих шарів інших біоматеріалів. У результаті утворюється двошаровий продукт (наприклад, «метал – скло»), що характеризується високою міцністю та біоактивною поверхнею. Крім того, можна приготувати стекла з різним ступенем біоактивності.

Таблиця 2.13 – Кристалічні фосфати кальцію

Назва	Хімічна формула	Вміст оксидів	Співвідношення Ca/P
Ультрафосфат кальцію	$\text{CaP}_4\text{O}_{11}$	$\text{CaO} \cdot 2\text{P}_2\text{O}_5$	0,25
Ультрафосфат кальцію	$\text{Ca}_2\text{P}_6\text{O}_{17}$	$2\text{CaO} \cdot 3\text{P}_2\text{O}_5$	0,33
Метафосфат кальцію	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2 (\alpha, \beta)$	$\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$	0,50
Поліфосфати кальцію	$[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]_n$	$(\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5)_n$	0,50
Тромаліт	$\text{Ca}_4\text{P}_6\text{O}_{19}$	$4\text{CaO} \cdot 3\text{P}_2\text{O}_5$	0,66
Дифосфат (пірофосфат) кальцію	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 (\gamma, \beta, \alpha)$	$2\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$	1,00
Монофосфат кальцію	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 (\beta, \alpha)$	$3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$	1,50
Гідроксиапатит	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	$10\text{CaO} \cdot 3\text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,67
Оксиапатит	$\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$	$4\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$	2,00

Більшість типів скла для отримання біосумісних і біоактивних склокристалічних матеріалів зазвичай мають наступний склад:

1) $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--MgO}$. Як каталізатор кристалізації використовується TiO_2 або ZrO_2 ;

2) $\text{SiO}_2\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--CaO}$. На основі цієї системи отримують досить міцні, хімічно стійкі, стійкі до зношування склокристалічні вироби, до яких для забезпечення тонкозернистої об'ємної кристалізації у висококремнеземистій зоні необхідна добавка до 11–18 мас. % TiO_2 ;

3) $\text{P}_2\text{O}_5\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--CaO}$ (TiO_2 – (1–2 %)). Склокристалічні матеріали даної групи після термічної обробки утворюють біоактивну пористу склокераміку, яка є досить стійкою до дії біологічних рідин й має високі механічні властивості. Але присутність іонів алюмінію, може призвести до токсичності;

4) $\text{P}_2\text{O}_5\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--CaO}$. Основною кристалічною фазою даної склокераміки є кристали гідроксиапатиту, які деформовані і не утворюють характерної гексагональної форми. Ця дефектність, очевидно, лежить в основі того, що вони не виявляють будь-якої біологічної активності;

5) $\text{P}_2\text{O}_5\text{--Al}_2\text{O}_3\text{--CaO--Na}_2\text{O}$. У цій системі в 1971 р. отримано перше біологічне скло, яке в ході взаємодії з кістковими тканинами та рідинами утворювало поверхневий шар ГАП;

6) $\text{P}_2\text{O}_5\text{--CaO}$. Вибір система обґрунтований тим, що кальцій-фосфатні сполуки, які входять до неї, найбільш близькі за складом і структурою до натуральної кістки. Фосфатне скло не знайшло широкого застосування, оскільки має низьку механічну міцність, навіть якщо використовуються у вигляді кристалічних матеріалів;

7) $\text{P}_2\text{O}_5\text{--TiO}_2\text{--CaO}$. Під час визначення міцності на вигин не витримує необхідних навантажень;

8) $P_2O_5-TiO_2-CaO + ГАП$. Не може застосовуватися в травматології та ортопедії через низькі міцність та деформованість;

9) $P_2O_5-TiO_2-CaO - Nb_2O_5 + ГА$. Має невисоку міцність;

10) $P_2O_5-TiO_2-CaO-Nb_2O_5$. Має досить високий модуль пружності, але низьку міцність на вигин;

11) $P_2O_5-SiO_2-CaO-Nb_2O_5-Al_2O_3$. Має високі міцнісні характеристики на вигин, але є надзвичайно крихким.

Авторами навчального посібника розроблені інноваційні біоактивні композиційні матеріали та покриття на основі кальцій-силікофосфатного скла, зокрема, карбонатвмісні матеріали у поєднанні з хітозаном – постачальником карбонатних фаз та пористі матеріали для кісткового ендопротезування зі скороченими термінами зрощування з кісткою. Доведено, що наявність КГАП змішаного А-В типу у структурі склокристалічного матеріалу (СКМ) сприяє інтенсифікації процесу утворення на поверхні розроблених матеріалів *in vitro* впродовж 30–90 діб апатитоподібного шару зі співвідношення $Si:Ca:P = 1:5:7,1$. Це є необхідним для формування молодшої кістки на імплантатах *in vivo* (табл. 2.14). Встановлена ефективність застосування методу дублювання полімерної матриці для отримання пористих СКМ з розвиненою каналною структурою та розміром пор від 125–750 мкм і відкритою пористістю 17–39 %, що дозволяє створити в організмі єдину клітинно-біоматеріальну структуру.

Таблиця 2.14 – Порівняльна характеристика біоактивних СКМ та СК

Параметр	Відомий ГАП (США)	Розроблені СКМ та СКП			
		Б-11	БС-11	ЦФ-1	АП-10
Розмір кристалів фосфатів кальцію, мкм	1	1	1	1	1
Твердість за Віккерсом, ГПа	4,5–6,0	5,9	4,2	4,8	5,4
Твердість за Роквелом, МПа	46–56	–	42	46	52
Міцність на стискання, МПа	50–80	100	100	120	120
ТКЛР, $\alpha \cdot 10^7$ (25–600), $1/^\circ C$	110	150	86	42,5	130
Розмір кристалів ФК, мкм	1	1	1–3	1	1
Розчинність у модельному розчині, %	–	8,0	2,0	5,5	5,0
Розчинність у розчині лимонної кислоти, %	–	2,0	0,2	1,25	1,1
Вільна енергія поверхні <i>in vitro</i> , мДж/м ²	–	55,9	51,0	53,6	52,0
Морфологія поверхні (R_a), мкм	–	2,5	6,0	4,0	10
Формування апатитоподібного шару <i>in vitro</i> як співвідношення $Ca:P$	1,3	0,86	0,87	0,82	1,6
Біосумісність	так	так	так	так	так
Термін зрощування з кісткою, міс	12–24	–	3	3	–

Розроблені технології композиційних матеріалів з встановленням оптимальних параметрів одностадійних режимів термообробки вихідних скломатеріалів (880–1 080 °С) та отримані покриття з них (мікродугове оксидування поверхні титанових сплавів, шлікерне нанесення з застосуванням розчину ксантанової камеді у кількості 0,2 мас. %, короткочасний випал за 820–840 °С). Встановлено, що отримані біоактивні композиційні матеріали порівняно з відомим біоактивним матеріалом (табл. 2.6) характеризуються високими механічними властивостями ($H = 5\,900\text{--}7\,820$ МПа, $K_{1C} = 1,48\text{--}2,22$ МПа·м^{1/2}, $HV = 3\,800\text{--}6\,200$ МПа) та можуть бути використані як імплантати для заміни статично- та динамічно навантажених ділянок кістки у щелепно-лицьовій хірургії. Клініко- та мікробіологічні дослідження в ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка АМНУ», Українського НДІЕП та Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України підтвердили перспективність і можливість їх використання як імплантатів у кістковому ендопротезуванні зі строками зрощування усього трьох місяців.

2.3.4 Біокомпозити

Для імітації натуральної кістки використовують композити з полімерів і кераміки (біокомпозитні матеріали), які розробляють для покращення механічних і біологічних характеристик матриці. Використовуючи переваги полімерів та в'язкість й міцність кераміки, їх композиції можуть володіти задовільною комбінацією властивостей. Крім того, додавання фаз біоактивної кераміки до полімеру не тільки підвищує їх біоактивність, але є й буфером кислотних продуктів розпаду полімерів.

Полімерно-фосфатні композити. Кераміка на основі фосфатів кальцію вже понад три десятиліття використовуються як замітники кістки. Однак їх застосування обмежене через складність виготовлення високопористих структур та механічну крихкість. Композит «полімер – кальцій фосфат» показав, що матеріали, виготовлені шляхом додавання кераміки на основі кальцій фосфату до полімеру, мають високу біосумісність. Відомі композити на основі НА або b-TCP та полімерів, схильних до біодеградації, які є матрицями в інженерії кісткової тканини. Скаффолди на основі композиту PLGA/НА покращують клітинну проліферацію та диференціацію, а також кісткову мінералізацію порівняно з PLGA. Композит PGA/b-TCP показав високу остеопровідність та ефективність формування нової кістки протягом 90 діб під час заміщення дефектів кісток у медіально-епікондилах стегнової кістки щурів порівняно з контролем без імплантатів.

Композити «полімер – біоскло». За останні два десятиліття досягнуто значного прогресу в затосуванні композиту на основі біоактивного матеріалу «скло – полімер». Вважається, що біоактивне скло має майбутнє в інженерії кісткової тканини, оскільки воно здійснює регуляцію генетичного контролю над циклом остеобластів та швидко експресію генів.

Композити PLA та біоактивного скла можуть утворювати поверхневі кальцій-фосфатні шари та підтримують швидкий ріст людських остеобластів і остеобластоподібних клітин *in vitro*. Крім того, пористе біоскло з біодеградуєчим полімерним покриттям показало підвищену міцність порівняно з керамічними матрицями без покриття та антибактеріальні властивості. Модуль стискання композиту залежить не тільки від пористості та розміру пор, а й від вмісту кераміки або скла. Слід зазначити, що лише деякі композитні каркаси, представлені у таблиці 2.15, можуть досягати модуля міцності губчастої кістки.

Таблиця 2.15 – Пористі композитні каркаси, призначені для регенерації кісток в тканинній інженерії

Композитний каркас		Вміст кераміки (мас. %)	Пористість (%)	Розмір пор (мкм)	Модуль (МПа)
Кераміка	Полімер				
Аморфний фосфат кальцію	PLGA	28–75	75	100	65
HA	PLLA	50	85–96	100–300	10–14
	PLGA	60–75	81–91	800–1 800	2–7.5
	PLGA	–	30–40	110–150	337–1,459
Bioglass	PLGA	75	43	89	51
	PLLA	20–50	77–80	≈100	137–260
		–	–	≈10	–
	PLGA	0,1–1	–	50–300	–
	PDLLA	5–29	94	≈100	10–50
	Cancellous bone	–	–	100–500	100–500

2.3.5 Матеріали для регенерації кісткової тканини

Біосумісні матеріали, які застосовуються для кісткового ендопротезування, мають свої переваги та недоліки (табл. 2.16). Сьогодні біоактивні матеріали є найбільш затребуваними матеріалами для заміщення кісткової тканини. Вони характеризуються виключно високою біосумісністю, нетоксичністю та здатністю до мінералізації кісткової тканини, що виключає повторні операції та скорочує терміни реабілітації. Однак складність оцінки впливу процесів резорбції на організм та низькі механічні властивості не дозволяють застосовувати вказані матеріали на значних динамічно навантажуваних ділянках кісткової тканини. Вирішенням цієї проблеми є створення композиційних матеріалів на основі органічних (колагену, хітозану тощо) та синтетичних полімерів або металів та їх сплавів та біоактивних матеріалів, зокрема склокристалічних матеріалів з регульованою резорбцією та механічними властивостями.

Таблиця 2.16 – Переваги та недоліки матеріалів для регенерації кісткової тканини

Матеріал	Переваги	Недоліки
Гідроксиапатит	Відмінна біосумісність, остеопровідність	Низька здатність до розкладання, відсутність остеоіндуктивності, крихкість
Трикальційфосфат	Відмінна біосумісність, висока безпека, легкість отримання	Незадовільна технологічність, низька механічна міцність
Біоскло	Висока здатність до зв'язування кісток	Порушення росту кісток, місцева зміна pH, крихкість
Кальцій силікофосфатна склокераміка	Відмінні механічні властивості, висока біосумісність, нетоксичність	Складність технології
Нержавіюча сталь	Висока міцність, стійкість до корозії	Не розкладається, екранує напругу, запалення та імунітетну відповідь
Титанові сплави	Висока міцність на розрив, стійкість до корозії, ефект пам'яті форми, відмінна біосумісність	Не розкладається
Кобальт-хромовий сплав	Зносостійкість, стійкість до корозії	Не розкладається
Корали	Висока пористість, висока механічна міцність, кісткова провідність	Низька здатність до розкладання
Колаген	Відмінна біосумісність, відповідний розмір пор, добра пластичність, слабка антигенність	Низька механічна міцність, важко формувати, нестабільність властивостей
Хітозан	Відмінна біосумісність, контрольована здатність до розкладання, нетоксичність, інгібування запалення	Низькі механічні властивості
Поліметилметакрилат	Довговічність, легкість обробки	Не розкладається
PCL	Біорозкладається, висока пористість	Низька механічна міцність
PLA	Біорозкладність, сильні механічні властивості, відмінна біосумісність, сприяють регенерації кісток	Місцева зміна pH

2.3.6 Застосовування протеїнів плазми для одержання тканинно-інженерних конструкцій

2.3.6.1 Роль органічних компонентів плазми у кальцифікації кісткової тканини

В останні роки інтенсивно розвивається напрямок, спрямований на створення функціональних імплантатів для відновлення структури та цілісності кісткової тканини людини. Ця задача пов'язана зі зростанням соціальних норм, спрямованих на збереження здорової нації.

Для вирішення вказаної задачі визначальним став підхід регенеративної медицини, що базується на використанні біорезорбуючих матеріалів, які здатні ініціювати регенерацію кісткової тканини та заміщатися новоствореною кісткою. У рамках регенераційного підходу особливо актуальним є застосування органічних речовин для отримання біоматеріалів. Це дозволяє поліпшити не тільки їх біосумісність, механічні властивості, а й досить часто резорбцію хімічно стійкої неорганічної компоненти кістки – фосфатів кальцію, тобто компонентів, які складно розчиняються в організмі під час імплантації. Тому органічні компоненти кістки, яка складаються з колагену I типу ($\approx 95\%$), неколагенових білків (альбуміну, протеогліканів, глікопротеїнів), глікозаміногліканів, органічних та нуклеїнових кислот, ефективно використовуються як для створення біосумісних матеріалів, так і для прогнозування їх поведінки *in vivo*.

Одним з основних аспектів у дослідженні процесу кальцифікації біоматеріалів *in vivo* є встановлення механізму появи зародків нерозчинних форм фосфатів кальцію на поверхні біоматеріалів. Ця проблема включає в себе цілий ряд фізико-хімічних і біохімічних аспектів. Відомі фізико-хімічні теорії пов'язують формування гетерогенних центрів зародження кристалів гідроксиапатиту (ГАП) на поверхні біоактивних матеріалів з трансформацією попередників кристалічного ГАП, у вигляді аморфного кальцію фосфату. З урахуванням концентраційної теорії, яка дозволяє врахувати та оцінити роль концентрації іонів кальцію і фосфатів у міжклітинній рідині, механізм зародження та росту кристалів досліджують в мінеральних кальційнасичених середовищах.

Однак, використання мінеральних розчинів виключає можливість вивчення ролі органічних компонентів в кальцифікації. Додавання органічних компонентів (білків: альбуміну, глобуліну та фібриногену) в ці середовища дозволить адекватно оцінити перебіг процесу кальцифікації в умовах, наближених до середовища живого організму.

Альбуміни (лат. *Albumen* – білок) – прості глобулярні білки. Дуже поширені в природі. Входять до складу рослинних та тваринних тканин. Мають дуже низький вміст гліцину, але багаті на сірковмісні та дикарбонові амінокислоти, здатні утворювати чітко оформлені кристали (глобуліни). Зокрема, входять до складу білка яєць, молока, сироватки крові, насіння, плодів тощо. Відіграють велику роль у життєдіяльності організмів. Альбуміни

розчинні у воді, у розчинах солей, кислотах і лугах, за гідролізу утворюють амінокислоти, під час нагрівання коагулюють. Широко застосовуються у харчовій і текстильній промисловості. Сироватковий альбумін людини широко використовується як кровозамінник та компонент поживних середовищ.

Дослідження адсорбції бичачого сироваткового альбуміну на різних формах ГАП дозволило встановити, що альбумін краще адсорбується на голковидному ГАП, ніж на ГАП сферичної чи волокнистої форм. Встановлено, що впровадження іонів силіцію в кристалічну решітку ГАП викликає зменшення розміру його кристалів, майже в 3,5 рази, та збільшення питомої поверхні майже в 4,5 рази, що дозволяє покращити здатність до адсорбції молекул альбуміну порівняно з немодифікованим ГАП.

Слід зауважити, що під час вилугування катіонів кальцію у результаті взаємодії біоактивного матеріалу з плазмою крові важливою є підтримка концентрації вільного «іонізованого» кальцію в чітко визначених межах. За зниження вмісту альбуміну в плазмі крові відповідно відзначається збільшення іонізованого кальцію (не зв'язаного з альбуміном), у той час як загальна його концентрація може знижуватися. Альбумін зв'язує кальцій з дванадцятьма доступними катіон-зв'язуючими угрупованнями. Лише катіон гідрогену є постійним джерелом конкуренції: зв'язування кальцію стають менш доступними, а зв'язування альбуміну з кальцієм зменшуються, збільшуючи тим самим кількість вільної фракції.

2.3.6.2 Властивості поверхні біоматеріалу, які обумовлюють адсорбцію протеїнів

З термодинамічної точки зору, для забезпечення остеоінтеграції поверхня матеріалу імплантату повинна забезпечувати самочинну адсорбцію протеїнів, яка поряд з іншими факторами (табл. 2.17) суттєво залежить від вільної енергії поверхні (ВЕР).

Таблиця 2.17 – Властивості поверхні біоматеріалу, які обумовлюють адсорбцію протеїнів

Властивості поверхні біоматеріалу	Властивості протеїнів
хімічний склад	кількість зв'язків
морфологія поверхні	четверна, третинна та вторинна структура
вільна енергія	загальна гідрофобність
заряд	заряд
кислотно-основні властивості	ізоелектрична точка
чистота поверхні	специфічна взаємодія залишків

Згідно з даними таблиці 2.17, композиційний ефект, який складає вільна енергія, хімічний склад покриття та морфологія його поверхні, обумовлюють результат остеоінтеграції в цілому, а також окремих її етапів: осадження,

міграції, проліферації (розмноження) і диференціювання клітин. Головним фактором для адгезії кісткових клітин є ВЕП, оскільки змочування поверхні, яке обумовлює ступінь контакту з фізіологічним середовищем, багато в чому залежить від поверхневої енергії. Вважається, що для здійснення адсорбції ВЕП біосумісного матеріалу повинна становити 60–120 мДж/м². Фізичний зміст вільної енергії поверхні полягає в міжмолекулярній взаємодії на межі розділу фаз, а сама ВЕП визначає роботу утворення зародків нової фази на межі розділу та вільну енергію активації процесу фазового перетворення.

Основними характеристиками адсорбуючої поверхні є її енергетичні (ступінь гідрофобності або гідрофільності) та електрохімічні властивості. Наявність поверхневого заряду приводить до електростатичної взаємодії між зарядженою поверхнею і зарядженими ділянками молекули протеїну. Однак, протеїни адсорбуються на більшості поверхонь, які мають гідрофобні ділянки, навіть за наявності електростатичного відштовхування між ним та поверхнею. Це пояснюється біполярністю протеїнів, які проявляють максимальну афінність (термодинамічна характеристика, яка кількісно описує силу взаємодії речовин) до поверхні з проміжною полярністю. Проте для гідрофільних скломатеріалів, які застосовують як біоактивні імпланти, важливим є протікання процесу адсорбції з компонентами плазми крові, зокрема з альбуміном.

Альбумін є розчинним у воді білком, проявляє в'язучу здатність відносно до різних низькомолекулярних сполук, вміщує ліпофільні та гідрофільні зв'язки. Відомо, що полярні групи біологічно важливих молекул часто містять атоми оксигену, нітрогену та гідрогену, які можуть утворювати з молекулами води водневі зв'язки, посилюючи гідрофільність групи (гідроксильна група –ОН, карбоксильна група –СООН, аміногрупа –NH₂).

Серед відомих біосумісних матеріалів найбільше значення ВЕП має склокераміка на основі ГАП, що обумовлене її хімічним складом та структурою (табл. 2.18). Це пояснюється тим, що як аналог головного компоненту мінеральної основи кістки, ГАП має виражені остеокондуктивні властивості, забезпечує адгезію протеїнів і клітин кісткової тканини, активно включається в іонний обмін і метаболізм кісткової матриці, підтримує іонні та ковалентні зв'язки з мінералами кістки.

Таблиця 2.18 – Вільна енергія поверхні біосумісних матеріалів

Біосумісний матеріал	ВЕП, мДж/м ²		
	полярна складова	дисперсійна складова	загальне значення
Ti6Al4V	8,59	30,14	38,73
Ti (після травлення)	8,88	32,97	41,85
ZrO ₂ (кераміка)	7,55	34,46	42,01
Ti (полірований)	15,97	31,05	47,01
Ti (оксидований)	—	—	40,00
Боросилікатне скло TEMPAX	33,00	21,10	54,10
Склокераміка BIOVERIT	58,40	8,00	66,40

Забезпечення показників мікрошорсткості біосумісних покриттів в межах 1–10 мкм з метою досягнення максимального зв'язку між кісткою та поверхнею імплантату надає їм більшої поверхневої енергії, змочуваності та може бути додатковим стимулюючим чинником росту тканин за допомогою прикріплення і проліферації остеогенних клітин на поверхні покриття, що дозволяє збільшити площу кісткової інтеграції. Точки екстремуму біоактивності для кальцій силікофосфатних покриттів були встановлені за шорсткості 2,0–3,5 мкм. Сила взаємодії «кістка – імплантат» не буде збільшуватися з безперервним зростанням шорсткості поверхні.

Розробка біосумісних матеріалів з оптимальними значеннями ВЕП та мікрошорсткості дозволить вирішити актуальну проблему створення ендопротезів з підвищеними остеоіндуктивними властивостями.

Для аналізу оптимальних значень ВЕП та мікрошорсткості біоактивних матеріалів для створення ендопротезів з підвищеними остеоіндуктивними властивостями проаналізуємо кальцій фосфатосилікатні скломатеріали з різним рівнем резорбції.

Відомо, що ефективність використання кальцій фосфатосилікатних скломатеріалів як кісткових ендопротезів пов'язана з їх здатністю до регенерації кісткової тканини у скорочений термін та механічними властивостями на рівні відповідних показників кісткової тканини.

Це реалізується завдяки особливостям їх структури, зокрема, наявності у складі 45–50 мол. % оксиду кремнію, який дозволяє забезпечити високу біоактивність скломатеріалів завдяки гідролізу біостекол в міжтканинній рідині. Протікання вказаного процесу приводить до утворення тонкого гелеподібного шару силікатної кислоти $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ на поверхні імплантату. Негативно заряджені гідроксильні групи поверхні шару силікатної кислоти притягують з навколишнього розчину міжтканинної рідини іони Ca^{2+} , заряд поверхні набуває позитивного значення, потім на поверхню осаджуються фосфат-іони та спостерігається наростання шару нестехіометричного ГАП.

Для встановлення можливості протікання процесу адсорбції органічної складової плазми людини використовують альбумін, який характеризується значним вмістом гідрофільних груп ($-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$).

Після витримки біоактивних склокристалічних матеріалів впродовж 7 та 14 діб в 10 % розчині альбуміну на поверхні матеріалів спостерігається осадження компонентів розчину, яке обумовило підвищення загальної складової ВЕП до 61–64 мДж/м². Обволікання фрагментів поверхні матеріалу може бути пояснено утворенням на поверхні імплантату білкового шару в результаті реакції білкового обміну між альбуміном та імплантатом. Даний факт свідчить про високу біологічну активність даних матеріалів та можливість їх застосування у якості покриттів для ендопротезування. Встановлені умови забезпечення вільної енергії поверхні склокристалічних покриттів знаходяться в межах 60 мДж/м².

2.3.6.3 Перспективи розробки гемосумісних гідрофільних матеріалів медичного призначення

Одним з фундаментальних питань у галузі створення медичних виробів, що контактують з кров'ю (штучне серце, апарати штучного та допоміжного кровообігу, судинні протези тощо) є вивчення взаємозв'язку між фізико-хімічними та гемосумісними властивостями біоматеріалів.

Відомо, що адсорбція білків є першим етапом взаємодії крові із чужорідною поверхнею. Хоча більшість досліджень гемосумісних властивостей біоматеріалів пов'язана з вивченням процесів утворення адсорбційного білкового шару і зміни його властивостей з часом, дотепер дані щодо впливу фізико-хімічних властивостей матеріалів (хімічний склад, аморфність і кристалічність структури тощо) на характер адсорбційно-десорбційних процесів білків досить суперечливі.

Незалежно від фізико-хімічних властивостей матеріалу підвищення його гемосумісності внаслідок попередньої альбумінізації поверхні супроводжується зниженням кількості центрів адсорбції та одночасним збільшенням частки центрів з низькими значеннями констант швидкостей адсорбції.

Зближення адсорбційно-енергетичних характеристик поверхні матеріалів з різною хімічною природою, структурою та гідрофільністю після адсорбції різними білками залежить від складу та концентрації пасивуючого розчину білків. Площина монокристалу лейкосапфіру з максимальним значенням вільної поверхневої енергії адсорбує більше білків плазми крові та тромбоцитів порівняно з площиною з мінімальним значеннями енергії.

Змінюючи електронну структуру та склад аморфних вуглецевих покриттів, можна істотно варіювати їх адсорбційні та гемосумісні властивості. Тому створення гемосумісних гідрофільних матеріалів медичного призначення є більш перспективним напрямом, порівняно з розробкою гемосумісних гідрофобних матеріалів.

2.4 Біоміметика та біоміметичні матеріали

2.4.1 Основні поняття біоміметики

За тривалий період еволюційного розвитку природа створила природні молекулярні наномашини та нанорозмірні системи. **Біоміметичний синтез** (*грец.* Bios – життя та *mimetikos* – наслідувати, імітувати, повторювати, подібний, а також *грец.* synthesis – з'єднання) – напрям досліджень, заснований на відтворенні природних властивостей за допомогою штучних матеріалів синтетичного походження або з використанням виділених складових з організмів для підготовки неорганічних продуктів.

Біоміметика поділяють на «естетичну» та «функціональну» для пояснення властивостей нових матеріалів. Ця наука є міждисциплінарною, вивчає хімічні, фізичні, фізико-хімічні, біохімічні властивості природних

наноматеріалів, що відіграють важливу роль у функціонуванні живих систем. Дослідження процесів, функцій, властивостей, які мають природні наноматеріали та нанопристрої, є важливим питанням для впровадження таких структур у різні галузі діяльності людини.

Нанокристалічна структура нових матеріалів із біоміметичною морфологією, яка відповідає фізико-хімічним, механічним, біологічним характеристикам живої тканини, може полегшити роботу лікарям-травматологам внаслідок якісного покращення регенерації кісток. Імунна відповідь організму на матеріал, відсутність алергічних реакцій, пошкоджень, деформацій внаслідок запальних процесів є метою дослідницької діяльності в галузі біоміметиків.

Природний позаклітинний матрикс на практиці не завжди може бути ефективною основою для регенеративної медицини. Біоматеріали відіграють ключову роль у пошуку тканин для відновлення. Сучасні методи тканинної інженерії вирокуристовують синтезові нанобіоматеріали. Штучні біоміметичні матеріали повинні якісно відтворювати процеси набору клітин, посіву, адгезії, проліферації, диференціювання та неогенезису тканин.

Біоміметичні матеріали можуть створюватися різними класичними способами, до яких відносять синтез «згори вниз» або «знизу вгору».

Нановолокна, отримані за допомогою спеціальної технології, можуть покращувати проліферацію живих клітин. Біоміметичні карбонові нановолокна можна використовувати у тканинній інженерії, тобто для заміщення пошкоджених тканин. Розуміння клітини як сукупності органічних компонентів та моделювання протобіологічних систем призводить до отримання біологічно нефункціональних синтетичних клітин, тому такі наноструктури можуть бути лише аналогами для деяких окремих сфер використання в медичній практиці – регенераторної медицини, імплантології та імунології.

Метод електророзпилення використовують для виготовлення колоїдних наноструктур, у тому числі колоїдних кристалів. Виготовлення біоміметичних матеріалів синтетичними методами включає застосування метаматеріалів.

Метаматеріали – це штучні композитні матеріали, які відрізняються за електромагнітними показниками, які мають особливе розміщення і структуру (кільцеподібна, рулонна тощо) компонентів, відсутнє в природі. За допомогою метаматеріалів можна змінювати електромагнітні та оптичні властивості матеріалів медичного використання. Структурною одиницею метаматеріалу є структура кубічної симетрії. Існують метаматеріали з підвищеною електричною проникністю і магнітною сприйнятливістю, ефективність яких порівняно зі звичайними речовинами збільшена на декілька порядків.

