



**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ**  
**“СВ. КЛИМЕНТ ОХРИДСКИ”**  
**ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЯ И ФАРМАЦИЯ**

**Силвия Станимирова Симеонова**

**ПОЛУЧАВАНЕ И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА НОВИ**  
**БИОМАТЕРИАЛИ ОТ БИОРАЗГРАДИМИ**  
**ПОЛИМЕРНИ СМЕСИ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

За получаване на образователна и научна степен „Доктор”

Професионално направление: 4.2 Химически науки

Научна специалност: 01.05.06 Химия на високомолекулните съединения

*Научен ръководител:* проф. дхн Михаил Евстатиев

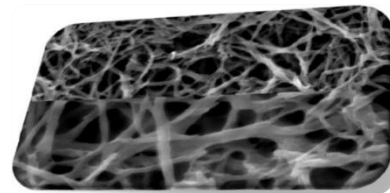
*Научно жури:* доц. д-р Елена Каменска (председател, рецензент)

чл.-кор. дхн Илия Рашков (рецензия)

проф. дхн Михаил Евстатиев (становище)

проф. дхн Станислав Рангелов (становище)

проф. дхн Милчо Натов (становище)



**София, 2013**

Дисертационният труд е обсъден и допуснат до защита на заседание на Катедра Приложна органична химия във Факултет по Химия и Фармация, СУ “Св. Климент Охридски”

**Дисертационният труд е изложен на 166 страници, включва 78 фигури, 12 таблици. Резултатите са публикувани в 3 научни статии и са докладвани на 18 научни форума (10 устни и 8 постерни съобщения).**

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 15.11.2013 г. от 16 ч. в заседателната зала на Факултета по химия и фармация при СУ “Св. Климент Охридски”, бул. „Джеймс Баучър” № 1, ет. 1, стая 108.

**Автор:** Силвия Станимирова Симеонова

**Заглавие:** ПОЛУЧАВАНЕ И ОХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА НОВИ БИОМАТЕРИАЛИ ОТ БИОРАЗГРАДИМИ ПОЛИМЕРНИ СМЕСИ

Изследванията в настоящата дисертационна работа са проведени в **Лаборатория структура и свойства на полимерните материали** към Катедра Приложна органична химия във Факултет по Химия и Фармация, СУ “Св. Климент Охридски”, с ръководител проф. дхн Михаил Евстатиев.

Част от изследванията са проведени и в Университета в Миньо, Департамент по полимерно инженерство, Португалия и Института по Композитни материали, IVW, Кайзерслаутерн, Германия.

Благодаря на доц. Р. Александрова (Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, БАН) за съдействието и консултациите при провеждане и обсъждане на *in vitro* изследванията.

Благодаря на проф. М. Габрашанска и проф. М. Александров (Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей, БАН) за съдействието и консултациите при провеждане и обсъждане на *in vivo* изследванията.

Благодаря на доц. Ст. Тепавичарова (Институт по обща и неорганична химия, БАН) за оказаното съдействие при провеждане на изследванията за определяне на биоминерализацията на фибрилните PLA подложки.

Искрено благодаря на д-р Албена Ледерер (Leibniz Institute, Dresden) и доц. К. Балашев (Факултет по Химия и Фармация, СУ “Св. Климент Охридски”) за оказаното съдействие и възможността да използваме наличната апаратура – газов хроматограф снабден с мас-селективен детектор и атомно-силов микроскоп за определяне на органични разтворители и изследване на надмолекулната организация на изолираните фибрили от полимлечна киселина.

Искрено благодаря и на Н. Димитров и доц. А. Апостолов (Факултет по Химия и Фармация, СУ “Св. Климент Охридски”) за възможността да използваме наличната апаратура – сканиращ електронен микроскоп и рентгенов апарат за определяне на морфологията и изследване на кристалната структура на получените екструдирани смеси, ориентирани влакна и изолирани фибрили.

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

**HA** – хидроксиапатит;

**TAP** – обща алкална фосфатаза;

**BAP** – костна алкална фосфатаза;

**PLA** – полимлечна киселина;

**PLLA** – поли(L-млечна киселина);

**PDLA** – поли(D-млечна киселина);

**LLA** – L-млечна киселина;

**EVAl<sup>TM</sup> (EVOH)** – поли (етилен-съ-винилов алкохол);

**PEVA** – поли (етилен-съ-винилов ацетат);

**PVA** – поли (винилов алкохол);

**VAc** – винил ацетат;

**MFC** – усилен микрофibrилни композити;

**DSC** – диференциална сканираща калориметрия;

**X-Ray** – рентгеноструктурен анализ;

**WAXS** – широкоъглово рентгеново разсейване;

**SAXS** – малкоъглово рентгеново разсейване;

**FTIR-AIR** – инфрачервена спектроскопия с фурие трансформация;

**SEM** – сканираща електронна микроскопия;

**AFM** – атомно-силова микроскопия;

**GC/MSD** – газова хроматография с мас-селективен детектор;

**UMT-2M** – универсален механичен тест

## У В О Д

Усилените микрофibrилни композити (MFC) са получени за първи път от М. Евстатиев и Ст. Факиров през 1992 година [1]. Тези нови полимерни материали са изградени от изотропен полимер-матрица, подсилена с хомогенно диспергирани микро- или нанофibrили с високо съотношение на дължината им спрямо тяхната дебелина т.н. *aspect ratio* (AR). След екструдирание на двата полимера и ориентиране на екструдата се получава ориентирано влакно, което е изградено от fibrилите на двата компонента. Композитният материал е изграден от изотропна матрица, в която хомогенно е диспергиран усилващият компонент (влакната или микрофibrилите). За да се превърне ориентираната полимерна смес в композит е необходимо последната да се държи при температура, по-висока от  $T_m$  на нискотопимия полимер и по-ниска от температурата на топенето на по-високотопимия полимер (fibrилите).

Настоящият дисертационен труд е насочен към получаване на изолирани fibrили и биоразградими подложки от поли (млечна киселина) чрез нов метод – модифициране на концепцията на усилените микрофibrилни композити (MFC) и оптимизиране на условията за селективно изолиране на fibrили от ориентираните влакна. Концепцията MFC е приложена и за получаване на усилените биоразградими композити на основата на поли (млечна киселина) и поли (бутилен адипат-съ-терефталат) (PBAT) с цел получаване на биоразградими материали за опаковъчни цели в хранителната промишленост. Получените нови биоматериали от биоразградими полимерни смеси са охарактеризирани чрез съвременни физикохимични методи с цел определяне на връзката между тяхната структура и свойства.

Получаването на усилените микрофibrилни композити (MFC) и изолиране на fibrили чрез модифициране на MFC концепцията включват три основни етапа. Първите два етапа на тези концепции са еднакви и включват:

- **Смесване на полимерите и екструзия** – Екструзия на сместа на два несъвместими полимера с различни температури на топене ( $T_m$ ), които продуцират екструдат-изотропна, непрекъсната смес.
- **Изтегляне на екструдата и fibrилизация** – Студено изтегляне на сместа с цел получаване на ориентация на двете полимерни фракции. На този етап се получават високо ориентираните микрофibrили. По време на изтегляне и fibrилизация двата полимера се преобразуват във високо ориентирано състояние.

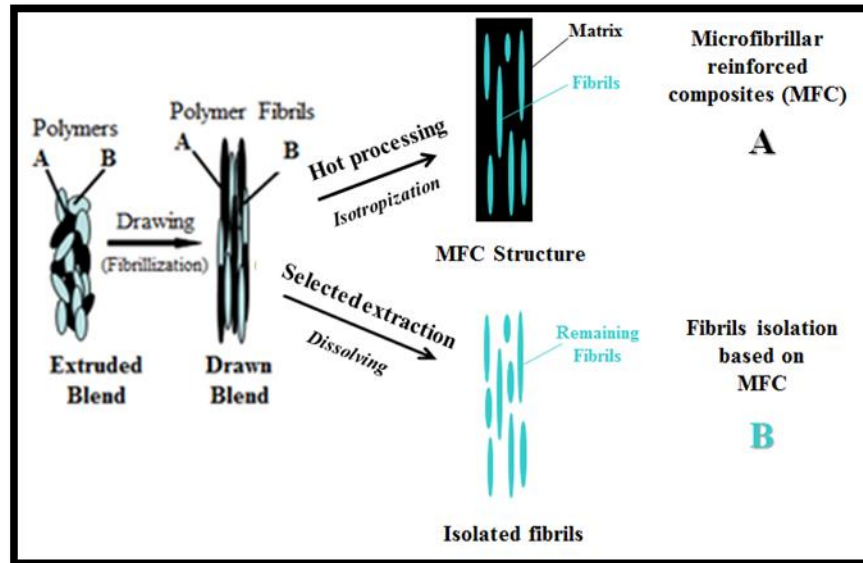
Концепцията MFC и модифицирането ѝ с цел изолиране на fibrили се различават по третия етап. При MFC третият етап е:

- **Допълнителна обработка** – Термична обработка при температура между температурата на топене на двата полимера с цел да се осигури формиране на изотропна матрица, която да включва ориентираните fibrили.

При модифицираната MFC концепция с цел изолиране на fibrили третият етап е:

- **Селективна екстракция** – Селективно изолиране на матрицата от ориентираното влакно и изолиране на индивидуални fibrили.

На фигура 1 са представени трите етапа за получаване на усилени микрофибрилни композити (MFC) и изолирани полимерни фибрили (модифицирана MFC концепция).



**Фигура 1.** Схема за получаване на: (A) Усилени микрофибрилни композити (MFC) и (B) Модифицирана MFC концепция с цел изолиране на фибрили [2, 4].

Факиров и сътрудници докладват резултати за получаване на подложки (*scaffolds*) от изолирани PET фибрили получени от ориентирано PP/PET (70/30 тегл. %) влакно [3].

Авторите прилагат нов метод, като използват модифицираната концепция на микрофибрилните композити (MFC), т.е. изолиране на PET фибрили от ориентираното, фибрилизирано PP/PET (70/30 тегл. %) влакно чрез селективно разтваряне на PP матрицата.

В статията [2] *Fibrillar polymer–polymer composites: morphology, properties and applications*, публикувана в Journal of Materials Science през 2008 година, Факиров и сътрудници, представят резултати за приложение на MFC концепцията за получаване на изолирани PLA фибрили от ориентирано PVA/PLA влакно.

Важността на тези първоначални изследвания за получаване на изолирани фибрили от ориентирано влакно, трудностите за получаването на индивидуалните фибрили и потенциала им за приложение в биомедицината, подробно и хронологично са представени в монографията на проф. Факиров „СЛЕД СЕДЕМДЕСЕТТЕ (спомени в бъдещето)“ [5].

”...биологичните изпитания с живи клетки бяха положителни, но основния материал – PET, не е биоразградим. Освен това за отстраняването на другия полимер бе използван органичен разтворител. Значи търсенията трябва да продължат в посока на използване на биоразградим, разрешен от FDA (Food and Drug Administration) полимер, като освен това при получаването на подложките не бива да се използва токсичен разтворител...” [5] стр. 216.

”...Сред допусканията за подложки и разнообразни протези полимери на първо място стои полимлечната киселина (*polylactic acid, PLA*) и нейни съполимери...” [5] стр. 214.

Всички тези резултати, почиващи на модифицираната MFC концепция са мотивиращата сила за нови изследвания с използване на други полимерни влакна.

Ето защо, основна цел на настоящата дисертация е **получаване и охарактеризиране на нови биоматериали от полимерни смеси**, на основата на модифицираната концепция на усилените микрофибрилни композити (MFC).

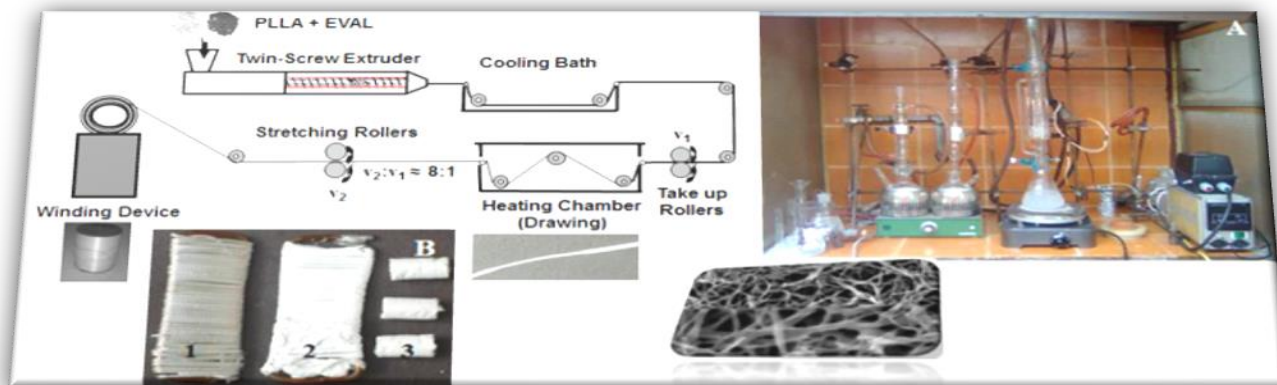
За постигането на тази цел са поставени следните задачи:

- Избор на подходяща полимерна смес, от която максимално да се изолират фибрили и да се получат подложки и композити от биоразградим полимер, който да отговаря на условията за приложимост на съвременните биоматериали.
- Да се оптимизират условията за селективно изолиране на фибрили от ориентирани влакна и термично пресоване, с цел получаване на биоматериали (подложки от фибрили, полимерни носители и композити) с подобрени механични и физикохимични свойства.
- Да се охарактеризират, термично, структурно, морфологично и механично получените ориентирани влакна, изолираните фибрили, подложки от изолираните фибрили и полимерни композити чрез съвременни физикохимични методи.
- Да се докаже потенциалната приложимост на получените биоматериали в медицината с помощта на *in vitro* и *in vivo* изследвания.

## Резултати и обсъждане

### I. Получаване на биоразградими полимерни подложки чрез използване на модифицираната концепция на микрофibrилните композити

За първи път модифицираната концепция на усилените микрофibrилни композити (MFC) е успешно приложена за получаване на изолирани PLLA фибрили от ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тег. %) влакно с цел получаване на биоразградими PLLA подложки (*scaffolds*) с използване на нетоксичен разтворител.



#### 3.1 Диференциална сканираща калориметрия (DSC)

##### 3.1.1. Термофизично охарактеризиране на образци от изходните PLLA хомополимер и EVAL съполимер, получената от тях екструдирана смес, ориентирани PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакна и изолирани PLLA фибрили

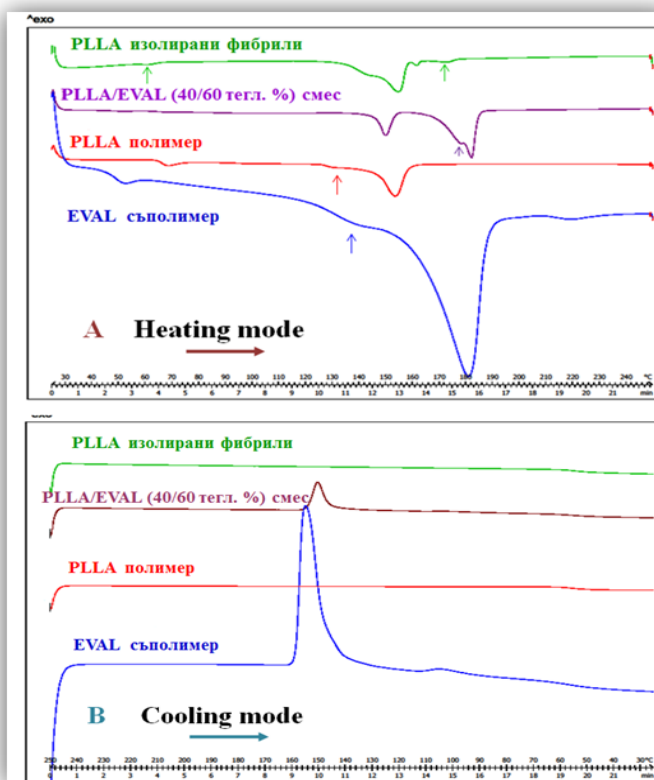
Резултатите от DSC метода дават информация за фазовото състояние, фазовите преходи, явлението кристализация в полимерите, топенето и степента на кристалност. На фигура 2 са представени DSC термограми в режим на нагряване и охлаждане, а в таблица 1 са обобщени резултатите за термичните свойства на материалите. Експерименталните резултати дават информация за наличието на два типа структурни полимерни смеси: (i) несъвместими смеси, поради наличието на два неинтензивни пика за температурата на встъкляване ( $T_g$ ), съответстващи на температурите за използваните изходни полимери: PLLA хомополимер с  $T_g = 67$  °C и EVAL съполимер с  $T_g = 50$  °C, както и (ii) компонентите в сместа са в семикристална структура, независимо от това кой от двата компонента е в изходно или смесено състояние (фигура 2, таблица 1). В термограмите на изходните полимери се наблюдават: (i) за PLLA хомополимера, два пика на топене неинтензивен при 133 °C (оказан със стрелка на фигура 2 A), и един интензивен при  $T = 153$  °C (ii) за EVAL съполимера са пиковете при  $T = 138$  °C и  $T = 180$  °C, които имат подобно отнасяне (фигура 2 A).



**Таблица 1.** Термофизични свойства получени с DSC метода на образци от изследваните материали.

| Термо-физични свойства | Изходни материали |         | Екструдирана PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) смес |      | Ориентирана PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) смес |         | PLLA фибрили след две процедури на екстракция |      |
|------------------------|-------------------|---------|---------------------------------------------|------|--------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------|------|
|                        | PLLA              | EVAL    | PLLA                                        | EVAL | PLLA                                       | EVAL    | PLLA                                          | EVAL |
| $T_g$ (°C)             | 67                | 50      | 64                                          | 52   | 65                                         | 50      | 62                                            | –    |
| $T_m$ (°C)             | 133,153           | 138,180 | 152                                         | 180  | 150                                        | 175,182 | 145,155,164                                   | 173  |
| $\Delta H_m$ (J/g)     | -34               | -37     | -5                                          | -30  | -13                                        | -44     | -45                                           | -3   |
| $W_c$ (%)              | 37                | 35      | 13                                          | 47   | 35                                         | 69      | 48                                            | 3    |
| $T_c$ (°C)             | –                 | 157     | –                                           | 155  | –                                          | 151     | –                                             | –    |
| $\Delta H_c$ (J/g)     | –                 | 28      | –                                           | 30   | –                                          | 34      | –                                             | –    |

От таблица 1 се вижда, че степента на кристалност ( $W_c$ ) на хомополимера PLLA, изчислена по формула (3.1.1 а) е 37 %, а тази на съполимера EVAL е 35 %. След екструзия, компонентите в сместа имат почти идентични температури на топене, но различна степен на кристалност в сравнение с изходните материали. Степента на кристалност за фракциите на екструдираната смес е изчислена по формула (3.1.1 б) и е 13 % за PLLA фракцията и 47 % за фракцията на EVAL.



**Фигура 2.** DSC термограми на изходните PLLA хомополимер и EVAL съполимер, ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно и изолирани PLLA фибрили (след втори етап на селективна екстракция): (A) в режим на нагряване и (B) в режим на охлаждане, измерени с *Differential Scanning Calorimetry (DSC)\* DSC 821 Mettler Toledo*.

В термограмите на ориентираните проби се наблюдават ендотермични пикове на топене в същия температурен интервал както и при екструдирания смеси. PLLA фракцията в сместа на ориентираното влакно има един пик при  $T = 150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , а при тази на EVAL се наблюдават два пика - един неинтензивен при  $T = 175\text{ }^{\circ}\text{C}$  (оказан със стрелка на фигура 2 А) и един интензивен при  $T = 182\text{ }^{\circ}\text{C}$  (фигура 2 А). Наличието на два пика в термограмата във фибрилизирания EVAL в сравнение с фракцията му в екструдиранията смес показва, че EVAL кристалите са с различен размер и съвършенство след изтегляне и ориентация. В сравнение с кристалността на екструдиранията PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) смес, степента на кристалност ( $W_c$ ) на двете фракции в ориентираното фибрилно влакно е сравнително по-висока. Съответните стойности, изчисление по формула (3.1.1 б) са представени в таблица 1 и са: 35 % за фракцията на PLLA и 69 % за фракцията на EVAL в ориентираното влакно.

След процесите на селективна екстракция на ориентираното влакно в термограмата на изолираните PLLA фибрили се регистрира само една температура на всъскляване  $T_g = 62\text{ }^{\circ}\text{C}$  и широка област на топене от  $T = 136\text{ }^{\circ}\text{C}$  до  $T = 164\text{ }^{\circ}\text{C}$ , която включва три пика, съответно при  $T = 145\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T = 155\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $T = 160\text{ }^{\circ}\text{C}$  (фигура 2 А, таблица 1). Наличието на тези три пика доказва съществуването на кристали в PLLA фибрилите с различен размер и съвършенство. Друго обяснение на явлението е релаксацията и допълнителните процеси на кристализация на PLLA фибрилите по време на разтваряне на съполимера EVAL от ориентираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно. Процесите на селективна екстракция представляват допълнително отгряване на ориентираното влакно с фиксирани краища на намотаното около металната рамка влакно при температура  $T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

При процесите на механично изтегляне се формира  $\beta$  кристална орторомбична структура, при която полимерните вериги преминават в една разтеглена хелатна конформация. PLLA  $\beta$  кристалите се превръщат в  $\alpha$  кристали, когато се отгряват над температурата на всъскляване  $T_g$  и под температурата на топене  $T_m$ . В конкретния случай, това става по време на отгряването на навитите PLLA/EVAL влакна с фиксирани краища около металната рамка при селективната екстракция на EVAL матрицата при температура  $T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$  [6, 7]. Образуването на  $\alpha$  кристали в PLLA се дължи на реорганизацията в полимерните вериги и увеличаване на степента на кристалност от 35 % за PLLA фибрилите в сместа до 48 % за изолираните PLLA фибрили, т.е с 13 % по-висока (таблица 1).

За изследваните PLLA фибрили не се регистрират температурата на всъскляване  $T_g$  и интензивен пик на EVAL компонента. След селективната екстракция на ориентираното влакно, наличието на слабо интензивния пик при  $T = 173\text{ }^{\circ}\text{C}$  може да се отнесе за останалото незначително количество на съполимера EVAL (фигура 2 А, таблица 1).

Качествена оценка за кристализационната способност на изходните, PLLA хомополимер и EVAL съполимер, както и за техните фракции в екструдата и ориентираното влакно може да се направи от DSC термограмите, които са регистрирани в процес на охлаждане на образците от стопилка. Кривите на охлаждане са представени на фигура 2 В и експерименталните резултати са систематизирани в таблица 1. За изходния EVAL съполимер и неговата фракция в ориентираното влакно се регистрират интензивни пикове на кристализация ( $T_c$ ), съответно при  $T = 157\text{ }^{\circ}\text{C}$  и  $T = 151\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Разликата от  $6\text{ }^{\circ}\text{C}$  между двата

пика се дължи на хетерогенен нуклеиращ ефект на PLLA върху кристализацията на EVAL в ориентираното влакно.

Когато изходният хомополимер или PLLA компонента във фибризираното влакно се охлаждат от стопилка, поради ниската кристализационна способност на PLLA, при този полимер не се наблюдават екзотермични пикове (фигура 2 В). Отсъствието на екзотермични пикове от пробата след селективната екстракция се дължи на споменатата ниска кристализационна способност на PLLA и незначителното количество от EVAL фракцията останало в PLLA фибрилите.

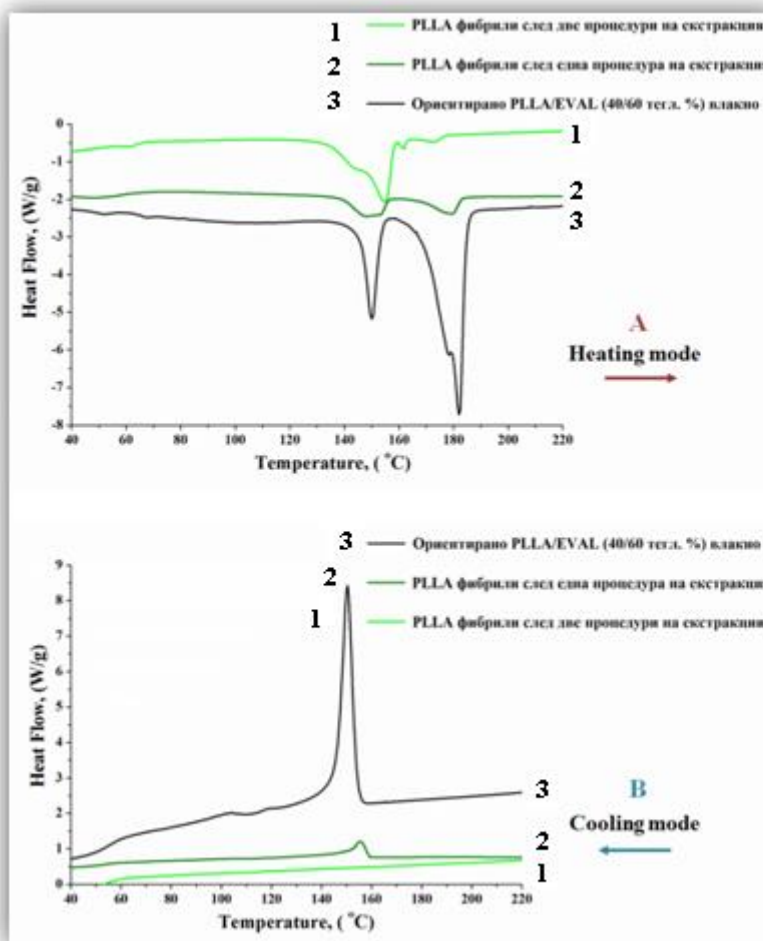
За да се оптимизира процесът на селективна екстракция и извличане на съполимера EVAL от ориентираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно и изолиране на PLLA фибрили, е необходимо отстраняването на матрицата от EVAL да се проведе в два последователни етапа. Необходимостта от провеждането на двуетапна екстракция е с цел максимално селективно разтваряне на EVAL матрицата и експериментално се доказва с DSC метода, а също така е онагледено с морфологични изследвания на изолираните индивидуални PLLA фибрили. Резултатите от изследването с DSC метода на двата етапа на екстракция са систематизирани в таблица 2. Сравнението на данните за степента на кристалност на изходното фибризирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно с тази на изолираните PLLA фибрилите след първия етап на екстракция показва намаление с 8 %, докато след втория етап  $W_c$  се увеличава с 13 %. Същевременно степента на кристалност на EVAL след една екстракция е 32 % (намалява 37 % в сравнение с тази във фибризираното влакно), а след втората селективна екстракция е едва 3 %, което потвърждава, че EVAL матрицата е извлечена от ориентираната смес. На фигура 3 са представени DSC термограми на ориентираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно и получените от него PLLA фибрили след една и две процедури на селективна екстракция в режим на нагряване и охлаждане.

