

УДК 615.31:541.64:539.6:615.28:617-089.844:616.71-74  
УКПП  
№ держреєстрації 0116U002625  
Інв. №

Міністерство освіти і науки України  
Сумський державний університет  
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2, (0542) 334108

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Проректор з наукової роботи  
д-р фіз.-мат.наук, професор  
\_\_\_\_\_ А.М. Черноус

ЗВІТ  
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ  
**РОЗРОБКА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ НАНОСТРУКТУРОВАНИХ  
АПАТИТ-БІОПОЛІМЕРНИХ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ ТА  
ПОКРИТТІВ ДЛЯ МЕДИЦИНИ**

(остаточний)

Начальник НДЧ,  
канд. фіз.-мат.наук, старш.наук.співроб.

Д.І. Курбатов

Керівник НДР,  
чл.-кор. НАНУ,  
д-р фіз.-мат.наук

Л.Ф. Суходуб

2017

Рукопис закінчено 20 грудня 2017 р.

Результати даної роботи розглянуті науковою радою СумДУ  
протокол від 28 грудня 2017р. №3

**СПИСОК АВТОРІВ**

Керівник НДР чл.-кор. НАНУ,  
д-р фіз.-мат.наук, професор,  
завідувач кафедри ББФБІ

Л.Ф.Суходуб  
(Вступ, розділ 4, 7,  
8, Висновки)

20.12.2017

Відповідальний виконавець –  
канд.хім.наук,  
старш.наук.співроб. кафедри  
ББФБІ

Л.Б. Суходуб  
(розділ 1, 2, 3, 5, 6,  
7)

20.12.2017

Виконавці:

мол.наук.співроб. науково-  
навчального центру «Нано- і  
біоматеріали»

О.С. Станіславов  
(підрозділ 2.4; 3.1-  
3.5).

20.12.2017

мол.наук.співроб. науково-  
навчального центру «Нано- і  
біоматеріали»

В.М. Кузнецов  
(підрозділ 1.1.2,  
1.3.2, 2.1.2, підрозділ  
5.2)

20.12.2017

аспірант кафедри ББФБІ

О.О. Мартинюк  
(підрозділ 1.1, 1.3)

20.12.2017

аспірант кафедри  
наноелектроніки

А.М. Мешков  
(підрозділ 1.3)

20.12.2017

мол.наук.співроб. кафедри  
ББФБІ

В.В. Наталіч  
(підрозділ 8.1)

20.12.2017

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 162 с., 61 рис., 26 табл., 119 джерел.

ГІДРОКСИАПАТИТ, ХІТОЗАН, АЛЬГІНАТ НАТРІЮ, НАНОКОМПОЗИТИ, СТРУКТУРА, БІОСУМІСНІ ПОКРИТТЯ, ФІЗИКО-МЕХАНІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, ПРОТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ.

Об'єкт дослідження – процеси біомінералізації полімерних матриць, властивості, структура, хімічний склад та біоактивність апатит-полімерних зразків; вплив органічних та неорганічних включень на стан кристалічної решітки гідроксиapatиту (НА); біосумісність нанокompatитних матеріалів і покриттів *in vivo*.

Мета роботи – дослідження процесів біомінералізації, впливу іонів металів, білкових молекул, наночастинок різної природи на структуру матеріалу; розробка технологій отримання наноструктурованих матеріалів на основі НА та природних полімерів.

Зроблено наступне: розроблені методики синтезу апатит-полімерних композитів на основі НА, досліджені їх механічні та хімічні властивості, вплив полімеру, ZnO, ультразвуку, надвисоких частот на формування НА; методики утворення наночастинок ZnO, ZnS та досліджено їх протимікробні властивості; створений біоматеріал на основі фосфорельованого хітозану. На модифікованій поверхні титанового субстрату отримано багат шарові покриття, що складаються з біоінертного шару пористого титану та біоактивного зовнішнього шару на основі НА з вмістом полімерів та ZnS. Досліджено взаємодію біоактивних покриттів з модельними фізіологічними розчинами, досліджені їх протимікробні властивості. Розроблені методики отримання біоматеріалів застосовано в циклі лабораторних робіт для магістрів за спеціальністю 8.163 "Біомедична інженерія" та впроваджено в навчальний процес.