Хоча можливість керування структурою матеріалу надає певну свободу в прогнозуванні їх властивостей, однак справжді революційними стали дослідження, які продемонстрували можливість створення метаматеріалів із властивостями, відсутніми в природних матеріалах. Термін «метаматеріали» особливо часто застосовують саме до таких матеріалів.

Згідно сучасних тенденцій спостерігається збільшення кількості публікацій по взаємодії електромагнітних хвиль із середовищем. Метаматеріали сприяють створенню речовин, які імітують електромагнітні властивості відомих речовин або мають нові функції для покращення характеристик ізотропності (однакових параметрів фізичних величин, таких як теплопровідність, електропровідність, пружність, оптичні властивості).

Синтез метаматеріалів проводиться шляхом розробки речовин із новою геометричною будовою. До метаматеріалів належать подвійнонегативні (double-negative – DNG) матеріали, омега-посередники, провідникові посередники, лінійні середовища тощо. Тому впровадження метаматеріалів, отриманих за допомогою нанотехнологій, у практичну діяльність людини здійснюється у різних напрямках: медицина, промисловість, сільське господарство, авіація тощо.

Природні наноматеріали – складні структури, які відіграють важливу роль у нормальному функціонуванні живих тканин. Це зумовлено тим, що до складу біоміметичних матеріалів включено різні функціональні елементи (наночастинки мінералів, металів, аденілові нуклеотиди), що стверджують доцільність нанесення біоміметичного нанопокриття на поверхні приладів, які контактують з агресивним середовищем.

Описані синтетичні методи виготовлення органічних або неорганічних наночастинок, які поєднують із вірусами. Наночастинки, синтезовані на основі вірусних компонентів селективні та близькі до органічного середовища. Зокрема встановлено, що наночастинки кремнезему (базова речовина) та органосіланів формують покриття з властивостями віріона. Показано, що біоміметичний матеріал на основі вірусів аналогічний біодіоксидом кремнію, який відомий як біосиліка (biosilica).

Промисловий синтез кремній-органічних мономерів відбувається за рахунок взаємодії метилхлориду з кремнієм (олігомерні хлорсілани містяться в побічних продуктах виробництва кремнію). Їх застосовують у процесах фотолітографії, створенні оптичних систем, полімеризації сополімерів поліфенілсілану з метилметакрилатом. Полікарбоновий субстрат з наночастинами селену застосовують для запобігання утворення біоплівки мікроорганізмів. Поліол, створений на основі гліцеролу, поєднаний із діоксидом кремнію, використовують як потенційний носій лікарського засобу, наприклад доксорубіцину гідрохлориду. Формування наночастинок кремнію на основі біоплівки, що утворюються на поверхні суспензій, знаходиться в центрі розробок нових пристроїв та покриттів.

Біосинтетичний підхід використовують для контролю організації молекулярних моторів у білковій масі. Такий підхід забезпечує зв'язок із біомоторами, до якого, наприклад, належить кінезин-1.

Природний метод синтезу наночастинок «знизу вгору» реалізується за рахунок самозбірки з елементарних одиниць за помірних температурних умов. Він використовується для виготовлення біомінералів, структура яких є ієрархічною, тому важливу роль у механічних властивостях матеріалів відіграє

ієрархічна організація та інші структурні особливості природного композиту. До таких природних композитів можна віднести перламутр, для синтезу якого потрібні органічні макромолекули у ролі шаблонів для виготовлення мінералу. Контрольоване вирощування природних матеріалів дозволяє проводити орієнтацію структурних елементів від молекулярного рівня до макроскопічних структур.

Вдосконалення методів досліджень біоміметичних матеріалів дозволило адекватно імітувати супрамолекулярні процеси самоорганізації в біосистемах живих структур. Органічне середовище – одна з основних умов існування біосистем. Основним завданням синтезу біосистем є відтворення плазмолем, геному, системи енергозабезпечення живих клітин. Проведені дослідження щодо створення штучних біологічних систем, конструкція яких є мінімальною за кількістю функціональних елементів. Наприклад, створені біоморфи (моделі морфології клітини).

Фізико-хімічний аспект взаємодії синтетичних елементів із зовнішнім середовищем за цих підходів не повністю відповідає природним методам реакції організму на ксенобіотики. Синтетичні неорганічні аналоги біологічних систем досліджуються на рахунок структурної та функціональної подібності з натуральними живими компонентами. Наприклад, відомий біоміметичний матеріал, який складається зі штучної мембрани з полімерного сурфактанту та пептидної нуклеїнової кислоти. Пептидна нуклеїнова кислота є прототипом генома. Прикладом цього процесу є дані зі створення звичайних везикулярних біореакторів, у складі яких знаходиться цитозоль *Escherichia coli*. Стінки отриманих мікрооб'єктів виконані з біліпідних шарів, фракціонованих методом аналітичного центрифугування з яєчного білка, а внутрішній простір мікрооб'єктів заповнений екстрактом цитозоля *Escherichia coli* без нуклеотиду.

Біоміметичні матеріали являють собою наноклітини, які, у свою чергу, є нанороботами, що виступають прототипами функціонуючих можливостей живих клітин, тканин, біологічних систем організму. Вдосконалення нанотехнологій – важлива проблема для досягнення якісного виготовлення біоміметичних матеріалів, тому що роботехнічна модель є ще не досконалою для повної імітації процесів у живих об'єктах. Видалення одного важливого фрагмента, який входить до складу живої структури, може суттєво погіршити якість біоміметичного матеріалу. Відомості щодо створення повноцінної синтетичної клітини або нанобіоміметичного робота на сьогодні відсутні.

Аденозинтрифосфатаза (АТФаза) належить до кінцевого ферменту окисного фосфорилування, відома як наномотор; також відомий Р-глікопротеїн у ролі наномотора, що забезпечує організму стійкість до лікарських засобів. У дослідженнях використовують бактерії *Serratia marcescens* для перетворення хімічної енергії в механічну. Одноклітинні організми рухаються завдяки наномоторам, одним з яких є білок міозин, енергія для якого виділяється під час гідролізу АТФ. М'язовим міозином здійснюється рухливість кінцівок, скорочення серця, регуляція просвіту судин.

Як приклад біологічних молекулярних моторів можна розглядати також джгутики бактерій, які обертаються зі швидкістю 10 000 обертів на хвилину. Рух джгутиків здійснюється протонним потоком, який викликається відмінностями електрохімічного потенціалу навколо мембрани. Ці джгутики містять протеїни. Так, міозин може рухатися вздовж актинових філаментів. Міозини належать до молекулярних моторів, вони представлені у геномі людини приблизно 40 генами. Волокна міозину складаються із 12 паралельних ниток та мають 4 нм у діаметрі. Важливу роль у енергетичному забезпеченні діяльності наномоторів відіграє АТФаза.

2.4.2 Основні фізико-хімічні властивості біоміметичних матеріалів

Рухливість компонентів, які відповідають за пересування у просторі та місцезнаходження певних функціональних елементів біоміметичних матеріалів, відбувається за рахунок використання енергії, яка виділяється у ході хімічних реакцій. Крім того, енергія необхідна для забезпечення інших функцій біоміметичних наноструктур. Технологія біоміметичних джерел живлення може використовуватися для виготовлення сонячних батарей, які перетворюють сонячну енергію в електричну, тому проблема абіогенезу активно вивчається. Абіогенезом (розвиток життя на основі неорганічної речовини) пояснюють функціонування протобіонтів – макромолекул, з яких, на думку дослідників, утворилися клітини з геномом. Метод прямого формування органел полягає в самоорганізаційних властивостях живої природної клітини, який реалізується завдяки енергії випромінювання, копіювання структури біологічного складника на неорганічний носій. Метаболічні процеси активують регенерацію клітин за рахунок фотоіндукуючих речовин. Фізико-хімічні властивості біоміметичних матеріалів наведені на рисунку 2.22.

Фізіологічно активні речовини рослин також належать до біоміметичних матеріалів. До них відносяться ферменти, вітаміни, фітогормони, антибіотики, фітонциди, інгібітори. Зовнішній шар поверхні пелюстків рослини має гідрофобні властивості, що дозволяє уникнути висихання, виконувати функцію захисту від впливу зовнішніх негативних факторів, запобігати транспірації. Деякі частини рослини мають водовідштовхувальні властивості, наприклад пелюстка *Nelumbo nucifera* (лотоса), яка самоочищується завдяки наявності гідрофобних покриттів. Краплі води можуть рухатися таким чином, що поверхня листка очищується під статичним крайовим кутом $>90^\circ$. У плаваючої папороті з роду *Salvinia* наявні різні види водовідштовхувальних (супергідрофобних) волосків. Властивості межі розділу «повітря – рідина» має вирішальне значення для супергідрофобності та самоочищення. На поверхні (верхній або адаксіальній стороні) листя волоски утворюють складні ієрархічні структури, які здатні утримувати шар повітря на зовнішньому шарі листя навіть тоді, коли перебувають під водою протягом декількох днів.

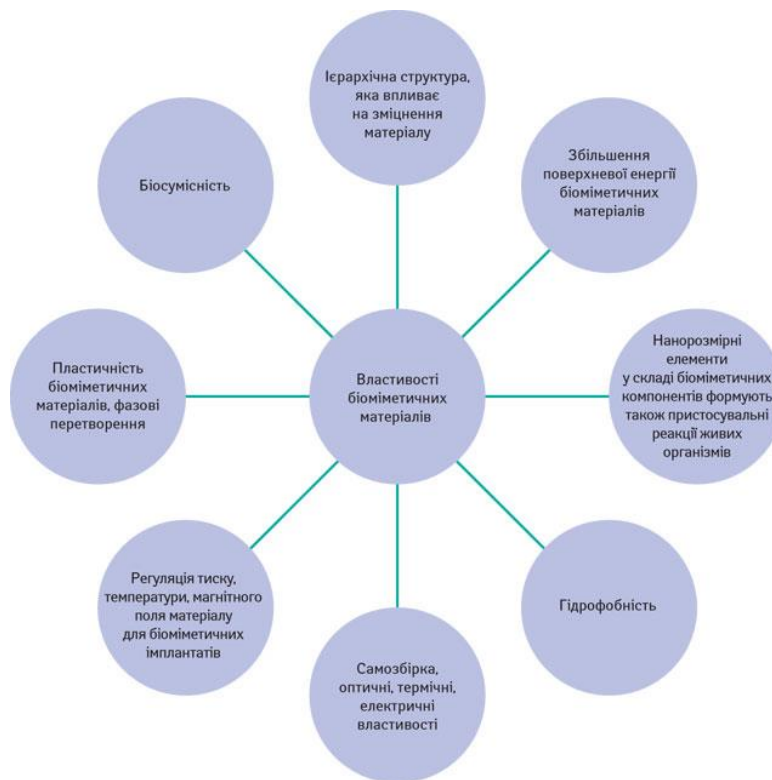


Рисунок 2.22 – Фізико-хімічні властивості біоміметичних матеріалів

Під час контакту двох твердих поверхонь спостерігається хімічне та фізичне тяжіння. За рахунок адгезії відбувається міжмолекулярна взаємодія. Капілярні сили виникають внаслідок рідинно-опосередкованого контакту. Формування адгезивних містків (менісків) збільшує зчеплення двох середовищ. Для відтворення вищевказаних властивостей використовують наноструктуровані полімери. Одним зі шляхів покращення так званого «ефекту лотоса» є збільшення шорсткості досліджуваної поверхні. Кут контакту рідини з шорсткою поверхнею відрізняється від аналогічної гладкої. Тому газова фаза шорсткої поверхні може потрапити у відділення неоднорідності та змінити взаємодію показників адгезії на межі «тверде тіло – рідини/повітря», що сприяє більш легкому ковзанню. Кут змочування гідрофільних матеріалів зменшується зі збільшенням фактору шорсткості. Плaskі поверхні мають кут змочування 109° , шорсткі поверхні – від 152 до 170° .

Важливу роль у формуванні реакції взаємодії поверхонь біоміметичних матеріалів відіграють олеофобні властивості, тому деякі морські організми вкриті олеофобною оболонкою. Це можна використати в практичній діяльності. Наприклад, поверхневий натяг нафти нижчий, ніж у воді, тому для утворення олеофобної поверхні поверхнева енергія твердого тіла в повітрі має бути нижчою, ніж у олії. Олеофобний ефект, який може з легкістю забезпечити біоміметичний матеріал аналогічний лотосу, може бути корисним для очищення поверхонь від налипань залишків палива в трубах, паливних баках та ін. Гідрофільні й олеофільні поверхні здатні взаємодіяти, тому за змивання нафти водою відбувається очищення поверхні. Цей ефект може знайти застосування для запобігання обростанню килю кораблів.

Всі живі організми мають сенсорні органи, які отримують інформацію із зовнішнього середовища для орієнтації, адаптації, пересування. Сенсорні системи комах прості з огляду будови, ефективні та надійні. Комахи здатні виявляти наближення хижаків за рахунок високочутливих волосків механорецепторів, які реагують на слабкі потоки повітря, низькі частоти звуку зовнішнього середовища. Подовження штучних волосків допомагає отримувати розширене поле ідентифікації завдяки чутливим пристроям природних нанотехнологій з інтегрованими системами. Для нейронної обробки візуального середовища комахам потрібно близько 1 млн нейронів, що в 40 000 разів менше потреби для людського ока.

Однією з природних форм кальцію карбонату є арагоніт. *Арагоніт* – нестабільна фаза кальцій карбонату, яка повільно перетворюється на кальцит. За нагрівання вище 400 °C відбувається швидкий перехід арагоніту в кальцит. Перетворення арагоніту в кальцит супроводжується збільшенням об'єму отриманого матеріалу. Арагоніт утворює різні кристали – призматичні, стовпчикові, спиноподібні, голчасті та ін. Він входить до складу перламутрового шару раковин молюсків, в екзоскелет коралів. У зв'язку з тим, що арагоніт у раковині молюска підлягає біологічному впливу, форма кристалів відрізняється від арагоніту неорганічного походження. У деяких молюсків вся раковина складається з арагоніту, в інших – тільки окремі частини, в той час як інші – з кальциту. Перлини складаються з тонких шарів арагоніту.

Мушлі молюсків мають різноманітну будову. Перламутр привертає особливу увагу дослідників, оскільки є зібранням орієнтованих пластинчастих кристалів арагоніту у вигляді «брикетів». Перламутр пропонується використовувати для створення шаруватих нанокомпозитів. Перламутр містить вушка, які складаються із двох шарів із різними мікроструктурами: кальциту й арагоніту.

«Смуги росту» створюють мезошари, що відіграють важливу роль як потужні дефлектори тріщин, призупиняючи їх збільшення. Інтерламмеральні листи між кальцієм і арагонітом в основному складаються з β -хітину. У межах листів наявні шовкподібні білки. Поверхня арагоніту не гладка, має нанорозмірну шорсткість, яка впливає на механічні властивості перламутру. Це дозволяє створювати біологічно активні наноматеріали, що є пластичною і міцною речовиною для імплантатів. Тому перламутр – перспективний матеріал для медицини.

Дефекти кісткової тканини людини, які не здатні до повноцінного самостійного відновлення, активно досліджують з метою поліпшення лікування їх травматичних пошкоджень. Поширеним способом вирішення існуючих проблем травматології є трансплантація природних тканин в місцях дефіциту кістки.

Трансплантація має наступні недоліки: травматичність проведених операцій, які відбуваються під час хірургічної роботи на місцях патологічних змін тканин, труднощі в пошуку якісного матеріалу від донорів, обмежена кількість наявних матеріалів, поширена низька сумісність наданих матеріалів

для імплантації. Дослідники розробили альтернативну стратегію лікування травм кісток.

2.4.3 Біоміметичні наноматеріали в імплантології

Біоміметичні наноматеріали в імплантології – напрямок досліджень, який надзвичайно важливий для лікування пацієнтів з переломами кісток, збільшення терміну придатності імплантатів та для безпечного розсмоктування імплантатів із подальшим виведенням продуктів метаболізму. Щорічно у світі виконується багато ортопедичних операцій. Імплантати, які застосовують у цих оперативних втручаннях, містять остеопрогеніторні клітини та остеоіндуктивні фактори росту. Розробка високобіосумісних, еластичних та міцних біоміметичних наноматеріалів є важливим питанням покращення регенеративної медицини в ортопедії та травматології.

Гідроксиапатит кальцію (ГАП) – неорганічний компонент кісткової тканини людини. У природних структурах забезпечує процеси остеогенезу, сприяє природному обміну кальцію в організмі; пористі та щільні керамічні матеріали на основі ГАП використовують у медицині для лікування кісткових дефектів. Сучасні методики лікування потребують використання такого матеріалу на основі кальцію фосфатів, який був би здатним розчинятися в середовищі організму по мірі наростання нової кістки, даючи для них основу для формування у вигляді іонів кальцію та фосфат-іонів. У перспективі доцільно отримати композиційні матеріали, у складі яких існують резорбуючі та резистентні фази. Зазвичай як резистивну фазу використовують ГАП, а у ролі резорбуючої – трикальційфосфат, кальцію пірофосфат, подвійні (кальцію, натрію) чи калію фосфати, кальцію карбонат, фосфатне скло.

Полімерні матеріали – матеріали на основі високомолекулярних сполук, широко застосовують у медицині для розробки дослідницької та лікувальної продукції, виготовлення інструментів, посуду для наукових лабораторій. Полімерні матеріали (поліетилен, поліпропілен, фторопласт, силікони, поліметилметакрилат), які не змінюють своїх властивостей під впливом зовнішнього середовища, застосовують для створення штучних судин, клапанів серця, кришталіків очей, частин ендопротезів суглобів, штучного сухожилля, м'язів, штучної нирки.

Наноматеріали для ортопедичних втручань мають здебільшого позитивні властивості: високу біосумісність, низьку токсичність, здатність до біодеградації. Почали застосовувати матеріали на основі полімерів та мінералів (до яких відносять хітозан та ГАП) для відновлення кісток. Кістка складається на 60–65 % з ГАП, а також колагену, хондроїтину сульфату тощо.

Біологічно активні частинки використовують у медицині. Біоміметичні матеріали поширені завдяки їх здатності сприяти відновленню кісток, біосумісності, відновленню мінералізованих тканин. Проводять впровадження нових методик із використанням золь-гель наночастинок $\text{SiO}_2\text{--CaO}$. Колоїдні кристали – це сферичні агрегати. Високовпорядкована організація отриманого

матеріалу на основі наночастинок подібна до мінералізованих структур. Біоскло на основі системи $\text{MgO}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ володіє високою активністю для формування ГАП кістки.

Кальцію фосфат вважають основою для утворення композитів із желатином. Кальцію фосфат має мінеральне походження. Поєднання двох тонких шарів кальцію фосфату забезпечує синтез кісткової тканини. Внутрішній шар кальцію фосфату розчиняється довше і вивільняє іони протягом тривалого періоду, що сприяє підвищенню остеогенезу. Щільно прилягаючі кристали ГАП забезпечують необхідний капілярний ефект на всій поверхні імплантату, що викликає швидкий ріст кісткової тканини.

Біоміметичні наночастинки використовують для виготовлення різних нанокомпозитів. Досліджують наночастинки біоміметичних матеріалів – полістирол сульфату, вкритого шаром діоктадецил диметиламонію, кремнезему, вкритого нейтральним бішаром фосфатидилхоліну, міконазолу.

Існують недоліки у традиційних методах лікування переломів кісток, тому дослідники розглядають можливості розробки нових наноструктурованих замінників кістки, у складі яких лежать одностінні нанотрубки, біоміметичний ГАП, біосумісний хітозан. Для поліпшення регенерації кістки виготовляють одностінні карбонові нанотрубки. Так, одностінні карбонові нанотрубки мають значно менший діаметр і довші. Їх нанокомпозити з хітозаном сприяють більш високій щільності вrostання остеобластів порівняно з іншими експериментальними матеріалами. Іншою важливою властивістю нанотрубок є їх здатність транспортувати лікарські засоби, яка підвищується за поєднання з полімерними матеріалами.

Карбонові наноструктури – дендримери – можуть бути застосовані для визначення домішок у фармацевтичних препаратах, сечі та сироватці крові.

Мінералізація біокомпозитних матеріалів ґрунтується на імітації хімічного складу натуральної кістки. Кристали утворюються на мембрані нановолокон, яка містить Ca^{2+} як прекурсор за рахунок більш сильних іонних взаємодій із желатином.

Діоксид титану в сполученні з наночастинками золота в присутності аскорбінової кислоти може виступати у ролі стабілізатора. Матеріал може бути основою для синтезу гібридних матеріалів, які будуть застосовані для фотокаталізу.

Гадоліній, поєднаний із бетацилодекстрином та/чи діоксидом титану, може бути застосований як флуоресцентний маркер панкреатичних ostrivciv. Матеріал *in vitro* забезпечує більш контрастне посилення візуалізації протягом більш короткого часу сканування. Представлений метод важливий для лікування підшлункової залози. Наночастинки титану силікату завдяки взаємодії з аланіном, лактатом, холінестеразою, глутатіонестеразою та іншими ферментами можна використовувати для вивчення метаболізму пуголоків.

Нанокристалічність структури покриття з наночастинками титану здатна забезпечити в поєднанні з наночастинками ГАП шорсткуватість, пористість, високу адсорбцію протеїнів, що покращують якість біоміметичних матеріалів.

Наноструктурований титан впливає на життєздатність клітин і експресію генів. Ендоцитоз відбувається за рахунок ліганд-рецепторних та електростатичних взаємодій між матеріалами і фосфоліпідами на мембрані клітини. Титанові імпланти мають розміри 45–50 нм у діаметрі.

Поєднання наночастинок полі-(молочної-со-гліколевої кислоти) (ПМГК) з полікапролактоном з метою утворення термостійкого біоміметичного матеріалу, в якому наночастинки залишаються в незмінному вигляді після плавлення, потрібне для безпечного здійснення термічного процесу стерилізації. Наночастинки ПМГК із полікапролактоном утворюють термостійкий біоміметичний матеріал, який не змінюється після плавлення, що важливе для здійснення термічного процесу стерилізації.

Розподіл і концентрацію ПМГК можна контролювати, підібравши розміри наночастинок і час доставки, тому що наночастинки швидко поглинаються ендотеліальними клітинами, локалізуються переважно в цитоплазмі. У регенеративній медицині використовують різні наноматеріали (матеріали з розмірами частинок в інтервалі 1–100 нм, створені за допомогою нанотехнологій), поширене застосування парамагнітних наночастинок (Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, MnFe_2O_4) для візуалізації кісток, органів шлунково-кишкового тракту, лімфатичних вузлів, печінки, селезінки тощо, хоча розміри деяких структур перевищують 100 нм. Прикладом є карбонові нанотрубки довжиною 500 нм і діаметром 2–3 нм.

Нанокompозити наночастинок ферум оксиду в сполученні з манганом призначають для візуалізації кісток, органів шлунково-кишкового тракту, печінки, селезінки тощо.

Наночастинки ферум оксиду в поєднанні з наночастинками золота вступають у взаємодію з лужною фосфатазою та іншими субстратами. Ці композити можуть бути виявлені завдяки електронній мікроскопії і спектроскопії. Відоме застосування вищезазначених композитів для визначення мутацій у ракових клітинах у присутності 2-фосфо-L-аскорбінової кислоти.

Час дії наночастинок оксидів металів залежить від концентрації дослідженого матеріалу, яка впливає на проникність наночастинок відносно клітинних мембран, запальні процеси в ендотеліальних клітинах судин та на життєздатність клітин. Щодо цитотоксичності та проникності в ендотеліальних клітинах судин наночастинки магній оксиду, міді та цинку відрізняються. Найменша цитотоксичність характерна для магній оксиду. Вода впливає на ступінь розчинення наночастинок магнію оксиду, що пов'язане зі ступенем гідроксилування поверхні наночастинок.

Біоміметичний синтез наночастинок металів можливий із використанням екстракту листя алое (*Aloe vera*). У дослідженні використовували наночастинки флуороурацилу з середнім розміром 35 ± 5 нм. Концентрація екстракту листя алое впливала на розмір синтезованих наночастинок: з її підвищенням зменшується розмір наночастинок флуороурацилу. Також для синтезу нанометалів (золото, срібло, залізо, кадмій) використовують овес (*Avena Sativa*),

лимонник (*Cymbopogon flexuosus*), листя дерева нім (*Azadirachta indica*), амалака (*Embllica officinalis*), кориця (*Cinnamon camphora*), алое (*Aloe vera*).

Можливість застосування нанобіотехнологічних розробок у медичній практиці для профілактики, діагностики і лікування різних захворювань із контролем біологічної активності отриманих продуктів чи медикаментів проводить нанобіотехнологія, хоча цей міждисциплінарний напрямок перебуває у стадії становлення та інтенсивних досліджень.

Запропоновано використання нанокристалів, наноемульсій, дендримерів у косметології. Деякі наноматеріали вже знайшли застосування на практиці. Прикладом є надтверді сплави металів у техніці, ліпосоми у медицині, фулерени і дендримери для діагностики захворювань і цільової доставки лікарських засобів. Важливим здобутком є використання генної інженерії, регенеративної медицини та наномедицини, побудоване на досягненнях нанобіотехнологій, причому чинником максимального успіху може стати їх спільне застосування з діагностикою захворювань за допомогою квантових міток. Зараз для цього використовують маркери з токсичних органічних барвників, що погано позначається на пацієнті, а квантові мітки (як напівпровідникові кристали нанометрового розміру) позбавлені цього недоліку.

Серед нових носіїв ліків слід окремо виділити **аквасоми** – клас твердих носіїв, що складаються з ядра, оболонки та ліків. За допомогою аквасом дослідники планують застосовувати терапевтичні препарати в організмі, тому поверхнева модифікація вуглеводами забезпечує гладку молекулярну стабілізуючу плівку, яка має зменшити побічні ефекти косметичних засобів. Перспективним розглядають використання плівок на основі нанотехнологій з метою відновлення шкіри, омолодження, зупинення процесів старіння за рахунок поліпшення надходження корисних речовин, до яких належать вітаміни, біометали, амінокислоти, ферменти. Довготривалий процес відновлення тканини після хірургічних втручань – негативний наслідок медицини. Важливим питанням є вивчення побічної дії біоміметичних матеріалів для терапії захворювань.

Біоміметичні матеріали відтворюють властивості живих тканин за рахунок імітації різних факторів. Розміри можуть покращити всмоктування наночастинок, разом із тим підвищити інтоксикацію організму. Токсичність наночастинок вивчена на сьогодні недостатньо. Щурі, миші, кролики можуть бути поганими моделями з метою дослідження токсичності біоміметичних матеріалів, тому що потрібен час для якісного вивчення властивостей препарату. Ефективний моніторинг може значно покращити координацію застосування біоміметиків. Фармацевтичний ринок пропонує патентовані ліки, які повинні відповідати безпеці, доцільності застосування, перспективності результатів, які потребує отримати покупець.

Наночастинки магнію також дозволяють зменшити вираженість екзотермічних реакцій полімерів, які використовують як кістковий цемент, таких як поліметилметакрилат, за рахунок збільшення площі поверхні порівняно зі звичайними частинками MgO. Поліметилметакрилат є

екзотермічним матеріалом, що може завдати шкоди здоровій кістковій тканині, наприклад після рентгенівського опромінення, коли погіршується візуалізація, тобто чіткість оцінки щодо формування кістки.

Для виготовлення біоміметичних матеріалів із медичним застосуванням використовують також поліамінокислоти, поліефіри, поліаміди, поліуретани, поліортоефіри, поліакриламід та ін. Природа дозволяє ефективно використовувати форми, але звичайне копіювання природної структури може не мати ефекту. Визначення біоматеріалів, які підтримують клітинну толерантність, є найголовнішим питанням у дослідженнях ембріональних стовбурових клітин. Стовбурові клітини є матеріалом досліджень із регенеративної медицини. Останнім часом нанотехнології надають можливість для функціоналізації нановолокон із біоактивними факторами (ліки, білки чи нуклеїнові кислоти), які можуть направити диференціацію ембріональних стовбурових клітин. Довгострокове приживлення стовбурових клітин у природних умовах має одне з важливих значень перед нанесенням інженерних тканин для клінічного застосування. Тканинна інженерія поєднує технології використання хімічних речовин із генною інженерією.

Біоміметичні матеріали розробляють для виготовлення тканин ока. Нові гібридні мікро- та наноматеріали дозволяють виготовити наноструктури, які пропускають світло для підвищення чутливості ока. Такі сполуки оптично характеризуються апертурою 0,77, а передача світла може бути покращена на 2,3 % за довжини хвилі 632,8 нм, що дозволяє отримати більш чітке зображення небілковими наноструктурами.