**Таблица 2.** Термофизични свойства получени с DSC метода за двуетапната екстракция и извличане на съполимера EVAL от ориентираното PLLA/EVAL влакно и изолиране на PLLA фибрили.

| Термофизични свойства | Ориентирана PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) смес |         | PLLA фибрили след една процедура на екстракция |      | PLLA фибрили след две процедури на екстракция |      |
|-----------------------|--------------------------------------------|---------|------------------------------------------------|------|-----------------------------------------------|------|
|                       | PLLA                                       | EVAL    | PLLA                                           | EVAL | PLLA                                          | EVAL |
| $T_f$ (°C)            | 65                                         | 50      | 65                                             | 50   | 62                                            | -    |
| $T_m$ (°C)            | 150                                        | 175,182 | 149                                            | 180  | 145,155,164                                   | 173  |
| $\Delta H_m$ (J/g)    | -13                                        | -44     | -25                                            | -18  | -45                                           | -3   |
| $W_c$ (%)             | 35                                         | 69      | 27                                             | 32   | 48                                            | 3    |
| $T_c$ (°C)            | -                                          | 151     | -                                              | 155  | -                                             | -    |
| $\Delta H_c$ (J/g)    | -                                          | 34      | -                                              | 19   | -                                             | -    |

За да се изолират PLLA фибрили от фибризираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно, получено чрез екструзия е необходимо да се приложат два етапа на селективна екстракция със сместа n-пропанол и вода. След една процедура на екстракция на PLLA фибрилите на термограмата им се регистрират характерните за EVAL фракцията, екзотермичен пик при  $T = 180$  °C (в режим на нагряване) и ендотермичен пик при  $T = 155$  °C

(в режим на охлаждане), представени съответно на фигура 3 А и фигура 3 В. На втория етап на селективна екстракция, с помощта на сокслет включен към терморегулатор за температурен контрол се осъществява максималното извличане на EVAL матрицата и изолиране на PLLA фибрили от фибрилизираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно. Това се доказва от термограмите им в режим на нагряване и охлаждане (фигура 3 А и фигура 3 В), където се регистрират само ендотермични пикове на топене, характерни само за PLLA фибрилите. Този резултат се потвърждава и чрез морфологични изследвания на PLLA фибрили, получени след един и два етапа на селективна екстракция.



**Фигура 3.** DSC термограми на ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно и PLLA фибрили след първи и втори етап на селективна екстракция: (А) в режим на нагряване и (В) в режим на охлаждане, измерени с *Differential Scanning Calorimetry (DSC)\* DSC Q100 - T. A. INSTRUMENTS (USA)* и *Differential Scanning Calorimetry (DSC)\* DSC Q200 - T. A. INSTRUMENTS (USA)*.

### 3.2 Рентгеноструктурен анализ (X-Ray)

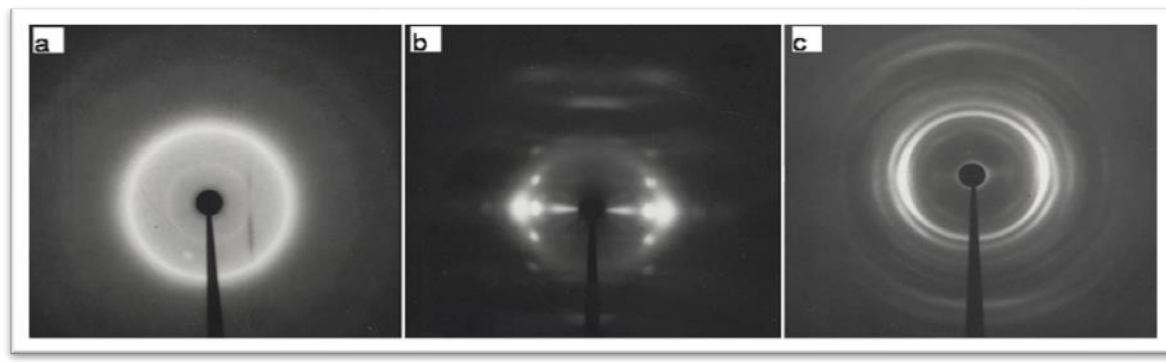
#### 3.2.1 Охарактеризиране на кристалната структура на изходните PLLA хомополимер и EVAL съполимер, получената от тях екструдирана смес, ориентирани PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакна и изолирани PLLA фибрили

След процеса на ориентация на екструдираната полимерна смес, съдържаща PLLA фракция в матрицата от EVAL, процесът на кристализация значително увеличава плътността на зародишите, което води до получаване на прозрачен продукт. За PLLA е установено, че проявява четири кристални структури:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и стерео-комплекс [6]. Орторомбичната  $\alpha$  кристална структура обикновено е най-преобладаващата структура, в която веригите са в лява спираловидна конформация. В литературата от различни изследователски групи са публикувани близки стойности за размерът на кристалната решетка, съответно:  $a = 10.34 - 10.7 \text{ \AA}$ ,  $b = 5.97 - 6.45 \text{ \AA}$ ,  $c = 27.8 - 28.8 \text{ \AA}$  [6, 7].

Когато полимерът PLA е подложен на механично напрежение, веригите му преминават във  $\beta$  кристална орторомбична структура ( $a_\beta = 10.31 \text{ \AA}$ ,  $b_\beta = 6.1 \text{ \AA}$ ,  $c_\beta = 9 \text{ \AA}$ ), която отнесена към по-разгънатата спираловидна  $\alpha$ -конформация ( $a_\alpha = 10.34-10.7 \text{ \AA}$ ,  $b_\alpha = 5.97-6.45 \text{ \AA}$ ,  $c_\alpha = 27.8-28.8 \text{ \AA}$ ), показва промяна в съотношението на параметрите на кристалната решетка  $c_\alpha$  и  $c_\beta$ , както следва  $\frac{c_\alpha}{c_\beta} = \frac{3}{1}$ . Установено е, че при отгряване над температурата на встъпяване  $T_g$ ,  $\beta$  кристалните структури преминават в  $\alpha$  кристали [6]. Триклинен стерео-комплекс се получава само при сместа PLLA:PDLA (1:1) [7]. Хексагоналните  $\gamma$  кристали могат да израстват върху определени субстрати.

Качествени отнасяния в ориентацията и кристалната съвършеност на структурата на компонентите PLLA и EVAL в сместа са регистрирани и представени на WAXS дифрактограми и фотографски плаки (снимки). На фигура 4 са представени WAXS снимки на образци получени от екстудирана смес (фигура 4a), ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно (фигура 4b) и PLLA фибрили (фигура 4c).

От WAXS снимката на екструдата на фигура 4a се регистрират плътни Debye-Scherrer пръстени, което показва, че PLLA и EVAL фракциите в сместа са в изотропно състояние и липсва ориентация. Поради бавната си скорост на кристализация, PLLA компонента в сместа не кристализира по време на охлаждането на екстудата във водната баня, където температурата е около  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Тази надмолекулярна организация се променя напълно след изтеглянето на екстудираната PLLA/EVAL смес и преминаването ѝ през термокамера, където температурата  $T_{\text{камера}}$  се поддържа да бъде в интервала между температурата на встъпяване ( $T_g$ ) и температурата на топене ( $T_m$ ) на двата полимера т.е.  $T_g < T_{\text{камера}} < T_m$ .



**Фигура 4.** WAXS снимки от: (a) екстудирана смес, (b) ориентирано влакно и (c) изолирани PLLA фибрили.

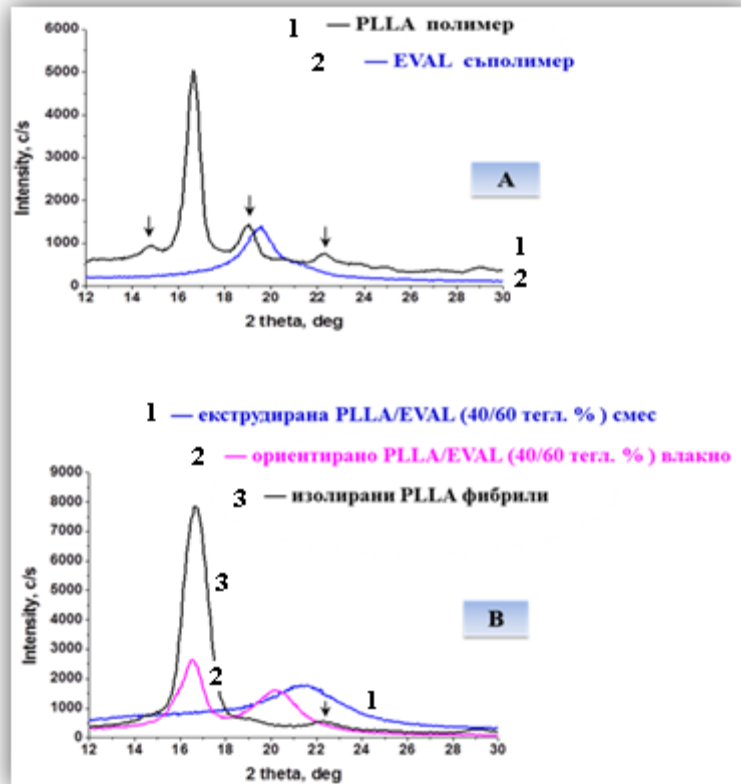
В случая на ориентираното PLLA/EVAL влакно от WAXS снимката на фигура 4b се вижда, че плътните Debye-Scherrer пръстени, наблюдавани в WAXS снимката на екструдиранията смес (фигура 4a) се трансформират и премиват в отличителни за двете фракции дъги. Тези резултати показват една пълна ориентация по екваториалната ос и подреждане на полимерните вериги и кристали по протежение на оста на влакното, т.е. фибрилизация на двата полимера PLLA и EVAL в сместа.

Снимката от WAXS метода на PLLA фибрилите след втората процедура на селективна екстракция са представени на фигура 4c. Характерното за тях е, че се наблюдават само рефлексите дължащи се на PLLA, докато тези на EVAL липсват. Резултатите съответстват на наличието на PLLA фракцията и отстраняването на EVAL матрицата от ориентираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно. Рефлексите от WAXS снимките на изолираните PLLA фибрили показват сливане на характерните за PLLA рефлекси в интензивни дъги, доказващи ориентацията на фибрилите след селективната им екстракция от ориентираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно (навито на метална рамка). Обяснението на тези резултати се дава с промяна на морфологията на изолираните PLLA фибрили, които след изтегляне са ориентирани по оста на изтегляне на влакното и се дезорганизируют след екстракция на фибрилизиранията EVAL фракция. В същото време молекулната организация на фибрилите се запазва. Доказателство за дезорганизация на изолираните фибрили след екстракция на EVAL матрицата е представено на снимката на фигура 4c.

Чрез рентгеноструктурен анализ, Сисего и сътрудници [8] изследват надмолекулната организация на PLLA фибрилите и кристалната им структура. Процесът на механично изтегляне предизвиква ориентация на полимерните вериги, а след това започва и процес на кристализация, където микрофибрилите се подреждат по протежение на оста на фибрилата. За да се предскаже степента на ориентация на влакното и подреждането на микрофибрилите по оста на фибрилата е необходимо да се определи съотношението за скоростта на изтегляне (*the draw ratio:  $DR = \frac{v_2}{v_1} = \frac{8}{1}$* )), така както е описано в главата Материали и методи. Като се увеличава DR, нараства и тенденцията микрофибрилите да се подреждат по оста на фибрилата. Кристалните и аморфните области образуват сандвичоподобни структури (*stacks*) и в междуфибрилните региони са разположени аморфните вериги [8].

На фигура 5 са представени WAXS дифрактограмите получени в екваториално направление на изследваните образци. На дифрактограмата на изходния PLLA хомополимер при  $2\theta$  се регистрират слабо интензивни пикове:  $2\theta = 14.8^\circ$ ,  $2\theta = 19.0^\circ$  и  $2\theta = 22.5^\circ$ , и един интензивен пик при  $2\theta = 16.6^\circ$  (фигура 5 A). Изходният EVAL съполимер има един рефлекс при  $2\theta = 19.5^\circ$ . В дифрактограмата на екструдиранията смес се регистрира един интензивен пик в областта на  $2\theta$  от  $18^\circ$  до  $25^\circ$  (фигура 5 B). Този пик включва и препокрива единичните пикове от PLLA и EVAL компонентите от екструдиранията смес. След процеса на изтегляне, на дифрактограмата за ориентираните влакна при ъгъл  $2\theta$  се регистрират два ясно изразени пика, съответно за  $2\theta = 16.6^\circ$  и  $2\theta = 20.5^\circ$  (фигура 5 B). Това се дължи на кристализацията, индуцирана в процеса на екструзия и изтегляне на екструдиранията смес. Този резултат отлично съответства на структурната организация представена от изображенията на фотографските снимки от рентгеноструктурния анализ (фигура 5 B). Наблюдаваният на дифрактограмата на ориентираното влакно пик при  $2\theta = 16.6^\circ$  е характерен за

фибрилизирания PLLA компонент. Пикът  $2\theta = 20.5^\circ$  е резултат от препокриване на рефлексите при  $2\theta$  на PLLA и EVAL фракциите за сместа, съответно при  $2\theta = 19.0^\circ$  и  $2\theta = 22.5^\circ$  (фигура 5 В).



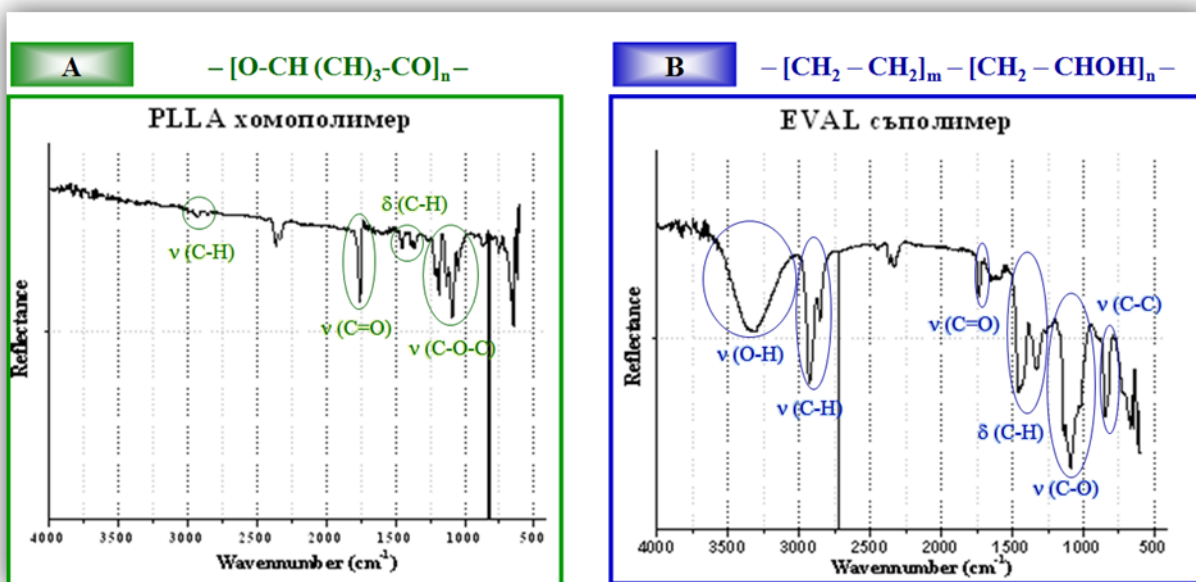
**Фигура 5.** WAXS дифрактограми на: (А) изходните полимери, (В) екструдирана смес, ориентирано влакно и изолирани PLLA фибрили.

От WAXS дифрактограмите на изолираните PLLA фибрили представени на фигура 5 В се регистрират два пика, един слабо интензивен пик при  $2\theta = 22.5^\circ$  и един интензивен при  $2\theta = 16.6^\circ$ . Експерименталните резултати представят косвено доказателство за селективната екстракция на EVAL компонента от ориентираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно. След селективната екстракция на EVAL фракцията от влакното, проведена при температура  $T = 85^\circ\text{C}$ , допълнително се постига кристализация на PLLA фибрилите, като показател за това е увеличеният, в дифрактограмата на PLLA фибрилите, интензитет на пика при  $2\theta = 16.6^\circ$  (фигура 5 В). Подобен резултат е докладван в литературата от Zhang и сътрудници [9] за две различни температури на отгряване на образци от PLLA при  $T = 80^\circ\text{C}$  и  $T = 140^\circ\text{C}$ . Наблюдавани са два силно интензивни пика, съответно при  $2\theta = 16.7^\circ$  и  $2\theta = 19.1^\circ$  и един слабо интензивен пик при  $2\theta = 22.3^\circ$  за PLLA образците. Тези резултати се интерпретират с появата на  $\alpha$  кристална структура. Подобни пикове се наблюдават в дифрактограмата, представена на фигура 5 В, която е регистрирана след отгряването на PLLA фибрилите при температура  $T = 85^\circ\text{C}$ . Тези пикове са съответно: интензивен пик при  $2\theta = 16.6^\circ$  и слабо интензивен пик при  $2\theta = 18.7^\circ$ , които се отнасят за (200) и (203) равнините регистрирани във фотографските снимки на фигура 4с. Наблюдава се и едни слабо интензивен пик при  $2\theta = 22.5^\circ$ .

### 3.3 Инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (FTIR-AIR)

#### 3.3.1 Структурно охарактеризиране на образци от изходните PLLA хомополимер, EVAL съполимер и PLLA фибрили след един етап на селективна екстракция от ориентираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно

На фигура 6 А е представен FTIR спектър на PLLA, в който са регистрирани характеричните валентни трептения за хомополимера. Интензивните ивици за асиметричното валентно **C-O-C** трептене при  $\nu^{as} = 1150 - 1050 \text{ cm}^{-1}$  и валентното **C=O** трептене при  $\nu = 1750 - 1760 \text{ cm}^{-1}$  са характерични ивици за естери във вибрационните спектри. Характеристична ивица на PLLA хомополимера е и валентното **C-O** трептене при  $\nu = 1120 - 1080 \text{ cm}^{-1}$ . На инфрачервения спектър са регистрирани слабо интензивните ивици на симетричните и асиметричните валентни трептения за **C-H** връзките ( $sp^3$ -хибриден С атом в  $\text{CH}_3$  метиловата група) при около  $\nu^s = 2870 \text{ cm}^{-1}$  и  $\nu^{as} = 2960 \text{ cm}^{-1}$ . Ножичните симетрични и асиметрични деформационни трептения за **C-H** връзките в метиловата група се проявяват като средно интензивни ивици при около  $\delta^s = 1380 \text{ cm}^{-1}$  и  $\delta^{as} = 1460 \text{ cm}^{-1}$ .



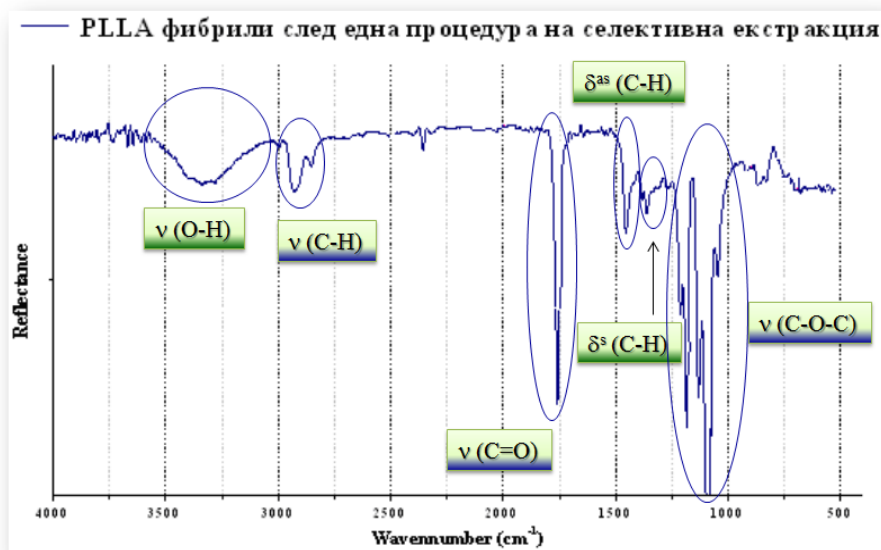
**Фигура 6.** Инфрачервени спектри на: (А) PLLA хомополимер и (В) EVAL съполимер, получени от **Fourier Transform Infrared (FTIR-ATR) spectrometer 3200 – BOSE**.

На фигура 6 В е представен FTIR спектър на EVAL, в който са регистрирани характеричните валентни трептения за съполимера. Широката ивица при  $\nu = 3580 - 3200 \text{ cm}^{-1}$  се отнася за **O-H** групите във винилалкохолните звена на EVAL. На инфрачервения спектър са регистрирани силно интензивните ивици на симетричните и асиметричните валентни трептения за **C-H** връзките ( $sp^2$ -хибриден С атом в  $\text{CH}_2$  метиленовата група) при около  $\nu^s = 2850 \text{ cm}^{-1}$  и  $\nu^{as} = 2925 \text{ cm}^{-1}$ . Деформационните трептения за **C-H** връзките в метиленовата група се проявяват като ивица в спектралния участък  $\delta = 1470 - 1350 \text{ cm}^{-1}$ . Ивицата при  $\nu = 1200 \text{ cm}^{-1}$  се отнася за валентните трептения на връзките **C-C** в полимерната верига. Характеристична ивица на EVAL е **C-O** при  $\nu = 1120 - 1080 \text{ cm}^{-1}$ , която качествено



доказва наличието на винилалкохолните звена в съполимера. Абсорбционна ивица се наблюдава и при  $\nu = 1750 \text{ cm}^{-1}$ , дължаща се на наличие на трептения от карбонилната група за изходния мономер винилацетат (VA), т.е. тази ивица се регистрира при частично хидролизиран поливинилалкохол (PVA). Ивиците при  $820 - 850 \text{ cm}^{-1}$  са характерни за алкилната полимерна верига.

Необходимостта от два етапа на селективна екстракция, при втория от който екстракцията протича в соклет с температурен контрол и промиване на фибрилите с n-пропанол, е доказана термично и структурно. Този резултат се потвърждава и от FTIR спектъра на получените фибрили при едноетапна екстракция, представен на фигура 7. На спектъра се регистрира характеристична ивица за **О-Н** валентно трептене при  $\nu = 3580 - 3200 \text{ cm}^{-1}$  и ивиците на симетричните и асиметричните валентни **С-Н** трептения за  $\text{CH}_2$  групата при около  $\nu^s = 2850 \text{ cm}^{-1}$  и  $\nu^{as} = 2925 \text{ cm}^{-1}$ .

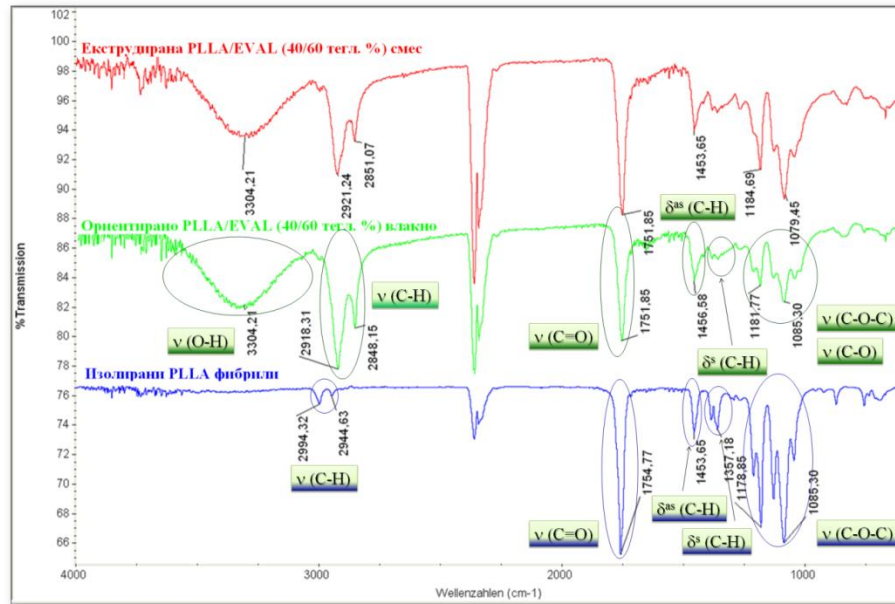


**Фигура 7.** Инфрачервен спектър на PLLA фибрили след един етап на селективна екстракция, получен от **Fourier Transform Infrared (FTIR-ATR) spectrometer 3200 – BOSE**.

### 3.3.2 Структурно охарактеризиране на образци от екструдирана PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) смес, ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно и изолирани PLLA фибрили след два етапа на селективна екстракция

Пряко доказателство за отстраняването на EVAL фракцията от ориентираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно след два етапа на селективна екстракция е представено с FTIR-ATR спектъра на фигура 8. От отнасянето на инфрачервените спектри на екструдата и на ориентираното влакно след изтегляне, ясно се вижда, че няма разлика в химичните им структури, т.е. процесите на екструзия и изтегляне не модифицират химически PLLA/EVAL сместа. От спектъртът на изолираните PLLA фибрили, след селективната екстракция в два етапа на EVAL матрицата се регистрират характеристичните валентни и деформационни трептения характерни за структурата на PLLA - поява на слабо интензивните ивици на симетричните и асиметричните валентни трептения за **С-Н** връзките ( $\text{sp}^3$ -хибриден С атом

CH<sub>3</sub> метиловата група) при около  $\nu^s = 2870 \text{ cm}^{-1}$  и  $\nu^{as} = 2960 \text{ cm}^{-1}$ ; валентното C=O трептене при  $\nu = 1750 - 1760 \text{ cm}^{-1}$ . Наблюдава се също така увеличаване на интензитета на ивиците за асиметричното валентно C-O-C трептене при  $\nu^{as} = 1150 - 1050 \text{ cm}^{-1}$  за сметка на характеристикната ивица на EVAL за C-O при  $\nu = 1120 - 1080 \text{ cm}^{-1}$ . Регистрира се и затихване на деформационните C-H трептения в спектралния участък  $\delta = 1470 - 1350 \text{ cm}^{-1}$  за CH<sub>2</sub> групата на EVAL съполимера, за сметка на увеличения интензитет на ножичните симетрични и асиметрични деформационни C-H трептения в спектралния участък  $\delta^s = 1380 \text{ cm}^{-1}$  и  $\delta^{as} = 1460 \text{ cm}^{-1}$  за CH<sub>3</sub> групата в PLLA фибрилите (фигура 8).



**Фигура 8.** Инфрочервени спектри на: екструдирана PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) смес; ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно и изолирани PLLA фибрили след два етапа на селективна екстракция, получени от **Fourier Transform InfraRed (FTIR) spectrometer Nicolet 510 Instrument USA**.

В спектъра на PLLA фибрилите не се регистрира характерната ивица за O-H валентно трептене при  $\nu = 3580 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ . Този резултат потвърждава получените резултати от термичното и рентгеноструктурното охарактеризиране на изолираните PLLA фибрили от ориентираното PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно.

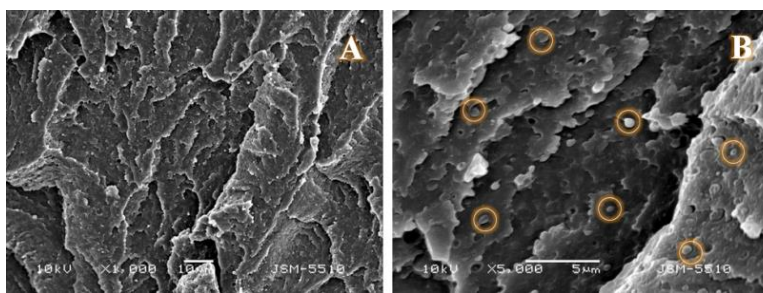
### 3.4 Сканираща електронна микроскопия (SEM)

#### 3.4.1 Морфологично охарактеризиране на образци от: екструдирана PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) смес, ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно, PLLA фибрили след два етапа на селективна екстракция, PLLA подложки след биоминерализация и хибридни PLLA/Chitosan (50/50 тегл. %) подложки

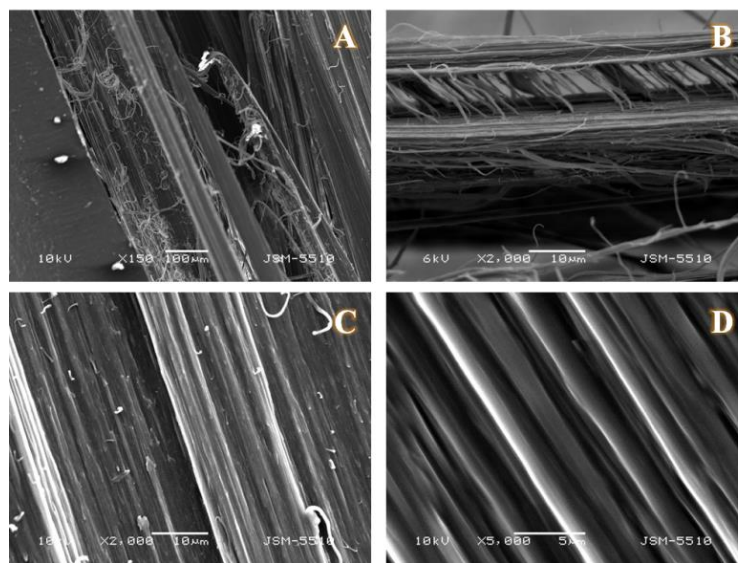
От WAXS метода се получава информация за кристалната структура и ориентация на макромолекулите в полимерните вериги, методът FTIR-ATR позволява структурно охарактеризиране на химичните групи в полимерите, а DSC методът дава термодинамичните

характеристики на полимерните материали. За изследване на морфологичните характеристики на материалите, в процесите на тяхното получаване и модифициране, се прилага SEM методът, който позволява микроскопски наблюдения на изследваните обекти в микро- и нанометричните скали.

На фигура 9 и 10 са представени SEM снимки съответно на екструдирана PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) смес и ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно. Подготовката на образците за SEM наблюдението е осъществено при счупване на проби от екструдата и ориентираното влакно в среда от течен  $N_2$ . От SEM снимките на двете фигури, ясно се виждат две несмесваеми фазови системи. На фигура 9 в матрицата от EVAL се наблюдават хомогенно диспергирани частици от полимера PLLA (част от тях са оградени с кръгчета на фигура 9 В). Размерът на частиците е в областта на  $0.5 \div 1.6 \mu m$ . Сферични частици от PLLA могат да попаднат на повърхността на отчупената страна, тъй като те са крехки при температури под тяхната температура на встъкляване -  $T_g$  (фигури 9 А и 9 В).



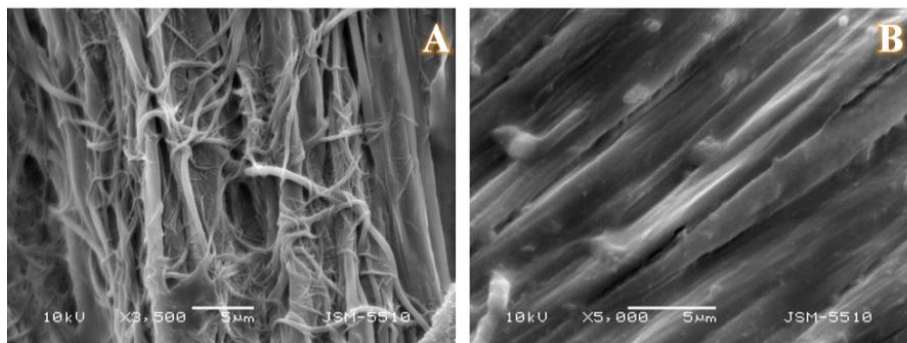
**Фигура 9.** SEM снимки, наблюдавани със *SEM JEOL JSM-5510* на екструдирана PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) смес: (А)-(В) с различни увеличения, съответно -  $\times 1000$  и  $\times 5000$ .



**Фигура 10.** SEM снимки, наблюдавани със *SEM JEOL JSM-5510* на ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно: (А)-(D) с различни увеличения, съответно -  $\times 150$ ,  $\times 2000$ ,  $\times 2000$  и  $\times 5000$ .

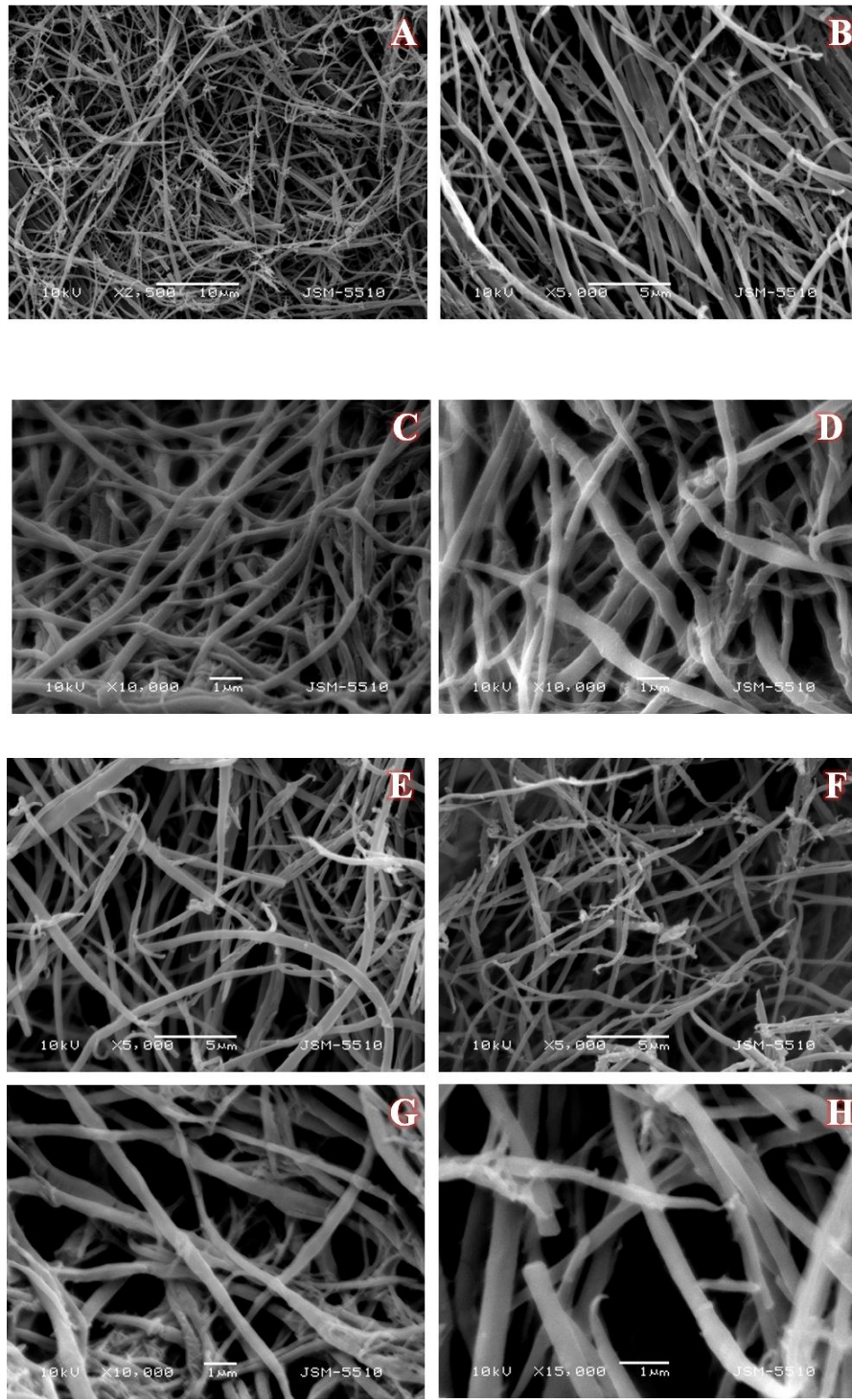
След изтегляне и ориентация на PLLA и EVAL фракциите, те се трансформират във фибрилизирани компоненти на влакното. Аналогично, както при подготовката на образците за SEM наблюдение при екструдата, образците от фибрилизираното влакно са счупени в

среда от течен  $N_2$ . При пробоподготовката на образците, фибрилите се разцепват по протежение на посоката на ориентация на влакното. На фигура 10 А и 10 В са представени SEM снимки на ориентирано влакно с различно увеличение, илюстриращи морфологичната организация на фибрилите от двете PLLA и EVAL фракции в ориентираното влакно.



**Фигура 11.** SEM снимки, наблюдавани със *SEM JEOL JSM-5510* на частично изолирани PLLA фибрили, получени при ецване на ориентирано PLLA/EVAL (40/60 тегл. %) влакно: (А)-(В) с различни увеличения, съответно -  $\times 3500$  и  $\times 5000$ .

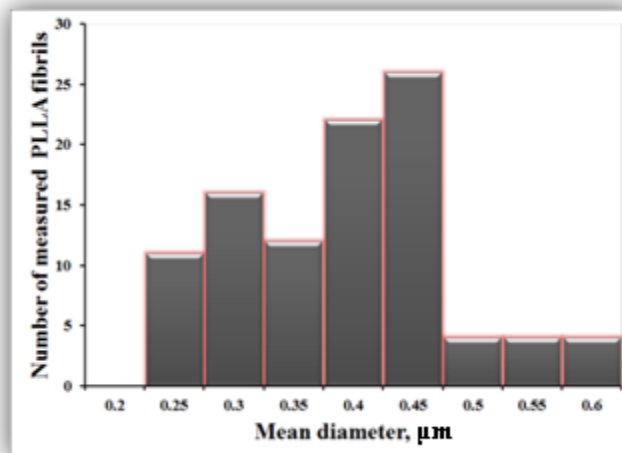
SEM снимките на фигура 11 дават информация за размера и съотношението на дължината към дебелината на PLLA фибрилите, намиращи се в изтегленото влакно. Тези образци са получени при частично разтваряне (ецване) на EVAL фракцията от ориентираното влакно. Ако се дефинира параметър  $AR = \frac{l}{d}$ , (*Aspect Ratio*) като съотношение на дължина  $l$ , на фибрилите към диаметъра  $d$ , то при анализ на SEM снимките, на PLLA фибрилите се установява, че  $AR = 30 \div 50$ . Точната стойност на  $AR$ , не може да бъде установена, поради това, че не може да се измери от SEM снимките цялата дължина на индивидуалните фибрилите. При опит да направим хипотетична оценка за стойността на  $AR$ , допускайки, че изтеглените фибрили не се късат по време на процедурата за селективна екстракция (или ецване) и приемайки като приблизителна дължина за индивидуалните фибрили стойност, която съвпада с дължината на получения образец (52 mm, съответстващи на дължината на металната рамката, около която е навито ориентираното влакно) и приблизителната средна стойност за диаметъра на фибрилите, определена от SEM снимката на фигура 11, която е около  $0.5 \mu m$ , следователно за приблизителната стойност на  $AR = \frac{l}{d} = \frac{52 \times 10^3}{0.5} \approx 10^4$ . Тази стойност е твърде висока и в границите за  $AR$  на многостенни въглеродни нанотръбички [10]. Следователно можем да приемем, че  $AR$  за PLLA фибрилите е в границите  $30 < AR < 10^4$ .



**Фигура 12.** SEM снимки, наблюдавани със *SEM JEOL JSM-5510* на изолирани PLLA фибрили, получени след два етапа на селективна екстракция: (A)-(B) PLLA фибрили преди лиофилизация; (C)-(D) повърхност на подложка от PLLA фибрили след лиофилизация; (E)-(H) напречно сечение на подложка от PLLA фибрили след лиофилизация. Снимките (A)-(H) имат различни увеличения, съответно -  $\times 2500$ ,  $\times 5000$ ,  $\times 10000$ ,  $\times 10000$ ,  $\times 5000$ ,  $\times 5000$ ,  $\times 10000$  и  $\times 15000$ .

Получените PLLA фибрили след два етапа на селективна екстракция са с диаметри в нано- и метричната скала, и са с малка стойност на AR (фигура 12).

Диаметърът и дължината на фибрилите зависят от количеството и размера на свързаните сферични PLLA частици при изтеглянето на екструдата. Измерените диаметри на изолираните PLLA фибрили на SEM снимките от фигура 12 E и 12 F са представени на хистограмата на фигура 13.



**Фигура 13.** Хистограма за разпределение на средния диаметър на фибрилите, измерени от SEM снимките на фигура 12 E и 12 F.

От разпределението, се определя стойността на средния диаметър на PLLA фибрилите,  $d_{\text{PLLA fibrils}} = 0.45 \mu\text{m}$ . Следователно приблизителната стойност на

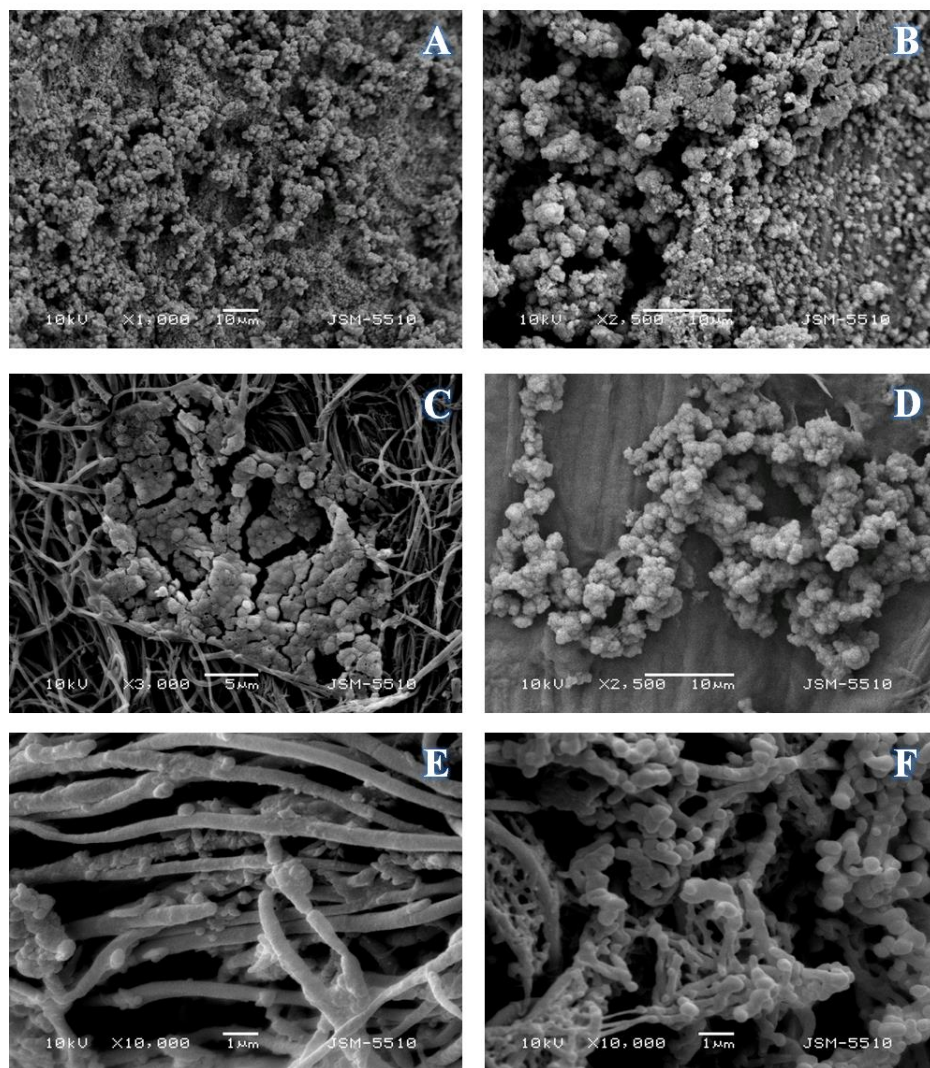
$$AR = \frac{l}{d} = \frac{5.2 \times 10^5}{0.45} \approx 1.16 \times 10^4 .$$

Качеството на подложките за приложение като костни импланти, получени по метода на селективна екстракция и лиофилизация на PLLA фибрилите, зависи от триизмерната пореста структура и морфологията на повърхността на изолираните PLLA фибрили. На фигура 12 са представени SEM снимки с различно увеличение на изолирани PLLA фибрили (фигура 12 A и 12 B) и получените от тях чрез лиофилизация подложки (фигура 12 C и 12 F).

От микроскопските снимки, направени за повърхността и напречното сечение на образци на подложки от PLLA фибрили след лиофилизация се установява, че подложките са изградени от фибрили, които формират на повърхността и във вътрешността триизмерна мрежеста структура. Анализът на SEM снимките преди и след лиофилизация показва, че има разлика в организацията на мрежестата фибрилна структура. Формират се свободни пространства в преплитащите се фибрили, като размерът на порите варира съответно: (i) 1.1  $\mu\text{m}$  за мрежестата структура преди лиофилизация, (ii) 1.5  $\mu\text{m}$  за мрежестата структура на повърхността на подложката след лиофилизация, (iii) 1.7  $\mu\text{m}$  за мрежестата структура във вътрешността на подложката след лиофилизация.

За да се анализират osteoconductive характеристики на PLLA подложките и да се оцени потенциала им за приложения в костното тъканно инженерство е проведен *in vitro* тест в условия на симулирана тъканна течност. На фигура 14 са представени SEM снимки на повърхността и напречно сечение на PLLA подложки, биоминерализирани за период от 30 дни. Фигура 14 (A), (B) и (D) съответстват на степента на биоминерализация на повърхността, а фигура 14 (C), (E), (F) на напречно сечение на подложката.

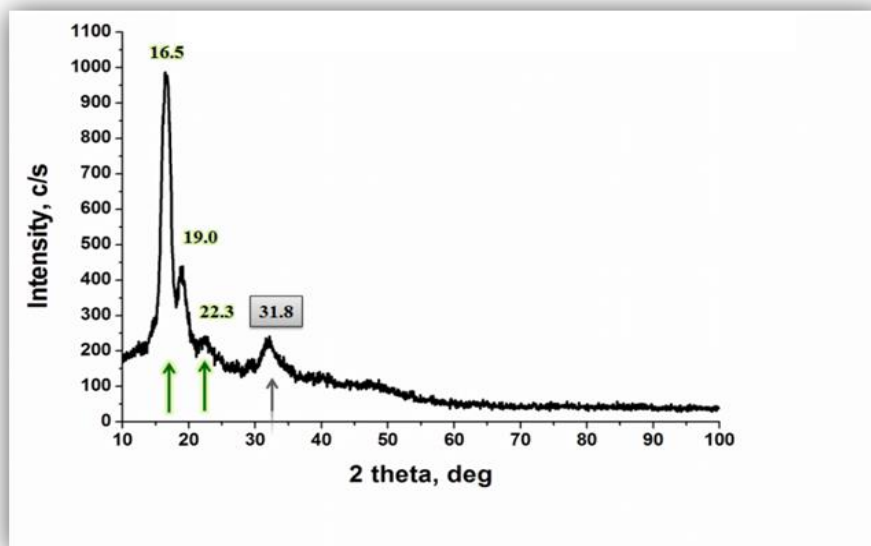
След престоя на подложките в SBF се наблюдава формиране на апатитни кълстери на повърхността и във вътрешността на подложката. Омрежената от фибрили подложка спомага за индуцирането на костно-подобна апатитна структура, за което има и данни в литературата [11, 12]. Вижда се, че на повърхността на подложката се формира апатитно покритие по цялата повърхност. Във вътрешността на PLLA подложката се наблюдава зародишообразуване на апатитни кълстери по повърхността на индивидуалните фибрили и на местата във вътрешността, където фибрилната мрежа е по-плътна, тези кълстери формират апатитни агломерати.



**Фигура 14.** SEM снимки, наблюдавани със *SEM JEOL JSM-5510* на биоминерализирана PLLA подложка: (A), (B), (D) различни участъци от повърхността и (C), (E), (F) напречно сечение на подложката. Снимките: (A), (B), (D) имат увеличения, съответно -  $\times 1000$ ,  $\times 2500$ ,  $\times 2500$ , а (C), (E), (F) съответно -  $\times 3000$ ,  $\times 10000$  и  $\times 10000$ .

Резултатите от SEM анализа се потвърждават и от Рентгеноструктурния анализ (WAXS). На фигура 15 е показана дифрактограма на PLLA подложка, биоминерализирана за период от 30 дни. На дифрактограмата се наблюдават характеричните пикове за семикристалния PLLA полимер при  $2\theta = 16.5^\circ$ ;  $19.0^\circ$  и  $22.3^\circ$  и появата на характеричен

пик за апатитната кристална структура при  $2\theta = 31.8^\circ$ . Морфологията и структурата на биоминерализираните PLLA подложки, потвърждават способността за индуциране на хидроксиапатитни костноподобни наслоявания и разкрива потенциала на тези подложки за приложения като костни заместители.