Розвиваються дослідження полісахаридних нанокристалів. **Біоміметичні оптичні наноматеріали** – це механічно адаптивні наноматеріали, для синтезу яких використовують наночастинки полімерів, емульсії наностабілізаторів. Хімічні модифікації нанокристалів мають фізико-хімічні переваги та покликані розвивати функціональність використання в терапії очних патологій.

Існують свідчення щодо утворення за допомогою гібридних нанотрубок трубчастих плазмових мембран для кальцій-іонних каналів. Нанотрубки – порожнисті білкові циліндри від 25 нм у діаметрі. Багатошарові карбонові нанотрубки відображають природу мікротрубок.

Досліджують іонні властивості проникності нанопор, які знаходяться у фосфоліпідному бішарі. Загальна вибірковість значною мірою залежить від сумарного заряду фільтра, аналіз розподілу функцій свідчить про значне структурування розподілу іонів і води в нанопорах. Детальний аналіз взаємодії нанопор, в яких заряд сітчастого фільтру дорівнює нулю, з іонами Ca^{2+} показав, що локальні взаємодії з аніонними (карбоксилатними) групами селективного фільтру зумовлюють часткову заміну сольватуючих водних іонів.

Декілька функціоналізованих матеріалів мають застосування в регенеративній медицині, тканинній інженерії. Наночастинки використовують для відстеження стовбурових клітин, доставки генів у стовбурових клітинах, трансплантації біоміметичних тканин. Використовують наноматеріали амфіфільних пептидів, що відносять до самоорганізуючих пептидів, карбонових

нанотрубок, волокон, виготовлених способом електропрядіння. Розробка нових наноструктур на сьогодні поглиблює розуміння молекулярної самозбірки для біоміметичних, багатофункціональних матеріалів. Функціоналізація може бути виконана на нанорівні, тому наноматеріали імітують позаклітинну матрицю, беруть участь у пептидних реакціях, сприяють відновлюючим процесам.

Перспективним є питання використання кількох індикаторів з однаковими властивостями. Нові інженерні індикатори дозволяють проводити ефективні дослідження. Створено новий індикатор, до складу якого належать полімолочна кислота, мікросфера з короткими нитками ДНК і синтетичні парамагнітні наночастинки ферум оксиду. Синтетична ДНК виступає в ролі мітки наших індикаторів, які дозволяють відрізнити різні індикатори, наночастинки ферум оксиду полегшують визначення магнітної концентрації трасерів у зразках води. Деякі потенційні переваги цієї концепції трасуючих компонентів включають практично безмежні можливості для позначення індукторів.

Нанокompозити розглядають як біоміметичний матеріал у зв'язку з регульованими фізичними, хімічними, фізико-хімічними та біологічними властивостями. Дослідження *in vitro* та *in vivo* дають змогу вирішити ряд важливих проблем, тому використовують нанокompозити на основі наночастинок ПМГК та аморфного кальцію фосфату (poly(lactic-co-glycolic acid) and amorphous calcium phosphate nanoparticles –PLGA/a-CaP). У ролі остеоіндуктивного компонента ГАП вважають більш перспективним матеріалом для синтезу інших композитів. Підстилаюча поверхня з наночастинок PLGA/a-ГАП підходить для розробок матеріалів з остеоіндуктивним ефектом.

Розуміння будови мінералізованих речовин є питанням галузі біомінералізації, тому має важливе значення для розвитку кісткової тканини. Кістка являє собою тканину з органічної матриці, складається з колагенових пучків, має відповідність із вбудованими нанорозмірними неорганічними наночастинами ГАП. Гібридні неорганічні наноструктури імітують склад мінералізованих тканин. Встановлено, що наноструктури циліндричної форми направляють ріст орієнтованих кристалів наногідроксиапатиту. Геометричні обмеження пов'язані з морфологією наноструктур, тому можна ефективно контролювати ріст наночастинок у кістковій тканині. Крім того, мінералізація макроскопічних пучків має відповідність із нанопучками.

Нанокompозити хітозану використовують у біомедичних компонентах. ω -Трансаміназу (ω -ТА) додають за допомогою нуклеофільних реакцій до катехінів. За оптимальних умов 87,5 % ω -ТА приєднується до речовини. Це дозволяє проводити ферментне завантаження в кількості 681,7 мг/м. Композит катехол-хітозан/наночастинки ферум оксиду термічно стабілізуються. Отримані результати свідчать, що така речовина для магнітних композитів може забезпечити поліпшену технологію виготовлення платформи для знерухомлення біомакромолекул. Перспективні матеріали – запорука розвитку техніки. Термічна, хімічна і механічна стабільність багатьох оксидних і

неоксидних сполук відкриває нові можливості конструювання мікроструктури і контролю над дефектами.

Таким чином, синтетичні біоміметичні наноматеріали, розроблені на основі властивостей природних матеріалів органічного та неорганічного походження, інтенсивно досліджуються вченими усіх країн. Поліпшення інтеграції біоміметичних наноматеріалів в організм людини є підставою для подальших наукових розробок у галузі біології, хімії, медицини для їх подальшого впровадження в медичну практику як нових наноматеріалів із метою застосування для профілактики, діагностики та лікування різних захворювань.

Запитання для самоконтролю до розділу 2

1. Висвітлити сучасне уявлення про клітинні технології.
2. Дати визначення стовбуровим клітинам.
3. Роль стовбурових клітин у створенні клітинних технологій.
4. Дати визначення поняттю «тканинна інженерія».
5. Які основні об'єкти тканинної інженерії?
6. На чому заснована концепція тканинної інженерії?
7. Якими властивостями живих тканин повинні характеризуватися тканинно-інженерні конструкції?
8. Проаналізувати основні проблеми на шляху практичного застосування продуктів тканинної інженерії.
9. Визначити основні принципи міждисциплінарного підходу у тканинній інженерії.
10. Надати характеристику основних джерел клітин для тканинної інженерії хряща.
11. Які аспекти включає техніка отримання біоактивних імплантатів та біоштучних органів?
12. Проаналізувати перспективи застосування та етичні проблеми використання стовбурових клітин в реконструктивній технології.
13. Вказати стратегічні напрямки у документі ЮНЕСКО: «Біоетика: міжнародні аспекти».
14. Визначити основну стратегію тканинної інженерії.
15. Навести основні критерії під час конструювання клітинних матриць.
16. Визначити ефективність застосування електроспінінгу в конструюванні клітинних матриць.
17. Проаналізувати основи методу імпринт-літографії в розробці клітинних матриць.
18. Визначити основні засади застосування 3D-друку в тканинній інженерії.
19. Проаналізувати основи методу склеювання порошкового матеріалу в конструюванні клітинних матриць.

20. Навести основи методу екструзійної технології в конструюванні клітинних матриць.
21. Проаналізувати застосування методу стереолітографії в конструюванні клітинних матриксів.
22. Визначити основи методу 3D-плотингу (біоплоттинг) у конструюванні клітинних матриць.
23. Дати визначення поняттю «біоміметичний синтез».
24. Якими методами можуть бути створені біоміметичні матеріали?
25. Обґрунтувати основні принципи на яких заснована біоміметика.
26. Навести приклади функціонування природних структур.
27. Охарактеризувати метаматеріали з позиції біоміметики.
28. Навести синтетичні неорганічні аналоги біологічних систем.
29. Проаналізувати основні властивості біоміметичних матеріалів.
30. Охарактеризувати високобіосумісні, еластичні та міцні біоміметичні наноматеріали для травматології.
31. Нанотехнології в біоміметиці.
32. Сучасні біоміметичні наноматеріали в імплантології.
33. Визначити основні вимоги до матеріалів для протезування кістки.
34. Визначити основні властивості альбуміну та гамма глобуліну.
35. Проаналізувати застосування альбуміну та гамма-глобуліну в сучасній терапії.
36. Проаналізувати роль органічних компонентів в кальцифікації кісткової тканини.
37. Визначити властивості поверхні біоматеріалу, які обумовлюють адсорбцію протеїнів.
38. Проаналізувати характеристики адсорбуючої поверхні.
39. Визначити вплив вільної енергії поверхні біоматеріалів на адсорбцію протеїнів.
40. Провести порівняльну оцінку можливості зв'язування з альбуміном поверхні резорбційних та резистивних склокристалічних матеріалів.
41. Обґрунтувати перспективи створення гемосумісних гідрофільних матеріалів медичного призначення.
42. Навести характеристику основних матеріалів для виготовлення скаффолдів у тканинній інженерії хряща.
43. Визначити перспективність застосування фіброїну шовку та желатину у тканинній інженерії.
44. Навести структуру та властивості хітозану.
45. Обґрунтувати переваги застосування хітозану в різних галузях науки, техніки, промисловості та медицини.
46. Обґрунтувати структурну роль хітозану в одержанні комопозиційних біоактивних кальцій-силікофосфатних матеріалів.
47. Визначити можливі шляхи формування у структурі біоактивних кальцій-фосфатних матеріалів КГАП В-типу.

48. Визначити необхідність наявності матеріалів КГАП В-типу у структурі біоактивних кальцій-фосфатних матеріалів у створенні ендопротезів для кісткового ендопротезування.
49. Проаналізувати антимікробну активність хітозану.
50. Визначити основні властивості та склад колагену.
51. Основна роль колагену в живому організмі.
52. Застосування колагену в створенні медичних полімерних матеріалів.
53. Визначити перспективність застосування целюлози в створенні тканинно-інженерних конструкцій.
54. Проаналізувати ефективність застосування фібрoneктину в створенні тканинно-інженерних конструкцій.
55. У чому переваги та недоліки застосування альгінату й агарози у створенні тканинно-інженерних конструкцій?
56. Визначити структуру та властивості гіалуронової кислоти як біоактивного матеріалу.
57. Навести основні види та властивості біосумісних полієфірів.
58. Визначити перспективність застосування еластомерів у створенні тканинно-інженерних конструкцій.
59. Навести природні та синтетичні полімери, а також їх комбінації, які використовуються для засобів доставки лікарських засобів.
60. Навести основні види біокераміки для протезування кісткової тканини.
61. Визначити переваги та недоліки застосування кераміки для заміщення кісткової тканини.
62. Проаналізувати типи взаємодії кісткової тканини з біокерамічними біосумісними імплантатами.
63. Проаналізувати реакційну здатність біокерамічних матеріалів.
64. Навести класифікацію керамічних імплантатів залежно від типу міжфазної відповіді.
65. Проаналізувати біоактивність кальцій-фосфатних матеріалів залежно від їх складу.
66. Навести основні види та властивості біоінертної кераміки.
67. Проаналізувати мікроструктуру біоінертних матеріалів залежно від їх властивостей.
68. Проаналізувати переваги та недоліки способів одержання біоінертної кераміки.
69. Визначити, за якими параметрами оцінюють вплив імплантатів на процес репаративної регенерації кістки з урахуванням складу матеріалу та механізмів регенерації.
70. Проаналізувати основні види біоактивних матеріалів та комерційні продукти на їх основі.
71. Навести основні системи для отримання біоактивного скла склокристаличних матеріалів.

РОЗДІЛ 3 ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ СКАФФОЛДІВ У КЛІТИННІЙ ІНЖЕНЕРІЇ

3.1 Стратегії вибору скаффолдів для біоінженерії кісткової тканини

3.1.1 Принципи проектування та основні вимоги до скаффолдів

Вибір скаффолда є одним із ключових елементів, від якого багато в чому залежить кінцевий успіх у реконструкції тканин. Скаффолди забезпечують не лише прикріплення клітин та їх росту, а й сприяють формуванню необхідної тканини. Вирощування клітин на носії-скаффолді, який підтримує формування та дозрівання тканини *in vitro*, є одним з найбільш інноваційним підходом у створенні тканинно-інженерних конструкцій. Згодом біоінженерний продукт імплантується пацієнту, де відбувається його ремоделювання та вбудовування в гістоархітектоніку тканини або органу.

Не викликає сумнівів, що найкращим скаффолдом для штучної тканини є позаклітинна матриця (ПКМ) тканини-мішені в їх природному стані. Тим не менш, множинні функції, складний склад та динамічний характер ПКМ у нативних тканинах ускладнюють його точне імітування. ПКМ є багатофункціональним, специфічним для кожного органу або тканини каркасом, що забезпечує зростання, диференціювання та функціонування клітин. Структурно він складається з численних водорозчинних й нерозчинних білків та глікопротеїнів, що формують жорсткі чи гелеподібні комплекси. Крім просторових та опорних функцій він виконує важливу роль в адгезії, проліферації, міграції та функціонуванні клітин, пов'язаних з формуванням ключових матрикс-асоційованих факторів і адгезивних молекул.

ПКМ характеризується в'язкопружністю та механокондукційними властивостями, що регулюють динамічну поведінку міжклітинних зв'язків. Між ПКМ та клітинами, що ростуть на ПКМ, формуються біохімічні, біоадгезивні та просторові взаємодії, які активують внутрішньо клітинні сигнальні шляхи, що регулюють проліферацію та клітинну експансію. Децелюляризований ПКМ розглядають як найбільш ефективну біологічну матрицю, що створює природне мікрооточення під час формування нових органів та тканин. Його властивості біосумісність, біорозкладання та біоіндуктивність є важливими критеріями використання як у наукових дослідженнях, так і в хірургічній практиці. Концепція використання ПКМ, специфічного для певної тканини, передбачає його застосування в регенерації даного типу тканини.

Наприклад, використання ПКМ внутрішнього меніска викликає диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку людини у фіброхондрогенні клітини, тоді як використання ПКМ зовнішнього меніска – їх диференціювання у фіброласти. Тому використання неспецифічних ПКМ для відновлення органів зрештою можуть наводити до відторгнення трансплантату.

Децелюляризований ПКМ тканини/органу, його форми у вигляді гідрогелю та мікрочастинок широко використовуються в регенеративній медицині. Децелюляризований ПКМ кісток, молочної залози, шкіри та сечового

міхура найчастіше застосовується у клінічній практиці. Цілий орган децелюляризується й використовується як скаффолд для заселення специфічними клітинами з використанням індукуючих та ростових факторів та регенерації функціонального органу *in vitro*. Використання децелюляризованого ПКМ у вигляді гідрогелю значно збільшилося в галузі дослідження раку та доставки ліків та клітин.

Після приготування гідрогелю його наносять на культуральний пластик або твердий каркас (зазвичай пористий), підготовлений з використанням таких технологій виготовлення, як 3D-друк дослідного зразку, традиційний метод прес-форми та стереолітографічні методи.

Покриття гідрогелем пористого скаффолда, отриманого з синтетичних біоматеріалів (полімерів), наприклад полікапролактону (polycaprolactone або PCL), забезпечує формування гідрофільної поверхні необхідної для початкових клітинно-матричних взаємодій, які є важливою первинною умовою для успішного прикріплення клітин та їх зростання.

Підготовка «біочорнила» із суміші мікрочастинок гідрогелю ПКМ із клітинами сьогодні є найважливішим напрямом у галузі біоінженерії та регенеративної медицини. Децелюляризований ПКМ вважається ідеальним біоматеріалом для його використання як біочорнила. Однак використання децелюляризованого ПКМ не завжди можливе. За винятком деяких досліджень для створення тканинно-інженерних конструкцій використовуються екзогенні скаффолди, які імітують можливості ПКМ для зростання клітин при створенні біоінженерних конструкцій.

У створенні скаффолдів прагнуть дотримуватись певних умов:

1) терміну для васкуляризації, формування нової тканини, ремоделювання, щоб полегшити її інтеграцію в тканини господаря за імплантації та забезпечити ефективне перенесення поживних речовин та метаболітів без значної шкоди механічній стійкості скаффолду;

2) структуру скаффолда, що забезпечує підтримку використаних та ендогенних клітин під час їх кріплення, росту та диференціації за культивування *in vitro* та імплантації *in vivo*;

3) взаємодію скаффолдів із клітинними компонентами тканинно-інженерної конструкції для підтримки та регулювання їх діяльності через клітинно-адгезивні ліганди, що покращують адгезію клітин або фізичні сигнали, що регулюють топографію та впливають на морфологію та напрямок росту клітин (скаффолд може служити як транспортний засіб доставки чи зберігання факторів зростання, що прискорюють регенерацію);

4) відповідність механічних властивостей та форми скаффолдів реконструйованої тканини;

5) скорочення термінів зрощування живої тканини з імплантатом,

У загальному випадку це може бути досягнуто двома різними методами.

Перший – це управління складом, структурою та, відповідно, експлуатаційними властивостями матеріалів для виготовлення імплантатів. Найбільш яскравим прикладом такого управління може бути забезпечення

необхідного рівня та швидкості резорбції матеріалу. За рахунок процесів часткового вилуговування іонів натрію, калію, магнію, кальцію, фосфатів зі структури матеріалу створюється пересичення ділянки навколо імплантату вказаними частинками, що поряд із наявністю аналогічних речовин у крові та плазми людини приводить до утворення нових кристалів фосфатів кальцію, які є острівцями адгезії для подальшого утворення сполучної тканини.

У свою чергу, за використання силікатних матеріалів скломатриця після вилуговування схильна до утворення аморфного силіційкисневого шару з великою кількістю Si–ОН груп, які притягують до себе біологічно активні клітини, що також пришвидшує процес зрощування.

Окрім вилуговування, суттєвий вплив має швидкість розчинення самого матеріалу. За незначної швидкості розчинення процес зрощування буде дуже довгим, що подовжує термін реабілітації пацієнтів.

У протилежному випадку, за рахунок стрімкого виходу катіонів у живі тканини, можливе виникнення критичного перенасичення рідин організму іонами, що негативно впливає на роботу печінки та може бути причиною виникнення важких її захворювань. Тому під час розгляду резорбційних силікатних чи інших матеріалів кажуть про оптимальну температуру розчинення, яка відповідає швидкості росту живої (в більшості кісткової) тканини. Таке заміщення «неживого» «живим» дозволить, не втрачаючи механічної міцності на ділянці імплантації, поступово замінити імплант природною тканиною, не подовжуючи термінів зрощування на першому етапі приживлення.

Другий – пришвидшення процесів регенерації самого живого організму. В організмі людини від самого народження та до смерті реалізується велика кількість механізмів, спрямованих на оновлення живих клітин, відбудову та відновлення пошкоджених чи втрачених тканин. Звісно у молодому віці ці механізми більш ефективні, а із плином часу їх продуктивність падає.

Усі процеси розмноження, росту й розвитку регулюються як завдяки експресії відповідних генів, так і біологічно активними речовинами. Клітина росте та розвивається під час інтерфази, коли подвоюються молекули ДНК та інтенсивно синтезуються інші органічні сполуки. Досягнувши певних розмірів, вона часто набуває здатності до наступного поділу. Але є клітини, які в процесі розвитку втрачають здатність до поділу. Так, на втрату здатності до поділу еритроцитів та тромбоцитів впливає насамперед відсутність у них ядра. Здатність до поділу можуть втрачати й інші типи диференційованих клітин людини, наприклад остецити.

До механізмів регуляції поділу, росту, розвитку та диференціації клітин належать різні варіанти узгодженої взаємодії між клітинами багатоклітинних тварин й людини. У них є складна система сигнальних взаємодій, коли комплекси сигнальних білків взаємодіють з мембранами клітин-мішеней й потрапляють усередину клітини. На поверхні кожної клітини є рецептори, завдяки яким клітина розпізнає різні зовнішні впливи, зокрема різні біологічно активні речовини. Подібні рецептори дають змогу розпізнавати й іншу, подібну

до себе клітину. Функціонують ці рецептори згідно з правилом «ключ – замок». Взаємодія позаклітинного сигналу з мембранним рецептором активує його та запускає каскад процесів у клітині, у результаті чого вона адекватно реагує на цей сигнал.

Зовнішні сигнали можуть бути як фізичними (температура, іонізуюче або електромагнітне опромінення тощо), так і хімічними (гормони, нейрогормони, нейромедіатори, фактори росту клітин, токсини). Досягаючи клітин, на які вони здатні впливати (такі клітини називають клітинами-мішенями), ці сигнали впливають на експресію певних генів, змінюючи тим самим перебіг процесів метаболізму. Щойно припиняється дія сигналів на клітину, вона перестає на них реагувати.

Серед великої кількості речовин та факторів, які впливають на процеси відновлення в живому організмі, із точки зору можливості використання для створення скаффолдів, можна виділити фактори росту, прикріплення та розпластування живих клітин.

Фактори росту клітин – це біологічно активні поліпептиди, які здатні синтезувати клітини різних типів тканин. Їхня дія подібна до дії гормонів або нейрогормонів. Вони можуть стимулювати або пригнічувати різні процеси життєдіяльності клітини: їхній ріст, розмноження, метаболізм, рухливість, диференціювання тощо.

На відміну від гормонів, фактори росту клітин виробляють неспеціалізовані клітини, які можна виявити в усіх тканинах. Зокрема, фактори росту клітин стимулюють синтез молекул ДНК й мітотичний поділ клітини, впливають на диференціацію дочірніх клітин, стимулюють експресію генів, які до того були неактивними.

Фактори росту також відіграють значну роль у застосуванні скаффолдів для інженерії кісткової тканини. Процеси утворення нової кістки та депонування позаклітинного матриксу регулюються рядом факторів росту та біомолекул.

Морфогенні білки кісток (МБК) відіграють вирішальну роль у розвитку кісток та хрящів, а також мають здатність ініціювати проліферацію та диференціацію остеопрогеніторних клітин.

Є кілька прикладів скаффолдів, які успішно включили МБК, що призвело до покращення формування кісток. Однак існує ризик утворення кісткової тканини в м'якій тканині тканин, або гетеротопне окостеніння, також пов'язане з використанням МБК. Фактор росту ендотелію судин (VEGF) також часто включаються в каркаси з бажаними властивостями, в тому числі здатність посилювати формування кровоносних судин і кісток *in vivo*.

Трансформуючий фактор росту b (TGF b), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1) й фактори росту фібробластів (FGF) є додатковими прикладами факторів росту, які використовуються в кістках та інженерії хрящової тканини.

На рівень синтезу факторів росту клітин впливають гормон росту (соматотропін), інсулін, статеві гормони тощо. Зокрема, інсулін і статеві

гормони підвищують рівень вироблення факторів росту клітинами печінки, а гормони кори надниркових залоз (глюкокортикоїди), навпаки, його знижують.

Створення скаффолдів, насичених активними речовинами, дозволить застосувати обидва вищенаведені методи пришвидшення термінів зрощування імплантатів з кістковою тканиною. Велика кількість модифікацій та комбінацій матриці та агента-наповнювача дозволяє ефективно керувати процесами відновлювання кісткових тканин та обирати найбільш оптимальні варіанти для кожного окремого випадку використання.

3.1.2 Конструктивні параметри скаффолдів для кісткової інженерії

Для створення скаффолдів для кісткової інженерії важливим є створення складу, структури та властивостей кісткової тканини. Розглянемо склад та структуру кісткової тканини.

3.1.2.1 Структура та властивості кісткової тканини

За своїм складом кістка є гетерогенний композитний матеріал, що включає мінерал гідроксиапатиту ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), змішаний органічний (колаген I типу, ліпіди, неколагенові білки), неорганічні компоненти, воду тощо (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Склад кісткової тканини

Неорганічна фаза	Органічна фаза
Гідроксиапатит – 60 %	Колаген – 20 % H_2O – 9 %
Mg^{2+} – 0,5 % Cl^- – 0,13 % Інші: K^+ , F^- , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Pb^{2+}	Поліцукри, ліпіди, цитокіни остеоцити, остеокласти

Макроскопічно кістка поділяється на зовнішню кортикальну (компактну) та внутрішню губчасту (трабекулярну). Кортикальний шар кістки представляє собою щільну структуру із силою стискання 130–200 МПа [18, 46], з пористістю 5–10 %, тоді як губчаста кістка має пористість 50–90 %.

Кортикальна кістка має значно більшу міцність на стискання (100–230 МПа), ніж губчаста (2–12 МПа). Мікроскопічною одиницею будови кістки є остеон (система Гаверса), розмір якого становить 100 мкм.

Кісткову тканину можна розглядати як кераміко-органічний біонаноккомпозитний комплекс, органічні компоненти якого забезпечують гнучкість, у той час як неорганічні – міцність та ударну в'язкість (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Механічні властивості кісткових тканин

Властивість	Кортикальна кістка	Губчаста кістка	Суглобовий хрящ	Сухожилля
Компресійна міцність (МПа)	100–230	2–12	–	–
Міцність за згинання, розтягування (МПа)	50–150	10–20	10–40	80–120
Деформація до перелому, %	1–3	5–7	15–50	10
Модуль Юнга (за розтягання) (ГПа)	7–30	0,05–0,50	0,001–0,010	1
Жорсткість на стискання (Н/мм)	–	–	20–60	–
Модуль компресійної повзучості (МПа)	–	–	4–15	–

3.1.2.2 Топологічна оптимізація структури керамічних імплантатів

У виробництві імплантату необхідно враховувати ряд механічних (твердість, міцність, модуль пружності тощо), фізико-хімічних та біологічних (адгезія, міграція клітин, васкуляризація тощо) властивостей, які сприятимуть біосумісності, остеointegraції, остеокондуктивності, біодеградації.

Для отримання необхідних характеристик імплантати виготовляються пористими або такими, що мають складну топологічну структуру. Скаффолд є тривимірним, пористим, проникним каркасом з мінімальною токсичністю за біологічного розкладання.

Ціль створення скаффолду – імітувати біологічну функцію й структуру позаклітинної матриці кісткової тканини, які забезпечують оптимальне середовище адсорбції, проліферацію та диференціювання клітин. Крім цього його можна модифікувати для доставки лікарських засобів, факторів росту, модифікованих білків тощо.

Дизайн матриць кісткової тканини – складне завдання, яке вимагає міждисциплінарного та багатомасштабного підходу, оскільки структура та геометрія матриці безпосередньо впливає на клітинну відповідь та утворення нової кістки. Механічні властивості біокерамічних скаффолдів нижчі, ніж у імплантатів, виготовлених у вигляді суцільного моноблока.

Архітектура матриці повинна бути розроблена таким чином, щоб вона створювала механічну підтримку та забезпечувала клітинам доступ до поживних речовин, кисню. Ці характеристики можуть бути досягнуті завдяки наявності пор у структурі скаффолду. Взаємопов'язана пориста структура забезпечує дифузію кисню та поживних речовин усередину та дифузію відходів

зі скаффолду назовні. Пористість також підтримує міграцію клітин у каркас й покращує доступну площу поверхні для зв'язування клітинних матриць та взаємодії з навколишніми тканинами (рис. 3.1 *а, б*).

В організмі клітини та їх ЕСМ зазвичай організовані в тривимірні 3D-комплекси. Таким чином, у тканинній інженерії високопористий 3D-матриця часто необхідна для розміщення клітин і для керування їхнім ростом і регенерацією тканин у трьох вимірах. Будова кісткової тканини різна залежно від розташування. Від цього залежить вибір конфігурацій, а також відповідних біоматеріалів на анатомічну ділянку регенерації, механічні навантаження та бажана швидкість реєстрації.

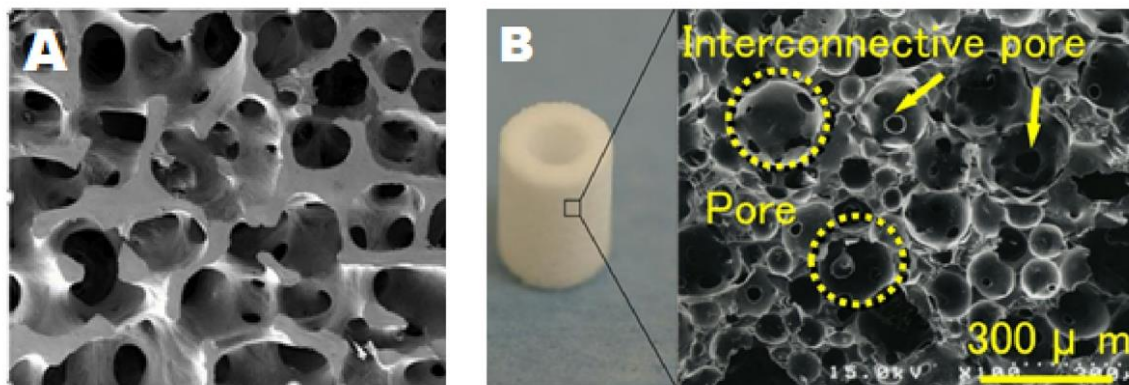


Рисунок 3.1 – SEM-зображення, які показують пористу структуру трабекулярної кістки людини (*а*), а також пори та сполучні пори гідроксиапатитового каркасу (*б*)

Матриця повинна мати високу пористість й міцність, відповідний розмір пор для підтримки міграції клітин та формування нових тканин, доставки поживних речовин. Вона повинна бути розроблена таким чином, щоб направляти формування нової кістки. Швидкість деградації матриці повинна відповідати швидкості формування нової тканини, тобто не має бути ні надто швидкою, ні надто повільною (ймовірно, 6 місяців для застосування *in vivo*). Найважливіші параметри конструкції каркасу кістки перераховані в таблиці 3.3.