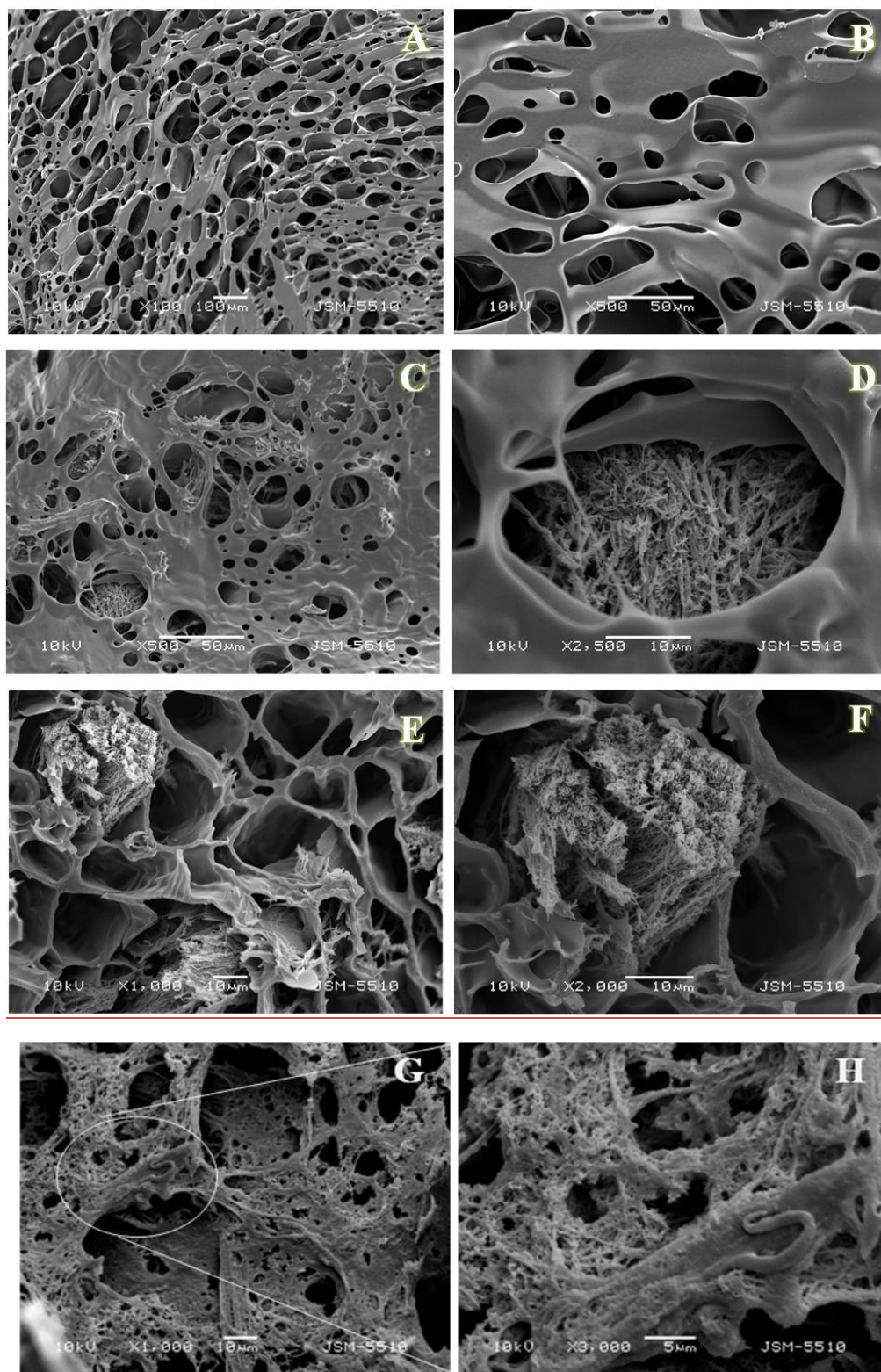


**Фигура 15.** WAXS дифрактограма на PLLA подложка, след биоминерализация за период от 30 дни в симулирана тъканна течност (SBF).

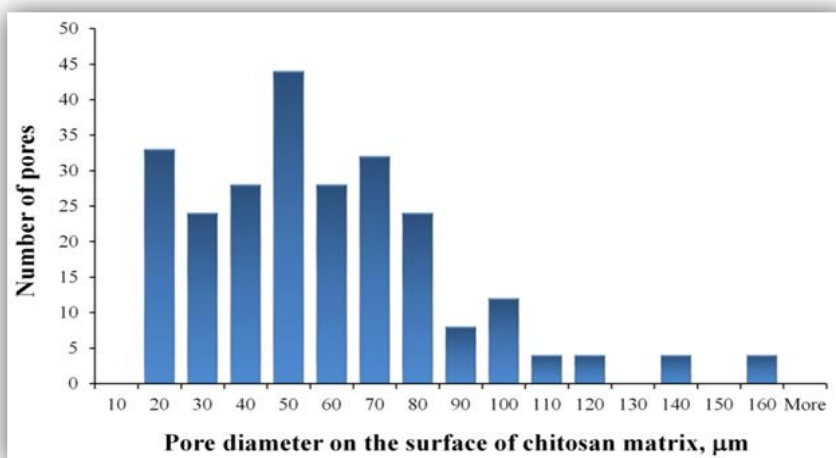
От изолираните PLLA фибрили са получени хибридни PLLA/Chitosan (50/50 тегл. %) подложки и са охарактеризирани със Сканиращ електронен микроскоп (SEM). На фигура 16 са представени SEM снимки на лиофилизирана хитозанова матрица (фигура 16 А и 16 В), повърхност (фигура 16 С и 16 D) и напречно сечение (фигура 16 Е, 16 F, 16 G и 16 Н) на хибридният PLLA/Chitosan (50/50 тегл. %) композит.

От SEM снимките на хитозановата матрица се вижда оформената мрежа от пори, получени при процеса на лиофилизация на хитозановия разтвор в лиофилизатор (*FTSTM Systems Inc., USA*). Статистическият анализ за размера на порите в хитозановата матрица е направен от SEM снимки и е представен на хистограмата на фигура 17.





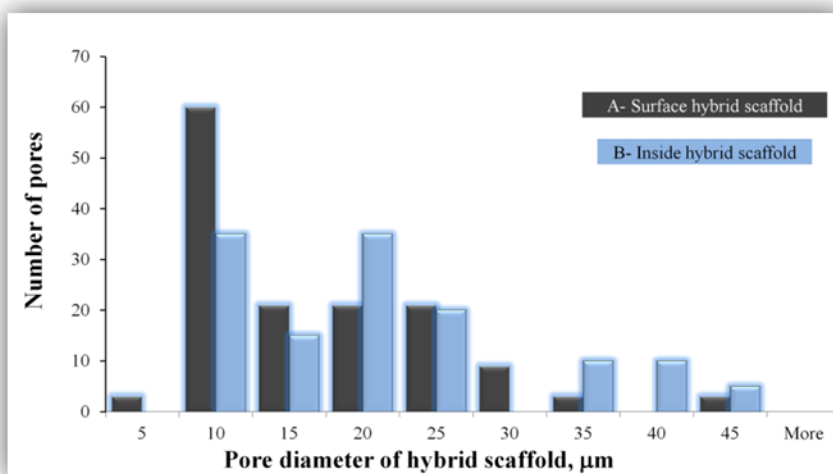
**Фигура 16.** SEM снимки, наблюдавани със *SEM JEOL JSM-5510* на повърхност на хитозанова матрица (A), (B); на хибридна PLLA/Chitosan (50/50 тегл. %) подложка: (C), (D) повърхност и (E), (F) (G), (H) напречно сечение. Снимките (A)-(H) имат различни увеличения, съответно -  $\times 100$ ,  $\times 500$ ,  $\times 500$ ,  $\times 2500$ ,  $\times 1000$ ,  $\times 2000$ ,  $\times 1000$ ,  $\times 3000$ .



**Фигура 17.** Хистограма за разпределение на порите по размер в хитозановата матрица, получена след процес на лиофилизация.

От хистограмата за разпределението на порите по размер на повърхността на хитозановата матрица се вижда, че средният им размер е около 50 µm. Преобладаващи са порите с по-малки размери до 80 µm, а процентът на порите с размери по-големи от 100 µm е сравнително малък.

От SEM снимките на хибридната PLLA/Chitosan (50/50 тегл. %) подложка се вижда, че в оформената мрежа от хитозанови пори са включени PLLA фибрилни снопове (фигура 16 C ÷ 16 F) или равномерно разпределени фибрили в хитозановата матрица (фигура 16 G ÷ 16 H).



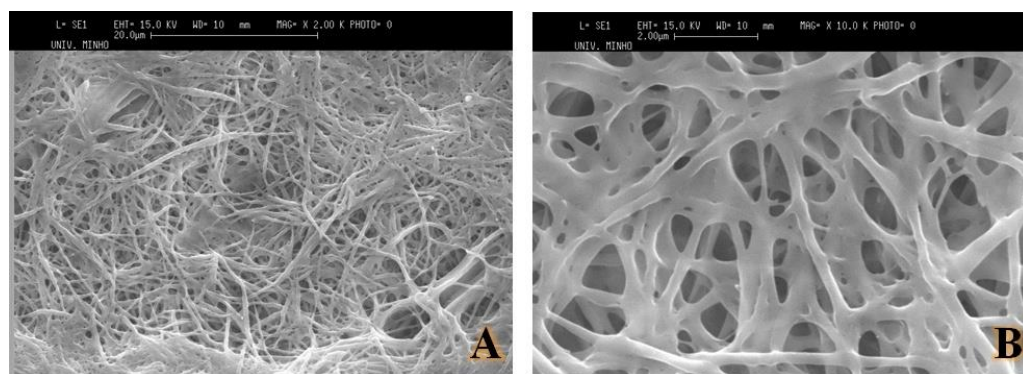
**Фигура 18.** Хистограми за разпределение на порите по размер: (A) на повърхността и (B) във вътрешността на хибридната PLLA/Chitosan (50/50 тегл. %) подложка.

От хистограмите за разпределението на порите по размер на повърхността и във вътрешността на хибридната подложка се вижда, че средният им размер е около 20 µm (фигура 18). Този размер е 2.5 пъти по-малък в сравнение със средния размер на порите в хитозановата матрица. Това може да се обясни с включване в матрицата от хитозан на PLLA

фибрили, които играят ролята на усилваща структура. От SEM снимките (фигура 16 С ÷ 16 F) се наблюдават и снопове от PLLA фибрили в кухините на по-големите пори (~40 µm) на хитозановата матрица. От двете хистограми се вижда, че процентът на тези пори не е висок. За сметка на това, броят на малките пори с размер около 10 µm в хибридна матрица, е значително по-висок, което също би могло да се обясни с усилващия ефект на включените в матрицата PLLA фибрили.

### 3.4.2 Морфологично охарактеризиране на PLLA фибрили след един етап на селективна екстракция

На фигура 19 са представени SEM снимки на PLLA фибрили, получени след един етап на селективна екстракция и лиофилизация. Вижда се, че EVAL фракцията не е отстранена напълно. Доказателство за това е наличието на ципести структури свързващи отделните фибрили във фибрилната мрежеста структура. Тези морфологични наблюдения са в съгласие с резултатите получени от структурния и химичен анализ (FTIR-ATR) и от термичния анализ (DSC).



**Фигура 19.** SEM снимки, наблюдавани със *SEM JFC 1000, JEOL* на PLLA фибрили, получени след един етап на селективна екстракция и лиофилизация: (A) на повърхност и (B) напречно сечение. Снимките (A) и (B) имат увеличения, съответно –  $\times 2000$ ,  $\times 10000$ .

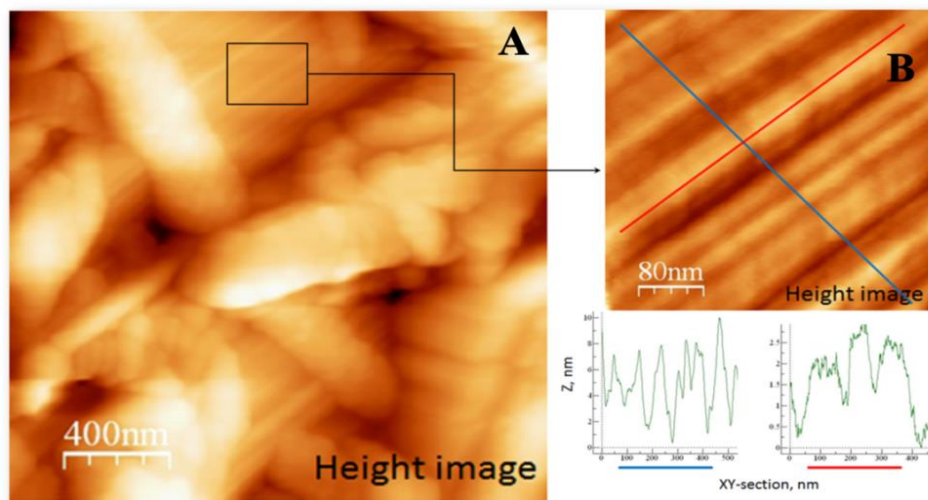
## 3.5 Атомно-силова микроскопия (AFM)

### 3.5.1 Изследване на надмолекулната организация на изолираните PLLA фибрили с Атомно Силов Микроскоп (AFM)

Атомно-силовата микроскопия (AFM) е визуализиращ метод, който позволява да се характеризира топографията и структурната организация на PLLA фибрилите на нанониво. В това отношение методът се явява допълващ на SEM, тъй като разделителната му способност е с един порядък по-висока.

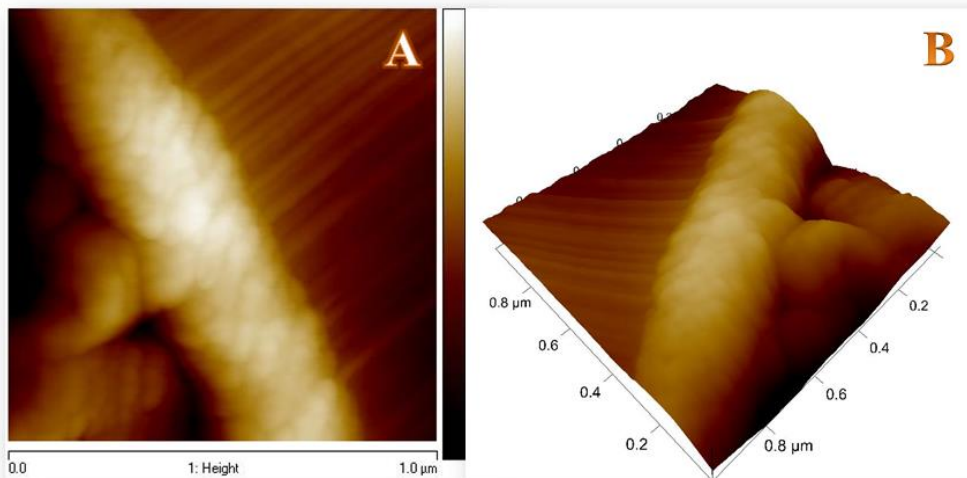
На фигура 20 са представени AFM снимки на топографията на PLLA фибрили в различен мащаб. Снимките показват фината структура на индивидуалните PLLA фибрили

(примера на фигура 20 В), т.е тяхната надмолекулярна организация. От напречния разрез на индивидуалните нановибрилли се вижда, че тяхната дебелина е около 8 nm. От надлъжния разрез се констатира, че индивидуалните нановибрилли имат периодична наноструктура от отделни сегменти с дължина между 100 и 150 nm.



**Фигура 20.** AFM 2D- снимки на топографията на PLLA фибрили в различен мащаб – (А)  $2 \times 2 \mu\text{m}$  и (В)  $0.4 \times 0.4 \mu\text{m}$ . Представени са две сечения в две перпендикулярни направления на повърхността на индивидуална PLLA фибрила.

На фигура 21 са представени AFM снимки в 2D и 3D формат на топографията на индивидуална PLLA фибрила. Снимките отново потвърждават фината структура на нанониво на сканираната с AFM, PLLA фибрила. От AFM снимката ясно се вижда, че дебелината на измерената фибрила е 300 nm.

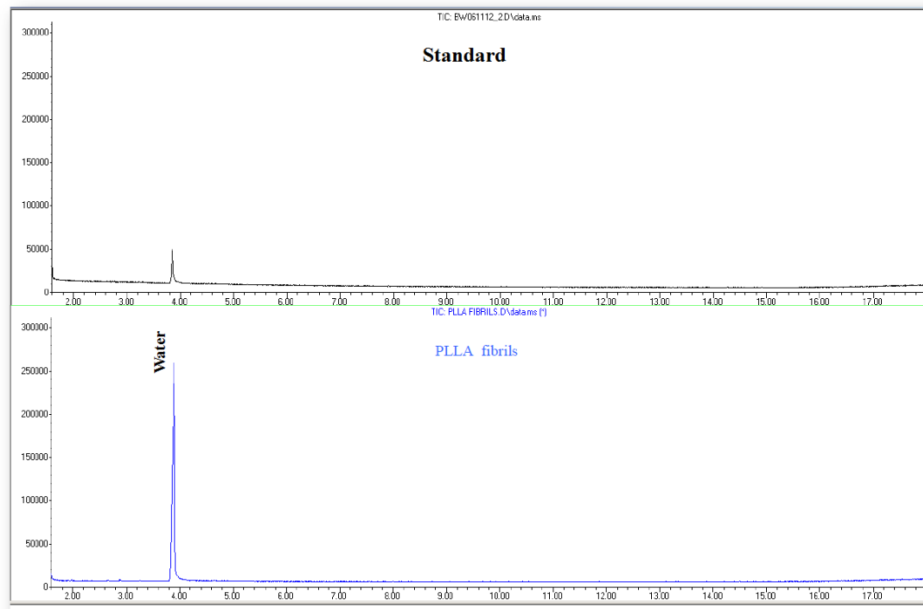


**Фигура 21.** AFM снимки на топографията на индивидуална PLLA фибрила в (А) 2D и (В) 3D формат. Сканираната площ е  $1 \times 1 \mu\text{m}$ .

### 3.6 Газова хроматография с мас-селективен детектор (*Gas Chromatograph/Mass selective Detector*)

#### 3.6.1 Експериментално определяне на следи от разтворител в PLLA фибрили с газов хроматограф снабден с мас-селективен детектор

На фигура 22 са представени хроматограмите на стандартна проба и проба от PLLA фибрилите. На абсцисата се отчита времето на задържане на анализа, а на ординатата - интензитетът на сигнала от детектора, в случая на маспектрометъра.



**Фигура 22.** Хроматограми на стандарт и образец от PLLA фибрили, изследвани чрез газов хроматограф снабден с мас-селективен детектор - **Gas Chromatograph GC (6890)/Mass selective Detector MSD (5973)**.

Първият спектър в хроматограмата, показва времето на задържане на водата в стандарт, докато втората хроматограма представя изследваните PLLA фибрили. От съпоставянето на двете хроматограми се вижда, че при фибрилите единствено се регистрира характерен пик на водата и липсва пика за използваният разтворител *n-propanol* при  $t = 4.9$  min (фигура 22) при провеждане на анализ **GC - MSD** с колоната тип **DB-WAX (polar)**.

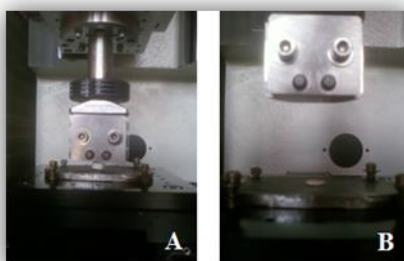
### 3.7 Универсален механичен тест (*UMT-2M*)

#### 3.7.1 Изследване на механичните отношения на подложки от изолирани PLLA фибрили

Проведени са механични изследвания при натиск на подложки от изолирани PLLA фибрили. Физическите характеристики на три примерни образци, които са изследвани на механичен натиск с апарат **UMT-2M (CETR-Bruker)**, са представени в таблица 3.

**Таблица 3.** Размери на подложките и максималната измерена сила.

| № | Означение                  | Височина, mm | Диаметър, mm | Маса, g | Максимална сила, N |
|---|----------------------------|--------------|--------------|---------|--------------------|
| 1 | Подложка от PLLA фибрили-1 | 3.50         | 8.00         | 0.02456 | 43                 |
| 2 | Подложка от PLLA фибрили-2 | 3.56         | 6.76         | 0.02700 | 83                 |
| 3 | Подложка от PLLA фибрили-3 | 2.92         | 8.02         | 0.01630 | 59                 |

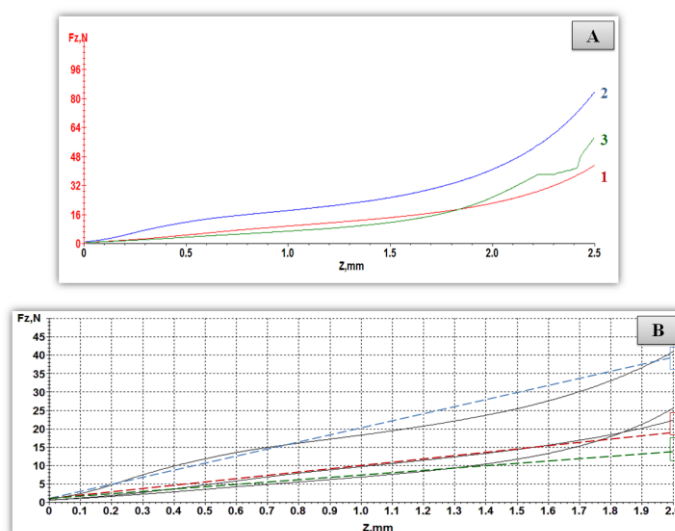


**Фигура 23.** Схема на опитната постановка на механичен натиск на образец от PLLA подложка, (A) преди натиск и (B) след натиск на образца с апарат UMT-2M (CETR-Bruker).

На фигура 23 А и 23 В е представена опитната постановка, преди и след натиск на подложка от PLLA фибрили при деформация 80 %. Представени са механичните криви на трите образца на графика, даваща силата на натиск като функция на деформацията (фигура 30). По закона на Хук,

$$\Delta F = -k\Delta z \quad (3.7 \text{ a})$$

може да се определи коефициента на еластичност  $-k$  на PLLA подложките. Във формула 3.7 а,  $\Delta F$  е приложената сила върху образца измерена в  $N$ , а  $\Delta z$  е деформацията измерана в  $mm$ .



**Фигура 24.** Зависимост от силата на натиск ( $F_z$ ) спрямо деформацията ( $Z$ ) (в различни скали (A) и (B)) за трите изследвани подложки от PLLA фибрили.

Получените експериментални криви са апроксимирани в линейните участъци в зоните, за които закона на Хук се спазва, т.е. има линейно отнасяне между силата и деформацията. Получените резултати дават стойности за константите на еластичност на изследваните образци:  $k_1 = 9.1 \times 10^3 \text{ N/m}$ ,  $k_2 = 19.5 \times 10^3 \text{ N/m}$  и  $k_3 = 7.2 \times 10^3 \text{ N/m}$ , т.е. средната стойност на константа на еластичност е около  $k_{cp.} = 11.9 \times 10^3 \text{ N/m}$ .

### 3.8 *In vitro* изследвания

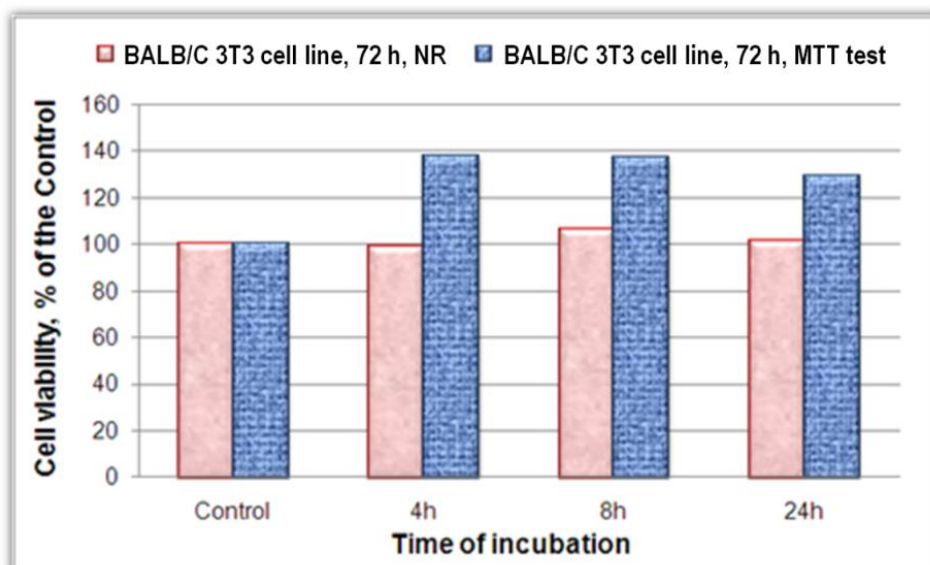
#### 3.8.3. Методи за изследване на клетъчната преживяемост и пролиферативна активност на PLLA фибрили и хитозанова матрица чрез прилагане на цитотоксични тестове с различни клетъчни мишени и механизми на действие

При проведените *in vitro* експерименти е изследвано влиянието на PLLA фибрилите върху преживяемостта и пролиферативната активност на култивирани в лабораторни условия клетки от линия BALB/C 3T3 (миши фибробласти). Изследването *in vitro* е проведено след 72-часово въздействие върху клетките чрез едновременно прилагане при еднакви условия на два различни цитотоксични метода – МТТ и NR. Сравнено е и влиянието на среди, инкубирани в продължение на различен период от време – (А) 4, (Б) 8, и (В) 24 часа, в присъствие на PLLA фибрили. Получените резултати са обобщени в таблица 4 и фигура 25.

**Таблица 4.** Влияние на PLLA фибрилите върху *преживяемостта и пролиферативната активност* на клетки от линия BALB/C 3T3.

|                         | Клетъчна линия BALB/C 3T3 |                        |                         |                        |                        |                         |
|-------------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
|                         | MTT test, 72h             |                        |                         | NR, 72h                |                        |                         |
|                         | 4h<br><i>инкубация</i>    | 8h<br><i>инкубация</i> | 24h<br><i>инкубация</i> | 4h<br><i>инкубация</i> | 8h<br><i>инкубация</i> | 24h<br><i>инкубация</i> |
| <b>PLLA<br/>фибрили</b> | 137.94<br>+/- 3.73        | 136.91<br>+/- 6.38     | 128.98<br>+/- 7.07      | 98.62<br>+/-4.27       | 106.01<br>+/- 4.62     | 101.54<br>+/- 4.98      |

Клетъчната преживяемост/пролиферативна активност е определена чрез МТТ тест (МТТ) и метода за включване на неутрално червено (NR). Представен е процентът на живите клетки спрямо контролната проба, за която преживяемостта на клетките е приета за 100%.

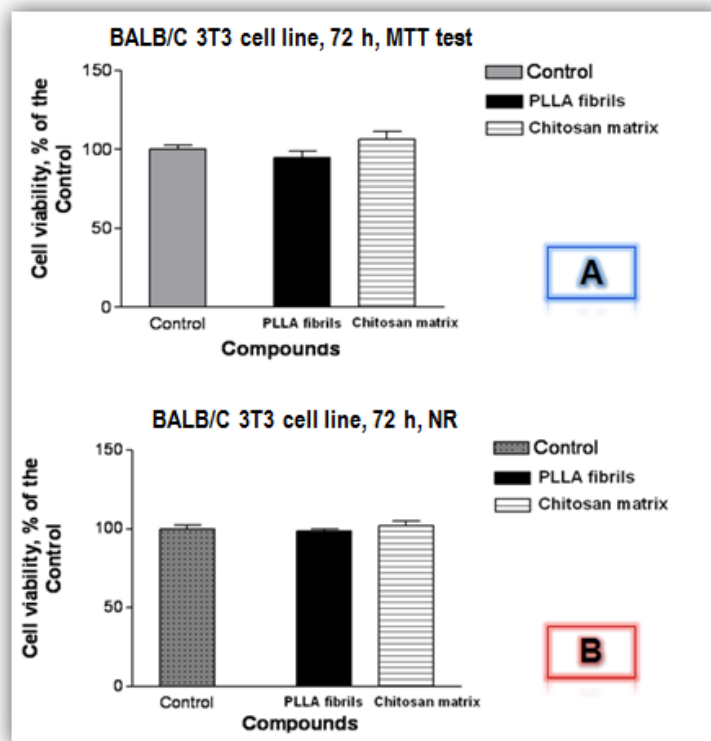


**Фигура 25.** Преживяемост и пролиферативна активност на клетките от линия BALB/C 3T3 (в процент спрямо контролата) в инкубирана в продължение на 4, 6 и 24 часа в присъствие на **PLLA фибрили** среда. Изследването е проведено на 72-ия час чрез МТТ тест (МТТ) и метод за включване на неутрално червено (NR).

Получените експериментални данни от проведените *in vitro* изследвания показват, че инкубираната (в продължение на 4, 8 и 24 часа) в присъствие на **PLLA фибрили** среда **не намалява** преживяемостта и пролиферативната активност на култивираните в продължение на 72 часа в нейно присъствие миши фибробластни клетки от линия BALB/C 3T3. Така например, процентът на живите клетки (култивирани в инкубирана в присъствие на PLLA фибрили среда) варира между  $134.61 \% \pm 5.73$  (средна стойност за 4, 8 и 24 часа) при МТТ теста и  $102.06 \% \pm 4.62$  (средна стойност за 4, 8 и 24 часа) при теста за включване на неутрално червено.

При провеждане на повторен експеримент, за получените **PLLA фибрили** резултати са съпоставени с данните за преживяемостта и пролиферативната активност на клетките, култивирани в инкубирана, в присъствие на **хитозанова матрица**, среда с период на инкубация 4 часа. Изследването е проведено чрез тестовете МТТ и NR, а получените резултати са обобщени на фигура 26.





**Фигура 26.** Преживяемост и пролиферативна активност на клетките от линия BALB/C 3T3 (в процент спрямо контролата) в инкубирана в продължение на 4 часа в присъствие на **PLLA фибрили** и **хитозанова матрица** среди. Изследването е проведено на 72-ия час чрез (A) MTT и (B) метод за включване на неутрално червено (NR).

Получените експериментални данни от проведените *in vitro* изследвания показват, че инкубираната (в продължение на 4 часа) в присъствие на **PLLA фибрили** и **хитозанова матрица** среди **не намаляват** преживяемостта и пролиферативната активност на култивираните в продължение на 72 часа миши фибробластни клетки от линия BALB/C 3T3.

## II. Получаване на биоразградими PLLA подложки и хибридни PLLA/HA композити чрез термично пресоване

### 3.1 Диференциална сканираща калориметрия (DSC)

#### 3.1.2 Термофизично охарактеризиране на подложки от PLLA с и без включени синтезирани хидроксиапатитни частици, получени чрез термично пресоване

За определяне на фазовите преходи, явленията кристализация и топене в полимерната PLLA подложка и хибридният PLLA/HA (60/40 тегл. %) композит, както и степента им на кристалност са направени измервания с Диференциална сканираща калориметрия (DSC).

На фигура 27 А и 27 В са представени термограми на PLLA подложка и хибриден PLLA/HA (60/40 тегл. %) композит в режим на нагряване. От получените термограми в режим на нагряване се регистрират: температура на встъкляване ( $T_g$ ), температура на топене ( $T_m$ ) и

температура на студена кристализация ( $T_c$ ) за PLLA подложката и хибридният композит. Данните са систематизирани в таблица 5. Температурата на встъкляване за двата образца е при 65 °C. Разлика в температурното отнасяне за двете подложки се наблюдава при температурите на студена кристализация, които са съответно  $T_c = 110$  °C за PLLA подложката и  $T_c = 102$  °C за хибридният PLLA/HA (60/40 тегл. %) композит. Тази разлика може да се обясни с ефекта на хетерогенно зародишообразуване на хидроксиапатитните частици (HA), включени в PLLA матрицата. Частиците от HA ускоряват кристализационната способност на PLLA полимера в хибридният PLLA/HA композит в процеса на нагриване в DSC апарата. Размерът на HA частиците е между 100 ÷ 150 nm.

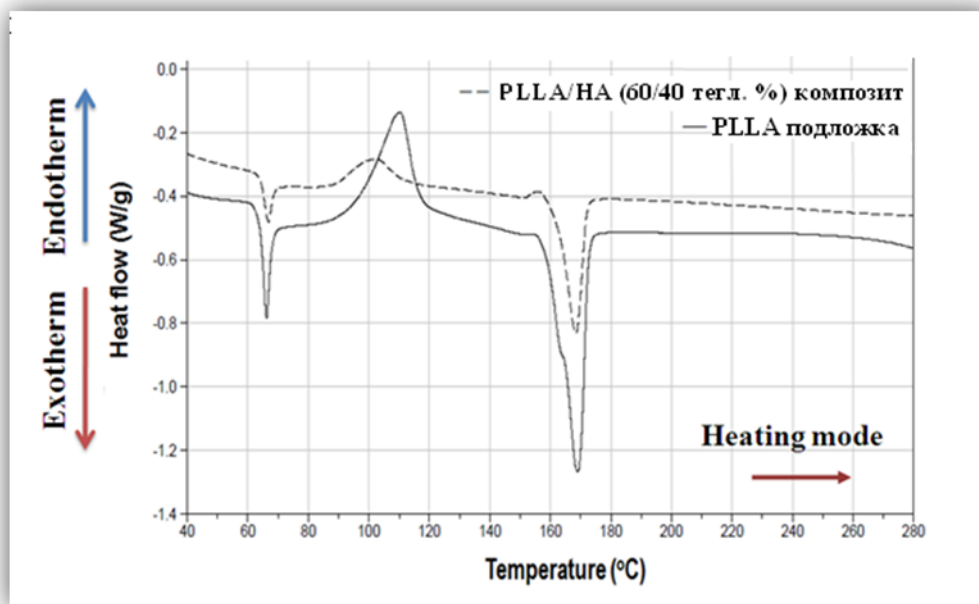
Наличието на екзотермични пикове на кристализация в двете термограми при нагриване се дължи на сравнително високата скорост на охлаждане на PLLA и PLLA/HA подложките, получени след термично пресоване. Полимерът PLLA трудно кристализира след бързо охлаждане от стопилка и не е в кристално фазово състояние. Този резултат за кристалната структура на PLLA е потвърден и с WAXS метода.

В термограмите за двата образца се наблюдават и ендотермични пикове на топене, съответно  $T_m = 169$  °C за PLLA подложката и  $T_m = 168,3$  °C за хибридният PLLA/HA (60/40 тегл. %) композит. Степента на кристалност на PLLA се изчислява като съотношение между разликата на измерената енталпия на топене ( $\Delta H_m$ ) и енталпията на кристализация ( $\Delta H_c$ ) отнесени към енталпията на топене на 100 % кристален полимер (формула 3.1.2 а) която според Fischer и сътрудници за PLLA полимера е 93 J/g [13].

Степента на кристалност ( $W_c$ ) на PLLA подложката и PLLA/HA композита са съответно 7 % и 14 %, което се обяснява с включването на кристалните HA частици в полимерната PLLA матрицата. Този резултат потвърждава ускоряващия ефект на частиците хидроксиапатит върху зародишообразуването за кристализационната способност на PLLA матрицата.

**Таблица 5.** Физикохимични характеристики на фазовите преходи в режим на нагриване за PLLA подложка и хибриден PLLA/HA композит.

| Термофизични свойства | PLLA подложка | Хибриден PLLA/HA (60/40 тегл. %) композит |
|-----------------------|---------------|-------------------------------------------|
| $T_g$ (°C)            | 65            | 65                                        |
| $T_m$ (°C)            | 169           | 168.3                                     |
| $\Delta H_m$ (J/g)    | - 35.95       | - 15.56                                   |
| $W_c$ (%)             | 7             | 14                                        |
| $T_c$ (°C)            | 110           | 102                                       |
| $\Delta H_c$ (J/g)    | 29.35         | 7.98                                      |



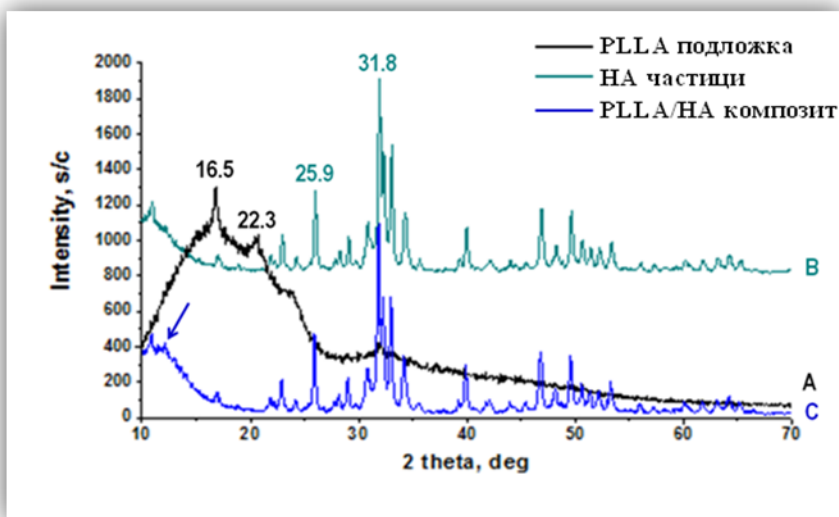
**Фигура 27.** DSC термограми на PLLA подложка и хибриден PLLA/HA (60/40 тегл. %) композит в режим на нагряване, измерени с *Differential Scanning Calorimetry (DSC)\* DSC Q200 - T. A. INSTRUMENTS (USA)*.

### 3.2 Рентгеноструктурен анализ (X-Ray)

#### 3.2.2 Охарактеризиране на кристалната структура на PLLA подложка с и без включени синтезирани хидроксиапатитни частици, получени чрез термично пресоване

На фигура 28 са представени дифрактограмите от WAXS метода на изследваните образци, съответно на HA частици, PLLA подложка, и хибриден PLLA/HA (60/40 тегл. %) композит. Характеристичните пикове, които се наблюдават, съответно при  $2\theta = 16.5^\circ$  и  $2\theta = 22.3^\circ$  съответстват на подложката от PLLA (фигура 28 крива А), а интензивните пикове наблюдавани, съответно при  $2\theta = 25.9^\circ$  и  $2\theta = 31.8^\circ$  отговарят на синтезираните HA частици (фигура 28 крива В). В подложките, PLLA полимерът е в аморфно състояние, поради бързото охлаждане на сместа (с или без HA частици) след термичното пресоване. Този резултат е в съгласие с резултата от термичния анализ (фигура 27).

При дифрактограмата на хибридният PLLA/HA (60/40 тегл. %) композит отново се регистрират двата характеристични пика за синтезираните HA частици, като двете дифрактограми, съответно криви В и С на фигура 28, са приблизително идентични. Разлика се наблюдава при малките ъгли при хибридната подложка и по-специално поява на неинтензивен пик при около  $2\theta = 12^\circ$  (фигура 28, посочено на крива С със стрелка). Това се дължи на факта, че не се регистрират аморфните рефлексии на PLLA полимера и доминират рефлексите на HA частиците. Тези резултати са сходни с резултатите, докладвани в литературата от Gang Sui и съавтори [14], отнасящи се за PLLA мембрани с включени в тях HA частици.



**Фигура 28.** WAXS дифрактограми от рентгеноструктурен анализ на: (А) PLLA подложка; (В) HA частици и (С) хибриден PLLA/HA (60/40 тегл. %) композит.

### 3.3 Инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (FTIR-AIR)

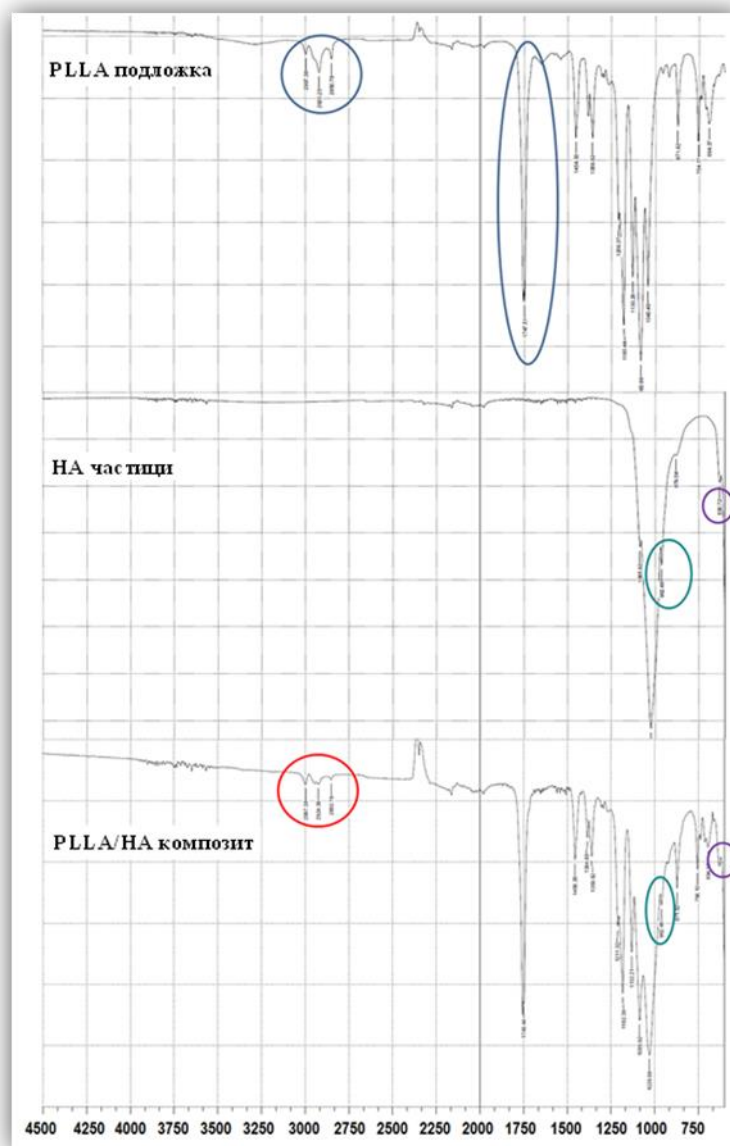
#### 3.3.3 Структурно охарактеризиране на подложки от PLLA с и без включени синтезирани хидроксиапатитни частици, получени чрез термично пресоване

Инфрачервената спектроскопия (FTIR) дава информация за химичните връзки, които възникват между двете фази изграждащи хибридният материал. На фигура 29 са представени инфрачервените спектри съответно на: PLLA подложка, HA частици и хибриден PLLA/HA композит.

От спектъра на PLLA се наблюдават характеристичните интензивни ивици, съответно при  $\nu = 1747.5 \text{ cm}^{-1}$ , съответстваща на валентното C=O трептене и при  $\nu^{\text{as}} = 1130.3 - 1043.5 \text{ cm}^{-1}$  за валентно C-O-C трептене в полимера. На инфрачервения спектър на PLLA подложката са регистрирани слабо интензивните ивици на симетричните и асиметричните валентни трептения за C-H връзките от CH<sub>3</sub> страничните групи на полимерната верига при около  $\nu^{\text{s}} = 2850.8 \text{ cm}^{-1}$  и  $\nu^{\text{as}} = 2920.2 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu^{\text{as}} = 2997.4 \text{ cm}^{-1}$ . Ножичните симетрични и асиметрични деформационни трептения за C-H връзките в метиловата група се проявяват като средно интензивни ивици при около  $\delta^{\text{s}} = 1369.8 \text{ cm}^{-1}$  и  $\delta^{\text{as}} = 1454.3 \text{ cm}^{-1}$  (фигура 29).

В ИЧ спектъра на хидроксиапатита се наблюдава ивица при  $\nu = 630.7 \text{ cm}^{-1}$ , която се дължи на хидроксилните групи (OH<sup>-</sup>) в кристалната решетка на HA. Интензивният пик в спектъра при  $\nu = 1024.2 \text{ cm}^{-1}$ , се дължи на фосфатните йони ( $PO_4^{3-}$ ).

В инфрачервеният спектър на композита се наблюдава комбинация от ивиците на спектрите на PLLA и HA. Регистрира се намаление на интензитета на ивиците на валентните трептения за C-H връзките от CH<sub>3</sub> страничните групи в PLLA полимера, дължащо се на включването на HA частиците в органичната матрица, което ограничава степените на свобода в движението на полимерните вериги.

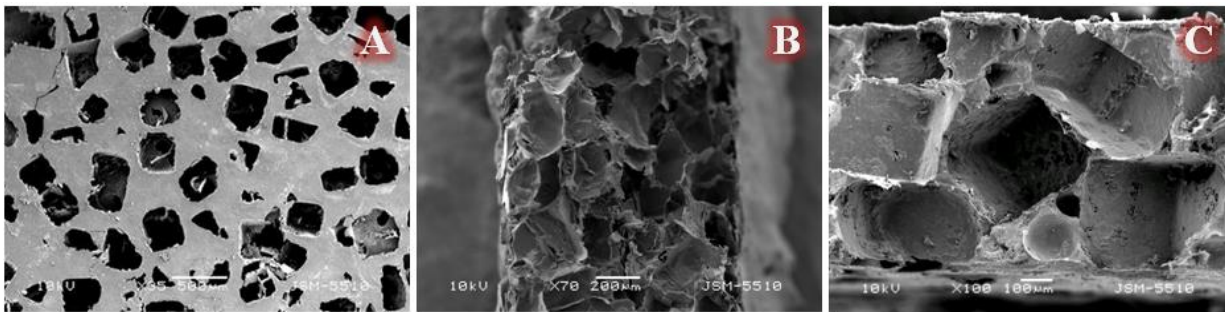


**Фигура 29.** Инфрочервени спектри по метода FTIR на: PLLA подложка, HA частици и хибриден PLLA/HA композит, получени от **Fourier Transform Infrared (FTIR-ATR) spectrometer – SHIMADZU**.

### 3.4 Сканираща електронна микроскопия (SEM)

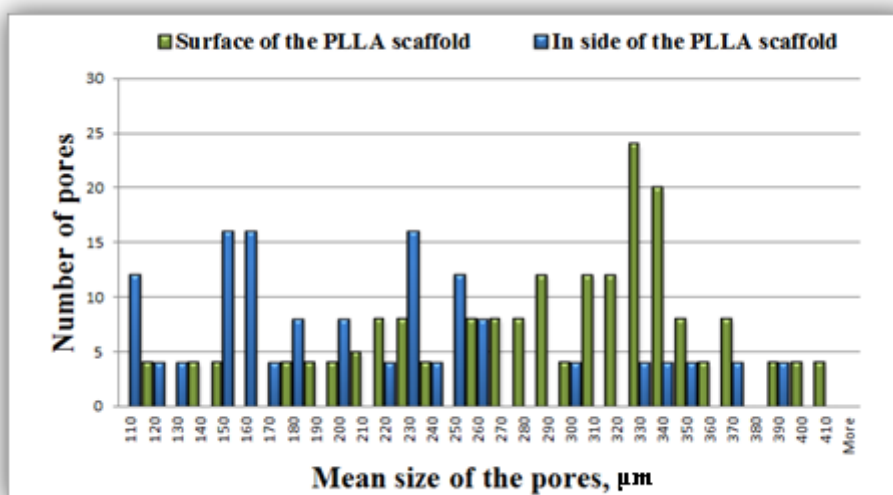
#### 3.4.3 Морфологично охарактеризиране на PLLA подложки преди и след биоминерализация за период от 30 дни със SBF; и на хибридни PLLA/HA (60/40 тегл. %) композити, получени чрез термично пресоване

От SEM снимките на получените PLLA подложки се вижда, че е оформена пореста структура, при която порите са се формирали в резултат на прибавянето на пресети частици от NaCl към полимера преди стапянето му и в следствие са отстранени чрез разтваряне във вода фигура 30 А, 30 В и 30 С.



**Фигура 30.** SEM снимки, наблюдавани с *SEM JEOL JSM-5510* на: (A) повърхност и (B), (C) напречно сечение на PLLA подложка. Снимките (A), (B) и (C) имат различни увеличения, съответно –  $\times 35$ ,  $\times 70$ ,  $\times 100$ .

От хистограмите за разпределението на порите по размер на повърхността и във вътрешността на PLLA подложката, получена при пресоване се вижда, че разпределението им по размер варира в един широк интервал от 100 до 400  $\mu\text{m}$  (фигура 31). От разпределението на порите на повърхността се вижда, че преобладават пори със среден размер около 340  $\mu\text{m}$ . По трудно е да се определи размера на порите във вътрешността на PLLA подложките, където размерите на порите варират в диапазона от 110 до 250  $\mu\text{m}$ .

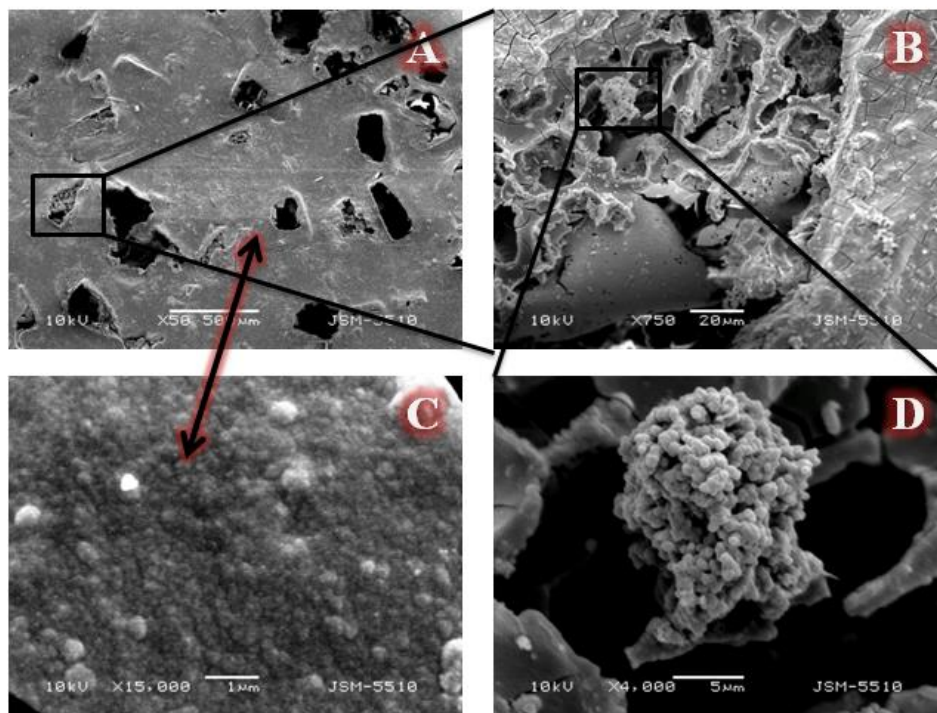


**Фигура 31.** Хистограма за разпределение на средния размер на порите на повърхността и във вътрешността на PLLA подложка, измерени от SEM снимките на фигури 30A и 30B.

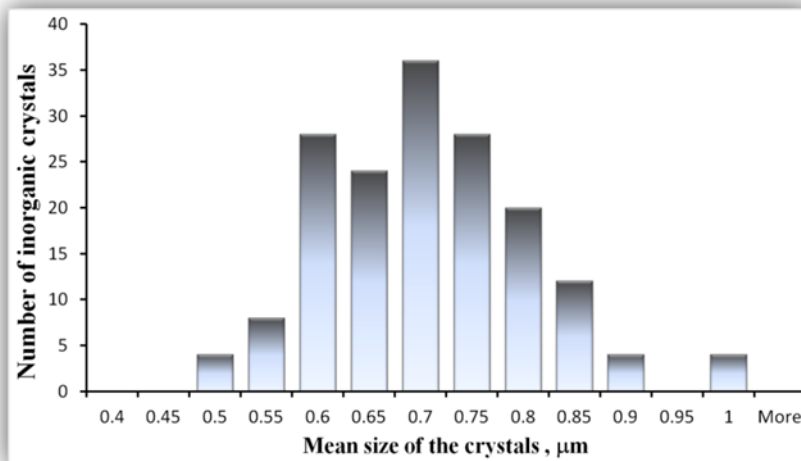
Аналогично както за изолираните PLLA фибрили е проведен *in vitro* тест в условия на симулирана тъканна течност и за получените PLLA подложки. На фигура 32 са представени SEM снимки на повърхността на PLLA подложки, биоминерализирани за период от 30 дни в SBF. При различни увеличения, съответстващи на фигура 32 (A), (B), (C) и (D), е представена степента на биоминерализация на повърхността.