Надалі ці властивості архітектури матриці істотно впливають на кількісні показники формування кісткової тканини *in vivo*. Більше того, демонстрація важливості цих параметрів матриці диктується тим, що оптимальна структура повинна формувати сигнальну експресію та індукувати остеогенне диференціювання рекрутованої клітинної популяції. Поряд із комбінацією біологічних та хімічних факторів, таких як керуючі ростові протеїни, регулярні, прецизійні елементи архітектури матриці з оптимізованим дизайном параметрів, необхідні для досягнення оптимальної тканинної інженерії кісткової тканини.

З цілого ряду характеристик тканинно-інженерних матриць, що формуються, необхідно зупинитися на ряді ключових структурних параметрів, які багато в чому визначають можливості міжклітинних взаємодій у матриці.

До таких відносимо пористість та розміри пор матриці, а також ступінь каналної взаємопов'язаності матричних пор.

Таблиця 3.3 – Параметри конструкції каркаса для інженерії кістки

Вимоги до параметрів	Застосування
Пористість (максимальна пористість без шкоди для механічних параметрів)	
Розмір пор	300–500 мкм
Структура пор	Взаємопов'язана
Механічні властивості	
Губчаста кістка	Розтягнення та компресія (стиснення) Міцність: 5–10 МПа Модуль: 50–100 МПа
Кортикальна кістка	Натяг Міцність: 80–150 МПа; Модуль: 17–20 ГПа Компресія Міцність: 130–220 МПа; Модуль: 17–20 ГПа В'язкість руйнування: 6–8 МПа·м ^{1/2}
Властивості	
Деградація, час	Має бути адаптована відповідно до програми пацієнтів
Деградація механізм	Об'ємна або поверхнева ерозія
Біологічна сумісність	Відсутність хронічного запалення
Можливість стерилізації	Стерилізується без зміни властивостей матеріалу

3.1.2.3 Вплив пористості та розмірів пор на міжклітинну взаємодію

Здатність матриці до посилення остеогенної сигнальної експресії та підтримки формування нової кістки значною мірою залежить від розмірів пор і пористості, де пористість відбивається сумарним відсотком пор від загальної поверхні. Розміри пор є діаметром окремої пори матриці. Важливість пористості та розмірів пор матриці може бути відмінною рисою нативної структури кістки, яка сама є пористою структурою.

Кортикальна кістка має значно щільнішу структуру, але і в ній також існує пористість більше 10 %. Така пористість зони кортикальної кістки не перешкоджає васкуляризації та клітинній інфільтрації структур. Навпаки, трабекулярна кістка – значно більш пориста структура з типовою пористістю від 50 до 90 %.

Пори мають значний вплив на ефективність клітинної адгезії, що, у свою чергу, визначає щільність заселення клітин у матриці, їх поширення та міграцію. Ці фактори показали вплив на остеогенне диференціювання за рахунок зміни сигнальної дистанції. Скаффолди повинні містити різний розмір

макропор, що дозволяє клітині та остеону вrostання *in vivo* та мікропори для заохочення до клітинної взаємодії.

Розміри пор й пористість впливають на характеристики матриці міцності. На додаток до розміру пор й загальної пористості, механорегуляторні ефекти вважаються ключовими у впливі на ріст кісткової тканини та клітинну диференціацію *in vivo*. Якщо каркас не в змозі відтворити механічні сили, що передаються клітинам у фізіологічних умовах, клітини можуть бути стимульовані диференціюватися від остеогенного походження до небажаної морфології. Досить міцна матриця забезпечує механічну підтримку в зоні дефекту. Часто міцність має бути порівнянна з кістковою тканиною, особливо у випадку, коли кістка опорна.

Вибір матриці матеріалу з такою ж жорсткістю, як нативна кістка є найбільш вигідним. Однак механічна жорсткість та пористість каркаса є прямим протиріччям фізичних властивостей, причому механічна міцність обернено пов'язана зі збільшенням пористості каркаса. З точки зору несучого навантаження, важливими механічними властивостями скаффолдів є: модуль Юнга (також відомий як пружність, міра жорсткості твердого матеріалу), міцність на стискання (здатність скаффолду витримувати навантаження, що прагнуть до зменшення розміру) та міцність на втому (найбільше напруження, яке матеріал може витримати за певну кількість циклів без руйнування).

Ідеальна матриця більш міцна на стискання порівнянно з кортикальною кісткою, величина якої вздовж довгої осі становить приблизно 100–230 МПа, з модулем Юнга, близьким до 7–30 ГПа та міцністю на розрив 50–151 МПа. В ідеалі, ця міцність на стискання буде доповнюватися пористістю від 60 до 90 % та середнім розміром пор >150 нм. Досягнення успішного балансу *in vivo* між властивостями каркасу є сприятливим для клітинної функції, клітинної життєздатності, тому забезпечення механічної цілісності під навантаженням являє собою важливу та складну задачу в розробці скаффолдів.

У перспективі пористість й розміри пор матриці здатні впливати *in vivo* на остеокондукцію та васкуляризацію. Інтеграція нативних тканин в матрицю стимулюється через проростання в комунікаційні пори, таким чином, оптимальні та мінімальні розміри пор повинні формуватися у матриці для підтримки вrostання тканин.

Індивідуальний розмір пор в межах скаффолду також є важливим фактором. Щільність розташування та розмір пор каркасу значно впливають на клітинний ріст та прикріплення. Коли розміри пор зменшуються, площа поверхні каркаса збільшується. Це збільшує доступність каркасних лігандів для зв'язування клітин для взаємодії. Однак, якщо розміри пор стають занадто малими, клітини можуть почати боротьбу за міграцію в структуру каркасу.

Розміри пор й пористість зумовлюють міжклітинні сигнальні взаємодії, що забезпечують остеобластне диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) та продукцію протеїнів позаклітинного матриксу. Оптимальна тканинно-інженерна матриця має підтримувати зростання і остеогенез

клітинної популяції, що заселяється, також обов'язковими є остеокондуктивність та можливість ангиогенезу з оточуючих тканин.

Обидва показники (остеокондуктивність та васкуляризація) визначаються розмірами пор, пористістю та взаємозв'язуючими пори каналами матриці. В матрицях з однаковою пористістю (близько 50 %) пор менше 40 мкм визначають мінімальне вrostання в матрицю, в той же час розміри пор від 100-350 мкм є обґрунтовано оптимальними.

Скаффолди повинні бути точно сконструйованими з врахуванням параметрів клітин та тканин, з якими вони будуть взаємодіяти. Наприклад, каркаси, імплантовані *in vivo*, мають розміри пор, близькі до 300 мкм, сприяють остеогенезу завдяки вищій проникності та потенціалу васкуляризації, тоді як менші розміри пор (до 100 мкм) є більш доцільними для хондрогенезу. Показано, що макропористість каркасу покращує ангиогенез *in vivo*, тоді як певний ступінь мікропористості (пори з діаметр менше 10 мкм) може покращити взаємодію між клітинами та каркасом, що призводить до остеогенних ефектів. Аналізом впливу пористості та розмірів пор на кісткове загоєння в моделі критичного краніального дефекту в щурів показано, що пори невеликого розміру (100 мкм) індують тим більшу кількість кісткових формувань у ході загоєння кістки, чим більші пори (500 мкм). Виявлено зв'язок між пористістю, набуханням матриці та її біодеградацією.

Оптимальне відсоткове співвідношення пористості за низкою досліджень знаходиться в межах 40–90 %. З одного боку, висока пористість матеріалу сприяє міграції остеоіндуктивних клітин, з іншого – знижує міцність імплантату. Висока пористість збільшує площу поверхні каркасу, що сприяє адгезії клітин та, як наслідок, остеоінтеграції. Існує верхня та нижня функціональна межа розміру пор і пористості матеріалу. Для проростання фіброзної тканини достатній розмір пор становить 5–14 мкм, для остеобластів – 50 мкм. Серед каркасів β -ТКФ з трьома розмірами пор (100, 250, 400 мкм) найбільш ефективна регенерація протягом 12 тижнів була у групі імплантатів з розмірами пор на рівні 100 мкм.

Мінімальний розмір пор для інтеграції кісткової тканини становить 100 мкм (що відповідає розміру остеону), але для оптимального остеогенезу розмір пор має бути в діапазоні 300–500 мкм. Менший розмір з часом призводить до гіпоксії тканин з подальшим утворенням хряща.

Недостатній обмін поживними речовинами та обмежене кровопостачання в пористому каркасі часто перешкоджають формуванню кістки, навіть попри те, що пористий каркас навантажений клітинами або факторами зростання.

Каркаси, що імітують структуру Гаверса, демонструють великий потенціал для доставки клітин, що індують остеогенне, ангиогенне та нейрогенне диференціювання *in vitro* та прискорюють вrostання кровоносних судин та утворення нової кістки *in vivo*.

Таким чином, малі розміри пор можуть збільшувати формування вrostання кістки з навколишньому матриксу тканин, також визначено, що

розміри пор впливають на місця вrostання кісткових формувань з навколишніх тканин у матрицю.

Пористість і розміри пор можуть відрізнятися в кістках різного типу, що технічно ускладнює отримання матриці адекватної пористості традиційними методами. Дослідження скаффолду стегнової кістки з розмірами пор 565 мкм показало більш інтенсивне формування кісткових утворень, ніж за розмірів пор 300 мкм. У цих групах пористість складала 40–50 %, спостерігалися незначні зміни у формуванні кісткових утворень. Було визначено, що пористість має менше значення для формування кісткової тканини, ніж розміри пор.

Незважаючи на велику кількість досліджень у цій галузі, є розбіжності в оцінці значущості розмірів пор на формування кісткової тканини *in vivo*.

Так, у полікапролактоновій матриці з розмірами пор 350, 550, 800 мкм спостерігали незначні відмінності у кількості кісткових формувань через 8 тижнів. Через 4 тижні у групах з великими розмірами пор показана більша кількість сформованої кісткової тканини, що показувало значимість впливу розмірів пор на ріст кістки, проте через 8 тижнів ці відмінності були незначні. Розміри пор на рівні 300 мкм індукують значну кількість кісткових формувань через 4 тижні порівняно з матрицями з розмірами пор 100, 200 та 400 мкм.

Розбіжності між цими дослідженнями можуть показувати, що на формування кісткових утворень у матриці впливають не тільки розміри пор, а й тип матеріалу, швидкість його біодеградації, час, розмір імплантату та особливості васкуляризації оточуючих його тканин. Всі ці фактори можуть значною мірою нівелювати ефекти, що визначаються розмірами пор.

Для кожного окремого матеріалу розміри досі впливають не тільки на остеокондукцію матриці, але і на васкуляризацію, яка є критичним елементом успіху формування кістки. Так, дослідження з використанням кальцій-фосфатної кераміки з розмірами пор від 140 до 280 мкм показали більш швидку васкуляризацію, ніж матриця з розмірами пор від 40 до 140 мкм. Матриці з великими розмірами пор демонстрували значно більшу щільність капілярів у порівнянні з матрицями з меншими розмірами пор, при цьому об'єм формування нової кістки корелював із цими результатами: у групах з великими розмірами пор (210–280 мкм) реєстрували більший об'єм кісткових формувань.

Швидка (рапідна) васкуляризація надзвичайно важлива для зростання кісткової тканини в імплантованому скаффолді, оскільки клітини, імплантовані в матрицю, втрачають життєздатність без крові та харчування. Кисень та поживні речовини передаються на дистанцію близько 200 мкм, отже, створення васкуляризації необхідне навіть для невеликих матриць. Ступінь васкуляризації тканинно-інженерного скаффолду впливає на механізм формування кістки.

Гідроксиапатитовий скаффолд з розмірами пор 90–120 мкм продемонстрував стимуляцію ендохондрального механізму формування кістки, під час якого МСК, які проліферують у скаффолді, утворювали хрящову тканину, після чого остання почала васкуляризуватися, потім була резорбована фагоцитуючими клітинами. МСК мігрували в ці місця, диференціювалися в остеобласти та формували кісткову тканину. Цей процес приводив до

формування кісткової тканини, аналогічної до тканини довгих трубчастих кісток.

У скаффолді з розмірами пор 350 мкм формування кістки відбувається через інтрамембранозний механізм осифікації, де МСК спочатку мігрували з початком васкуляризації і формували лише кісткову тканину без утворення хряща. Цей тип кістки нагадував кістку склепіння черепа або будь-яку іншу плоску кістку.

Таким чином, розміри пор впливають на механізм формування кісткової тканини й ступінь васкуляризації, а остання, у свою чергу, приводить до оксигенації тканин, зникнення хондрогенезу й стимулювання остеогенезу. Вплив розмірів пор на механізм формування кісткової тканини показує важливість їх контролю, загальної пористості скаффолда, будови пор, що є необхідним для створення специфічної кісткової тканини та ефективного тканинного інжинірингу.

Показово, що *in vitro* ріст клітин та диференціювання в скаффолді значною мірою залежить від розмірів пор та пористості. Так, якщо *in vivo* пористість й розміри пор впливають на нативні тканини, що оточують і проникають у скаффолд, то розміри пор і пористість мають особливе значення для міграції, проліферації та диференціювання клітин всередині матриці.

Мезенхімальні клітини людини, вирощені в кораловому гідроксиапатитному скаффолді, показали нижчий рівень проліферації та більш високий рівень остеогенного диференціювання, а також збільшення мРНК лужної фосфатази та BMP-2 у скаффолді з меншими розмірами пор (200 мкм) порівняно зі скаффолдом з великими розмірами пор (500 мкм).

Посилення остеогенного диференціювання та зменшення рівня проліферації визначалося в обох випадках експланації за рахунок відмінностей у площі поверхні та ефективності транспорту, викликаного змінами у розмірі пор. Це наводить на думку, що геометрія скаффолду з меншими розмірами пор приводить до збільшення кривизни і, таким чином, до зменшення транспортної ефективності розчинних факторів у навколишнє середовище та обмеження клітинної інфільтрації. Надалі зниження проліферації спостерігалось внаслідок зміни сигнальної дистанції за рахунок варіабельності геометрії пори, що індукує більш високий рівень диференціації.

Розміри пор та пористість впливають на рівень експресії остеогенних сигналів: у колагенглікозаміноглікановому скаффолді спостерігалася велика експресія остеокластів та колагену I типу у МСК через 21 добу культивування в скаффолді з розмірами пор 151 мкм у порівнянні зі скаффолдом з порами 96 мкм.

Розміри пор також впливали на диференціювання людських МСК у β -трикальціфосфатному скаффолді з різною пористістю (25–75 %) й розмірами пор (10–600 мкм). У цьому дослідженні не спостерігали значних відмінностей *in vitro* у остеогенній диференціації між групами. Однак за імплантації зразків мишам підшкірно вищий рівень остеобластного диференціювання та продукції лужної фосфатази спостерігали в скаффолдах з пористістю 65 та 75 %, а

найбільший рівень був відзначений у разі пористості скаффолду 65 %. Це дослідження показало, що пористість не є основою впливу на остеогенне диференціювання, відмінності у сигнальній експресії можуть бути пов'язані з розмірами пор *in vivo*, навіть без кісткових вростань з навколишніх тканин.

3.1.2.4 Вплив каналної взаємопов'язаності пор клітинної матриці на міжклітинну взаємодію

Однією з важливих характеристик будови скаффолду, окрім пористості та розмірів пор, є система каналів, яка зв'язує пори. Структура матриці з високим ступенем зв'язаності пор збільшує комунікацію між клітинами різних зон скаффолду та посилює тканинне вrostання. Ступінь зв'язаності скаффолду має обмежений вплив на МСК-опосередковані сигнальні взаємодії та диференціацію, але впливає на морфологію поверхні кістки, що формується усередині матриці.

Однак ступінь взаємопов'язаності не є головним фактором впливу на кісткове вrostання, оскільки діаметр каналів, що з'єднують пори, також може впливати на клітинну penetрацію. Так за використання гідроксиапатитних скаффолдів та клітин остеосаркоми людини показано, що канали з більшим діаметром збільшують щільність клітин та підсилюють penetрацію клітин у центр скаффолду. Мінімальний розмір діаметра каналу, що забезпечує penetрацію клітин, становить 82 мкм.

Також показана можливість проникнення остеобластів у канали діаметром понад 20 мкм, які потрібні для формування в них нових кісткових утворень. Це дослідження показало, що мінімальний діаметр каналів та матеріал скаффолдів можна змінювати. Канали, що забезпечують зв'язки між порами, сприяють не тільки посиленню клітинної інфільтрації скаффолду, а й васкуляризації та підтримці живлення клітин, що підтверджує необхідність ретельного контролю зв'язаності скаффолду за допомогою каналів.

Деградація скаффолду впливає на вrostання кісткової тканини у нього. Існує думка, що це питання необхідно розглядати спільно зі станом системи каналів скаффолду, що забезпечують зв'язність внутрішньої системи каналів скаффолду, тому що під час деградації скаффолду доступ до його внутрішніх каналів може бути ускладнений.

На основі дослідження *in vivo* деградації гідроксиапатитного скаффолду, виготовленого з забезпеченням тривимірної пористості на моделі краніального дефекту кісткової тканини було висловлено припущення, що напрямок та вільний об'єм скаффолду може впливати на формування нової кісткової тканини. Гістологічна оцінка показала, що канали можуть спрямовувати ріст нової кісткової тканини: радіальні канали пенетрувалися з боку скаффолду та показували успішне формування кістки з навколишніх тканин, а осьові канали показували зростання кісткової тканини всередину скаффолду, з його нижньої частини, спрямовуючи міграцію клітин у центр скаффолду. Це дослідження

продемонструвало, що структура скаффолду та його внутрішня система каналів впливають на вrostання кісткової тканини *in vivo*.

Подібний результат показало вrostання кісткової тканини *in vivo* у скаффолді, виготовленому за допомогою методу стереолітографії з гідроксиапатиту.

У ході дослідження *in vivo* впливу напрямків пор з ортогональними або радіальними каналами скаффолди були імплантовані в нижню щелепу свині та був показаний вплив його структури на кількість регенованої кісткової тканини: за ортогональної структури каналів показано більше формування кісткової тканини порівняно з радіально орієнтованими каналами. Втрата взаємозв'язку між окремими каналами пояснюється зменшенням вrostання кістки в скаффолдах із радіальними каналами. Періодичність пор суттєво впливає на геометрію сформованої кісткової тканини. Тканини кістки інтегрувалися вздовж всієї довжини ортогональних гідроксиапатитних каналів; у радіальних каналах залишалися незаповнені ділянки в центрі скаффолда.

Геометрія пор, пористість, кривизна їх поверхні впливає на клітинну активність, регенерацію кістки та приводить до зміни морфології, збільшення механічної міцності імплантату і швидкості зростання тканин. На біологічну реакцію тканин, що контактують з імплантатом, впливає шорсткість, яка сприяє адгезії та інтеграції клітин у імплантат. Шорсткість імплантата має прямий вплив як *in vitro*, так і *in vivo* на клітинну морфологію, проліферацію та диференціювання. Адгезія різних матеріалів визначається не тільки шорсткістю, а й гідрофільністю імплантату. Висока однорідна гідрофільність матриці забезпечує сприятливе середовище для дифузії поживних речовин. Матриці зі складною мікроструктурою краще поглинають воду та переміщують її в сусідні комірки.

Всі вищенаведені дослідження підтверджують значущість застосування в скаффолдах міжпористих каналів та їх будови для спрямування та посилення кісткової регенерації *in vivo*.

3.1.3 Основні механізми реконструкції кістки та ремоделювання хряща

3.1.3.1 Реконструкція кістки

На даний час існує два основні підходи до реконструкції великих кісткових дефектів – це використання кісткових графтів (ауто-, ало- та ксенографтів) або тканинно-інженерних конструкцій.

Тканинно-інженерна стратегія включення клітин у матрицю є обнадійливою альтернативою для лікування пошкоджень кісток. Вона складається з трьох основних блоків: клітин, матриці (скаффолду) та остеоіндуктивних ростових факторів. Кожен із цих елементів може викликати регенерацію тканини, але комбінація всіх трьох компонентів більш ефективна. Під час створення матриці ретельно розробляють тривимірну конструкцію, яка є каркасом для клітин усередині матриці та забезпечує взаємодію клітин з живильним середовищем.

Донедавна більшість дослідників формували кісткову структуру матриці з перенесенням гістотопографії на мікрорівні, проте зараз основні зусилля зосереджені на створенні кісткових конструкцій, які мають оптимальні біомеханічні та біоміметичні властивості на нанорівні. Сучасні матриці повинні стимулювати остеогенне диференціювання та забезпечувати функціонування остеогенних прогеніторних клітин, таких як мезенхімальні стовбурові клітини у складі штучної кістки. Дослідження тканинно-інженерних конструкцій для кісткових тканин з використанням мезенхімальних стовбурових клітин показали важливість різних параметрів матриці, її властивостей для остеогенного диференціювання та заселення клітинами. З моменту, коли кісткову тканину почали розглядати як нанокомпозитну структуру, змінилися уявлення і щодо клітинних матриць. Наноматеріал клітинних матриць розглядається як структура, яка може індукувати чи посилювати остеогенез за рахунок створення клітинних ніш на нанорівні.

Регенерація кістки – складний багатостадійний біологічний процес. Під час відновлення дефектів кісткової тканини регенеративний процес може бути індукований рядом біоактивних матеріалів-імплантатів і клітин. Фактори, які сприяють росту тканин у місці пошкодження скелета відіграють важливу роль у фізіологічному та репаративному загоєнні переломів кісток. Фактори росту, такі як тромбоцитарний фактор росту (PDGF), кістковий морфогенетичний білок (BMP), інсуліноподібний фактор росту (IGF), трансформуючий фактор росту (TGFs- β) та судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), надають широку можливість їх застосування в загоєнні кісток та остеогенезі для регуляції поведінки клітин, включаючи утворення, міграцію, адгезію, проліферацію та диференціювання (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Фактори росту та їх функції

Фактор регенерації	Основні форми		Джерело	Функції
1	2		3	4
Остеогенні фактори	BMP	BMP-4	Мезенхімальні клітини, остеобласт, хондроцит, ендотеліальні клітини	Синтез, проліферація та гіпертрофія матриць хондроцитів
		BMP-4		Ріст та диференціювання МСК та остеобластів
		BMP-7		Збільшення синтезу позаклітинної матриці
	TGF- β		Мезенхімальні клітини, остеобласт, хондроцит, ендотеліальні клітини, тромбоцити, фібробласти, медіатори запалення	Диференціювання хрящової та кісткової тканини, ангиогенез, формування кісткового мозку

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4
Ангіогенні фактори	VEGF	Тромбоцити, остеобласти, хондроцити	Сприяє проліферації, диференціації та міграції ендотеліальних клітин, що приводить до утворення судин та сприяє регуляції та апоптозу хондроцитів, ремоделювання хряща, окостеніння зростаючих пластин всередині хряща та міграції остеобластів
	PDGF	Тромбоцити, остеобласти, клітини та медіатори запалення, ендотеліальні клітини	Підвищує експресію VEGF, сприяє дозріванню судин, що стимулює проліферацію остеобластів, індукує хемотаксис МСК для підтримки формування судинної системи
	FGF	Мезенхімальні клітини, остеобласти, хондроцити, клітини та медіатори запалення, ендотеліальні клітини	Активує проліферацію та міграцію ендотеліальних клітин через кілька сигнальних шляхів для сприяння ангіогенезу
	IGF	Остеобласти, хондроцити, гепатоцити, ендотеліальні клітини	Мітогенний фактор впливає на зростання зрілих клітин, підтримує зростання та диференціювання ембріональних клітин, стимулює проліферацію остеобластів, що призводить до посилення остеointegraції
Протизапальні фактори	Інтерлейкіни	Т та В-лімфоцити, макрофаги, огрядні клітини, фібробласти, стромальні клітини	Участь у сигнальній системі остеобластів та остеоцитів, підтримує розвиток кістково-резорбуючих остеокластів, діючи на ранній стадії остеобластної лінії

Продовження таблиці 3.4

1	2	3	4
	Інтерферони		Активує диференціювання остеобластів та інгібує злиття остеокластів
	TNF- α		Безпосередньо посилює експресію RANKL остеокитів та сприяє утворенню остеокластів
Системні фактори	Глюкокортикостероїди	Кора наднирника	Перешкоджають формуванню кісткової тканини, стимулюють резорбцію

Прогеніторні мезенхімальні клітини, що імплантуються в матрицю перед їх трансплантацією або залучені з навколишніх тканин, можуть диференціюватися в остеогенні тканини через серію послідовних стадій (проліферацію, формування матриці, мінералізацію). На цих стадіях різні ростові фактори, цитокіни та гормони включаються до біологічних сигнальних взаємодій.

Кістковий морфогенетичний протеїн-2 (BMP-2), фактор росту фібробластів, трансформуючий ростовий фактор, судинний ендотеліальний ростовий фактор та тромбоцитарний фактор зростання – головні остеогенні фактори, а лужна фосфатаза та остеокальцин є маркерами остеогенного диференціювання. Остеопонтин, остеонектин й кістковий сіалопротеїн є основними компонентами екстрацелюлярного матриксу.

Окрім верхнього рівня регулювання остеогенної сигнальної експресії, існують динамічні сигнальні шляхи: Smad й Wnt, мітоген-активовані протеїнкінази, включення мініатюрного зв'язаного транскрипційного фактора-2 та рецептора активатора ядерного фактора ліганду, які визначають початкову кісткову регенерацію в тканинно-інженерних конструкціях.

Асоціація великої кількості клітин та конструкційні параметри матриці впливають на остеогенну сигнальну експресію. Серед цих параметрів матриці важливі фізичні конструкційні фактори, особливо дизайн матриці, включаючи такі фактори, як пористість, розміри пор, можливість взаємодії клітин, біологічні та механічні властивості матеріалів, з яких вони виготовлені, що значно впливає на індукцію остеогенної експресії та диференціацію під час заселення клітин та в кінцевому рахунку на формування кісткової тканини *in vitro* та *in vivo*.

Ефективність регенерації кістки значно підвищується за рахунок введення в тканинний еквівалент біоактивних факторів, що регулюють зростання кісткової тканини, насамперед морфогенетичних білків, основного фактора зростання фібробластів та трансформуючого фактора росту $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Безпосереднє включення ростових остеогенних факторів до складу

скаффолду на сучасному етапі стало можливим за рахунок переваг низькотемпературного 3D-друку.

Для відновлення щодо невеликих кісткових дефектів досить остеоіндуктивної активності імплантованого пористого тривимірного скаффолда. Однак реконструкція критичних дефектів кісткової тканини потребує присутності остеогенних факторів і обов'язкового заселення скаффолду клітинним матеріалом.

Як клітинні джерела для заселення кісткових імплантів можуть служити періодонтальні або періостальні остеобласти, однак, у клінічній практиці для реконструкції кісткової тканини з використанням аутологічного матеріалу найчастіше з різних типів клітин використовують мезенхімальні стовбурові клітини (СК) жирової тканини або кісткомозкового походження, які попередньо піддають експансії *in vitro* для отримання ефективної дози СК.

Окремою проблемою створення життєздатних тривимірних тканинних еквівалентів є їх адекватна васкуляризація. Щодо біоінженерних кісткових імплантів, стимуляція ангиогенезу та васкулогенезу досягається за рахунок використання пористих скаффолдів із спільним заселенням їх *in vitro* ендотеліальними клітинами з остеогенними клітинами.

Регенерація дефекта кістки передбачає комплекс складних, координованих у часі процесів, що включає взаємодію молекулярних, кліткових, біохімічних та механічних сигналів, серед яких васкуляризація та остеointegraція мають виняткове значення.

Введення біологічно активних молекул у структуру скаффолду загалом прискорює процес заживлення та відновлення кістки. Включення біоактивних речовин у скаффолд вирішує декілька основних завдань: локалізована доставка оптимальної концентрації ростових факторів всередину імплантата, збереження біологічної активності молекул, контрольоване вивільнення речовин протягом необхідного періоду часу.

Серед найбільш поширених біоактивних агентів виокремлюють антибіотики, протизапальні препарати, цитокіни, ферменти та інші білки. Успішність застосування скаффолдів визначається їх здатністю коригувати власні регуляторні механізми, що забезпечують адекватне протікання всіх етапів відновлення кістки. У зв'язку з цим як активні компоненти скаффолдів найчастіше використовуються аналоги гуморальних й клітинних факторів, що беруть участь у репаративній регенерації кісткової тканини.

Перший варіант доставки ростових факторів включає їх безпосереднє інкорпорування в структуру скаффолду. Для цього білки зазвичай іммобілізують через ковалентне чи нековалентне зв'язування з полімером матриць. Нековалентне зв'язування включає фізичне захоплення, адсорбцію або іонне комплексоутворення. Однак, використання таких систем обмежено через складність регулювання вивільнення великих білкових молекул.

Другий варіант включення біоактивних речовин у скаффолд полягає в інкапсуляції ростових факторів у системи лікарської доставки (мікросфери, ліпосоми, гідрогелі та ін). Як і самі скаффолди, системи доставки повинні мати

регульовану швидкість біодеградації, відсутність токсичності та впливу на структуру матриць. Як матеріалів для мікросфер можуть використовуватися біодеградуючі полімери, що використовуються під час синтезу матриць (полілактид, полігліколід, поліетиленгліколь, желатин, целюлоза та ін).

Процес відновлення кістки можна розділити на чотири послідовні етапи. Перший етап починається з утворення гематоми та другий – із запальної фази видалення потенційних антигенів та сторонніх агентів. Третій етап характеризується подальшою клітковою проліферацією та диференціацією, ущільненням та мінералізацією міжкліткового матриксу. Відбувається інтрамембранозна осифікація та енхондральне окостиніння елементів первинного мозолу, що заміщується твердим калусом. Значну роль в цьому процесі відіграють білки сімейства Wnt (сигнальних білків).

У резорбції хряща беруть участь M-CSF (макрофагальний колонієстимулюючий фактор), ліганд рецептора-активатора ядерного фактору каппа-B (RANKL), остеопротегерин та TNF- α (фактор некрозу пухлини-альфа).

Кінцевою стадією заживлення кістки є фаза ремоделювання, коли M-CSF та RANKL опосередковують активність макрофагів та остеокластів для резорбції залишків твердих тіл. Ці фази сприяють формуванню перебудованої кістки, яка структурно та функціонально подібна до нативної кістки.

Важливою умовою у ході розробки скаффолдів із контрольованою системою доставки є вибір одного чи більше фактору росту для максимального покращення регенерації кісткової тканини. Основні фактори росту та інші білки, що беруть участь у відновленні кістки представлені у таблиці 3.5.

3.1.3.2 Ремодельовання хряща

Суглобовий хрящ (СХ) є унікальною тканиною. СХ утворює прошарок між кістками, допомагаючи зменшити навантаження на кістку та забезпечити змащування суглоба; водночас він має достатньо позаклітинної матриці, в якій безладно розкидані хондроцити. Хрящ дорослої людини має зоновану структуру, складається з поверхневої, середньої та глибокої зон, які відрізняються за біохімічним складом матриксу, щільністю розташування клітин та їхньою морфологією, а також метаболізмом. На поверхневу зону припадає 10–20 % товщини СХ; хондроцити цієї зони видовжені, сплюснені, розташовані паралельно поверхні хряща й оточені щільно розміщеними колагеновими фібрилами. Середня (проміжна) зона становить 40–60 % товщини хряща; в цій зоні хондроцити оточені хаотично розміщеними фібрилами колагену II типу з великим вмістом агреканів, гіалуронової кислоти та дерматансульфату. Хондроцити глибокої зони є еліпсоїдними, вони формують своєрідні колонки, пронизані радіально орієнтованим колагеновим матриксом. Між глибокою зоною хряща та кальцифікованим хрящем розташований прошарок аморфного матеріалу на кшталт мембрани (рис. 3.2). Хоча «золотим стандартом» відновлення пошкодженого хряща на сьогоднішній день залишається аутогенна хондроплатика, більшість фахівців у галузі

регенеративної медицини розуміють, що наступним лідером у цій галузі вже в найближче десятиліття стануть тканинно-інженерні технології. На сьогоднішній день добре окреслене коло джерел клітин і матеріалів для формування їх тимчасового носія (скаффолда).



Рисунок 3.2 – Структура суглобу та основні компоненти хряща

Ключова проблема – забезпечення послідовного повного ремоделювання цієї конструкції у власний хрящ – вимагає передбачуваних керуючих впливів на процеси заселення, проліферації, диференціювання та адекватної фенотипичної експресії клітин у речовині скаффолда та майбутнього ЕЦМ хряща. Принципово виділити три керуючі моменти: сама структура скаффолда (1), використання факторів зростання (2) і механічна стимуляція (3), які повинні використовуватися у комплексі. Точки розвитку цього напрямку сконцентровані навколо подальшого розуміння молекулярної біології та патофізіології хряща, використання нанотехнологій для виготовлення скаффолдів із заздалегідь заданими функціями управління, проблеми паралельного управління різними молекулярними регуляторними шляхами.

Одним з перспективних підходів, що дозволяють досягти суттєвого прогресу в цьому напрямку, може стати повноцикловий підхід *de novo* підключенням біоінформаційного аналізу. Для цього послідовно необхідно створити інформаційну базу даних на основі метаболомічної карти суглобового хряща, провести віртуальне моделювання біоміметичних хрящів структур на основі наноматеріалів, що володіють необхідними ознаками біосумісності, біодеградації та хондроіндукції, відпрацювати технології виготовлення біогібридної матриці та випробувати її можливості за керованим післяімплантаційним ремоделюванням в модельних дослідах та *in vivo*. У результаті це може призвести до створення нових тканинно-інженерних рішень, що дозволяють з успіхом перетворити тканинно-інженерну конструкцію в функціональний повноцінний хрящ.

Таблиця 3.5 – Фактори росту та білки, що беруть участь у регенерації кісток

Фактори росту та білки	Мультипотентні мезенхімні стромальні клітини			Синтез матриці	Ангіогенез
	міграція	ріст та проліферація	остеогенне диференціювання		
EGF (епідермальний фактор росту)		+		+	+
PDGF-BB (тромбоцитарний фактор росту)	+	+		+	+
TGF- β (трансформуючий фактор росту- β)		+	+	+	+
BMP (кісний морфогенетичний білок)	+	+	+		+
VEGF (фактор росту епітелію судин)	+	+	+		+
FGF (фактор росту фібробластів)			+	+	+
Wnt (сімейство сигнальних білків)			+		
TNF- α (фактор некрозу пухлини- α)	+		+		
OGP (пептид остеогенного росту)		+	+	+	+
Активин		+		+	
IGF-1 (інсуліноподібний фактор росту)		+	+	+	+

3.2 Матеріали для виготовлення скаффолдів

3.2.1 Основні вимоги до матеріалів для скаффолдів

Кістковий скаффолд є тривимірною остеокондуктивною опорою для формування нової тканини. Він повинен мати особливі морфологічні та функціональні властивості, які сприяють адгезії, диференціації та проліферації

клітин, а також власної механічної цілісності скаффолду для підтримки заздалегідь спроектованої структури, що імітує живі тканини.

Розробка остеостимулюючих скаффолдів може сприяти природному відновленню пошкоджених тканин, допомагаючи в лікуванні дефектів кістки, спричинених втратою кісткової тканини внаслідок захворювання або травми, та у випадках, коли традиційні методи лікування недостатньо ефективно вирішують проблему.

Загалом, ідеальна 3D-матриця складається з біосумісного, біорозкладаного матеріалу із аналогічними механічними властивостями тканини, в яку він має бути імплантований. 3D архітектурний каркас повинен бути високопористим з взаємопов'язаною структурою для забезпечення міграції клітин та поживних речовин. Поверхня скаффолду повинна також бути оптимізованою для полегшення прикріплення клітин, проліферації та диференціації.

З хірургічної точки зору, також бажано, щоб можна було легко використовувати матеріал каркасу різних форм і розмірів, що дозволяє проводити лікування на місці дефекту кісток пацієнта. Скаффолди та продукти їх розпаду повинні бути перш за все біосумісними. Матеріал повинен бути нетоксичним до клітин, легко видалятися з організму та мати незначну імунну відповідь.

Контрольована здатність до біологічного розкладання також є важливою характеристикою матриці: якщо скаффолд надто швидко руйнується, це може призвести до механічної деструкції. Це особливо актуально, коли імплантований каркас не може витримати навантаження та не зможе забезпечити механічну підтримку в ході формування нової кістки. Якщо матриця не руйнується, тривале перебування чужорідного тіла може викликати запальний процес, що порушує регенерацію тканин.

Конструкція високопористих скаффолдів часто має вирішальне значення. Скаффолд повинен забезпечувати мікроструктуроване оточення для клітин, підтримуючи їх прикріплення, проліферацію та диференціацію в остеогенному напрямку, що передують генезу нових тканин, а саме виступати в ролі синтетичного тимчасової зовнішньої матриці.

Фактори, що впливають на конструкцію матриці, складні та включають розмір пор, морфологію, властивості поверхні, час деградації. Точний контроль архітектурних параметрів скаффолда (наприклад, геометрії пор, розміру, взаємозв'язку, орієнтації та розгалуження) необхідний для васкуляризації та максималізації дифузії поживних речовин, контролю зростання та функціонування клітин, управління диференціюванням, та імітації механічних властивостей регенованої тканини.

Таким чином, можна висунути ряд вимог до скаффолдів для заміщення кісткової тканини:

- фізико-хімічні властивості, макро- та мікроструктура поверхні скаффолду повинні стимулювати адгезію, проліферацію та диференціювання клітин у остеогенному напрямку;

- геометрія та внутрішня структура з відкритими порами має стимулювати вrostання клітин, проростання судин та продукцію специфічної для кісткових клітин матриці;

- морфологія поверхні та її фізико-хімічні властивості повинні стимулювати внутрішньоклітинну передачу сигналів та рекрутування клітин;

- скаффолд має бути виготовлений із матеріалу з передбачуваною швидкістю резорбції в умовах живого організму, а продукти його деградації мають бути нетоксичними.

Кістковий скаффолд повинен бути здатним до біодеградації, щоб утворювався власна позаклітинна матриця. Трансплантат повинен деградувати з контрольованою швидкістю, створюючи простір для зростання нової кісткової тканини, а продукти деградації не повинні надавати токсичну дію та викликати запалення. Переважною вважається поверхнева деградація, оскільки вона дозволяє підтримувати об'ємну структуру, забезпечуючи тривалішу механічну стабільність.

Окрім того, швидкість резорбції скаффолду повинна змінюватися в залежності від сфери застосування; наприклад, для хірургії хребта тривалість резорбції становить не менше 9 міс, для щелепно-лицьової хірургії – 3–6 міс. Трансплантат має бути достатньо міцним для стримування гідростатичного тиску та механічних навантажень.

Отже, підсумовуючи проведений аналіз загальних (табл. 3.6) до усіх біосумісних матеріалів для заміщення втрачених чи пошкоджених кісткових тканин, та спеціальних, в більшості обумовлених необхідністю реалізації принципів відновлення кісткових тканин крупних кісток, вимог.

У таблиці 3.7 наведена їх порівняльна характеристика.

Наявність специфічних характеристик вказує на характерні вимоги до скаффолдів, які відрізняють цю групу матеріалів від інших біосумісних. Головною специфікою проектування складів та технології одержання скаффолдів є необхідність одночасного забезпечення: високої механічної міцності за наявності значної кількості пор та можливість керування характером зміни поруватості матеріалів від центру до периферії.

Усі матеріали для протезування повинні мати відповідні властивості для їх успішного використання. Таким чином, можна виокремити загальні вимоги та спеціальні, що будуть регулювати застосування ендопротезів для відновлення кісткової тканини.

Матеріали для виготовлення біосумісних кісткових ендопротезів повинні відповідати комплексу таких властивостей:

- медико-біологічні властивості: нетоксичність і біологічна сумісність, тобто відсутність імунологічних, канцерогенних, бактеріологічних ефектів, алергічних і запальних реакцій організму, злоякісного переродження і травмування тканин, стимулювання процесу утворення кісткової тканини;

- хімічні властивості: регульована хімічна стійкість у фізіологічному середовищі організму, що забезпечує необхідний «час життя» імплантату (від повної біодеградації протягом певного часу до довготривалої біоінертності);

стійкість до окиснення, що виключає накопичення шкідливих продуктів взаємодії в різних органах; відсутність гальваноелектричних явищ призводять до металозу навколишніх тканин;

- тромбостійкість; витримування різних видів стерилізації, не руйнуватися за випромінювання;

- механічні властивості: близькість значень міцносних та пружних характеристик до відповідних показників живої кісткової тканини; висока і тривала міцність (довговічність – технологічні властивості: простота виготовлення виробів різноманітного розміру та форми; можливість регулювання структури для швидкого проростання кісткової тканини в імплантат, необхідна наявність в останньому наскрізних пор; машинооброблюваність (за необхідності) та економічність.

Таблиця 3.6 – Загальні вимоги до біосумісних скаффолдів

Властивості	Вимоги	
	Загальні	Специфічні
Медико-біологічні	нетоксичність; біологічна сумісність	стимулювання проростання клітин, проростання судин, продукції специфічного для кісткових клітин матриксу
Фізико-хімічні	регульована хімічна стійкість у фізіологічному середовищі організму; стійкість до окиснення; відсутність гальваноелектричних явищ; тромбостійкість; витримування різних видів стерилізації, не руйнуватися при випромінюванні	стимулювання поверхнею адгезії, проліферації, диференціювання клітин у остеогенному напрямку; стимулювання внутрішньоклітинної передачі сигналів та рекрутування клітин; біодеградація із контрольованою швидкістю
Механічні	близькість значень міцносних та пружних характеристик до показників живої кісткової тканини; довговічність	структурна міцність при наявності значної кількості пор у структурі матеріалів
Технологічні	простота виготовлення виробів різноманітного розміру та форми; можливість регулювання структури; машинооброблюваність; економічність	можливість створення градієнтної поруватої структури

Таким чином, біоматеріали, що використовуються для виготовлення скаффолдів, повинні бути сумісні з клітинними компонентами сконструйованих

тканин й ендогенних клітин тканини господаря. Крім того, вони повинні руйнуватися за імплантації зі швидкістю, що відповідає швидкості формування нової матриці.

Загалом, ідеальна матриця складається з біосумісного, біорозкладаного матеріалу із властивостями, близькими до властивостей тканини. Ідеальна конструкція не призначена для постійних імплантатів і має полегшити клітинам-господарям його заміну з часом.

Вибір матеріалу скаффолда для реконструкції кістки особливо актуальний через необхідність стабільної підтримки об'ємної тривимірної структури. Стабілізація об'єктів кістки, що реконструюється, вимагає абсолютно стабільних каркасів (титанова мережа), або скаффолдів з біорезорбованих полімерів з прогнозованою швидкістю їх деградації, яка повинна перебувати в балансі зі швидкістю росту клітин та продукування ними клітинної речовини кістки, що заміщає в кінцевому підсумку деградує тимчасовий субстрат.

Тривалий час для одержання скаффолдів застосовували природні кісткові матеріали людини або тварини. Серед них відомі наступні види матеріалів:

- **автогенні кісткові матеріали** – це вид імплантів, виготовлений з донорського матеріалу (з підборіддя, верхньої щелепи, рідше – клубової кістки, ребра, вкрай рідко у складних операціях – потилично-тім'яної частини). Кістковий матеріал беруть за допомогою спеціального скребка або пастки і він має вигляд стружки або блоків;

- **аллогенні кісткові матеріали** – це імпланти-органи, відібрані від інших осіб та оброблені і пересаджені особам, що їх потребують;

- **ксеногенні кісткові матеріали** – (природний гідроксіапатит) отримують з кісткової тканини ссавців. Структура кісток тварин ідентична кістці людини, що дозволяє використовувати їх у стоматологічній практиці. Ксенокістку попередньо піддають спеціальній обробці та деантигенізації.

Таблиця 3.7 – Специфічні вимоги до біосумісних скаффолдів

Характеристики скаффолду	Бажані функції
1	2
Біологічна сумісність	нетоксичні продукти розпаду; незапальні компоненти каркасу, що дозволяють уникнути імунного відторгнення
Здатність до біологічного розкладання	контрольована деградація скелету, яка може доповнювати вrostання тканини, зберігаючи достатню підтримку; розкладання ферментативними або біологічними рідинами живої тканини; здатність надання функції клітинам виробляти власний позаклітинний матрикс

Продовження таблиці 3.7

1	2
Біоактивність	біоактивні каркасні матеріали, які можуть взаємодіяти з живою тканиною та зв'язуватися з нею; остеокондуктивні та остеоіндуктивні властивості; включення біологічних сигналів та факторів росту для стимулювання росту, прикріплення та диференціювання клітин
Структура скелета	взаємопов'язані пори, що забезпечують дифузію та міграцію клітин; мікропористість для створення великої площі поверхні для взаємодії клітини та каркасу; макропористість для міграції клітин та проникнення в судинну систему; розмір пор, адаптований до цільової тканини та клітин; достатня пористість для полегшення вrostання клітин без послаблення механічних властивостей; вбудовані судинні канали для посилення ангіогенезу <i>in vivo</i>
Механічні властивості	міцність на стиск, пружність та втому, порівняні з живою тканиною, що дозволяє відбуватися клітинній механорегуляції та зберігати структурну цілісність в природних умовах; матеріал каркаса, яким можна легко маніпулювати в клінічному середовищі для лікування окремого кісткового дефекту пацієнта

Недоліки вище перелічених імплантатів сприяли розробці інших матеріалів органічного та неорганічного походження (табл. 3.8).

Для створення біодеградуємих матриць найчастіше використовують такі матеріали: складний моноетилефір фумарової кислоти, поліпропілен фумарат, d,l-лактид олігомер, N-вініл-2-піролідон-d,l-лактид, полімери молочної кислоти, поліметилметакрилат, полібутилен тетрафталат, полікапролактон. До матеріалів для скаффолдів відносять колаген, колаген з глікозаміногліканами, желатин, шовк.

Включення до складу скаффолду мінералів, насамперед основних солей – ТКФ та ГАП, які імітують хімічні властивості натуральної кістки, приводить до підвищення механічної міцності кісткового імплантату та сприяє підтримці оптимального рН на фоні накопичення кислих продуктів розпаду полімеру. Для моделювання кістки на основі 3D-друку успішно використовуються такі полімерно-мінеральні композити, як PCL-TCP, PLGA-TCP-NA, PCL-PLGA-TCP, PLGA-PCL, желатин з НА (див. розділ 2).

Таблиця 3.8 – Види матеріалів, які застосовуються в тканинній інженерії кістки, їх переваги, недоліки та способи виробництва

Види матеріалу	Переваги	Недоліки	Способи виробництва
1	2	3	4
Матеріали кісткової тканини			
Аутоімплантат	Гістосумісність. Імунна інертність. Остеогенез. Остеоіндукція. Остеокондукція	Невідповідність розміру дефекту та імплантата. Додаткове оперативне втручання. Обмеження об'єму матеріалу	Хірургічний
Аллоімплантат	Гістосумісність. Остеоіндукція. Остеокондукція. Нема обмежень за об'ємом матеріалу	Ризик імунного відторгнення. Передача вірусної та бактеріальної інфекції. Додатковий етап обробки імплантата. Невідповідність розміру дефекту та імплантата	Хірургічний
Ксеноімплантат	Остеоіндукція. Остеокондукція. Нема обмежень за об'ємом забору матеріалу	Передача вірусної та бактеріальної інфекції. Додатковий етап обробки імплантата. Невідповідність розміру дефекту та імплантата	Хірургічний

Продовження таблиці 3.8

1	2	3	4
Метал			
Сплави металів (хром-кобальт, титан та ін.)	Біосумісність. Високі механічні властивості та міцність. Доступність. Низька здатність до біологічного розкладання	Низька стійкість до циклічних навантажень. Вторинне вивільнення іонів металів	SLA. SLM. SLS . EBM. Порошкова Металургія. Вакуумне спінювання. Спрямована кристалізація
Полімери синтетичні			
Синтетичні Біодеградовані (PLA, PGA, PLGA, PCL, PEG, PAA). Небіодеградовані (поліетилен, поліуретан, PAA тощо)	Біосумісність та низька токсичність. Поліпшений контроль над фізичними властивостями	Низькі механічні властивості. Наявність природних домішок. Гідрофобність	Лиття. Пресування
Полімери природні			
Білкові (колаген, фібрин, желатин, фібриноген та ін.) Поліцукри (альгінати, хітозани та ін.)	Біосумісність та низька токсичність. Поліпшений контроль над фізичними властивостями	Низькі механічні властивості. Наявність природних домішок. Гідрофобність	Лиття. Пресування
Біокераміка			
Біоінертна (оксид цирконію, оксид алюмінію)	Біоінертність Біосумісність Біокондуктивність Біоіндуктивність	Крихкість. Складність управління швидкістю резорбції, що призводить до зниження механічної міцності	Лиття, пресування
Біоактивна (ГАП, ТКФ, біоскло тощо)	Схожість за складом з кістковою тканиною		

Для виготовлення екзогенних скаффолдів використовують різні матеріали, включаючи метали, природні та синтетичні полімери, кераміку та їх композити.

Вибір скаффолів є одним з ключових елементів для успішної реконструкції тканин. Наприклад, біокераміка (гідроксиапатит, НА; біоскло (оксид силіцію з оксидами інших елементів), включаючи підгрупу цементних матриць (трикальцій фосфат, ТСР)) та полімери підходять для формування кісткової тканини, оскільки нативна кістка складається з біологічного апатиту і природних полімерів.

Однак кераміка є крихкою, а полімери не мають достатніх механічних властивостей це обмежує їх застосування в зонах, що несуть навантаження. На відміну від цих матеріалів, метали більш придатні для зон з підвищеним навантаженням через їх високу механічну міцність. Однак метали не використовуються в інженерії м'яких тканин, оскільки є біоінертними й практично не розкладаються.

Залежно від завдання, скаффолди можуть виготовлятися з речовин, які схильні до біорозкладання, після зникнення яких на їх місці залишиться лише новостворена тканина або вони можуть бути досить стабільними і забезпечувати довгострокову підтримку тканини.

У разі використання біодеградованих скаффолдів клітини будуть заміщувати матрицю скаффолду шляхом синтезу власних білків, вбудовуючись у нього без шкоди для структурної цілісності існуючих тканин. Однак цей процес вимагає суворої координації швидкості біодеградації скаффолду і швидкості біосинтезу, і це є однією з основних перешкод.

У цілому усі матеріали, що застосовуються для протезування кісток та щелепно-лицьової хірургії можна поділити на п'ять основних груп: метали та їх сплави, полімерні матеріали, біостекла, керамічні матеріали та композити. В цьому розділі розглянемо скаффолди на основі цих матеріалів.

3.2.2 Скаффолди на основі металів та їх сплавів

Основними перевагами металевих матеріалів є високі фізико-механічні характеристики, пластичність, легка оброблюваність, а недоліками – незадовільна корозійна стійкість у фізіологічних середовищах і біоінертність. Це може призводити до корозійних пошкоджень імплантатів та обумовлювати негативну реакцію організму. Під час травмування ділянки з металевим імплантатом швидше руйнується кістка, аніж імплантат.

Такі металеві матеріали, як сплав кобальт – хром, цирконій, титан, нержавіюча сталь мають відмінну біосумісність й міцність. Вони зазвичай використовуються для заміни суглобів та як імплантати для фіксації переломів, щоб забезпечити підтримку кістки під час загоєння. Однак відсутність здатності до біологічного розкладання робить їх менш придатними для тканинної інженерії, де метою є резорбція нативної тканини та заміна імплантованої конструкції. Для видалення металу часто потрібна додаткова операція,

особливо коли він використовуються для лікування пацієнтів, які не досягли скелетної зрілості.

Високі модуль пружності та міцність металів відносно кістки також можуть сприяти стресу екранування. За цього явища механічні навантаження в кістці, яка оточує імплантат, можуть призвести до резорбції кістки та підвищення ризику переломів. Незважаючи на ці обмеження, певних успіхів досягнуто завдяки створенню композитів на основі металів.

Можливим шляхом вирішення проблеми є створення композитів. Наприклад, за допомогою сублімаційної сушки стронцій поєднували з гідроксиапатитом та хітозаном, створюючи композитні наногібридні каркаси. Наявність нанокристалів Sr-ГАП дозволила значно посилити проліферацію клітин та остеогенну диференціацію стовбурових клітин кісткового мозку людини.

Ієрархічна структура створена з мікропористого нікель-титанового композиту після обробки поверхні гідроксидом натрію в гідротермальній реакції. Це привело до створення наноструктурованої мікропористої відкритої поверхні на мікропористому NiTi каркасі. Була покращена гідрофільність поверхні для осадження ГАП і прискорене прикріплення клітин та проліферація.

Також були виготовлені матриці на основі титану шляхом спікання мікропористих сфер з титану та титанового порошку. Досягнута максимальна пористість складала 50 %, межа міцності на стискання становила до 109 МПа. *In vitro*, мікропористість каркасів сприяла прикріпленню та росту мезенхімальних стовбурових клітин.

Для створення залізо-магнієвих композитних матриць використовують 3D струменевий друк. Після 3D-друку було виявлено, що конструкції мають відкриту пористість і механічні властивості, подібні до губчастої кістки. Виявлена висока життєздатність клітин на даній матриці, також спостерігалася клітинна інфільтрація в пори (рис. 3.3).

Вибіркове лазерне спікання (SLS) – метод 3D-друку, який успішно використовується для створення металевих композитів. Цим методом був шар за шаром нанесений порошок титану та суспензія золю кремнезему для виготовлення композитних титано-кремнеземних каркасів зі складною геометрією. Міцність композиту на стискання збільшувалась у результаті термообробки. Однак, високі температури виготовлення металевих конструкцій з використанням SLS та інших методів, обмежують їх потенціал.

Підвищення біосумісності може бути реалізовано шляхом нанесення на поверхню металевих каркасів біоактивної кераміки, такої як ГАП та силікат кальцію.

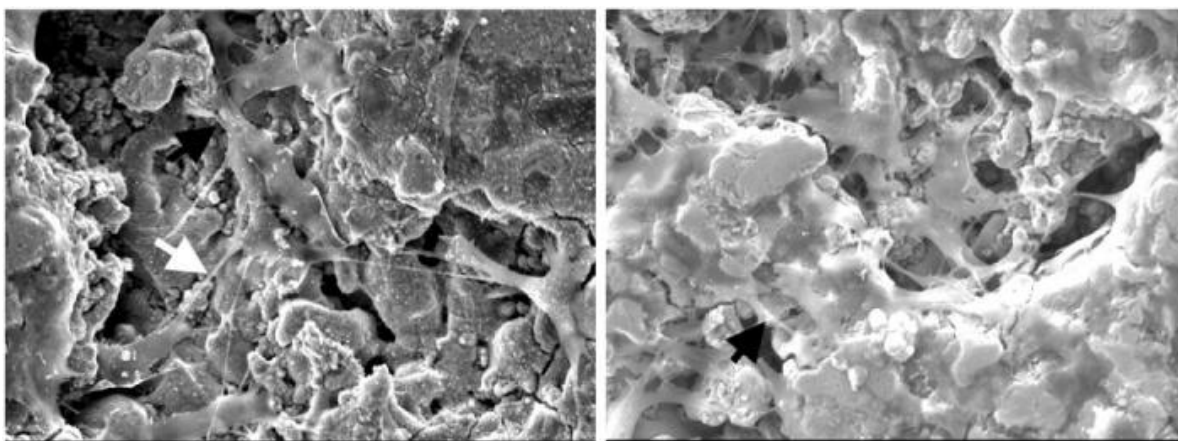


Рисунок 3.3 – SEM-фото клітин на поверхні надрукованого на 3D-принтері FeMg. Біла стрілка позначає клітинне з'єднання через один день; чорні стрілки позначають з'єднання до стінок пор через 3 дні

Нержавіюча сталь, титан й кобальтохромові сплави можуть бути сполучені за допомогою SLS та вторинно модифіковані за допомогою фосфатної кислоти. Результатом цього процесу є утворення композиту з біосумісним фосфатним шаром на поверхні каркасу. Показано. Що біомолекули та ліки, включаючи парацетамол і антибіотики, які були успішно нанесені на модифіковану поверхню, покращили свою активність.

3.2.3 Скаффолди на основі полімерів та фосфатів кальцію

3.2.3.1 Основні тенденції створення полімер-неорганічних скаффолдів

У чистому вигляді полімерні матеріали в ендопротезуванні використовуються для сполучних елементів, які не потребують проведення повторних операцій для їх видалення, і для стимулювання процесів росту кістки. Для формування більшості тканин для створення скаффолдів використовують природні (колаген, хітозан, альгінат, агарозу, фібрин, фібронектин) й синтетичні (поліа-гідроксієфіри, зокрема полімолочну кислоту (PLA), поліглілієву кислоту (PGA), їх суміш (PLGA), PCL, поліетиленгліколь (PEG)) полімери, гідрогелі, що утворюються шляхом ковалентного або іонного зшивання водорозчинних природних і штучних полімерів, або їх комбінації.