На SEM снимката на фигура 32 B се виждат образувани агломерати от кристали, в резултат на биоминерализацията на PLLA подложката в симулирана тъканна течност в период от 30 дни. Увеличеният участък от снимката на фигура 32 B е представен на фигура 32 D, където ясно се вижда конгломерат с размери 12 x 16  $\mu\text{m}$ , изграден от нанокристали със среден размер около 700 nm. Разпределението по размер на тези нанокристали в агломерата е

дадено с хистограма на фигура 33. Отлагането на тези нанокристали на повърхността на полимерната PLLA матрица се вижда на SEM снимка на фигура 32 C, която е увеличение на участъка обозначен със стрелка от SEM снимката на фигура 32 A.



**Фигура 32.** SEM снимки, наблюдавани с *SEM JEOL JSM-5510* на: (A), (B) различни участъци от повърхността на PLLA подложка след биоминерализация за период от 30 дни. Снимките (A), (B), (C) и (D) имат различни увеличения, съответно –  $\times 50$ ,  $\times 750$ ,  $\times 15000$ ,  $\times 4000$ .

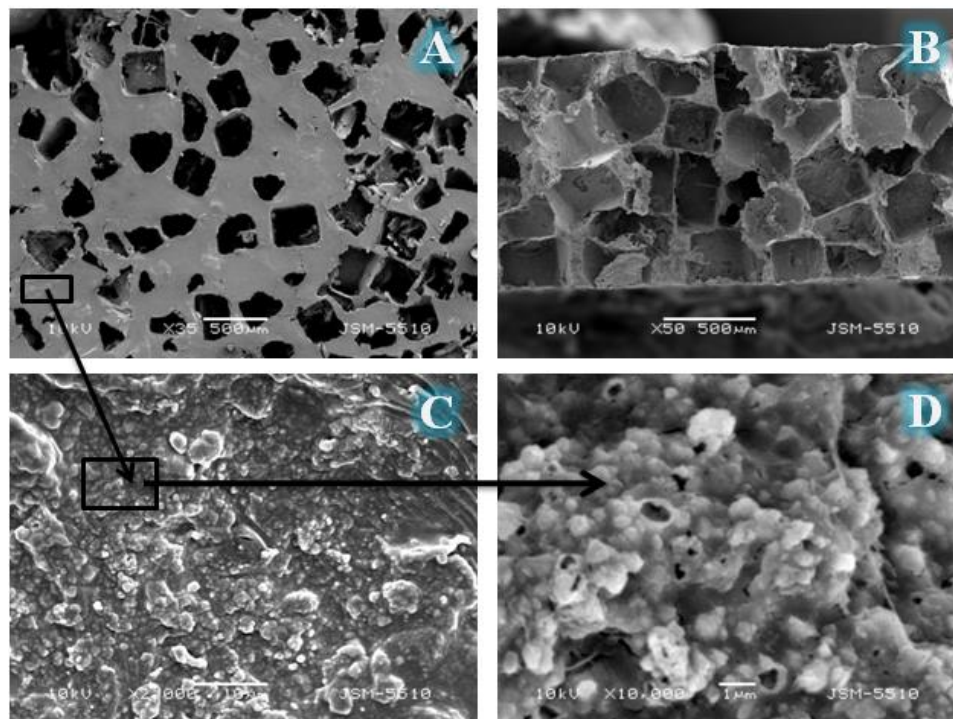


**Фигура 33.** Хистограма за разпределение на средния размер на кристалите на повърхността на PLLA подложка, измерени от SEM снимките на фигури 32 B и 32 D.

На фигура 34 са представени SEM снимки на получените хибридни PLLA/HA (60/40 тегл. %) композити. Отново се вижда оформената пореста структура, получена вследствие от прибавянето на частици от NaCl към полимера. Размерът и формата на тези пори на

повърхността и във вътрешността са сходни с тези при PLLA подложката без включени НА частици (фигура 34).

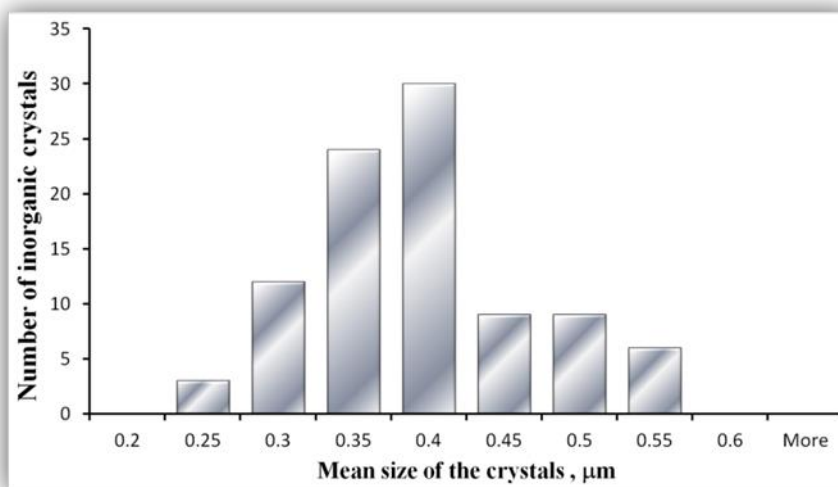
На SEM снимката на фигура 34 А е указан участък от полимерната PLLA матрица, на който след увеличение се наблюдава морфологията и начина на включване на НА частиците в полимера.



**Фигура 34.** SEM снимки, наблюдавани с *SEM JEOL JSM-5510* на: (A), (C), (D) повърхност и (B) напречно сечение на хибриден PLLA/НА композит. Снимките (A), (B), (C) и (D) имат различни увеличения, съответно –  $\times 35$ ,  $\times 50$ ,  $\times 2000$  и  $\times 10000$ .

От SEM снимки е измерен размера на НА частици, които ясно се разграничават в PLLA матрицата. От направения анализ е представена хистограма за разпределението на частиците по размер (фигура 35) и е определен среден размер около 400 nm. В сравнение с размера на синтезираните и в последствие включени в PLLA матрицата частици този размер е 3 пъти по-голям от докладвания в литературата [15]. Този резултат потвърждава, че нанокристалите и агломерати от НА са „облечени“ от PLLA матрицата.



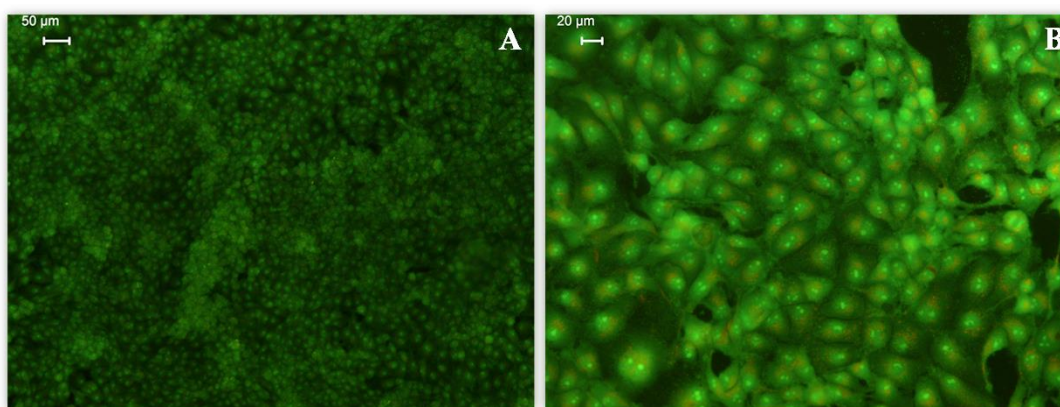


**Фигура 35.** Хистограма за разпределение на средния размер на HA частици, включени в PLLA матрицата, измерени от SEM снимки.

### 3.8 *In vitro* изследвания

#### 3.8.4 Комбинирано оцветяване на клетки от линия BALB/C 3T3 с акридин оранж и пропидиев йодид (АО/ПИ) в присъствие на PLLA подложки и хибридни PLLA/HA (60/40 тегл. %) композити

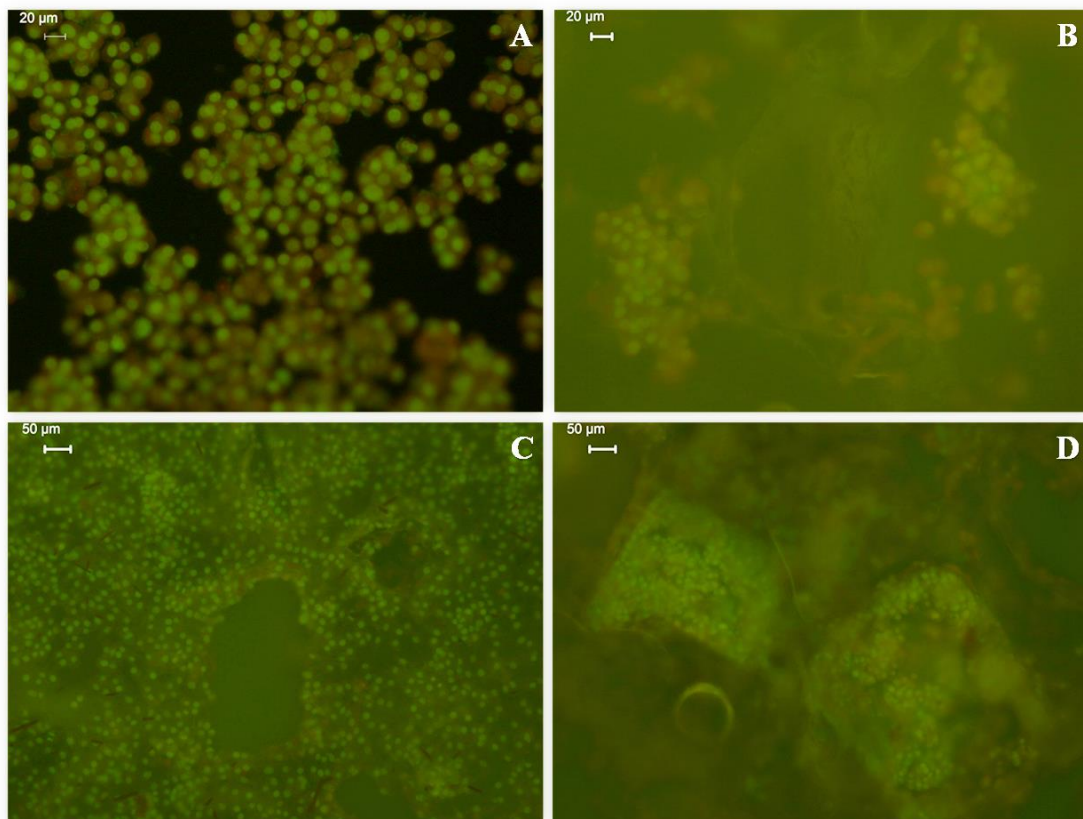
При *in vitro* експериментите е изследвано и отнасянето на клетките от линия BALB/C 3T3 в присъствието на PLLA подложки и хибридни PLLA/HA (60/40 тегл. %) композити, по-специално тяхната способност да прилепват върху повърхността на тези материали. Проучването беше осъществено чрез комбинирано оцветяване с акридин оранж и пропидиев йодид (АО/ПИ), а получените резултати са представени на фигури 36, фигура 37 и фигура 38.



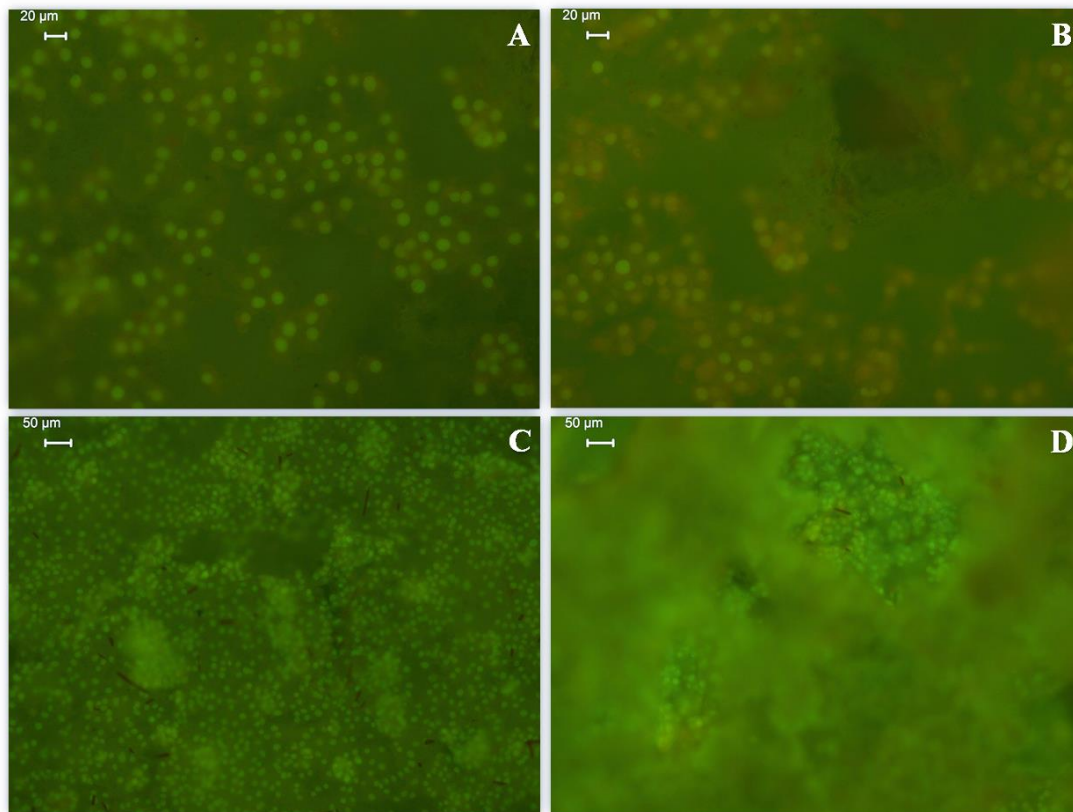
**Фигура 36.** Контролни клетки от линия BALB/C 3T3, наблюдавани с помощта на флуоресцентен микроскоп *Leica DM 5000B*. Снимките (A), (B) имат различни увеличения, съответно –  $\times 50$ ,  $\times 20$ .

На фигура 36 са представени снимки от флуоресцентен микроскоп на контролни клетки от линия BALB/C 3T3. Тези снимки са използвани като база за сравнение с резултатите от снимките получени за клетъчните линии BALB/C 3T3 в присъствие на PLLA подложки и хибридни PLLA/HA (60/40 тегл. %) композити, с цел да се оцени клетъчната способност за адхезия и пролиферация върху повърхността на тези материали.

На фигури 37 и 38 са представени снимките от флуоресцентен микроскоп на клетки от линия BALB/C 3T3 култивирани за различни периоди от време, съответно за PLLA подложки (фигури 37) и хибридни PLLA/HA (60/40 тегл. %) композити (фигури 38).



**Фигура 37.** Комбинирано оцветяване на клетки от линия BALB/C 3T3 с пропидиев йодид и акридин оранж. Клетките са култивирани в продължение на (A), (B) 5 часа и (C), (D) 24 часа в присъствие на PLLA подложки и са наблюдавани с помощта на флуоресцентен микроскоп *Leica DM 5000B*. Увеличенията на (A), (B), (C) и (D) са съответно  $\times 20$ ,  $\times 20$ ,  $\times 50$ ,  $\times 50$ .



**Фигура 38.** Комбинирано оцветяване на клетки от линия BALB/C 3T3 с пропидиев йодид и акридин оранж. Клетките са култивирани в продължение на (A), (B) 5 часа и (C), (D) 24 часа в присъствие на хибридни PLLA/HA (60/40 тег. %) композити и са наблюдавани с помощта на флуоресцентен микроскоп *Leica DM 5000B*. Увеличенията на (A), (B), (C) и (D) са съответно  $\times 20$ ,  $\times 20$ ,  $\times 50$  и  $\times 50$ .

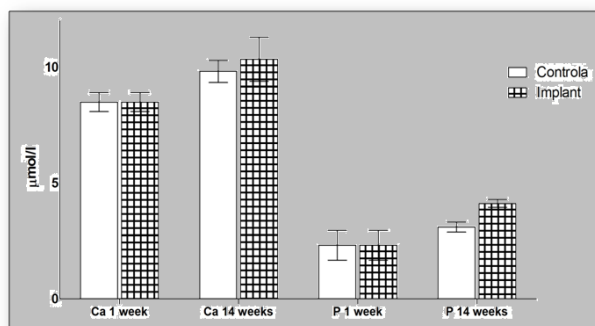
Получените резултати показват, че не се наблюдават цитопатологични изменения при клетките от линията BALB/C 3T3, след тяхното култивиране в продължение на 5 и 24 часа върху получените при термично пресоване порьозни PLLA подложки и PLLA/HA (60/40 тегл. %) композити. На фигурите 37 и 38 ясно се вижда, че и при двете порьозни пластинки пролиферативната активност на клетките нараства на 24-ия час на повърхността на материала и във вътрешността на порите. В сравнение с PLLA подложките, при композитите се наблюдават повече пролиферирани миши фибробласти, което най-вероятно се дължи на подобрената биосъвместимост на PLLA подложката след включване на синтезирани HA частици.

### 3.9 In vivo изследвания при плъхове

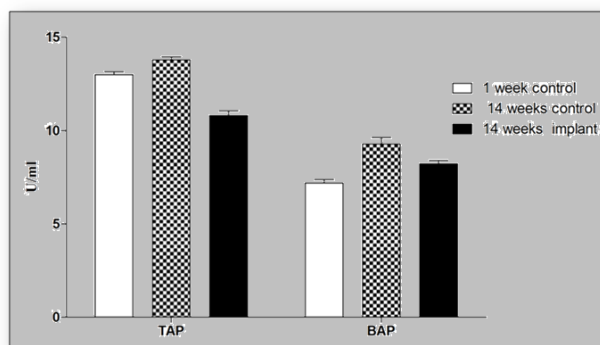
#### 3.9.1 Серумни биохимични изследвания

Морфологията и кристалността на хибридните подложки имат важна роля в регулирането на клетъчната адхезия и времето за разграждане на импланта в живата тъкан. От проведените физикохимични и морфологични изследвания на PLLA подложките и PLLA/HA композитите е установено влиянието на частиците хидроксиапатит, включени в PLLA матрицата. Данните от направените изследвания показват, че стойностите на изследваните елементи (Ca и P), както и активността на фосфатазите са в нормално допустимите физиологични норми при всички плъхове.

В края на 14-та седмица съдържанието на Ca и P беше увеличено в сравнение с това след 1-та седмица при двете групи плъхове. Стойностите на Ca и P бяха близки в края на експеримента при всички плъхове в края на 14-та седмица (фигура 39). В края на 14-та седмица активността на обща алкална фосфатаза (TAP) и костна алкална фосфатаза (BAP) в контролната група бяха слабо променени в сравнение с тези от 1-та седмица. Активността на ензима и изоензима бяха понижени в края на експеримента при плъховете с имплантирания хибриден PLLA/HA композит (фигура 40).



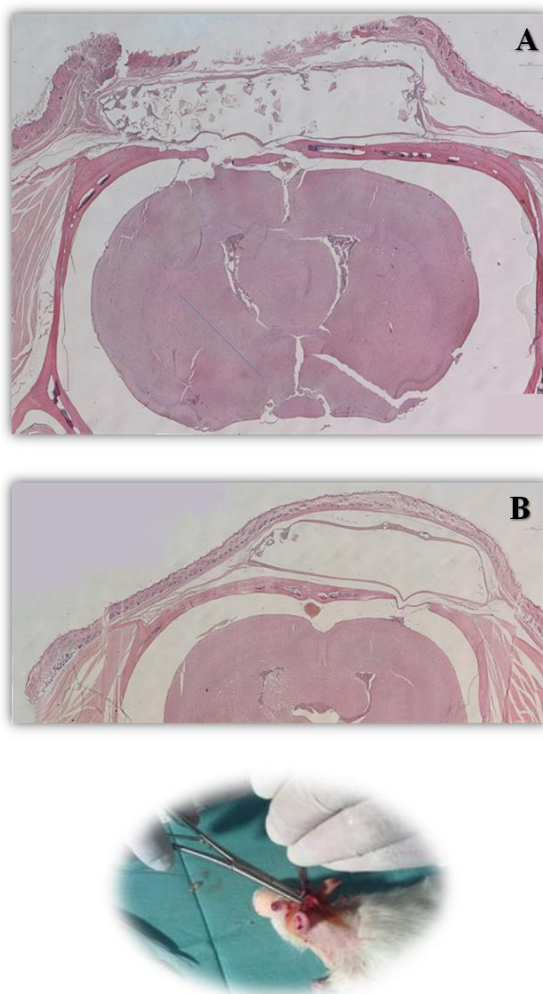
**Фигура 39.** Съдържание на Ca и P в серум на плъхове след имплантиране на PLLA/HA композита.



**Фигура 40.** Активност на обща и костна алкална фосфатаза в серум на плъхове след имплантиране на PLLA/HA композита.

### 3.9.2 Хистологични изследвания

Хистологичните изследвания, проведени на опитни животни (плъхове) са представени на фигура 41 А и 41 В. От двете снимки, направени с микроскоп *Leica DM 5000B* се вижда, че около импланта се наблюдава образуването на тънка фибозна капсула. Реактивна детергентна активност в областта около импланта не беше установена (фигура 41 А и 41 В).



**Фигура 41.** Хистологични снимки на костни дефекти в калвария на плъховете (А) и (В) с имплантирани **PLLA/HA композити**, наблюдавани с микроскоп *Leica DM 5000B*.

Имплантирането на хибридният PLLA/HA композит в костен дефект на калвария не предизвиква, отрицателен биологичен отговор от страна на организма на опитните животни спрямо полимер - керамичния имплант. Констатирана е хистопатологична, слаба чуждотелна реакция около имплантирания материал, която показва, че няма вторични неблагоприятни прояви от страна на костната тъкан.

### III. Получаване на усилен микрофибрилни композити (MFC) от биоразградими PLA/Ecoflex смеси

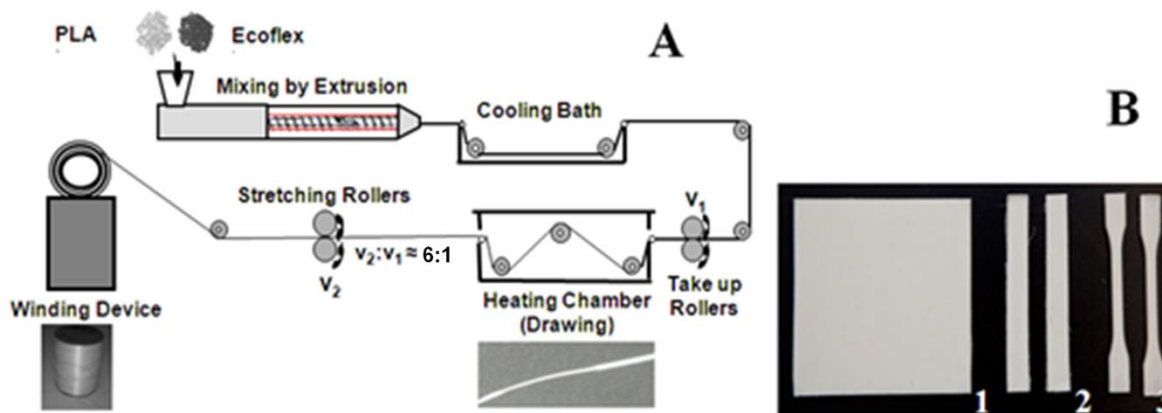
Полимерите полилактид (PLA) и поли (бутилен адипат-съ-терефталат) (PBAT) са биоразградими и термопластични полимери и могат да се обработват посредством стандартните методи за преработка. В автореферата, накратко са представени получените усилен микрофибрилни композити (MFC) на основата на PLA/PBAT (PLA/Ecoflex<sup>®</sup>) смеси в различно теглово съотношение. Технологичният процес включва, екструзия от стопилка на PLA и Ecoflex при непрекъснато механично изтегляне на екструдата, получаване на ориентирано влакно и термично пресоване на фибрилизиранията смес в близки до индустриалните условия.

Чрез пресоване (*Compression Molding CM*) се получават образци под формата на пластини (ламинати) изградени от ориентирани PLA влакна в изотропна Ecoflex матрица при температури на процеса над температурата на топене на ( $T_m$ ) на Ecoflex, но под  $T_m$  на PLA. Чрез методите SEM и WAXS е доказано, че изследваните компоненти на екструдиранията PLA/Ecoflex смес имат изотропна структура, но след механично изтегляне се трансформират във високо ориентирано състояние с анизотропна структура. След пресоване и изотропизация на Ecoflex матрицата, ориентиранията влакна се трансформират в MFC структурирани полимер-полимер композити.

За получаването на биоразградими, полимерни материали за опаковъчни цели е приложена концепцията за усилените микрофибрилни композити (MFC). Тези полимер-полимерни материали са усилен със снопове от фибрили, които имат средни диаметри в нано- до микро- скалата и са висока стойност на параметъра AR (*Aspect Ratio AR*). Фибрилите са структурни единици със свойства, които зависят от разпределението им по дължината на линейна ос, или оста на симетрия [16].

Получаването на MFC включва три основни етапа: (i) смесване, последвано от екструдиране на два несъвместими полимера, които имат различни температури на топене  $T_m$  (*mixing step*) (етап на смесване); (ii) студено изтегляне на екструдата с постигане на добра ориентация на двете фази (*in situ* създаване на полимерни фибрили); (iii) термична обработка на ориентираното влакно, при температура в интервала между температурата на топене на двата компонента в сместа (*isotropisation step*) (фигура 42).

Във втория етап двата полимера се трансформират във високо ориентирано състояние, т.е. екструдиранията смес преминава в ориентирано (фибрилизирано) влакно. В третия етап в резултат на топене на ниско-топимия компонент и превръщането му в изотропна матрица се получава композит, усилен с фибрили от високо-топимия компонент [17, 18, 19, 20, 21, 22]. Технологично, трансформацията към MFC структура може да се осъществи по време на обработката на фибрилизиранията влакно чрез леене под налягане, пресоване, екструдиране, или пултрузия.



**Фигура 42.** (А) Схема на производствената линия за получаване на ориентирани PLA/Ecoflex влакна чрез екструзия. (В) Снимка на MFC структурирани PLA/Ecoflex образци с различна форма.

Механичните, термичните и биоразградимите свойства на PLA зависят от последователността на стереоизомерите на повтарящи се PLA звена. Кристалността на PLA е важна характеристика, от която зависят свойствата му на пропускливост за газове и течности, а също така и неговото отнасяне в процесите на разграждане и използването му за специфични приложения за опаковъчни и медицински цели [23, 24].

Освен полиестери от природни източници (например PLAs и PHBs), е установено, че някои синтетични съполиестери получени от петролни източници, съдържащи алифатни и ароматни съставки могат да се разградят от микроорганизми. Като например алифатно-ароматния съполиестер поли (бутилен адипат-съ-терефталат) (PBAT), който се предлага на пазара от BASF (Germany) под търговското име Ecoflex® [25].

PLA и PBAT са най-често използваните биоразградими полимери, които се изследват с цел в близко бъдеще да заместят съществуващите понастояще полимери за опаковъчни цели. Ecoflex е материал с недобри механични характеристики и ниски бариерни свойства за газове, докато PLA е твърд материал с ниска газопроницаемост. Комбинирането на свойствата на двата полимера при смесване, цели да подобри механичните и бариерните свойства на крайния полимерен композит [26]. Свойствата на тези полимерни материали зависят от различни фактори, като например формата и размера на усилената фаза и ориентацията по отношение на посоката на изтегляне.

Основната цел на изследването е получаване на MFC структурирани полимерни композити на основата на PLA/Ecoflex смеси с подобрени механични и бариерни свойства. За целта са решени следните задачи: (i) в полупромишлени условия чрез екструзия и механично изтегляне са получени фибрилизирани PLA/Ecoflex влакна с различно тегловно съотношение; (ii) чрез пресоване са получени пластини от усиленни микрофибрилни PLA/Ecoflex композити (iii) изследвана е връзката между структурата и свойствата на тези полимерни материали.

За получаването на MFC композитите са използвани следните материали: полилактид (PLA) (Natureworks PLA 6202D) и поли (бутилен адипат-съ-терефталат) (PBAT) (Ecoflex® F Blend A1200, BASF, Germany).

Чрез процес на екструзия на изходните PLA хомополимер и Ecoflex съполимер, са получени екструдирани и ориентирани смеси с различно тегловно съотношение съответно: 25/75, 30/70, 40/60 и 50/50 тегл. %. Екструдирането е осъществено в двушнеков екструдер *PL*

**2000** (*Brabender® GmbH & Co. KG, Duisburg, Germany*). Температурният профил на технологичния процес в отделните зони на екструдера са съответно 150, 180, 190 и 195 °C и скоростта на въртене на шнековете се поддържа при 30 грм.

След охлаждане на екструдатът до около 45 °C кръглите екструдирани нишки с диаметър 2.2 ÷ 2.6 mm, преминават през ролките преди нагриващата термокамера (с постоянна температура в камерата около 70 °C над T<sub>g</sub> на двата полимера) и механично се деформират до ленти с размери: дебелина 1.2 mm и широчина между 3.5 ÷ 3.8 mm. При следващия технологичен етап се осъществява изтегляне и ориентация на PLA/Ecoflex сместа и се получават филми с размери, 0.6 ÷ 0.8 mm дебелина и 1.5 ÷ 1.8 mm ширина при изтегляне на нишките с отношение на скоростите на ролките преди и след термокамерата  $DR = \frac{v_1}{v_2} = \frac{6}{1}$ .

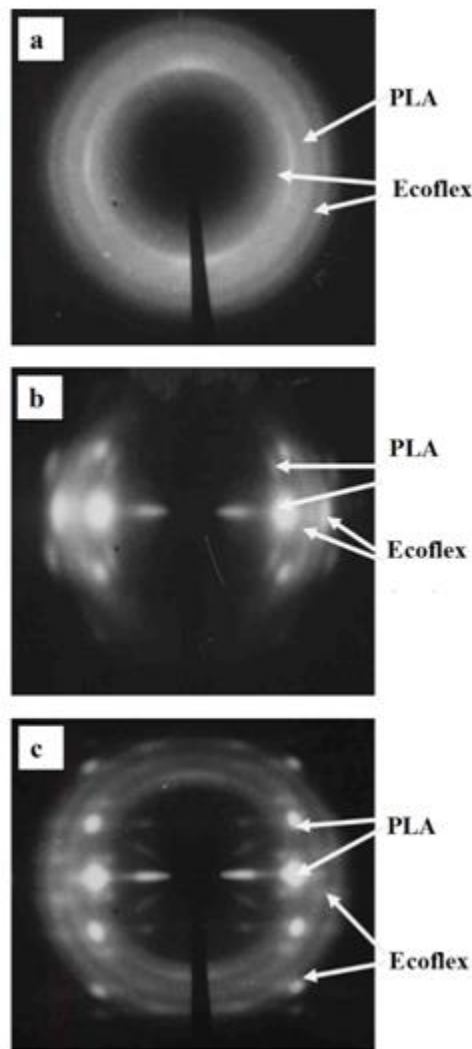
Получаването на MFC структурирани композити от ориентирани PLA/Ecoflex влакна е осъществено с помощта на *Paul Weber* преса при следните условия: температура на пресоване 140 °C (под T<sub>m</sub> на PLA, но над T<sub>m</sub> на Ecoflex), натоварваща сила 1.0 kN, приложена за време 30 sec. По този начин се получават пластини (филми) с размери, 0.2 ÷ 0.35 mm дебелина и 2.5 ÷ 3.2 mm ширина. Едноосно ориентирани ламинати (пластини) с размери 0.7x100x150 mm<sup>3</sup> се получават чрез пресоване на два слоя от ориентирани PLA/Ecoflex филми. Условието за получаване на MFC композитите в същата преса са: температура 140 °C, налягане 5 MPa, за време 5 min. След топенето на Ecoflex матрицата в ориентираното влакно, получените композити се охлаждат до стайна температура със скорост на охлаждане 10 °C/min.

Качествените промени в надмолекулярната организация и морфологията на изходните PLA и Ecoflex полимери, както и получените техни смеси по време на технологичния процес на екструзия и ориентация, се наблюдават с помощта на експерименталните методи Широкоъглово рентгеново разсейване (**WAXS**) и на сканиращ електронен микроскоп (**SEM**).

Дифрактограмите и фотографските снимки на изследваните образци са получени с рентгенов апарат **Siemens D 500**, описан в глава Материали и методи.

На фигура 43 са представени дифрактограмите на PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) смеси след екструзия и ориентирани и след пресоване. В екструдирано състояние компонентите на сместа проявяват пълна изоинтензивност на Дебаевите пръстени за Ecoflex и наличие на аморфното хало за PLA, т.е. двата компонента в сместа притежават изотропно разпределение.





**Фигура 43.** WAXS снимки получени от PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) смеси след: (а) екструзия, (b) фибрилизация и (c) пресоване.

В екструдираните PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) смеси се регистрира само кристалната структура на Ecoflex фракцията (фигура 43a), като размерът на кристалната решетка на Ecoflex е подобна на тази на PBT [27]. Това дава основание да се допусне, че кристалната структура на Ecoflex се формира от мономерните звена на бутилен терефталат (BT), докато бутилен адипатните (BA) звена не са част от кристалните домени.

След изтегляне на екструдираната смес, изотропното разпределение на компонентите в сместа се трансформира в свършена едноосна ориентация на двата полимера във влакното, като веригите им са ориентирани по посока на изтеглянето (фигура 43b). В ориентираното PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) влакно се наблюдава и кристална фаза в PLA. Това явление се дължи на индуцирана кристализация в следствие на механичен стрес, което възниква в процеса на изтегляне.

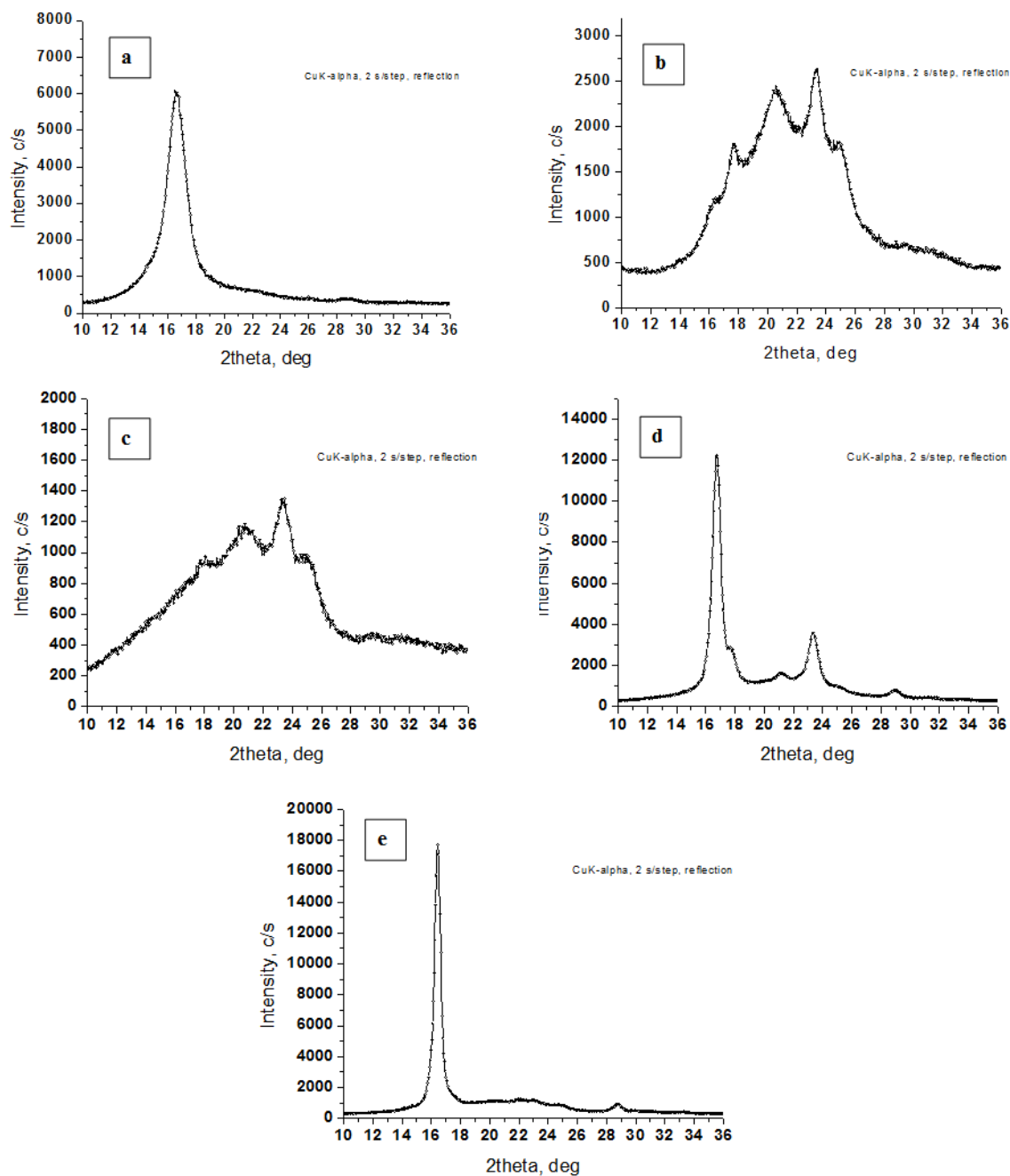
Сісего и съавтори [28] са изследвали надмолекулната организация на PLA фибрили и кристалната морфология на PLA влакната с помощта на методите на рентгенова дифракция и атомно силова микроскопия. Установено е, че процесът на изтегляне предизвиква ориентация на молекулните вериги, като кристализацията настъпва, по дължината на микрофibrилите лежащи по протежение на оста на влакното. Установено е, че надмолекулната структура на

PLA микрофибрилите, след ориентация по оста на влакното се определя от съотношението на скоростта на изтегляне на ролките преди и след термокамерата (*Draw Ratio DR*). С увеличаване на *DR*, се увеличава и способността на микрофибрилите да се ориентират по оста на влакното. Кристалните и аморфните области образуват сандвичоподобни структури, с аморфни вериги в междуфибрилните области [28].

След пресоване на ориентираното PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) влакно при температура 140 °C, т.е. над температурата на топене  $T_m$  на Ecoflex, се създава различна структура (фигура 43c). Фибрилите на PLA в композита запазват своята ориентация. От фигури 43b и 43c, се вижда, че PLA кристалите, получени след допълнителна изотермична обработка по време на процеса на пресоване са с добро съвършенство. След пресоването на ориентираното влакно, Ecoflex компонента е в изотропно състояние, и се получава MFC структуриран композит при който матрицата от Ecoflex е подсилена с ориентирани PLA фибрили (фигура 43c).

От анализът на фигура 43 се вижда, че фотографските WAXS снимки на образци получени след пресоване (фигура 43c) се различават от WAXS снимките на образците на ориентираните PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) влакна (фигура 43b). Разпределението на рефлексите за Ecoflex може да се обобщи от фигури 43b и 43c. Отместването на рефлексите след процеса на кристализация показват, че веригите на Ecoflex в кристалите не са успоредни на посоката на изтегляне, така както са били ориентирани в първоначалното фибрилизирано влакно (фигура 43b). Това се дължи на транскристализация, при която промените в ориентацията на полимерните вериги във влакното са настъпили по отношение на първоначалната им ориентация. Този процес протича, когато PLA микрофибрилите играят ролята на зародиши в процеса на зародишообразуване, подобно на различни подсилващи влакна в други полимерни композити. Разликата между класическите композити и MFC структурираните композити е, че при MFC, PLA фибрилите не само благоприятстват кристализацията, но също така влияят на ориентацията на полимерите веригите в матрицата. При процесът на транскристализация се постига ориентираност на полимерните вериги на матрицата, които вече не са паралелни на веригите на PLA изтеглената фаза при процеса на топене по време на пресоването им в матрица и охлаждането на композита.

На фигура 44 са представени WAXS дифрактограмите (по екваториалната ос) на изходните PLA и Ecoflex полимери и получените от тях смеси PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) след екструзия, ориентация и пресоване. При изходният PLA хомополимер се регистрират един интензивен пик при  $2\theta$  около  $16,6^\circ$  и един слабо интензивен при  $2\theta = 27,5^\circ$  (фигура 3a). При изходният Ecoflex съполимер се наблюдават два слабо интензивни рефлекси при  $2\theta = 17,7^\circ$  и при  $2\theta = 25^\circ$ , както и два сравнително интензивни пика при  $2\theta = 20^\circ$  и  $2\theta = 23,4^\circ$  (фигура 44b). На дифрактограмата на екструдиранията PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) смес се регистрират само рефлексите на Ecoflex и не се наблюдава кристална фаза на PLA (фигура 44c).

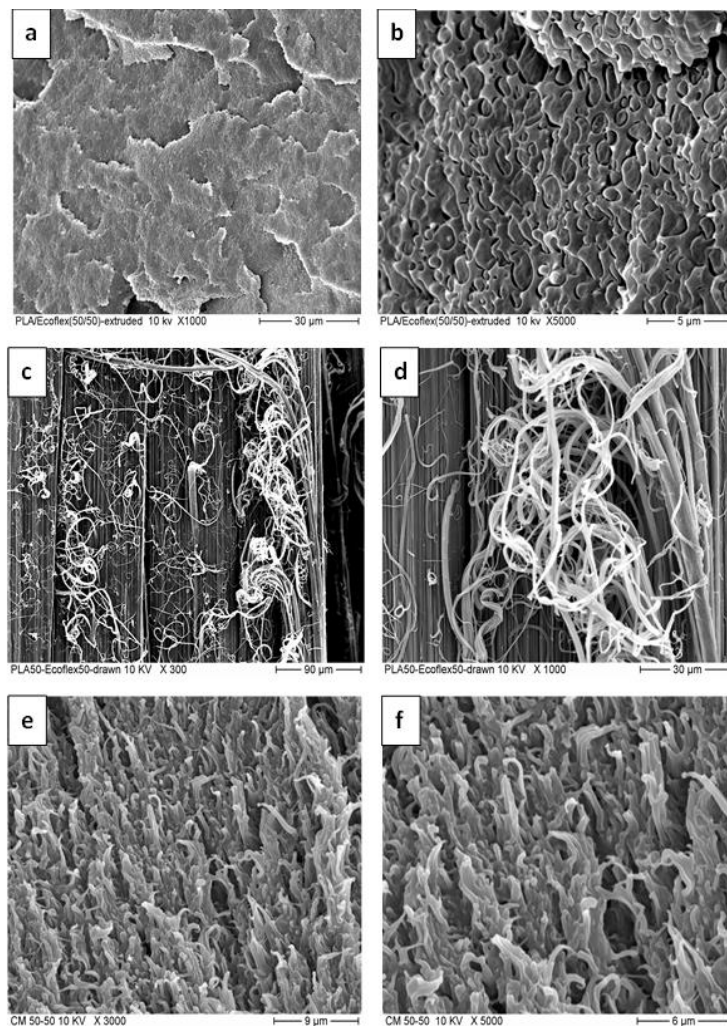


**Фигура 44.** WAXS дифрактограми получени от (a) изходен PLA хомополимер, (b) изходен Ecoflex съполимер и PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) смеси след: (c) екструзия, (d) фибрилизация и (e) пресоване.

След механично изтегляне на екструдираната смес, се наблюдава характерният пик на кристалната PLA фракция при  $2\theta = 16.6^\circ$  (фигура 44d). Това се дължи на допълнителната кристализация на PLA при фибрилизация на екструдата (фигура 44c). След термична обработка не се регистрират рефлексите на Ecoflex матрицата, докато характерният пик за PLA фракцията е по-тесен и с по-голям интензитет (фигура 44e). Това явление се обяснява с изместването на рефлексите на Ecoflex матрицата в меридианна посока след пресоване (фигура 43c) и се подобрява размера и съвършенството на кристалите на PLA, в резултат на допълнителната изотермична обработка при матричното пресоване.

Морфологичната структура на изходните полимери и получените от тях PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) смеси, влакна и композити е определена със Сканиращ електронен микроскоп **JEOL JSM 5400 SEM** с ускоряващо напрежение 10 kV, описан в Материали и методи.

WAXS методът дава информация за ориентацията и надмолекулната организация на полимерните смеси, а чрез микроскопски наблюдения се придобива представа за топографията и морфологичните характеристики на полимерните материали. На фигура 45 са представени SEM снимки на изследваните образци. Те са получени при счупване в течен азот, перпендикулярно на оста на образца. Поради различната си морфология екструдираните и пресованите смеси, при потапяне в течен азот, се разчупват перпендикулярно на оста на изтегляне, докато ориентираните влакна се разчупват по оста на изтегляне. От повърхността на така получените образци са снети SEM снимки.



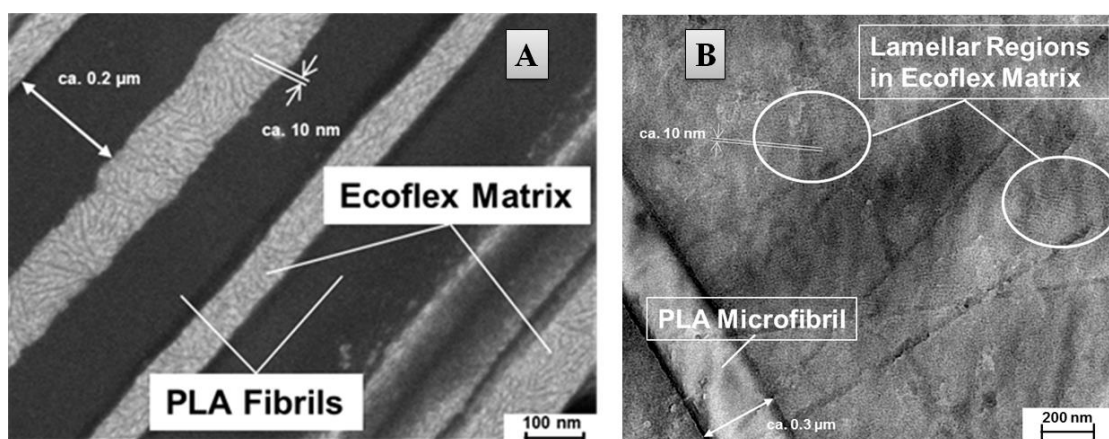
**Фигура 45.** SEM снимки с различни увеличения на счупени в течен азот PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) смеси след: екструзия (a и b), фибрилизация (c и d) и пресоване (e и f).

На SEM снимките на екструдираните PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) смеси се наблюдава изотропна морфология на двете отделни фази. На фигури 45a и 45b са представени SEM снимки, показващи равномерното разпределение на диспергираните сферични PLA частици в Ecoflex матрицата, чийто диаметър е в границите от  $0.5 \div 1.5 \mu\text{m}$ . На фигури 45c и 45d са представени SEM снимки илюстриращи промените в морфологията на смесите след

фибрилизация. Както се вижда от снимките ориентираното PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) влакно включва PLA фибрили с диаметър в границите  $0,2 \div 1 \mu\text{m}$ , които са получени в резултат на механичното изтегляне на екструдата. Тази морфология съответства на ориентирано влакно, но не е характерна за композитен материал, при който фибрилите са включени в изотропната матрица.

От SEM снимките може да се направи заключението, че PLA фибрилите имат голяма стойност на съотношението дължина към диаметър (*Aspect Ratio AR*), което е от основно значение за механичните свойства на композитните материали. Най-важна стъпка за формирането на PLA фибрили с диаметри в нано- или в микро- размерената скала и имащи голямо *AR*, е процесът на механичното изтегляне на екструдата. В нагряващата камера, където температурата се поддържа около  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  (над  $T_g$  на двата компонента в сместа), при механичното изтегляне протича и шийкообразуване на екструдата. Впоследствие, диспергираните сферични PLA частици в екструдиранията смес, коалесцират (смесват се) и се трансформират във фибрили. Диаметърът и дължината на тези фибрили зависи от количеството и размера на коалесциралите PLA частици. След процеса на пресоване на ориентираното PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) влакно при  $T = 140 \text{ }^\circ\text{C}$ , Ecoflex се стапя, а PLA фибрилите вече са вградени в изотропизираната матрица и се наблюдава структура на полимерен композит (фиг. 45e и 45f). Най-важната характеристика на получения материал е, че не се наблюдават снопове от фибрили, т.е. всяка фибрилла е „опакована“ от Ecoflex матрицата и усилващия PLA компонент има добро разпределение на нано- и микро- ниво в сравнение с други наноматериали използвани за получаване на полимерни нанокompозити.

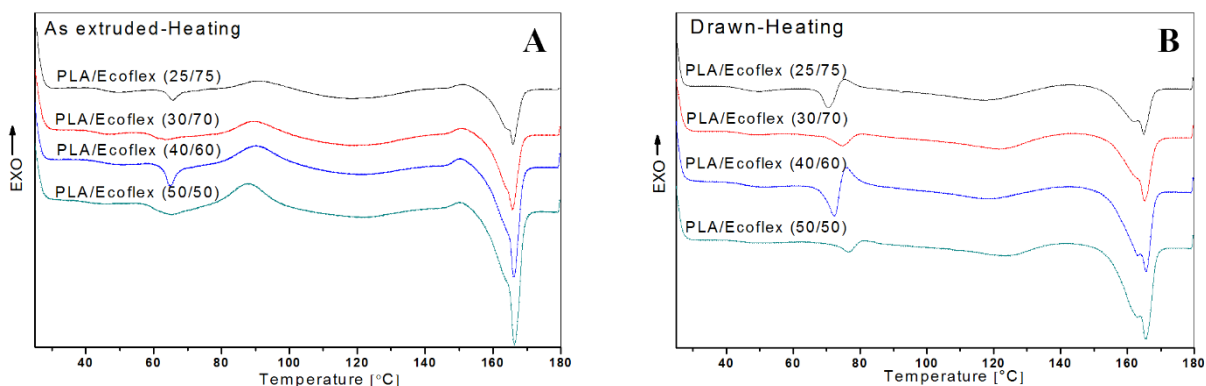
Проведени са изследвания с високо-разделителна сканираща микроскопия **High resolution SEM** и трансмисионна електронна микроскопия **Zeiss Libra200 TEM** за определяне размера на фибрилите и ламеларната структура на матрицата. На фигури 46A и 46B са представени снимки с висока разделителна способност, съответно от SEM и TEM, доказващи разделянето на PLA фибрилите от Ecoflex матрицата след пресоване. Определени са наноразмерният диаметър на фибрилите и кристалната структура на матрицата.



**Фигура 46.** (A) Снимка с високо-разделителна сканираща микроскопия **High resolution SEM** на образци от PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) влакна, показваща диаметъра на фибрилите и кристалните зони в матрицата намиращи се между индивидуалните PLA фибрили; (B) TEM снимка представяща PLA микрофибрилите и ламелните зони в изотропизираната Ecoflex матрица на композита.

Термофизичните свойства на изследваните образци са измерени чрез Диференциална сканираща калориметрия **DSC 821 Mettler Toledo**.