Природні полімери складаються з полімерної сітки і можуть містити до 99 % води. Тому природні полімери називають гідрогелями, а їхня здатність набухання у воді дозволяє імітувати високогідратований стан живих тканин. Іншою причиною, через яку природні полімери представляють особливу цінність, є структура аналогічна структурі позаклітинної матриці, що сприяє підвищенню їх остеоіндуктивних та остеокондуктивних властивостей. Природні полімери включають поліпептиди, поліцукри, складні полієфіри, а також їх комбінації.

Гідрогелі, синтезовані іонним або ковалентним зв'язуванням, можуть інкапсулювати білки або біологічно активні молекули, поступово вивільняючи

їх, та керувати ростом клітин. Використання природно отриманих крос-лінкерів, наприклад, гепарину та світлочутливого вітаміну В2, для зшивки GKM та факторів росту є великим досягненням тканинної інженерії. Це сприяє зменшенню використання нерідких крос-лінкерів й синтетичних полімерів, які мають більше недоліків, ніж переваг у регенерації тканин та високу ймовірність відторгнення трансплантатів. Варіюванням співвідношення різних компонентів – природних і штучних полімерів, біокераміки і гідрогелів – скаффолду намагаються надати заздалегідь заданих властивостей.

Використання природних полімерів (колаген, шовк, альгінат, хітозан й гіалуронова кислота) викликало значний інтерес у тканинній інженерії завдяки сприятливим властивостям, які включають пластичність, біосумісність й біодеградацію. Натуральні полімери часто містять на своїй поверхні біофункціональні молекули, які можуть сприяти прикріпленню, інтеграції та диференціації клітин скаффолдів.

Однак, використання природних полімерів обмежується наявністю патогенних домішок, таких як ендотоксини, відсутністю регульованої швидкості деградації та пов'язане з деградацією інгібування локальних клітин. Механічні властивості природних полімерів також є неоптимальними, хоча зшивання полімерів може покращити структурні властивості. Якщо враховувати факт, що каркасна функція – це головна функція скаффолдів, то даний недолік є істотною проблемою в регенерації кісткових тканин. У цьому випадку альтернативою природним матеріалам є синтетичні полімери. Завдяки великій кількості методів синтезу та обробки матеріалів можна легко отримати як необхідну форму, так і широкий спектр фізико-хімічних властивостей матриць.

Синтетичні полімери в основному ділять на дві групи: біодеградовані (біоруйновані) та небіодеградовані (табл. 3.8). Перші включають полілактид, полігліколід, їх сополімер полілактогліколід, полікапролактон, поліціаноакрилат та ін. До другої групи відносять полівініловий спирт, полігідроксиетилметакрилат, полі-N-ізопропілакриламід та ін.

Варто зазначити, що для оптимізації параметрів та отримання необхідних матриць у синтезі скаффолдів перспективним є використання композиційних матеріалів, що поєднують переваги декількох груп. Наприклад, стабільність полімерів, що мають недостатню механічну міцність, може бути посилена шляхом додавання міцних полімерів. Аналогічно до матеріалів, які мають слабкі остеоіндуктивні та остеокондуктивні властивості, можуть бути додані більш біоактивні полімери.

Серед біоматеріалів, активно розробляються на даний час, слід відзначити аліфатичні поліефіри, поліаміди, сегментовані поліефіуретани, полімери молочної та гліколевої кислот, силікон, поліетилентерефталат та полігідроксиалканоати (ПГА).

Одними з перших матеріалів для тканинної інженерії стали біодеградовані синтетичні біоматеріали на основі полімерів монокарбонових кислот – молочної та гліколевої (полігліколіди, полілактиди та продукти їх

сополімеризації). Проведеним тестування біосумісності цих матеріалів з різними типами клітин встановлено, що вони можуть бути матрицями для створення тканинно-інженерних матеріалів, конструкцій м'язової, хрящової, кісткової та епітеліальної тканини.

Для цих цілей використовують і інші полімери, наприклад, **полілактон** – напівпрозорий полімер з температурою плавлення менше 60 °С. Він повільно (до трьох років) деградує в біологічних середовищах. З цього полімеру можна отримувати пластичні та механічно міцні конструкції; це комерційний препарат під назвою «Monocryl» фірми «Ethicon Inc.».

Поліпропіленфумарат – міцний, пластичний полімер, що зберігає міцність *in vivo* до 200 днів; біорезорбція відбувається ферментативним шляхом. Дуже важливо, що за цього не змінюється рН оточуючих тканин. Недоліком цього матеріалу є утворення вираженої фіброзної капсули у відповідь на імплантацію виробів з нього.

Похідні моноангідридів поліметилену з рядом сполук вивчаються на даний час; показано, що ці матеріали біологічно резорбуються поверхневою ерозією протягом 28 тижнів і мають високу механічну міцність (до 60 МПа). Особливо перспективними для тканинної інженерії видаються ПГА, з яких можливе отримання матриць для культивування клітин різних типів. Принципова придатність полімерних плівок з полігідроксibuтирату (ПГБ) для культивування тварин клітин була показана ще наприкінці 80-х – початку 90-х рр. ХХ ст; сьогодні ці полімери активно вивчаються для тканинної інженерії.

Біодеградуючі полімери – найбільш популярний матеріал для матриксів завдяки комплексу властивостей. По-перше, з них легко виготовити тривимірні шаблони з необхідною пористістю. По-друге, полімери можуть бути механічно міцними та мати високу ударну в'язкість. Механічні властивості легко контролювати шляхом зміни молекулярної ваги (довжини ланцюга) полімеру.

По-третє, ряд біодеградуючих полімерів успішно застосовують багато років (бар'єрні сітки, шовний матеріал, що розсмоктується). Вони мають відповідні сертифікати для застосування в клініці.

Синтетичні полімери, які застосовуються для ВТЕ, включають полімолочну кислоту (PLA), полігліколеву кислоту (PGA), полікапролактон (PCL) й поліетиленгліколь (PEG). Також використовувалися сополімери, включаючи полімолочну-співгліколеву кислоту (PLGA). Синтетичні полімери можна створювати з певною пористістю, швидкістю деградації та механічною міцністю. Однак вони часто є гідрофобними і не розпізнаються клітинами. Тому їх застосування обмежене без додаткової модифікації для покращення біоактивності.

Синтетичні та природні полімери в цілому мають відносно низьку несучу здатність за самотійного використання, низькі модулі пружності порівняно з металевими та керамічними сполуками. Однак механічні вимоги до скаффолдів є складними, включаючи властивості стиснення, розтягування та втоми, необхідні для витримування навантажень.

Один із підходів, який виявився ефективним для вирішення цих проблем є поєднання полімерів з біокерамікою або біосклом для виготовлення композитних каркасів. Найчастіше біокераміку або біоскло додають як покриття або наповнювач до полімерної матриці, які покращують біоактивність та покращують їх механічні властивості.

Пористість може бути забезпечена для композитних полімерних керамічних каркасів із різним рівнем точності за допомогою технологій, включаючи 3D-друк й електроспінінг. Ці методи дозволяють наносити матеріал із зазорами між волокнами, для забезпечення тісного взаємозв'язку. Пороутворювачі можуть бути включені в структуру перед розчиненням або хімічно розкладатися за нагрівання, вивільнюючи газ, здатні створити пори. Поєднання пороутворювачів із такими методами, як 3D-друк у процесі їх виготовлення збільшує мікро- та макропористість.

Застосування полімерів як покриттів для скаффолдів також відійшли на другий план, поступившись місцем хімічно обробленим поверхням для збільшення мікропористості за допомогою використання органічних розчинників. Біосумісність скаффолдів також може бути збільшена шляхом модифікації поверхні біоактивними речовинами, включаючи фактори росту та поверхневі ліганди для сприяння клітинній адгезії й проліферації.

3.2.3.2 Композитні матриці на основі колагену та фосфатів кальцію

Серед природних полімерів, які використовуються в інженерії кісткової тканини, колаген, мабуть, найчастіше використовується як матриці. Колаген становить 90 % загальної маси позаклітинної кістки матричних білків й тому є гарним вибором для включення в композитний каркас. Хоча існує приблизно двадцять дев'ять відомих типів колагену, частіше використовується колаген типу I завдяки відсутності імунної реактивності, пов'язаної з його використанням.

Колаген – це невід'ємно біосумісний матеріал, що біологічно розкладається і може стимулювати проліферацію клітин й дифференціювання. Окрім того, механічні та деградаційні властивості колагену можна адаптувати за допомогою процесу зшивання. Колаген має механічні властивості, які є недостатніми для створення несучої конструкції. Тому для створення ВТЕ колаген часто поєднують з більш міцними матеріалами.

Як основний неорганічний компонент кістки, ГАП часто комбінують з колагеном у скаффолдах. Відомий скаффолд на основі колагену-ГАП (Col-ГАП), який отримують спільним осадженням та литтям-заморожуванням. Створений скаффолд має високий ступінь проникності, придатний для клітинної інфільтрації, прикріплення та остеогенезу.

Виявлено, що матриці з чистого ГАП не деградували через 6 років введення пацієнтам з дефектами довгих кісток. Матриці колаген-ГАП мали гарні механічні властивості, що робить їх придатними для використання в черепно-лицьовій хірургії. Також вони можуть використовуватись для

лікування складних переломів як замітники кістки або кісткові трансплантати.

Продемонстровано остеоіндуктивний потенціал скаффолду колагену 1 типу (30 %) – ГАП (70 %). Скаффолд був виготовлений за допомогою процесу сублімаційного лиття з додаванням магнію для створення біоактивних нанокристалів ГАП, легованих магнієм. МСК людини, виділені з жирової тканини, висівали на каркас та культивували *in vitro* за відсутності специфічних остеогенних індукуючих факторів. Після 8 тижнів скаффолд продемонстрував остеогенність за рахунок диференціації МСК. Це дослідження показало, що матеріал скаффолду може викликати остеогенну диференціацію МСК з формуванням позаклітинної матриці, експресією генів й мінералізацією, що демонструє остеоіндуктивний потенціал каркасу.

Проведені клінічні дослідження *in vivo* скаффолду Col-МГАП після імплантації в кісткову тканину мишей показали, що скаффолд Col-МГАП характеризувався ектопічними остеоіндуктивними й ангіогенними характеристиками порівняно з колагеновим каркасом. Зафіксовано збільшення кісткової тканини та виявлено, що ангіогенез спонтанно відбувається в композитному каркасі Col-МГАП із залученням клітин у структуру. Скаффолд Col-МГАП показав значно кращі результати, ніж колагеновий каркас з меншою кількістю фіброзної тканини та більшою остеогенною тканиною, що відкладається на терміні до 16 тижнів.

Також досліджувались матриці, складені з колагену I типу і леговані Mg-ГАП. Скаффолд був розроблений як біоміметик, з трьома різними шарами, що відтворювали хрящову, проміжну та субхондральну шарувату структуру суглобової кістки. Хрящовий шар складався виключно з колагену I типу; проміжний шар – з колагену I типу (60 %) та Mg-ГАП (40 %); субхондральний шар складався з колагену I типу (30 %) Mg ГАП (70 %). Скаффолд виготовлений шляхом поєднання техніки спікання та сублімаційної сушки для отримання інтегрованого монолітного композиту. МСК людини (hMSC) були висіяні на окремі шари композитного матеріалу окремо та на інтегрований композитний каркас. Потім клітини вирощували в хондрогенних або остеогенних середовищах. Імунофарбування підтвердило хондрогенну диференціацію hMSCs лише в колагеновий хрящовий шар за використання хондрогенних середовищ. Хондрогенна диференціація не відбулася в кістці Mg-ГАП шару, незважаючи на використання хондрогенних середовищ. Імунофарбування також підтвердило остеогенну диференціацію hMSCs в обох шарах, що містять Mg-ГАП, та інфільтрацію в хрящовий шар за використання остеогенного середовища, але цього не відбувалося в присутності хондрогенного середовища. Процеси остеогенної та хондрогенної диференціації, як правило, залежали в основному від середовища, що використовується для культури, а не від складу біоматеріалу.

Концентрат людського кісткового мозку використаний замість hMSCs на тришаровій основі. Після виявлення відсутності остеогенезу в хрящовому шарі та хондрогенезу в кістковому шарі було вирішено індукувати хондрогенну диференціацію лише в хрящовий шар та остеогенез у композитний шар

(тип I колаген (60 %) і Mg-ГАП (40 %)) та кістковий шар (колаген I типу (30 %) й Mg-ГАП (70 %)). Через 52 дні *in vitro* життєздатність клітин залишалася високою та гістологічним і імуногістохімічним аналізом була показана диференціація клітин як за хондрогенним, так і за остеогенним шляхом. Таким чином, цей біоміметичний нанокомпозитний матеріал має потенціал лікування остеохондральних уражень. У поєднанні з концентратом кісткового мозку хондрогенні та остеогенні ділянки можуть бути об'єднані в один каркас для проведення трансплантації остеохондральних дефектів.

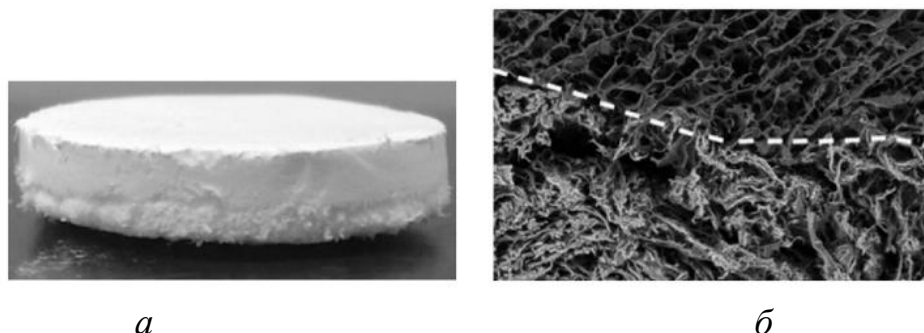


Рисунок 3.4 – Фотографія біоміметичного каркасу з шаруватою структурою (а); SEM-фото, які підтверджує зв'язок між його шарами (б)

Покращення механічних властивостей каркасів колаген-ГАП досягнуто шляхом модифікації процесу сублімаційної сушки, який найбільш часто використовується для їх виготовлення. Спроба покращити пористість каркаса та механічну міцність була забезпечена шляхом пресування та поєднання ГАП, мікросфер парафіну та концентрованих колагенових фібрил. Парафінові мікросфери потім вимиваються та забезпечують пороутворення, а колаген хімічно зшиває матрицю. Скаффолд характеризувався наявністю сполучених пор діаметром 300–400 мкм з товщиною стінок 3–100 мкм та загальною пористістю 85–90 %. Механічні випробування композиту з вмістом з 60 об. % ГАП показали повну пружну деформацію за навантаження. Порівняно з каркасами Col-ГАП, які створені з використанням сублімаційної сушки, модуль стискання матриці, створеної таким способом був більшим приблизно на 1 МПа. Це робить матрицю придатною для клінічного застосування, оскільки деформація потенційно полегшує хірургічне лікування й маніпуляції, в той час як модуль стискання потенційно полегшує певну ступінь навантаження.

Біоактивність досліджували шляхом посіву мишачого жиру стромальних клітин (mASCs) на каркаси та культивування в остеогенних маркерах. Через 14 днів спостерігалось значне підвищення активності лужної фосфатази, з повною інфільтрацією скелета mASCs, що містить ГАП. Скаффолди показали значно вищу біоактивність порівняно з скаффолдами лише з колагену, оскільки виявлено підвищену остеогенну диференціацію та рівень лужної фосфатази. Однак збільшення вмісту ГК понад 40 об. % не принесло ефекту. Остеогенез та ангіогенез *in vivo* спостерігався лише в каркасах з вмістом ГАП 40 об. %, що

оцінювали шляхом імплантації ацелюлярних каркасів підшкірно мишам протягом 8 тижнів. Було показано, що каркас *in vivo* сприяє інфільтрації та диференціюванню ендогенних клітин із остеогенезом та ангіогенезом, які спостерігаються під час гістологічного аналізу, що свідчить про те, що каркас є остеоіндуктивним.

Отже, скаффолди колаген-ГАП мають потенціал для клінічних досліджень для використання як синтетична заміна кісткового трансплантата, враховуючи їх перевагу в механічних властивостях над матрицями, виготовленими шляхом ліофільної сушки зі сприятливими остеоіндуктивними та ангіогенними властивостями.

Вплив масової частки ГАП на матриці Col-ГАП досліджувався *in vivo*. Безклітинні колагенові каркаси, що містять 20 і 40 мас. % ГАП імплантували підшкірно на термін до 12 тижнів мишам. Встановлено, що ендогенна клітинна інфільтрація через 6 тижнів збільшується в каркасах, що містять ГАП, порівняно лише з колагеном. Вміст ГАП прямо корелює з покращенною васкуляризацією, щільністю клітин та мінералізацією. ГАП сприяє залученню та диференціюванню популяцій ендогенних клітин, що призводить до ангіогенної та остеогенної активності колагенових каркасів. Навпаки, колагенові скаффолди не виявили відкладення матриці, мінералізації, експресії остеогенних генів і мали значно нижчу щільність клітинної інфільтрації.

3.2.3.3 Композитні матриці на основі хітозану

У ВТЕ хітозан (CS) поєднується з низкою матеріалів у матрицях, включаючи фосфати кальцію, кальцій сульфат, гідроксиапатити й інші природні полімери, включаючи шовк.

Наприклад, виготовлений композитний спечений каркас на основі мікросфер CS і полімолочної кислоти та гліколевої кислоти (CS/PLAGA), додатково функціоналізований молекулами гепарину. Скаффолди мали середній розмір пор 172 мкм. Тестування показало, що гепаринізація каркасів CS/PLAGA не змінює істотно механічні властивості каркаса або пористість. Відзначено, що остеобластоподібні клітини проліферуються швидше на скаффолдах CS/PLAGA порівняно зі скаффолдами PLAGA. Крім того, показано, що наявність CS на поверхні мікросфер збільшує активність лужної фосфатази клітин, культивованих на композиті скаффолду та посилює експресію генів остеопонтину та кісткового сіалопротеїну. Таким чином, показаний потенціал функціоналізованих каркасів CS/PLAGA.

Композитні матриці на основі нановолокон хітозану, кремнію і наногідроксиапатиту (nГАП) використані для ВТЕ із застосуванням електроспінінгу. Однак, електроспінінг CS є складною і ненадійною технологією. Змішування таких агентів, як поліетиленоксид (PEG) з іншими полімерами такими як шовк, колаген та PCL, у ході створення композитів можуть значно знижувати швидкість деградації CS в каркасах, які отримано із застосуванням електроспінінгу. CS також може бути поєднаний з колагеном та

кістковим морфогенним білком (ВМР) у композитних матрицях. Отримані скаффолди були імплантовані в нижню щелепу собаки з гістологічно збільшеною кісткою. За результатами дослідження зроблений висновок, що тривала деградація ВМР з мікросферами є більш ефективними в індукції остеointegraції імплантату порівняно з ВМР.

Методом сублімаційного сушіння мікросфери CS поєднали з колагеновою губкою для досягнення контрольованого вивільнення ВМР. Композитні скаффолди, до яких було залучено ВМР, імплантували в кролика і оцінювали їх здатність до відновлення кісток. Виявлено, що нова кістка формується вже через 4 тижні, а повне загоєння та реканалізація в кістковомозковій порожнині спостерігається на рентгенограмі вже через 12 тижнів. Ці результати продемонстрували, що композитна матриця CS-Col є перспективним носієм ВМР-2 для лікування сегментарних дефектів кісток.

Алендронova кислота (AL) використовується у все більшій кількості досліджень ВТЕ з відомими властивостями, включаючи потужну остеoіндукцію. Новий композитний каркас на основі полі-L-лактину/нГАП/мікросфер CS, просочені алендронатом (CS-AL) є перспективним матеріалом для доставки ліків та ВТЕ, що було продемонстровано результатами *in vitro* та *in vivo* (рис. 3.5). Порівняння групи імплантованих CS-AL (10 %) з групою CS-AL (0 %) виявило значно більший рівень утворення нової кістки, який з часом посилювався.

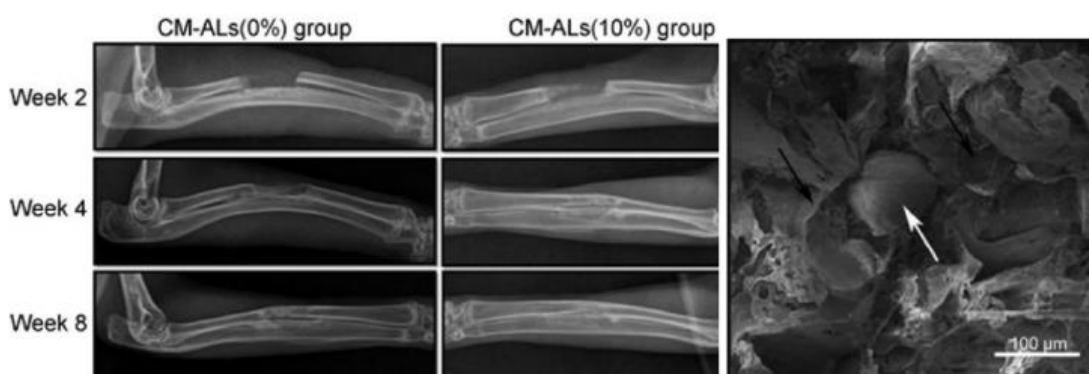


Рисунок 3.5 – SEM-зображення CS-AL скелету з чорними стрілками, які показують матрицю PLLA/нГАП, та білою стрілкою, яка показує мікросфери CS/нГАП-AL

Скаффолди PLLA/нГАП/CS-AL готували з концентраціями CS/nHA-AL в діапазоні від 0 до 20 %. SEM-дослідження показали, що каркаси демонструють однорідну взаємопов'язану пористу структуру з діаметрами пор 150–250 мкм. Матриці з 10 % CS/нГАП-AL *in vitro* мають найбільш сприятливі характеристики вивільнення, деградації та механічні властивості. Жирові стовбурові клітини виявили швидку проліферацію клітин. Ріст в остеогенних середовищах привів до значного підвищення активності лужної фосфатази й відкладення кальцію на каркасах, що містять CS/nHA-AL. Скаффолди, що містять 10 % та 8 % CS-AL, потім імплантували кролику. Дефекти кістки були загоєні з утворенням нової кісткової тканини через 4–8 тижнів імплантації.

Утворення нової кістки було значно вищим в групі CS-AL (10 %) порівняно з CS-AL (8 %). Дослідження показали перспективне застосування мікросфер CS-AL (10 %) як матриць для доставки ліків, так і для інженерії кісткової тканини.

3.2.3.4 Композитні матриці на основі фіброїну шовку

Фіброїн шовку (SF) – це в основному природний білковий полімер, який виробляється шовкопрядами та павуками. SF має кілька характеристик, сприятливих для використання в інженерії кісткової тканини, в тому числі біосумісність, низька імуногенність, обмежена бактеріальна адгезія, здатність до біологічного розкладання, механічна цілісність та здатність до підтримки диференціації мезенхімальних стовбурових клітин уздовж остеогенних ліній.

Відома техніка виготовлення пористих матриць ГАП-шовк. На першій стадії змішували шовк з порошком ГАП. Суміш спікають і вигоряння шовку обумовлює появу пористості матеріалу. З суміші можна формувати великі складні заготовки і після спікання створювати тривимірні вироби. Скаффолди на їх основі забезпечують прикріплення та проліферацію кісткового мозку без ознак цитотоксичності.

Була проведена порівняльна оцінка ефективності скаффолдів на основі шовку з ГАП покриттям та колагенових каркасів, які вкриті ГАП. Імпантували обидва варіанти каркасу в гомілки щурів та через 6 тижнів *in vivo* проводили гістологічний аналіз кістки, яка формувалася навколо скаффолдів. Покриття каркасів на основі шовку сприяло регенерації кісткової тканини та продемонструвало чудові результати порівняно з колагеновими скаффолдами, вкритими ГАП.

Шовк також використовувався для покриття скаффолдів ВТЕ. Нановолокна PCL, які вкриті шовком і поєднані з двофазним фосфатом кальцію мали покращену міцність на стискання (від 0,07 МПа до 0,42 МПа), модуль пружності (від 5 МПа до 25 МПа) і біоактивність, зберігали пористість (85 %) і сполученість (99 %). Крім того, швидкість проліферації та диференціації остеобластів була збільшена в ФК/PCL-шовкових каркасах порівняно з такою в гранулах ФК/PCL та ФК.

Комплексний матеріал на основі гідроксиапатиту та фіброїну шовку (SF) синтезований за допомогою методу спільного осадження та доданий до композиту CPC/SF. Розроблені композити показують високу біосумісність як *in vitro*, так і *in vivo*. Цей композит може бути перспективним для ортопедичних застосувань, у тому числі як наповнювач за лікування переломів хребців.

Були зроблені спроби покращення механічних властивостей SF каркасів, які отримували методом електроспінінгу з рівномірно диспергованими наночастинками гідроксиапатиту в нановолокнах SF. Додавання вмісту ГАП до 20 мас. % підвищувало механічні властивості композитних матриць.

3.2.3.5 Композитні матриці на основі гіалуронової кислоти

Гіалуронова кислота (HLA) є природним глікозаміногліканом входить до складу сполучної, епітеліальної та нервової тканин. HLA природно

в'язкопружний і біосумісний матеріал, схильний до біорозкладання, що робить його ідеальним матеріалом для БТЕ. Як один з головних компонентів позаклітинної матриці HLA суттєво сприяє проліферації та міграції клітин. Зазвичай HLA має дуже велику молекулярну масу, тому використовується в інженерії твердих і м'яких тканин, зокрема як гідрогель.

Механічні властивості HLA можна покращити за допомогою таких процесів, як зшивання, що реалізоване в композитних матрицях. Поєднання сприятливих властивостей досягається в біоактивному композитному матеріалі на основі оксиду графену, хітозану та HLA, а також симвастатину (SV), який індукуює остеогенез. Цікаво, що SV здатний ініціювати диференціацію остеобластів людських жирових стовбурових клітин (hADSC) й добре відомий своєю властивістю посилювати морфогенні білки кісток (БМП). SV використовується в композитних каркасах та ін'єкційних гелях для регенерації кісток з поліпшенням остеогенезу. SV каркас GOeCSeHLA в цьому дослідженні був підготовлений безперервним змішуванням розчинених CS й HLA з додаванням GO для створення композиційної суміші, перш ніж було виконано етап заморожування та ліофілізації для додавання SV. Отримані композитні матриці були зшиті N,N-(3-диметиламінопропіл)-N-етилкарбодимідом (EDC). Електронна мікроскопія виявила, що матриці мають суцільну пористу структуру. Додавання GO також привело до зменшення набряку та в кінцевому підсумку сприяло підвищенню його структурної цілісності. Водночас використання GO спричинило зниження на 35 % пористості каркаса GOeCSeHLA. Помічено, що клітини остеобласти краще прилипають і проліферують на SVGoeCSeHLA матриці протягом 48 годин аналізу *in vitro*. Також було відмічено значно вищу мінералізацію матриці, що виявлено в SV каркасах після 14 днів аналізу. Загалом SV каркас GOeCSeHLA є вдалим варіантом для БТЕ, з додаванням SV, що значно прискорює біоактивність і остеогенез. Також комбінували HLA та CS у пористий матриці для інженерії кісткової тканини. Після змішування CS і HLA та сублімаційної сушки формували пористі тривимірні складки. Зшивання підвищувало модуль пружності і структурну цілісність матриці. Колонізація стовбурових клітин і проліферація всередині каркаса показані аналізами ДНК й конфокальною візуалізацією. Також використовували сублімаційну сушку для виготовлення композитних матриць хітозану та HLA у тканинній інженерії хряща. У рамках цього дослідження показана проліферація хондроцитів і адгезія клітин до поверхні матриці.

Гібридні матриці були підготовлені додаванням 0,1–0,5 мас. % колагену до HLA. HLA зшитий дигліцидиловим ефіром етиленгліколю з наступною сублімаційною сушкою. Отримані композитні матриці мали тривимірну структуру зі з'єднаними порами і показали збільшення міцності на розрив зі збільшенням концентрації колагену. Час деградації гібридних каркасів *in vitro* збільшується зі збільшенням концентрації колагену. *In vitro* ріст хондроцитів на матрицях також покращувався шляхом збільшення концентрації колагену протягом 2 тижнів у культурі. Крім того, концентрація глікозаміноглікану

(GAGA) у гібридних матрицях була вищою, ніж у матрицях з HLA. Ці композитні скаффолди мають регенераційний потенціал для заміни хрящів *in vivo*. HLA також використовують як засіб доставки ліків для покращення біоактивності матеріалів, що замінюють кістку.