Резултатите получени от Диференциалната сканираща калориметрия (DSC) дават информация за фазовите преходи и степента на кристалност на полимерите. Измерванията с DSC метода са извършени за екструдирани смеси, фибрилизирани влакна и MFC структурирани PLA/Ecoflex композити с различно тегловно съотношение на двата компонента. В таблица 6 са обобщени термичните свойства на всички изследвани образци, а на фигура 47 са представени DSC термограмите в режим на нагряване и охлаждане на екструдираните и фибрилизираните PLA/Ecoflex смеси.

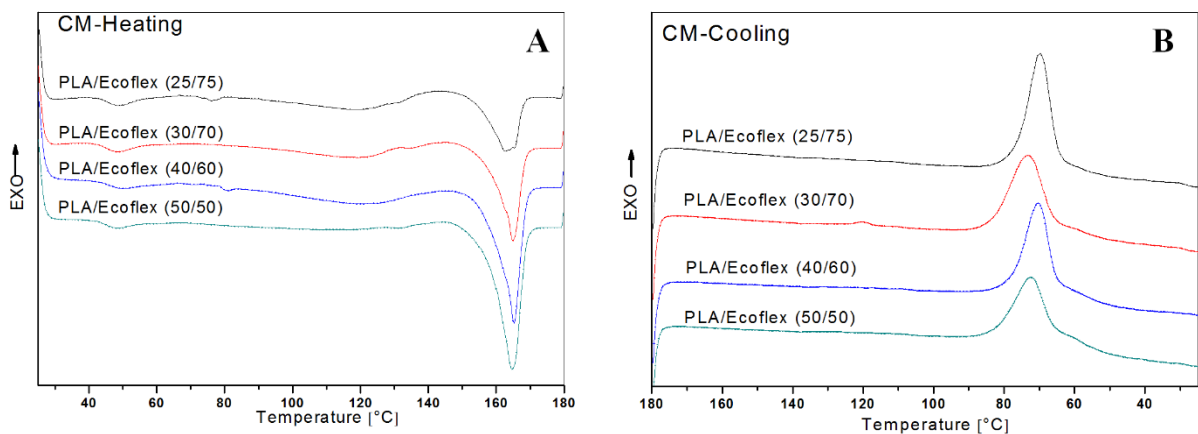


**Фигура 47.** DSC термограми в режим на нагряване на: (A) екструдирани PLA/Ecoflex смеси и (B) ориентирани PLA/Ecoflex влакна.

На фигура 47A за екструдираната PLA/Ecoflex смес се регистрират две температури на встъкляване ( $T_g$ ), съответстващи на изходните полимери, при температура около 64 °C за PLA хомополимера и при температура 45 °C за Ecoflex съполимера. Наблюдава се и екзотермичен пик на кристализация ( $T_c$ ) за PLA при  $T = 90$  °C, и област на топене за Ecoflex фракцията в температурната област 110 ÷ 120 °C. При по-нататъшното нагряване, за PLA компонента в сместа се наблюдават два пика на топене, неинтензивен при  $T = 163$  °C и интензивен при  $T = 166$  °C, доказващи наличието на кристали с различен размер и съвършенство. Степента на кристалност ( $W_c$ ) на Ecoflex и PLA са съответно 8 % и 32 %. Енталпията на топене ( $\Delta H_0$ ) за 100 % кристални PLA и Ecoflex са съответно 93 J/g [29] и 114 J/g [30].

На DSC термограмите в режим на нагряване (фигура 47B) след фибрилизация на екструдираните PLA/Ecoflex смеси, се наблюдава, че температурата на встъкляване ( $T_g$ ) на PLA се повишава с около 10 °C, докато екзотермичният пикът на кристализация ( $T_c$ ) на PLA се измества към по-ниска температура (с около 10 °C, в сравнение с този за екструдираните смеси). Кристализация след температурата на встъкляване ( $T_g$ ) е явление, което се дължи на механичното изтегляне (фибрилизация) на PLA вериги в аксиална посока, което благоприятства кристализацията на хомополимера веднага след  $T_g$ . При ориентираните PLA/Ecoflex влакна се наблюдават ендотермични пикове на топене в същия температурен интервал 160 ÷ 170 °C като при компонентите в екструдираните смеси.

В сравнение със степента на кристалност на екструдираните смеси,  $W_c$  на фракциите в ориентираните влакна са с 10 % по-високи (таблица 6). Тези резултати потвърждават резултатите от WAXS снимките и дифрактограмите на екструдираните смеси и ориентираните влакна, представени на фигури 43 и 44. Това явление се дължи на кристализацията на PLA, индуцирана в резултат на механичен стрес.



**Фигура 48.** DSC термограми: (A) в режим на нагряване и (B) в режим на охлаждане на PLA/Ecoflex композити с различно тегловно съотношение, получени чрез пресоване.

На Фигура 48 са представени DSC термограми в режим на нагряване и охлаждане на получените MFC композити след термично пресоване. Ясно се вижда, че след изотропизация на матрицата, не се регистрират температура на встъкляване ( $T_g$ ) и температура на кристализация ( $T_c$ ) на PLA. Наблюдава се само ясно изразен ендотермичен пик на топене ( $T_m$ ) на PLA компонента в MFC композитите при  $T = 166$  °C. Отново степента на кристалност на PLA нараства 5 %, в сравнение с PLA фракциите за ориентираните образци. Това явление се наблюдава за PLA фракцията във фибрилизирани влакна преди и след пресоване при температура  $T = 140$  °C (таблица 6). Може да се отбележи, че получаването на MFC композити след изотропизация на матрицата от Ecoflex, представлява допълнителен изотермичен процес на отгряване при  $T = 140$  °C, на ориентираните влакна с фиксирани краища. Тази обработка при нагряване, допринася за процесите на реорганизация на структурираните PLA вериги и усъвършенстване на кристалната структура. Отново тези резултати са в добро съгласие с WAXS снимките и дифрактограмите на ориентираните влакна и получените от тях композитни материали (фигури 43 и 44).

Както вече е доказано в литературата [31], че в резултат на механичен стрес по време на процесите на изтегляне в PLA се формират  $\beta$  кристални структури с орто-ромбични вериги в разтегната хелатна конформация. Установено е, че при отгряване на ориентираните влакна с фиксирани краища при температури над  $T_g$  ( $T = 140$  °C),  $\beta$  PLA кристалите се трансформират в  $\alpha$  кристали. В резултат на процесите на реорганизация в структурата на композита, степента на кристалност на PLA фракциите се увеличава до 48 %, което е с около 10 % по-висока в сравнение със същата фракция при фибрилизирани влакна преди получаването на MFC структурата (таблица 6).

Качествена оценка за кристализационната способност на PLA и Ecoflex фракциите в сместа може да се получи и от DSC термограмите, в режим на охлаждане на образците от стопилка. Експерименталните данни от термограмите при охлаждане са обобщени в таблица 6. Поради по-ниската кристализационна способност на PLA в сравнение с Ecoflex, за PLA фракциите не се наблюдава екзотермичен пик на кристализация ( $T_c$ ) след охлаждане от стопилка.

Поради високата кристализационна способност на Ecoflex фракцията при всички MFC структурирани композити в DSC термограмите се наблюдават екзотермични пикове на кристализация ( $T_c$ ) в областта от  $60 \div 80$  °C (таблица 6). Регистрираните температура и

енталпия на кристализация ( $T_c$  и  $\Delta H_c$ ), за изходния Ecoflex получени в процеса на охлаждане от стопилка са по-ниски, в сравнение с Ecoflex фракциите в MFC композитите ( $T_c$  е с  $15^\circ\text{C}$ , по-ниска и  $\Delta H_c$  е с около  $7\text{ J/g}$ ) (таблица 6). Това се дължи на зародишообразуваният ефект на PLA и затруднения кристален растеж на Ecoflex фракциите в MFC композитите след охлаждане от стопилка (фигура 48).

**Таблица 6.** Термофизични свойства на изходните PLA и Ecoflex и на получените PLA/Ecoflex смеси в различно тегловно съотношение.

| Sample                 | $T_g$ ( $^\circ\text{C}$ ) |     | $T_c$ ( $^\circ\text{C}$ ) | $\Delta H'_c$ (J/g) | $T_m$ ( $^\circ\text{C}$ ) |     | $\Delta H'_m$ (J/g) |     | $W_c$ (%) |     | $T_c^*$ ( $^\circ\text{C}$ ) | $\Delta H_c^*$ (J/g) |    |
|------------------------|----------------------------|-----|----------------------------|---------------------|----------------------------|-----|---------------------|-----|-----------|-----|------------------------------|----------------------|----|
|                        | Eco                        | PLA | PLA                        | PLA                 | Eco                        | PLA | Eco                 | PLA | Eco       | PLA | Eco                          | Eco                  |    |
| <b>PLA</b>             |                            |     |                            |                     |                            |     |                     |     |           |     |                              |                      |    |
| Extruded               | —                          | 63  | 106                        | 26                  | —                          | 164 | —                   | -34 | —         | 8   | —                            | —                    |    |
| Drawn                  | —                          | 65  | 80                         | 3                   | —                          | 165 | —                   | -43 | —         | 43  | —                            | —                    |    |
| CM                     | —                          | —   | —                          | —                   | —                          | 166 | —                   | -42 | —         | 47  | —                            | —                    |    |
| Eco CM                 | 45                         | —   | —                          | —                   | 120                        | —   | -12                 | —   | 11        | —   | 55                           | 21                   |    |
| <b>PLA/Eco (25/75)</b> |                            |     |                            |                     |                            |     |                     |     |           |     |                              |                      |    |
| Extruded               | 46                         | 64  | 91                         | 12                  | 120                        | 163 | 166                 | -8  | -40       | 7   | 31                           | 71                   | 15 |
| Drawn                  | 45                         | 70  | 78                         | 5                   | 119                        | 162 | 166                 | -9  | -40       | 8   | 41                           | 70                   | 17 |
| CM                     | 46                         | 75  | —                          | —                   | 120                        | 163 | 165                 | -7  | -40       | 6   | 46                           | 70                   | 16 |
| <b>PLA/Eco (30/70)</b> |                            |     |                            |                     |                            |     |                     |     |           |     |                              |                      |    |
| Extruded               | 47                         | 63  | 90                         | 13                  | 119                        | 164 | 166                 | -8  | -43       | 7   | 32                           | 73                   | 16 |
| Drawn                  | 47                         | 72  | 82                         | 4                   | 121                        | 162 | 165                 | -9  | -43       | 8   | 43                           | 73                   | 17 |
| CM                     | 46                         | —   | —                          | —                   | 120                        | 165 | —                   | -6  | -43       | 5   | 48                           | 74                   | 16 |
| <b>PLA/Eco (40/60)</b> |                            |     |                            |                     |                            |     |                     |     |           |     |                              |                      |    |
| Extruded               | 46                         | 64  | 90                         | 15                  | 121                        | 162 | 166                 | -10 | -45       | 9   | 32                           | 71                   | 15 |
| Drawn                  | 46                         | 72  | 79                         | 7                   | 120                        | 162 | 166                 | -9  | -45       | 8   | 42                           | 71                   | 15 |
| CM                     | 47                         | 73  | —                          | —                   | 120                        | 166 | —                   | -8  | -46       | 7   | 49                           | 70                   | 16 |
| <b>PLA/Eco (50/50)</b> |                            |     |                            |                     |                            |     |                     |     |           |     |                              |                      |    |
| Extruded               | 46                         | 64  | 89                         | 14                  | 122                        | 163 | 166                 | -12 | -44       | 9   | 32                           | 72                   | 14 |
| Drawn                  | 46                         | 71  | 81                         | 4                   | 123                        | 162 | 166                 | -11 | -42       | 9   | 41                           | 73                   | 16 |
| CM                     | 45                         | —   | —                          | —                   | 123                        | 166 | —                   | -6  | -45       | 5   | 48                           | 72                   | 16 |

\*After cooling mode

Механичните тестове на екструдирани, фибрилизирани и пресовани образци са проведени с помощта на апарат за механични тестове **Zwick 1474** при стайна температура и скорост на деформация  $5\text{ mm/min}$ . От експерименталните криви приложена сила-деформация са определени: модулът на еластичност (**E**), якостта на опън ( **$\sigma$** ) и деформацията ( **$\epsilon$** ).

В зависимост от състава на MFC структурираните композити (получените филми) е установено, че пресованите PLA/Ecoflex образци притежават от 20 до 40 пъти по-високи стойности за модулът на еластичност (**E**) и от 3.5 до 6.5 пъти по-високи стойности за якостта на опън ( **$\sigma$** ) в сравнение с тези на изходния Ecoflex [32].

Барьерните свойства за изходните PLA и Ecoflex и на получените от тях PLA/Ecoflex композити с тегловни съотношения съответно 25/75 и 50/50 тегл %, са определени при стайна температура и 50 % влажност, чрез камера **XENOTEST ALPHA-LM (Heraeus Instruments, Germany)** [32]. Експерименталните резултати за барьерната пропускливост на получените структурирани MFC композити на основата на включените в тях PLA фибрили, показват подобрене на барьерните им свойства спрямо пропускливостта на кислород. В сравнение с изходния Ecoflex, пропускливостта на композитите намалява между 2 пъти за PLA/Ecoflex (25/75 тегл. %) композита и 5 пъти за PLA/Ecoflex (50/50 тегл. %) композита [32].

Механичните и барьерните свойства на MFC структурираните PLA/Ecoflex композити, разкриват техния потенциал за приложения като биоразградими материали за опаковъчни цели в хранителната промишленост.



## НАУЧНИ ПРИНОСИ

- Приложена е модифицираната концепция за усилените микрофibrилни композити (MFC) за получаване на полимерни подложки от PLLA фибрили с използване на нетоксичен разтворител от ориентирани PLLA/EVAL смеси. Получени са подложки и композити от биоразградимия PLLA полимер, които отговарят на условията за приложимост на съвременните биоматериали.
- Оптимизирани са условията за селективно изолиране на PLLA фибрили от ориентирани PLLA/EVAL влакна и са получени нови биоматериали (подложки от фибрили, полимерни носители и композити) с подобрени механични и физикохимични свойства.
- Определени са структурата и надмолекулната организация на получените ориентирани PLLA/EVAL влакна, изолирани PLLA фибрили и получените от тях подложки и композити чрез термично, структурно, химично, морфологично и механично охарактеризиране със съвременни физикохимични методи.
- С помощта на *in vitro* и *in vivo* изследвания е доказана потенциалната приложимост на получените биоматериали от фибрилни PLLA подложки в медицината за костно тъканни заместители.
- Приложена е концепцията за усилените микрофibrилни композити за получаване на MFC структурирани PLLA/Ecoflex композити, с подобрени механични и бариерни свойства, с потенциални приложения като биоразградими материали за опаковъчни цели в хранителната промишленост.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Evstatiev, M., Fakirov, S.: Microfibrillar reinforcement of polymer blends. *Polymer* 33 (1992), pp. 877-880.
2. Shields, R. J., Bhattacharyya, D., Fakirov, S.: Fibrillar polymer-polymer composites: morphology, properties and applications. *Journal of Materials Science* 43 (2008), pp. 6758-6770.
3. A. Lederer, C. Harnisch, D. Bhattacharyya, S. Fakirov, *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Tissue Engineering* Vol.7 (2010) pp 1-6.
4. Evstatiev, M., Fakirov, S., Krasteva, B., Friedrich, K., Covas, J., Cunha, A.: Recycling of poly (ethylene terephthalate) as polymer-polymer composites. *Polymer Engineering and Science* 42 (2002), pp. 826-835.
5. Факиров Ст., **СЛЕД СЕДЕМДЕСЕТТЕ (спомени в бъдещето)**, Университетско издателство "Св. Климент Охридски", София 2011.
6. Garlotta, D. *J. Polym. and the Environ.* 2002, 9, 63-84.
7. Cartier, L.; Lotz, B. *Polymer*. 2000, 41, 8909-8919.
8. Cicero, J. A.; Dorgan, J. R.; Janzen, J.; Garrett, J.; Runt, J.; Lin, J. S. *J. Appl. Polym. Sci.* 2002, 86, 2839-2846.
9. Zhang, J.; Duan, Y.; Sato, H.; Tsuji, H.; Noda, I.; Yan, S.; Ozaki, Y. *Macromolecules*. 2005, 38, 8012-8021.
10. Yao Wang\*, Jun Wu, Fei Wei, A treatment method to give separated multi-walled carbon nanotubes with high purity, high crystallization and a large aspect ratio, *Carbon*, 41 (2003) 2939-2948.
11. Zhang K, Wang Y, Hillmyer MA, Francis LF. Processing and properties of porous poly (L-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials* 2004;25:2489-500.
12. Zhang R, Ma PX. Porous poly (L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J Biomed Mater Res* 1999;45:285-93.
13. Fischer EW, Sterzel HJ, Wegner G, Kolloid ZZ. *Polymer* 1973;251:980-990.
14. Sui G, Yang X, Mei F, Hu X, Chen G, Deng X, Ryu S. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *J. Biomed. Mater. Res.*, 2007 82(2), 445.
15. R. Ilieva, E. Dyulgerova, O. Petrov, R. Aleksandrova and R. Titorenkova, Effects of high energy dry milling on biphasic calcium phosphates, *Advances in Applied Ceramics*, 2012
16. Ihm D W, Hiltner A, Baer E (1991) in: Baer E, Moet A (ed) *High Performance Polymers Hanser*, Munich.
17. Evstatiev M, Fakirov S, Schultz JM, Friedrich K (2001) *Polym Eng Sci* 41: 192.
18. Evstatiev M, Fakirov S, Krasteva B, Friedrich K, Covas J, Cunha A (2002) *Polym Eng Sci* 42: 826.
19. Friedrich K, Kamo H, Evstatiev M, Fakirov S (2004). *J Macromol Sci: Phys* 43: 776.
20. Friedrich K Evstatiev M, Fakirov S, Evstatiev O, Ishii M, Harrass M (2005) *Comp Sci Technol* 65: 107.
21. Fakirov S, Shields RJ, Fuchs C, Friedrich K, Bhattacharyya D. (2008) *Int J Polym Mater* 1: 33-53.
22. Shields RJ, Bhattacharyya D, Fakirov S. (2008) *Composites: Part A* 39: 940.
23. Mohanty AK, Misra M, Hinrichsen G (2000) *Macromol Mater Eng* 276/277: 1.
24. Plackettanda D, Vazquez Z (2004) In: Baillie C (ed) *Green composites. Woodhead Publishing Ltd & CRC Press LLC*.
25. Witt U, Einig T, Yamamoto M, Kleeber I (2002) *Chemosphere* 44: 289.
26. BASF 2001, 23/02/01-last update, *A News Service Provided by BASF [Homepage of BASF]*.
27. Shi XQ, Ito H, Kikutani T (2005) *Polymer* 46: 11442.
28. Cicero JA, Dorgan JR, Janzen J, Garrett J, Runt J, Lin JS (2002) *J Appl Polym Sci* 86: 2839.
29. NatureWorks® PLA Polymer 6202D, Data Sheet (2006).
30. Herrera R, Franco L, Rodríguez-Galán A, Puiggali J (2002) *J Polym Sci Part A- Polym Chem* 40: 4141.
31. Garlotta D (2002) *J Polym Env* 9: 63.
32. Evstatiev M, Simeonova S, Friedrich K, X.-Q. Pei, Formanek P (2013) *J Mater Sci*

**Резултатите от дисертационната работа са представени в следните публикации, научни съобщения и научни проекти:**

#### **ПУБЛИКАЦИИ**

1. S. Simeonova, M. Evstatiev, W. Li, T. Burkhart. **Fabrication and Characterization of Biodegradable Polymer Scaffolds Adapting Microfibrillar Composite Concept.** *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 51 (17), pp.1298-1311, **2013**

2. M. Evstatiev, S. Simeonova, K. Friedrich, X.-Q. Pei, P. Formanek. **MFC-structured biodegradable poly(L-lactide)/poly(butylene adipate-co-terephthalate) blends with improved mechanical and barrier properties.** *Journal of Material Science*, 48 (18), pp.6312-6330, **2013**

3. S. Simeonova, V. Nanev, P. Dimitrov, I. Vladov, M. Alexandrov, M. Gabrashanska, E. Dyulgerova, M. Evstatiev. **In vivo experimental investigations of bone scaffolds – composite calcium phosphate/poly L-lactide acid PLLA.** Proceedings of the Scientific Conference with International participation, University of Forestry, Faculty of Veterinary medicine, **2012**

#### **УЧАСТИЕ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ:**

1. **Договор № 178/2009 год.** на тема “Създаване на нова технология за получаване на биоразградими подложки за тъканното инженерство”, финансиран от Научни изследвания на СУ “Св. Климент Охридски”

2. **Договор ДТК 02/70/17.12.2009 год.** на тема “Биоматериали за костни импланти-калциево-фосфатни базирани керамики, цименти и хибридни материали”, финансиран от МОМН, Фонд Научни Изследвания

## НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ

### Устни съобщения:

1. S. Simeonova, M. Evstatiev “*New materials for medicine application from a biodegradable fibrillar polymers composite*” VIII National Conference on Chemistry for Students and PhD Students, Sofia University, Faculty of Chemistry, May 20-21, **2009**, Sofia, Bulgaria
2. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Using of microfibrillar composite – concept for manufacturing of biodegradable scaffolds for medicine application*” Scientific Seminar, Sofia University, Faculty of Chemistry and Pharmacy, April 25-26, **2009**, Guletshtitsa, Bulgaria
3. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Manufacturing of new, biodegradable materials for medicine application from fibrillar polymers blends*” IX National Conference on Chemistry for Students and PhD Students, Sofia University, Faculty of Chemistry, May 18-19, **2010**, Sofia, Bulgaria
4. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Manufacturing and characterization of PLLA scaffolds for tissue engineering*” X National Conference on Chemistry for Students and PhD Students, Sofia University, Faculty of Chemistry, May 17-19, **2011**, Sofia, Bulgaria
5. S. Simeonova, M. Evstatiev “*New method for manufacturing of biodegradable scaffolds for fibrillar polymers blends*” Scientific Seminar, Sofia University, Faculty of Chemistry and Pharmacy, May 27-29, **2011** Guletshtitsa, Bulgaria
6. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Using two different methods for manufacturing of biodegradable scaffolds for medicine application*” Scientific Seminar UNION, Sofia University, Faculty of Chemistry, June 10-12, **2011**, Bankya, Bulgaria
7. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Fibrillar reinforced scaffolds for medical application based on biodegradable PLLA and chitosan*” WORKSHOP “Materials for Medicine and Pharmacy”, Sofia University, Faculty of Chemistry and Pharmacy - Beyond Everest Project, May 9-12, **2012**, Velingrad, Bulgaria
8. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Manufacturing and characterization of PLLA scaffolds for tissue engineering*” XI National Conference on Chemistry for Students and PhD Students, Sofia University, Faculty of Chemistry and Pharmacy, May 14-16, **2012**, Sofia, Bulgaria
9. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Manufacturing and characterization of hybrid scaffolds for tissue engineering*” Scientific Seminar, Sofia University, Faculty of Chemistry and Pharmacy, June 8-10, **2012**, Guletshtitsa, Bulgaria
10. S. Simeonova, M. Evstatiev, E. Dyulgerova, R. Aleksandrova, M. Gabrashanska, M. Aleksandrov, D. Rabadjieva, St. Tepavitcharova “*Manufacturing of scaffolds with interconnected porous hydroxyapatite ceramic in poly (L-lactic acid) matrix for bone tissue engineering*” Seventh Workshop on Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, The Bulgarian Academy of Sciences, November 27-29, **2012**, Sofia, Bulgaria

## Постерни съобщения:

1. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Applying of the MFC Concept for Manufacturing of Biodegradable Scaffolds*”, Tissue engineering, stem cells and biocompatibility testing of biomaterials, Practical Training Course, August 24 - September 03, **2009**, Aachen University, Germany
2. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Manufacturing of Biodegradable Scaffolds from PLA/EVOH Drawn Blends*”, 3<sup>rd</sup> International Symposium “Advanced Micro – and Mesoporous Materials’ **2009**, September 06-09, Albena, Bulgaria
3. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Biodegradable Scaffolds from PLA/EVOH Drawn Blends*”, Scientific Seminar UNION, Institute of Polymers, Bulgarian Academy of Sciences, June 03, **2010**, Sofia, Bulgaria
4. S. Simeonova, M. Evstatiev “*Manufacturing of Biodegradable Scaffolds, based on Polylactic Acid*”, Conference “Tissue Engineering and Regenerative Medicine”, June 13-17, **2010**, Galway, Ireland
5. S. Simeonova, M. Evstatiev, St. Tepavitcharova “*Manufacturing and Biomineralisation of Scaffolds, based on Polylactic Acid Fibrils*”, Second Workshop on SIZF Mat 2, UNION, September 19-21, **2010**, Nesseber, Bulgaria
6. S. Simeonova, M. Evstatiev, “*Microfibrillar structured polymer materials from PLLA/Ecoflex blends for packaging applications*”, XVII National Symposium open to International Participation ‘POLYMERS 2012’, May 31 – June 2, **2012**, Ribaritsa, Bulgaria
7. S. Simeonova, M. Evstatiev, “*Manufacturing and investigation of fibrillar reinforced scaffolds for medical application, based on biodegradable PLLA and chitosan*”, International Conference “Advanced Functional Materials”, Sofia University, Faculty of Chemistry and Pharmacy - Beyond Everest Project, September 05-08, **2012**, Riviera Resort, Bulgaria
8. S. Simeonova, V. Nanev, P. Dimitrov, I. Vladov, M. Alexandrov, M. Gabrashanska, E. Dyulgerova, M. Evstatiev, “*In vivo experimental investigations of bone scaffolds – composite calcium phosphate/poly L-lactide acid PLLA*”, Scientific Conference with International participation, University of Forestry, Faculty of Veterinary medicine, November 30-December 2, **2012**, Yundola, Bulgaria