3.2.3.6 Синтетичні полімерні матриці

Композитні матриці на основі полікапролактону (PCL).

Полікапролактон широко використовується в ВТЕ для виготовлення 3D-матриць. Перевагами полієфіру є біосумісність, відносно повільна швидкість деградації, менш кислотні продукти розпаду порівняно з іншими полієфірами та можливість застосування в механічно навантажених зонах. З точки зору інженерії твердих тканин, висока механічна міцність і повільна швидкість деградації PCL є особливо вигідними характеристиками, які потенційно дозволяють витримувати навантаження, поки нативна тканина поступово осифікує каркас ВТЕ. Однак через погану клітинну адгезію було зроблено численні спроби створити композити PCL з покращеною біоактивністю. Гарні результати *in vitro* сопстерігаються на 3D-друкованих PCL/альгінатних композитних матрицях. Альгінати мають переваги у застосуванні для виготовлення 3D-матриць (біосумісність, низьку вартість, контрольовану деградацію та швидке гелеутворення в присутності іонів Ca^{2+}). Однак вони мають низькі механічні властивості та надмірну гідрофільність, що ускладнює контроль структури та форми матриці. Поєднання 3D-друку, електроформування та штампування дозволяє створити композитні PCL/альгінатні конструкції із нановолокнистим наповнювачем і покращеною механічною міцністю. Електроформовані шари PCL/альгінату були затиснуті мікророзмірними шарами PCL; остаточну матрицю перфоровали для створення наскрізних мікророзмірних пор (рис. 3.6). Порівняно з матрицями з PCL композитні каркаси PCL/альгінат показали значно підвищену життєздатність клітин через 7 днів, активність ЩФ і відкладення кальцію через 14 днів і значно збільшене поглинання води завдяки покращеній гідрофільності.

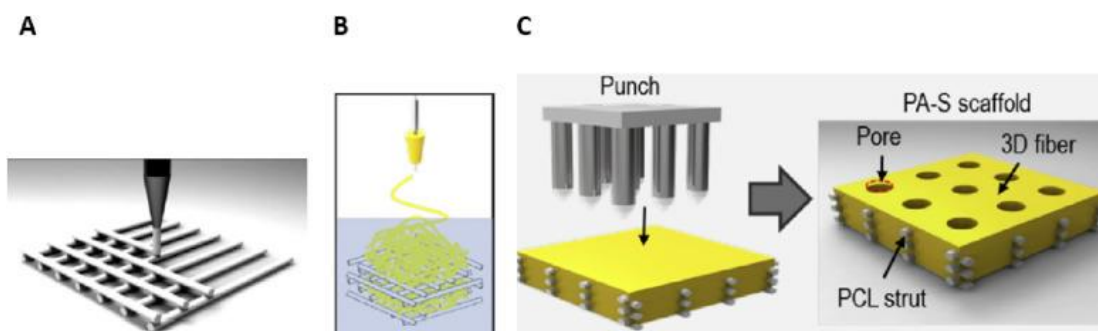


Рисунок 3.6 – Виготовлення матриці PCL/альгінат: *a* – 3D-друк розпірок з PCL; *в* – електроформування PCL/альгінату на розпірках PCL; *с* – перфорація матриці PCL/альгінату (PAS-S)

Композитні матриці на основі полі(молочної кислоти) (PLA).

Полімолочна кислота – біоактивний термопластичний полімер, який використовується для виготовлення медичних імплантатів (кісткові гвинти, фіксуючі пристрої та судинні трансплантати) [108]. PLA утворюється в результаті полімеризації молочної кислоти і може бути отриманий з відновлюваних джерел, наприклад, крохмалю або цукру. Завдяки хіральній природі молочної кислоти існує кілька різних форм PLA, включаючи полі-L-лактид (PLLA) і полі-D-лактид (PDLA), які утворюються в результаті полімеризації L-лактиду і D-лактиду відповідно.

Відомі макропористі біосумісні (HmPB) матриці, що містять каркас з PLA, PCL та гідрофобно модифікованих наночастинок кремнезему ($h\text{-SiO}_2$). PCL й PLA спочатку розчиняли в органічному розчиннику, а потім додавали наночастинок $h\text{-SiO}_2$ в якості емульгатору. Після випаровування розчинника з отриманого композитного матеріалу друкували матриці з пористістю понад 98 %. Скаффолди мали ієрархічну структуру і забезпечували адгезію та проліферацію МСК.

Композитні матриці на основі полі(молочної-співгліколевої кислоти)/PLGA. PLGA є синтетичним співполімером полі-L-молочної кислоти (PLLA) і полігліколевої кислоти (PGA), який отримав дозвіл Управління з контролю за якістю харчових продуктів і медикаментів США для застосування на людях. Швидкість деградації PLGA можна налаштувати в діапазоні від тижнів до місяців залежно від співвідношення PLLA до PGA в структурі кополімеру.

Існують деякі обмеження щодо використання PLGA в ВТЕ. Аморфна структура PLGA має низький модуль Юнга, що призводить до сприйнятливості до пружної деформації, тоді як PLGA також має низьку остеокондуктивність. Щоб усунути ці обмеження, PLGA об'єднують з керамікою та біоактивним склом для створення композитних матриць. Наприклад, об'єднують нано-ГАП (нГАП) і PLGA, сподіваючись отримати користь від остеогенних властивостей і високого модуля нГАП. У той час як високі концентрації нГАП у композиті потенційно можуть мати несприятливий вплив на механічні властивості через нерівномірний розподіл, нижчі концентрації можуть покращити властивості каркасів на розтягнення та стиснення. Показано, що нГАП, що міститься в композитній матриці, допомагає клітинам і білкам прикріплюватися до неї. PLGA також потенційно врівноважує обмеження нГАП, які пов'язані з його крихкістю й повільною деградацією.

Оцінена клітинна сумісність композитних нановолоконних каркасів PLGA-нГАП шляхом культивування остеобластів на матрицях PLGA та PLGA-нНА (рис. 3.7). Також вивчався вплив морфології ГК шляхом порівняння сферичної та волокнистої форм нГК на результати культивування клітин. Скаффолди з нановолокон PLGA-нГАП показали вищу клітинну адгезію, проліферацію, посилений остеогенез й підвищене вивільнення іонів Ca^{2+} порівняно зі сферичними каркасами PLGA-нГАП й чистим PLGA. У цьому дослідженні був підтверджений сприятливий вплив включення нГАП в

матрицю на культуру остеобластів. Посилена проліферація клітин на волокнистій матриці PLGA-пГАП порівняно з матрицями, що містять сферичні пГАП, свідчить про те, що морфологія пГАП також впливає на поведінку клітин.

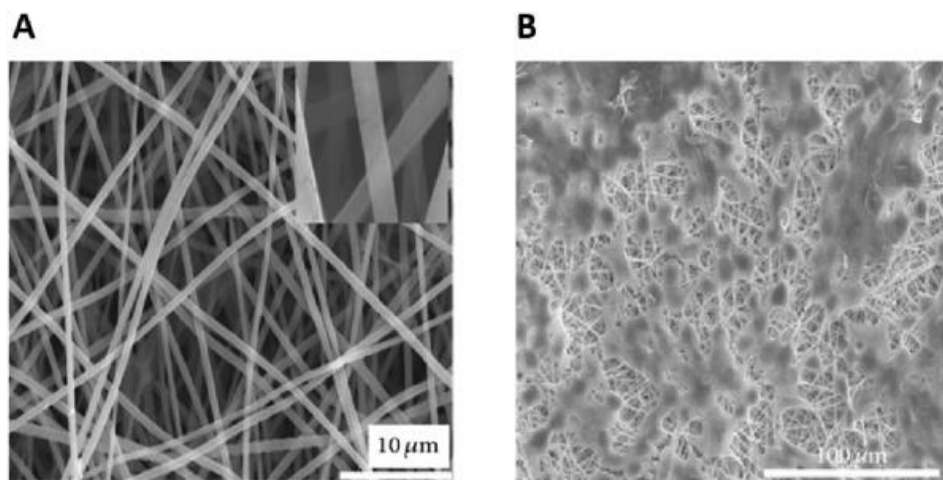


Рисунок 3.7 – SEM-фото композитних нановолоконних каркасів (а) пГАП/PLGA з прикріпленими клітинами після 24 годин інкубації (б)

3.2.4 Скаффолди на основі біокераміки

Біокераміка, включаючи керамічні композити, аморфне скло та кристалокераміку, демонструє великі перспективи в ВТЕ як механічно міцні матеріали зі сприятливою біоактивністю та стійкістю до корозії.

Найбільш часто використовуваною кристалічною біокерамікою в ВТЕ є фосфати кальцію (СаР), частково через їхню поширеність у нативній кістковій тканині. Гідроксиапатит (ГАП), трикальцій фосфат (ТСР) та суміш обох речовин, відома як двофазний фосфат кальцію (ВСР), були адаптовані до матриць ВТЕ. Клітинна деградація цієї кераміки *in vivo* супроводжується вивільненням іонів Ca^{2+} та PO_4^{2-} , які сприяють остеоіндуктивному утворенню нової кістки. СаР подібні за структурою та хімічним складом до мінерального вмісту нативної кістки. Це дозволяє конструкціям з СаР забезпечувати біосумісний, остеокондуктивний зв'язок, здатний сприяти інтеграції з тканиною господаря без утворення рубцевої тканини.

ГП має відмінні властивості для ВТЕ, які включають біосумісність, контрольовану деградацію та відсутність цитотоксичності. ГК за складом схожа з кісткою з доведеними остеоіндуктивними та остеокондуктивними властивостями, що дозволяє матрицям з ГК утворювати міцні зв'язки з навколишньою кісткою. ГК також може стимулювати ендогенну експресію остеогенних факторів росту, таких як кістковий морфогенетичний білок (ВМР) і посилювати активність лужної фосфатази (ALP) у мезенхімальних стовбурових клітинах (MSC). Це особливо важливо, оскільки активність ALP є ключовою в ранньому процесі мінералізації, пов'язаному з формуванням кісток. Однак, як і інша кераміка, ГК є твердою та крихкою, що обмежує навантаження матриць ГК у зонах дефектів кісток. ГК має повільну швидкість

розпаду *in vivo*, що може призвести до механічного пошкодження в місцях імплантації. Щоб подолати ці механічні обмеження, ГК об'єднують з природними та синтетичними полімерами для створення композитних матриць.

Дикальцій фосфат (DCP) використовувався набагато рідше, ніж ГК, у ВТЕ внаслідок своєї крихкості і високої швидкості резорбції *in vivo*. Незважаючи на те, що виготовлені DCP/синтетичні полімерні композити мали покращені механічні властивості, вони уступають матрицям на основі ГК та трикальційфосфату, тому що швидкість їх деградації важко контролювати.

Трикальцій фосфат (TCP) – поширена біокераміка, адаптована до ВТЕ, і є доступним комерційним продуктом. Намистини бета-TCP (β -TCP) були об'єднані з альгінатними гелями для створення ін'єкційних 3D-матриць, які здатні підтримувати *in vivo* остеогенну диференціацію МСК (рис. 3.7). Алотроп β -TCP також був поєднаний з колагеном типу I для отримання пористих матриць з еквівалентною клінічною ефективністю до аутотрансплантатів. Ефективність нанокомпозитних TCP/колагенових скелетів також була порівняна з НА скаффолдами *in vivo*. Через 45 днів було виявлено утворення кісткової тканини в TCP/колагенових матрицях, які були імплантовані в дефект сегментарної стегнової кістки кролика, з кращими результатами порівняно з імплантованими каркасами ГАП.

Перспективною є розробка каркасу TCP з покриттям полікапролактоном (PCL) й алендреновою кислотою (AL) каркаса із застосуванням 3D-друку. Було виявлено, що *in vivo* локальна доставка AL з скелетів TCP, вкритих PCL, привела до збільшення раннього формування кістки порівняно з матрицями TCP, вкритими TCP й PCL. У подальших дослідженнях на 3D-принтері була надрукована композитна матриця з TCP, легована MgO і SiO₂. У матриці спостерігалось значно більше утворення кісток й кровоносних судин, ніж у контрольній TCP. Результати свідчать про те, що магній і кремній, включені в матрицю з TCP, мають потенціал для виокритсання у ВТЕ.

Ефективним є використання методу вилугування солей для створення композитного скелета β -TCP й полімолочної кислоти (PLA). Композитні матриці мали пористість на рівні 50 % і розміри пор 300–420 мкм, що сприятливе для ВТЕ. Міцність матриці на стискання становила ~5 МПа, що близьке до характеристики трабекулярної кістки, хоча *in vivo* клітинну відповідь не оцінювали.

Біокерамічні композити на основі кремнезему також привернули значну увагу. Іонні продукти розпаду Si-вмісних матриць є остеокондуктивними. Створені матриці на основі силікату кальцію із застосуванням SLS та включенням вусів ГАП для покращення їх міцності. Виявлено, що міцність на стискання матриць з 45 % пористістю збільшилася з 15 МПа до 27 МПа за додавання 20 мас. % вусів ГАП. Крім того, швидкість деградації матриці зменшилась із збільшенням вмісту вусів ГАП. Мінералізація апатиту відбулася на поверхні каркаса *in vitro*, під час чого остеобластоподібні клітини MG-63 проникали в матрицю і проліферували зі збільшенням часу культивування (рис. 3.8).

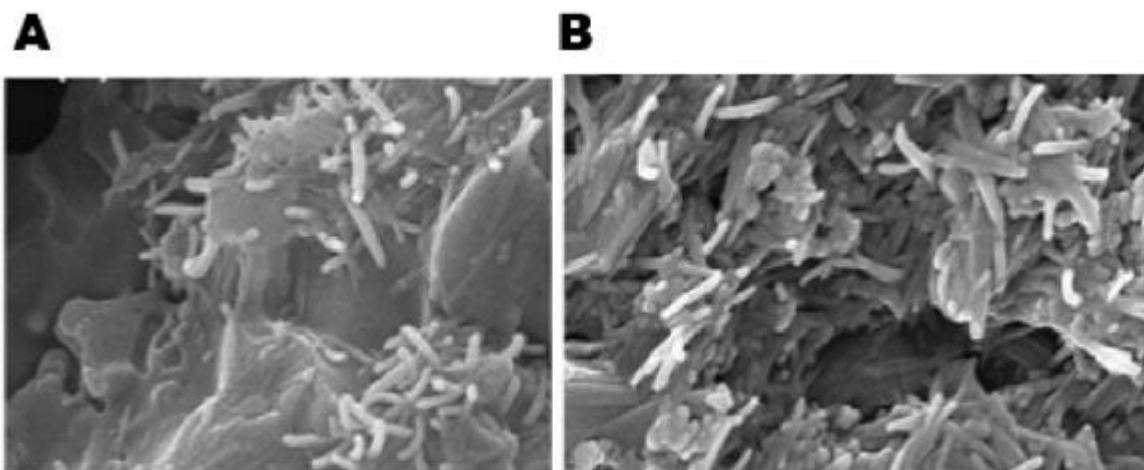


Рисунок 3.8 – SEM-зображення (а) 10 % і (б) 30 % вусів ГАП, присутніх у матриці силікату кальцію

Методом спікання CaCO_3 й SiO_2 створений пористай β -дикальцієвий силікат ($\beta\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$). Механічний аналіз виявив максимальну міцність матриці на стискання 28,1 МПа та пористість до 71 %.

Також виявлена біосумісність клітин MG-63 у МСК, які проліферували на матрицях *in vitro*, а також спостерігалось утворення поверхневого апатиту. Аналіз *in vivo* на мишах виявив утворення кісткової тканини на матрицях через 9 тижнів, що свідчить про її остеоіндуктивні властивості.

Методом 3D-друку у формі SLS виготовлені композитні матриці з акерманіту ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$), зміцнені наночастинками оксиду титану, які характеризувалися максимальною міцністю на стискання 23 МПа і пористістю 58 % після додавання 5 мас. % наноксиду титану. Ударна в'язкість, твердість, міцність на стискання, жорсткість підвищувались зі збільшенням вмісту TiO_2 в межах 0–5 мас. %.

Кісткоподібний апатит утворювався на каркасах *in vitro* під час чого клітини MG-63 прикріплювалися до каркасів й добре проліферували.

Такі властивості, як стійкість до корозії, біосумісність і жорсткість, привели до широкого використання біокераміки в клінічній ортопедії.

Використовуються керамічні замінники суглобів, а також керамічні порошки і гранули для заповнення кісткових дефектів. Однак керамічні матриці крихі та, як і металеві матриці, деградує з важко контрольованою швидкістю. Тому велика увага приділяється розробці композитних полімер-керамічних матриць.

3.2.5 Модифікація поверхні імплантатів

Модифікація поверхні – один із важливих способів створення біосумісних матеріалів в інженерії кісткової тканини (табл. 3.9).

Підвищення механічної міцності дозволяє усунути крихкість біокерамічних імплантатів за використання двох або більше вихідних

матеріалів або зміні просторової структури виробу, яка збільшує механічну міцність та створює умови для ефективного заміщення дефекту остеοіндуктивними клітинами на своїй поверхні.

Імплантат, спроектований з додаванням зовнішньої «кортикальної оболонки», має більш високу механічну міцність (жорсткість збільшується з 447,6 до 653,9 МПа, напруження – з 4,8 до 23,0 МПа) порівняно з матрицями без зовнішньої оболонки.

Створення систем доставки лікарських засобів. Здатність матриць доставляти ліки визначається можливістю контролю швидкості вивільнення препаратів за певних умов.

Глобальне зростання числа стійких до антибіотиків штамів бактерій зумовлює пошук нових методів боротьби з бактеріальними інфекціями.

Завдяки особливостям біокераміки, що виготовляється у вигляді скаффолдів, з'явилася можливість використання контрольованого вивільнення іонів аргентуму, використання фагової терапії, за допомогою яких можна досягти антибактеріального ефекту без цитотоксичності для здорових тканин. Окрім антибактеріальної активності можливе використання біокерамічних скаффолдів для післяопераційного загоєння тканин, лікування дефектів кістки та доставки хіміотерапевтичних препаратів, що використовуються для протипухлинної терапії. Проведені експерименти з модифікації поверхні імплантату наведені в таблиці 3.9.

Посилення регенеративних властивостей. Процес загоєння кістки може бути індукований рядом клітинних факторів росту, які можуть бути включені до структури імплантату (табл. 3.9).

Таблиця 3.9 – Методи модифікації поверхні імплантатів та їх ефективність у тканинній інженерії

Матеріал матриці	Модифікація	Метод виконання	Результат
1	2	3	4
ГА	Колаген І типу та морфогенетичний білок (BMP-2)	<i>In vitro</i>	Процес модифікації покращив клітинну адгезію та диференціювання, без зниження міцності матриці
ТКФ	Наносрібло	<i>In vitro</i>	Срібло має антибактеріальну активність та підвищує механічну міцність матриці
Фосфат кальцію	Ванкоміцин та рифампіцин	<i>In vivo</i> (на мишах)	Матриця значно знижує бактеріальне навантаження
Фосфат кальцію	Макрофаги (Lambda та Remus)	<i>In vitro</i>	Знищення всіх бактеріальних колоній та відсутність резистентності до фагів

Продовження таблиці 3.9

1	2	3	4
Силікат кальцію	Fe ⁺ NIR випромінювання	<i>In vitro</i>	Усунення пухлинних клітин, що пов'язане з комбінованими фототермічним та окисним механізмом дії композиту без пошкодження здорових клітин
Пористий титан	Суміші бактеріофагів, специфічних до <i>S. aureus</i>	<i>In vitro</i>	Обробка фагом відразу після бактеріальної інокуляції пригнічувала ріст <i>S. aureus</i> більш ніж на 98 %
Біоскло	Нанокристали CuFeSe ₂ + NIR опромінювання	<i>In vivo</i> (на кроликах)	Мали високу остеоздатність у відновленні кісткових дефектів після короткочасної фототермічної обробки
PCL	Мезенхімальні клітини + ZnO + ГА	<i>In vivo</i> (на мишах)	Матриці остеокондуктивні ті підтримують мезенхімальні стовбурові клітини. ZnO інгібував ріст бактерій на поверхні матриць, що важливе в лікуванні травм
ГА/ТКФ	Ауто-, ало- та ксеногенні МСК	<i>In vivo</i> (на кроликах)	Швидке формування нової кістки та зв'язку на межі кістки з імплантом. Матриця МСКГА/ТКФ прискорює загоєння дефекту кістки. Відсутність ознак запальної реакції
PLA-PCL/CaP	Моксифлокса-цину гідрохлорид	<i>In vivo</i> (на кроликах)	Композитна матриця посилювала проліферацію та диференціювання клітин MG-63. Кількість <i>S. aureus</i> значно знижена після інкубації на матриці з моксифлокса-цином

3.3 Сучасні технології виготовлення скаффолдів для тканинної інженерії

3.3.1 Порівняльна характеристика методів отримання скаффолдів для тканинної інженерії

Для виготовлення скаффолдів використовують значну кількість різноманітних 3D-матриць або їх комбінації. Методи виготовлення 3D-матриць можна розділити на дві групи: звичайні технології та методику суцільної довільної форми (SFF) або «швидке прототипування».

Загальним недоліком звичайних методик є труднощі створення складних скаффолдів з точним керуванням процесом.

Використання 3D-друку з системами автоматизованого проектування значно підвищила точність й відтворюваність виготовлення скаффолдів з контролем макро- та мікропористості матриці. Переваги та недоліки звичайних методів виробництва та новітні технології 3D-друку наведені в таблиці 3.10.

Вибір технології для виготовлення скаффолдів повинен бути зроблений на основі цілісного аналізу та порівняння всіх методик.

Таблиця 3.10 – Порівняння методів виготовлення скаффолдів

Метод	Переваги	Потенційні обмеження
1	2	3
Сольвентне лиття + вилуговування	Проста методика для створення матриць з контрольованими регулярною пористістю, розміром пор, складом	Використання органічних розчинників виключає впровадження клітин і біомолекул безпосередньо в скаффолд. Важко контролювати форму пор і їх розташування. Обмежена товщина матриць і неоптимальні механічні властивості
Газове спінювання	Виключає використання хімічних розчинників	Високий тиск виключає включення клітин і біоактивних молекул у скаффолд. Матеріал можуть бути нетерmostійкими. Важко контролювати розміри пор і гарантувати їх взаємозв'язок
Емульгування + ліофільна сушка	Не вимагає використання твердої пористої речовини	Вимагає використання органічних розчинників. Маленький розмір пор. Пористість часто нерівномірна. Тривалий час обробки

Продовження таблиці 3.10

1	2	3
Розділення фаз	Легко поєднується з іншими техніками	Малі розміри пор обмежують застосування біоактивних молекул або клітини
Електроспінінг	Створення матриць з великою площею поверхні для прикріплення клітин. Проста	Застосовуються органічні розчинники, які можуть бути шкідливим для клітин. Обмежені механічні властивості. Важко регулювати структуру конструкції
3D-друк SLA SLS FDM струменевий лазерний мікроекструзія	Складні тривимірні форми з високою роздільною здатністю, контрольованим розміром і морфологією пор. Покращена здатність включати судинні структури	Залежно від методики, клітини можуть бути включені у високій концентрації безпосередньо в матеріал матриці. Деякі техніки обмежені можливостями друку

3.3.2 Традиційні технології виготовлення скаффолдів для кісткових каркасів

Лиття (solvent casting). Розчинне лиття передбачає розчинення суміші «полімер-кераміка» в органічному розчиннику та виливання розчину в 3D-форму. Розчинник згодом випаровується, формуючи матрицю. Перевага методу полягає в тому, що процес є нескладним і не вимагає вартісного обладнання. Має два основних недоліки. По-перше, можна отримувати матриці лише простої форми (плоскі листи і труби). По-друге, залишки розчинника в матриці можуть денатурувати білки, і бути шкідливим для клітин і біологічних тканин.

Лиття з наступним вилученням часток (solvent casting/particulate leaching). Цей спосіб є традиційним методом виготовлення скаффолдів, який полягає в розчинення полімеру в органічному розчиннику (рис. 3.9) з подальшим литтям суміші розчину полімеру з пороутворювачем та неорганічним наповнювачем для виготовлення пористих мембран або тривимірних сіток. Пороутворювачі – це речовини, які диспергують у формованій матриці, а після її застигання розчиняють в результаті чого утворюються пори. Розмір пороутворюючих частинок і співвідношення «полімер – пороутворювач» дозволяє контролювати діаметр пор й пористість матриці. Методика має такі ж переваги і недоліки, як і методика розчинного лиття (табл. 3.10).

Газове спінування виключає використання розчинників (рис. 3.9). Цією технікою створюють пористі структури завдяки зародженню та росту

бульбашок газу, розсіяних у полімері. Компресійне формування використовується для створення твердих дисків з полімолочної та гліколевої кислоти в нагрітій формі. Потім диски насичують карбон діоксидом під високим тиском CO₂ (5,5 МПа) протягом 72 годин за кімнатної температури. За допомогою методик забезпечують пористість до 93 % і розміри пор до 100 мкм, однак сполучення пор і їх розміри контролювати важко.

Сублімаційна сушка (ліофілізація; ліофільна сушка) (англ. *freeze drying* або *lyophilization*) – процес видалення розчинника із заморожених розчинів, гелей, есенцій і біооб'єктів, заснований на сублімації льоду без утворення макрокількостей рідкої фази.

Ліофільна сушка полягає в заморожуванні полімерного розчину, що приводить до утворення кристалів льоду, оточених полімерними агрегатами (рис. 3.9).

За зменшення зовнішнього тиску під час вакуумування до рівня, нижчого, ніж рівноважний тиск пари води, починається її сублімація в газову фазу з твердої фази. Коли розчинник повністю сублімований, залишена суха полімерна суміш є пористою структурою.

Цей спосіб також вимагає використання органічних розчинників або води для створення пористої основи, але не вимагає використання пороутворювачів. Процес починається з розчинення полімеру в розчиннику, а потім змішуванні розчину з водою і керамікою для отримання емульсії. Суміш виливають у форму та заморожують до того, як дві фази змогли розділитися. Заморожену емульсію ліофілізують для видалення розчинника та диспергованої води, створюючи пори в затверділій матриці.

Основна перевага методики – можливість виготовлення скаффолдів без використання високих температур. Розмір пор і їх морфологія залежать від параметрів обробки (швидкості замерзання, температури, концентрації полімерів). Однак матриці, виготовлені цим способом, мають пори неправильної форми малого розміру (як правило, від 15 до 35 мкм).

Фазове розділення визначається зміною теплового ефекту незмішування гомогенної системи «полімер – розчинник». Розчин полімеру, наприклад, PLLA, може стати термодинамічно нестабільним за низької температури та спонтанно поділитися на фазу, збагачену полімером, і фазу, збагачену розчинником. Це використовують для виробництва матриць скаффолдів.

Розділення фаз починається з розчинення полімеру в висококиплячому розчиннику з низькою молекулярною масою за високої температури, близької до температури плавлення полімеру, що дозволяє утворювати гомогенну розплавлену суміш. Потім вливають розчин у бажану форму та контрольовано охолоджують, що викликає розділення фаз та осадження розчину. Фаза, збагачена полімером, і фаза, збагачена розчинником, утворюють нановолокнисту матрицю (рис. 3.9). Фазу, багату розчинником, та розчинник видаляють екстракцією, випаровуванням або сублімацією. Це створює пористу основу, оскільки видалення розчинника залишає пори в полімерній матриці.

Електроспінінг ще одна популярна технологія виготовлення матриць з можливістю створення нановолокнистих пористих структур (рис. 3.9).

У цьому методі використовується зовнішній електричний струм для створення заряджених ниток полімерних розчинів або полімеру, які плавляться і витікають у вигляді тонких струменів з капілярної трубки на колекторну пластину. Мікро- і нановолокна можна створювати послідовно для формування матриці, яка може включати композиційні матеріали або біомолекули.

Термоіндуковане розділення фаз (TIPS). Підхід передбачає використання летючого органічного розчинника з низькою температурою замерзання для розчинення полімеру, змішаного з керамічними частками або без них. Для розділення фаз, розчин полімеру швидко охолоджують, що приводить до затвердіння розчинника.

Згодом, після сублімації розчинника, утворюється пористий каркас. Контроль великої кількості змінних, включаючи тип полімеру та розчинника, його концентрацію, температури розділення дозволяє створювати різноманітні матриці.

Основна перевага цього методу полягає в тому, що високої пористості можна досягти шляхом регулювання параметрів синтезу. Показано, що використання термоіндукованого розділення фаз (TIPS) з подальшою сублімаційною сушкою дозволяє забезпечити пористість $> 95\%$. Зміною умов приготування також можна змінити морфологію пор матриці. Розмір пор пористих матриць, створених за цією технікою, зазвичай більший за 200 мкм, що обмежує його використання в інженерії кісткової тканини.

Газове спінювання/обробка надкритичною рідиною (foaming/supercritical fluid processing). Техніка газового спінювання під високим тиском передбачає використання газу як порогену для створення взаємопов'язаних пор.

Метод виключає використання органічних розчинників, залишки яких можуть призвести до запальної реакції після імплантації. Застосування нетоксичного і негорючого газу CO_2 дозволяє широко використовувати метод за надкритичної обробки рідини для одержання скаффолдів. Спочатку полімер поміщають у камеру, а потім насичують її CO_2 під високим тиском. Оскільки тиск газу швидко падає, зародження й утворення пор відбуваються в результаті термодинамічної нестабільності у системі «газ – полімер».

Параметри виготовлення (температура, тиск, ступінь насичення, тривалість періоду зниження тиску) впливають на форму та розмір пор матриць. За допомогою газопінної методики формують губкоподібні структури з середнім розмір пор 30–700 мкм і пористістю до 85 %. До недоліків цього процесу можна віднести нагрівання під час пресування, утворення закритих незв'язаних між собою пористих структур та непористий шар на поверхні матриці.

Для досягнення високої взаємопов'язаності пор, поєднання газоутворення під високим тиском й твердих часток розроблена методика пороутворення. З її використанням отримують матриці з PGLA з пористістю до 97 %.

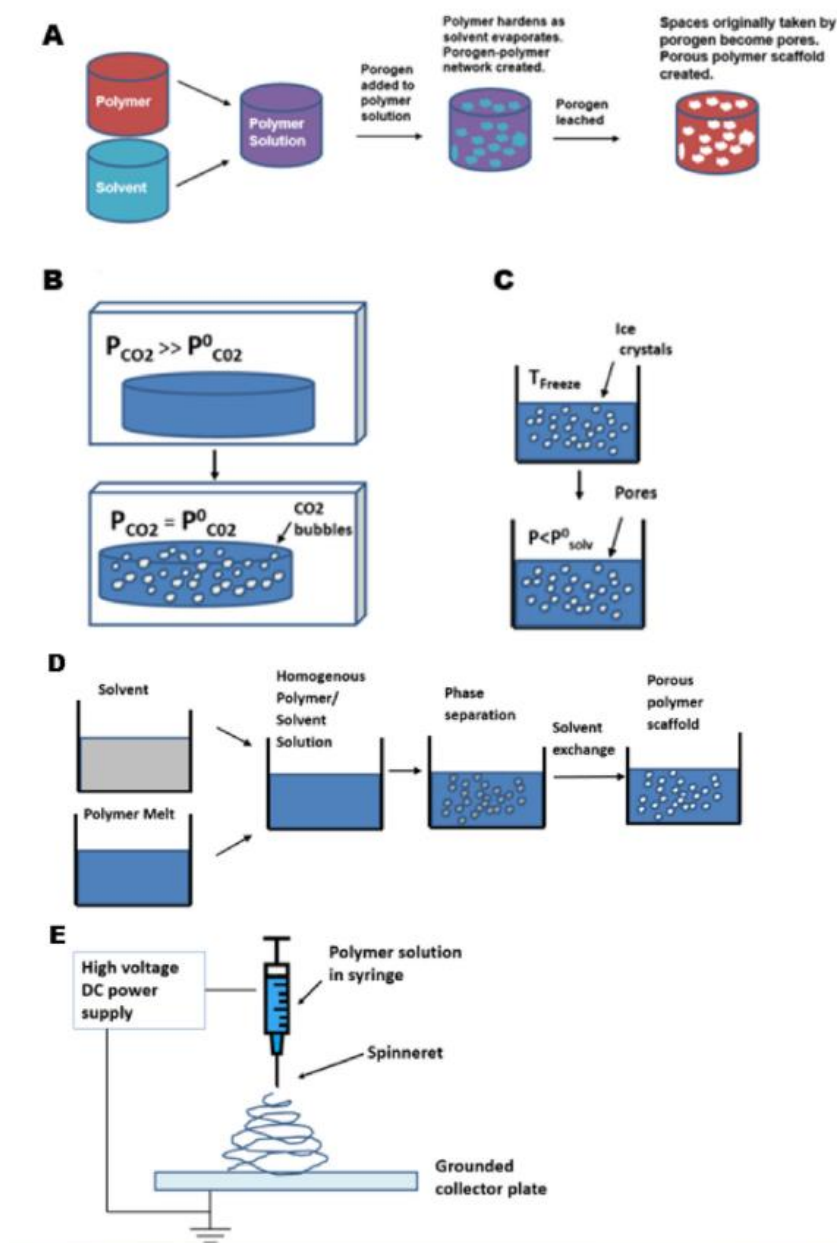


Рисунок 3.9 – Методики виготовлення матриць: *a* – лиття з наступним вилученням часток; процес вилучення частинками; *b* – газове спінювання; *c* – ліофілізована сушка; *d* – розділення фаз; *e* – електроформування

Порошкова технологія. Процес розроблений для виготовлення матриць з пористої кераміки та скла з суспензій керамічних частинок у відповідній рідині (наприклад, воді або етанолі). Наповнювачі (сахароза, желатин, мікрогранули ПММА та змочувальна поверхнево-активна речовина), які додають у суспензію, утворюють пори під час випаровування або випалу.

Наявність сполучних речовин (поліцукри та полівінілбутил) у суспензіях відіграє важливу роль у підвищенні міцності кераміки перед спіканням продукту. Способи формування керамічних скаффолдів поділяють на сухий та вологий (табл. 3.11).

Таблиця 3.11 – Способи формування керамічних скаффолдів

Вид процесу	Тип процесу
Сухі процеси	1. Розсипна упаковка 2. Ущільнення 3. Одновісне пресування 4. Холодне ізостатичне пресування
Мокрі процеси	1. Шлікерне лиття 2. Лиття під тиском 3. Розділення фаз/сублімаційна сушка 4. Реплікація полімерів 5. Гель-залівка

Методика реплікації отримала назву *«полімерно-губчастого» методу* або методу *дублювання полімерної матриці*. Метод привертає значну увагу, оскільки має потенціал для створення матриць з рівномірним розподілом керамічного порошку, що дає можливість отримувати матеріали з контрольованим розміром пор, пористістю та їх зв'язністю. У цьому процесі полімерну піну з бажаною макроструктурою (наприклад, поліуретан) занурюють в керамічну суспензію. Після висихання полімерну піну з керамічним покриттям нагрівають для її розкладання, а залишену кераміку спікають до бажаної густини.

Використовуючи цю техніку, були виготовлені пористі матриці з біоскла 45S5 пористістю > 90 % і розміром пор 510–720 мкм. Умови спікання були оптимізовані для досягнення покращеної механічної стабільності матриць з біоскла зі збереженням їх високої біоактивності. Це досягалось за рахунок нанесення покриття PDLA на піну з біоскла 45S5.

Золь-гель процес. Методика полягає в утворенні золю за рахунок додавання поверхнево-активної речовини з його подальшою конденсацією і гелеутворенням. Використовуючи золь-гель процес, можна виготовляти керамічні або скляні матеріали різноманітних форм, у тому числі ультратонкі порошки, тонкоплівкові покриття, керамічні волокна, мікропористі неорганічні мембрани, монолітні кераміку та скло, а також високопористі аерогелеві матеріали. Незважаючи на свої переваги, золь-гель методика не дозволяє отримувати пористу кераміку високою механічної міцності. Успішне застосування золь-гель процесу в розробці біоактивної склокераміки, що містить Na_2O , дозволило отримати біоактивний скаффолд з покращеною механічною міцністю без втрати задовільної здатності до біологічного розкладання. Однак, механічні властивості золь-гель біосклокерамічного матеріалу 45S5 не відповідали показникам кісткової тканини.

Обмеження застосування традиційних технологій виготовлення скаффолдів. Ідеальна матриця кісткової тканини повинна бути пористою, мати відповідний розмір пор й високу зв'язність між ними. Це сприяє проникненню в матрицю клітин, судин, вrostанню тканин і швидкій доставці поживних речовин. Також вони повинні забезпечувати належну механічну цілісність і

деградувати зі швидкістю, що відповідає швидкості росту пошкодженої кістки. Незважаючи на те, що описані звичайні методи виготовлення дозволили створили матриці, які використовуються в тканинній інженерії, більшість з них не здатні повноцінно забезпечувати безперервну зв'язність і рівномірний розподіл пор у матриці. Розміри пор, їх геометрія та просторовий розподіл не можуть точно контролюватися в звичайних процесах. Деякі звичайні методи не механізовані і мають незадовільну відтворюваність. Ще одне обмеження більшості традиційних способів виготовлення – необхідність використання органічних розчинників полімерів та інших хімічних речовин, а також порогенів для створення пор. Більшість розчинників та порогенів є токсичними і їх залишки в матриці можуть викликати серйозні запальні реакції.

3.3.3 Інновації технології виготовлення скаффолдів для кісткових матриць

Техніка 3D-друку. Традиційні методи виготовлення скаффолдів, як правило, характеризуються обмеженням контролем розміру пор, їх геометрії та взаємозв'язку. Для покращення здатності контролю структури матриці була розроблена така технологія, як 3D-друк.

3D-друком виготовляють об'єкти шляхом пошарового нанесення порошкових, рідких або твердих матеріалів. Пошарово створюють конструкцію відповідного розміру. Структура надрукованого об'єкту визначається моделлю автоматизованого проектування (CAD), яка завантажується в 3D-принтер. CAD-моделі описують тривимірні об'єкти серією шарів поперечного перерізу, що дозволяє 3D-принтерам фізично відтворювати моделі за допомогою адитивного процесу.

Спеціальні CAD-моделі пацієнта можна створити шляхом застосування комп'ютерної томографії (КТ) або магнітно-резонансної томографії (МРТ) клінічних дефектів у моделі (CAD). Потім використовують додаткове програмне забезпечення для розділення моделі САПР на G-код, який кодує 3D-моделі у САПР-формат, що може керувати 3D-принтерами. Такі параметри, як швидкість друку, висота шару, температура та тиск друкуючої головки можуть бути модифіковані та оптимізовані через G-код.

Стереолітографія (SLA) є одним із найперших 3D-друків техніки, які мають бути розроблені (рис. 3.10, а). Він заснований на спрямованому використанні лазера для шарової полімеризації рідкої фотополімерної смоли. Метод стереолітографії – це швидка техніка прототипування, в якій використовується фотополяризація для формування 3D-матриць з пошаровою деталізацією, що досягається за допомогою комп'ютерної графіки. Цей метод дозволяє формувати матриці з можливістю репродукції та контрольованою пористістю, їх розмірами, внутрішніми зв'язками і механічними властивостями.

У результаті застосування **УФ-випромінювання** утворюється тверда 3D-модель. УФ-лазер може отверджувати шари в поперечному перерізі моделі і залишати в рідкому вигляді інших зонах. Після кожного поперечного перерізу

платформа друку рухається вниз, вкриваючи твердим полімером інший шар смоли. Зайва рідка смола видаляється з отриманої тривимірної структури. Незважаючи на те, що за допомогою SLA може швидко створювати матриці з контрольованою структурою та роздільною на мікрорівні, існує обмежена кількість матеріалів, які можна застосовувати в цій методиці.

У **моделюванні осадження розплаву (FDM)** використовується певна температура друкуючої головки для пошарового нанесення термопластичного матеріалу з метою створення тривимірної конструкції (рис. 3.10, б). Термопластичну нитку набивають у нагріту друкувальну головку де вона розплавляється і утворює тонкий шар розплавленого полімеру, наприклад, полікапролактону. Надрукована нитка охолоджується в середовищі, що дозволяє їм зшиватися одна з одною, утворюючи скаффолд. FDM був успішно адаптований до ВТЕ як метод виготовлення синтетичних матриць. Однак за підвищених температур обмежується включення біомолекул та гідрогелів у структуру скаффолдів.

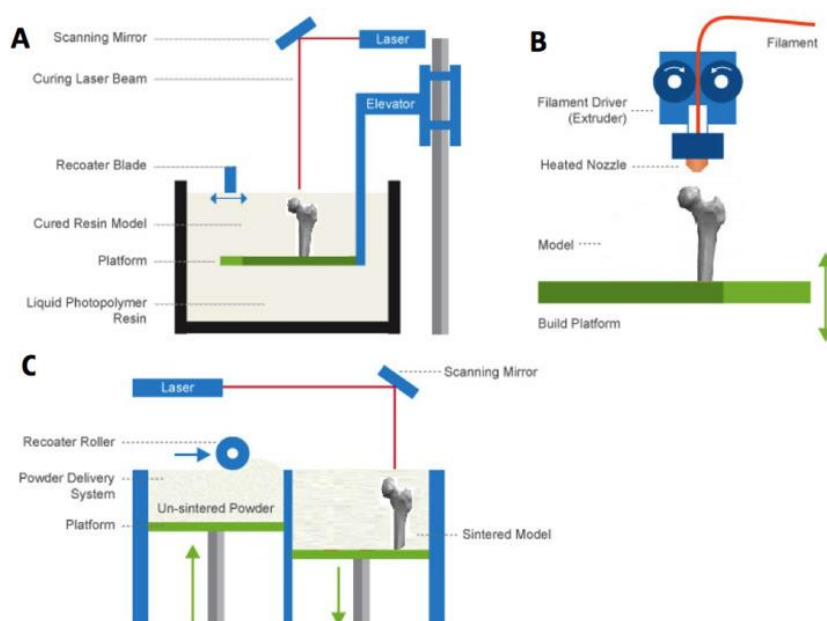


Рисунок 3.10 – Методи 3D-друку. (А) Стереолітографія (В) Моделювання осадження розплаву (С)

3D-біодрук. 3D-біодрук перспективний для рішення проблеми лікування артрити та інших захворювань кісток. Для депонування можна використовувати біодрук живих клітин, позаклітинних матриць та інших біоматеріалів та для створення складних тканинних конструкцій.

Вибіркове лазерне спікання (SLS) передбачає використання комп'ютера з керованим лазерним променем для пошарового сплавлення порошку і спікання порошкового матеріалу для створення суцільної тривимірної структури (рис. 3.10, с). Цієї методикою виробляють біоактивні, композитні матриці з механічними властивостями, близькими до властивостей трабекулярної кістки. Підвищені температури процесу обмежують включення клітин і біоматеріалів безпосередньо в SLS матриці.

Процес біодруку починається з вибору клітини та біоматеріалів для включення в біодруковані конструкції (рис. 3.11). Клітини для друку можна отримати з тканин, зразків крові та з інших джерел. Після культивування клітин та відібрані біоматеріали додають у біочорнило. Картриджі з біочорнилом завантажують в 3D-біопринтер, який розподіляє біочорнило за попередньо визначеною 3D-геометрією відповідно до CAD-моделі. Біопринтери мають декілька насадок для друку, що дозволяють комбінувати клітини та біоматеріали, включені в друковану конструкцію. Після друку конструкцію можна безпосередньо імплантувати в організм пацієнта або відправити на дозрівання *in vitro* у біореактори.

Техніка 3D-біодруку. Зазвичай використовують струменевий, лазерний, мікроклапанний та екструзійний біодрук. Струменевий біодрук або біодрук краплею за вимогою використовує термічні або акустичні сили для викидання крапель біочорнила з сопла (рис. 3.11, а). Термічні струменеві принтери використовують тепло для створення тиску імпульсу усередині друкувальної голівки протягом короткого періоду часу, що викликає викидання крапель біочорнила. Інші системи застосовують п'єзоелектричні кристали, які стискаються під дією напруги і змінюють свою форму. Це генерує акустичну хвилю, яка створює тиск, що викидає краплі з насадки. Перевагою струменевої технології є те, що вона адаптована в настільних струменевих принтерах, низьковартісна, має широку доступність та високу швидкість друку. Обмеження – часте засмічення сопла, вплив на клітини та матеріали термічного та механічних факторів, внаслідок чого спостерігається неоднорідний розмір крапель.

Системи лазерного біодруку (LAB) використовують імпульсний лазерний промінь для створення бульбашок високого тиску, які рухають клітинні матеріали до колекторної підкладки (рис. 3.11, в). Для LAB використовують мезенхімальні стромальні клітини, зв'язані з колагеном та наногідроксиапатитом. Деякі обмеження LAB полягають в нагріванні і пошкодженні клітин, складності створення 3D-структур, високій трудомісткості створення стрічок з клітин і біоматеріалів.

Мікроклапанний біодрук – методика, де рідини під постійним пневматичним тиском дозуються з картриджа наконечника (рис. 3.11, с). Клапаном можна керувати механічно, електрично або магнітно. Мікроклапанні системи можуть друкувати клітини, включаючи MSC з високою життєздатністю й функціональністю. Для друку застосовують колаген та кістковий морфогенний білок.

Екструзійні біопринтери наносять безперервні нитки матеріалів, а не окремі краплі (рис. 3.11, д). Пневматичний або механічний тиск прикладається до шприца і викликає екструзію біочорнила через насадку. Істотною перевагою такого підходу є можливість отримувати дуже високу щільність клітин. Методом екструзії виробляють тканинні сфероїди, тканинні нитки, клітинні гранули, децелюляризовані матричні компоненти та клітинні гідрогелі. Потенційні обмеження та проблеми полягають у проблемах з досягненням

високої роздільної здатності друку, впливі напруги зсуву на клітини в друкарських соплах, значних витратах біочорнил для друку.

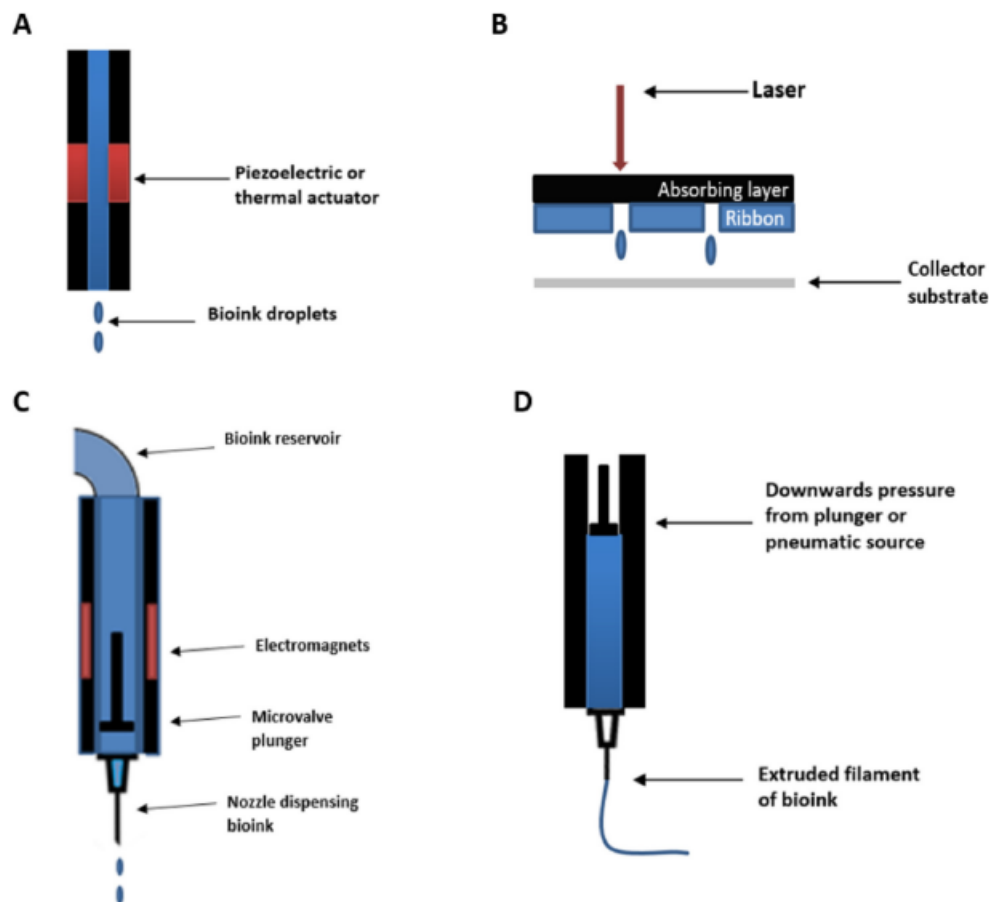


Рисунок 3.11 – Поширені методи біодруку: (А) струменевий, (В) лазерний, (С) мікроклапанний та (D) екструзійний біодрук

Запитання для самоконтролю до розділу 3

1. Обґрунтувати вибір скаффолдів для реконструкції тканин.
2. Визначити роль позаклітинної матриці в створенні клітинних матриць.
3. Які параметри необхідно дотримати під час створення скаффолдів?
4. Наведіть методи пришвидшення термінів зрощування імплантатів з кістковою тканиною.
5. Яким чином забезпечення необхідного рівня та швидкості резорбції матеріалу визначає ефективність зрощування матеріалу імплантату з кістковою тканиною?
6. Проаналізувати фактори росту та їх функції.
7. Визначити роль факторів росту клітин у ході зрощування імплантатів з кістковою тканиною.
8. Як впливають механічні властивості скаффолду на клітинну функцію.
9. Визначити, які фактори росту та білки беруть участь у регенерації кісток.

10. Навести загальні та спеціальні вимоги до біосумісних матеріалів та скаффолдів.
12. Навести склад кісткової тканини.
13. Проаналізувати структуру та властивості кісткової тканини.
14. Навести конструктивні параметри скаффолдів для кісткової інженерії.
15. Як впливають пористість та індивідуальний розмір пор на клітинний ріст та прикріплення клітин та клітинну адгезію?
16. Як впливають розміри пор й пористість на міжклітинні сигнальні взаємодії?
17. Як впливають розміри пор і пористість на характеристики міцності матриці?
18. Визначити вплив каналної взаємопов'язаності пор клітинної матриці на міжклітинну взаємодію.
19. Навести приклади впливу різних матеріалів скаффолдів на остеокондукцію матриці і васкуляризацію під час формування кістки.
20. Яким чином шорсткість імплантантів модулює біологічну реакцію тканин?
21. Проаналізувати основні механізми реконструкції кістки за застосування скаффолдів.
22. Яким чином можуть бути введені до скаффолду ростові фактори?
23. Які існують основні підходи до реконструкції великих кісткових дефектів?
24. Проаналізувати клітинну матрицю як нанокompозитну структуру.
25. Проаналізувати механізм відновлення кістки.
26. Визначити головні остеогенні фактори та маркери остеогенного диференціювання.
27. Які сигнальні шляхи визначають початкову кісткову регенерацію в тканинно-інженерних конструкціях?
28. Визначити основні аспекти ремоделювання хряща.
29. Проаналізувати структуру суглобу та основні компоненти хряща.
30. Навести порівняльну характеристику матеріалів, які застосовуються для виготовлення скаффолдів. Визначити їх переваги та недоліки.
31. Проаналізувати перспективність створення скаффолдів на основі металів та їх сплавів.
32. Визначити переваги та недоліки застосування природних та синтетичних полімерів.
33. Навести основні види біоруйнівних полімерів, їх переваги та недоліки за виготовлення скаффолдів.
34. Навести приклади композиційних матеріалів на основі полімерів для одержання скаффолдів для застосування в інженерії кісткової тканини.
35. Проаналізувати перспективність створення композитних каркасів на основі колагену.
36. Навести склад та властивості скаффолдів на основі хітозану та фосфатів кальцію та полімерів.

37. Визначити переваги застосування композитних каркасів на основі гіалуронової кислоти.

38. Яку роль відіграє фіброїн шовку в створенні то застосуванні композитних матеріалів для тканинної інженерії?

39. Які переваги та недоліки застосування скаффолдів на основі біокераміки?

40. Проаналізувати застосування методів модифікації поверхні імплантатів та їх ефективність для тканинної інженерії.

41. Визначити основні традиційні технології виготовлення скаффолдів для кісткових матриць.

42. Навести особливості розчинного лиття.

43. У чому полягає сутність процесу газового спінювання?

44. Які переваги та недоліки сублімаційної сушки?

45. Проаналізувати особливості одержання скаффолдів для кісткових каркасів методом фазового розділення.

46. У чому полягає сутність процесу електроспінінгу?

47. Які процеси відбуваються під час газового спінювання?

48. Навести основні види порошкових технологій.

49. Охарактеризувати процес термоіндукованого розділення фаз.

50. Проаналізувати обмеження застосування традиційних технологій виготовлення скаффолдів.

51. Навести інноваційні технології виготовлення скаффолдів для кісткових каркасів.

52. У чому полягають переваги 3D-друку?

53. Які особливості процесу стереолітографії?

54. Визначити основні характеристики процесу моделювання осадження розплавом.

55. У чому полягають особливості вибіркового лазерного спікання?

56. Навести особливості застосування 3D-біодруку.

57. Охарактеризувати 3D-біодрук.

58. Навести системи лазерного біодруку.

59. У чому полягають особливості мікроклапанного біодруку?

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Саввова О. В. Нові керамічні та скломатеріали спеціального призначення [Електрон. ресурс] : конспект лекцій для студентів 1 курсу денної форми навчання другого (магістерського) рівня вищої освіти за спеціальністю 161 – Хімічні технології та інженерія / О. В. Саввова ; Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова – Електрон. текст. дані. – Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2020. – 106 с. – Режим доступу: <https://eprints.kname.edu.ua/55733/>, вільний (дата звернення 05.05.2025). – Назва з екрана.
2. Біоактивні матеріали для регенерації кісткової тканини : навч. посіб. / О. В. Саввова, Г. К. Воронов, О. І. Фесенко, Ю. О. Смирнова ; Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова. – Електрон. текст. дані. – Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2021. – 142 с.
3. Основи біоматеріалознавства [Електрон. ресурс] : навч. посіб. / О. В. Саввова, Г. К. Воронов, О. І. Фесенко, О. І. Пилипенко ; Харків. нац. ун-т міськ. госп-ва ім. О. М. Бекетова. – Електрон. текст. дані. – Харків : ХНУМГ ім. О. М. Бекетова, 2023. – 202 с. – Режим доступу: <https://eprints.kname.edu.ua/63924/>, вільний (дата звернення 05.05.2025). – Назва з екрана.
4. Олійник І. М. Біоматеріали : конспект лекцій з дисципліни «Біоматеріали» для здобувачів освітнього ступеня «бакалавр» спеціальності 163 – Біомедична інженерія, освітньої програми «Біомедична інженерія» / І. М. Олійник. – Маріуполь : ДВНЗ «ПДТУ», 2019. – 39 с.
5. Карпов О. В. Клітинна та генна інженерія : підручник / О. В. Карпов, С. В. Демидов, С. С. Кир'яченко. – Київ : Фітосоціоцентр, 2010. – 208 с.
6. Зиман З. З. Кальцій-фосфатні біоматеріали : навч. посіб. / З. З. Зиман. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2018. – 288 с.
7. Суходуб Л. Ф. Біоматеріали та покриття : навч. посіб. / Л. Ф. Суходуб. – Суми : Сумський державний університет, 2020. – 300 с.
8. Барбаш В. А. Біоматеріали у мікро- та наноелектроніці : навч. посіб. / В. А. Барбаш, Н. П. Ключко, В. Р. Копач. – Київ : Видавництво «Каравела», 2023. – 328 с.
9. Панченко С. П. Проектування матеріалів медичного призначення. Конспект лекцій для здобувачів ступеня бакалавра спеціальності 132 – Матеріалознавство / С. П. Панченко; Нац. техн. ун-т «Дніпровська політехніка». – Дніпро : НТУ «ДП», 2022. – 73 с.
10. Principles of Regenerative Medicine. 3rd Edition, Kindle Edition / Anthony Atala, Robert Lanza, Tony Mikos, Robert Nerem. – Academic Press, 2018. – 1454 p.
11. Principles of Translational Science in Medicine. From Bench to Bedside. Second Edition / ed. by Martin Wehling. – Academic Press, 2015. – 332 p.
12. Regenerative Medicine : From Protocol to Patient. Second Edition / ed. by Gustav Steinhoff. – Springer, 2013. – 1220 p.

Електронне навчальне видання

САВВОВА Оксана Вікторівна,
БАБІЧ Олена Вікторівна,
ФЕСЕНКО Олексій Ігорович,
СМИРНОВА Юлія Олегівна,
ПИЛИПЕНКО Олексій Іванович,
ГОПКО Андрій Олексійович

СУЧАСНІ МАТЕРІАЛИ ДЛЯ КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

Відповідальний за випуск *Т. Д. Панайотова*

За авторською редакцією

Комп'ютерне верстання *О. І. Пилипенко*

Підп. до друку 21.05.2025. Формат 60 × 84/16.
Ум. друк. арк. 9,8.

Видавець і виготовлювач:
Харківський національний університет
міського господарства імені О. М. Бекетова,
вул. Чорноглазівська (Маршала Бажанова), 17, Харків, 61002.
Електронна адреса: office@kname.edu.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи:
ДК № 5328 від 11.04.2017.