## ЗМІСТ

<b>Перелік умовних позначень та скорочень .....</b>	<b>8</b>
<b>Передмова .....</b>	<b>9</b>
<b>Вступ .....</b>	<b>19</b>
<b>1 Встановлення умов та механізмів утворення нанокристалітів на в структурі полісахаридних матриць. Вивчення впливу природних біополімерів на мінеральну складову кісткової тканини .....</b>	<b>21</b>
1.1 Полімер-композитні матеріали.....	22
1.1.1 Нанокompозитний матеріал на основі НА та Alg. Методика синтезу	22
1.1.2 Результати дослідження .....	23
1.1.3 Дослідження біоактивності <i>in vitro</i> .....	29
1.2 Порівняльна характеристика матеріалів з різною полімерною складовою.....	32
1.3 Нанокompозитний матеріал на основі на з вмістом ZnO .....	35
1.3.1 Методика синтезів.....	36
1.3.2 Результати дослідження .....	39
1.4 Механічні властивості апатит полімерних композитів.....	44
1.4.1 Механічні властивості композитів з вмістом ZnO .....	44
1.4.2 Механічні властивості композитів з вмістом Alg та желатини.....	46
<b>2 Розробка біоміметичних методів отримання композитних порошків, гелів, паст, гранул на основі га та природних обо синтетичних полімерів, а саме: альгінат натрію, хітозан, поліакриламід, виготовлення на основі гідрогелів ін'єкційного біоматеріалу для неінвазивних методів лікування травм кістки .....</b>	<b>48</b>
2.1 Біоматеріал для ін'єкцій у формі гідрогелю .....	48
2.1.1 Методика синтезу.....	49
2.1.2 Результати дослідження .....	50
2.2 Дослідження впливу альгінату натрію на структурну цілісність та деградацію матеріалу для ін'єкцій на основі на та хітозану .....	56

2.3 Композитний матеріал біомедичного призначення на основі фосфорельованого хітозану у формі порошку та гранул.....	59
2.3.1 Характеристика матеріалу та його складових матеріалу.....	59
2.3.2 Методика синтезу.....	65
2.3.3 Дослідження композитного матеріалу <i>in vivo</i> . Морфологічні особливості регенерації кістки після імплантації отриманого біоматеріалу в її дефект.....	65
2.4 Вплив ультразвуку та надвисоких частот на формування гідроксиапатиту, як компоненти композитних біоматеріалів.....	68
2.5 Технологія синтезу апатит-полімерного матеріалу у формі гелю для стоматологічного застосування.....	79
2.5.1 Методика синтезу аквагелю та його характеристика.....	79
2.5.2 Апатит-полімерний матеріал у формі гелю для стоматологічного застосування.....	82
<b>3 Розробка технології інкорпорування кальцій фосфатних матеріалів наночастинками хітозану, іонами срібла, наночастинками сполук оксиду та сульфату цинку, магнетиту, розробка методики утворення наночастинок сполук цинку (ZnO, ZnS) та магнетиту (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), дослідження їх фізичних та структурних особливостей, протимікробних властивостей у складі апатит-полімерних біокомпозитних матеріалів медичного призначення.....</b>	<b>83</b>
3.1 Методики утворення наночастинок магнетиту (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ).....	83
3.2 Методика синтезу композитного матеріалу магнетит-альгінат.....	84
3.3 Методика синтезу композитного матеріалу магнетит-хітозан.....	87
3.4 Методика синтезу композитного матеріалу магнетит-желатина.....	88
3.5 Методика синтезу композитного матеріалу магнетит-колаген.....	89
3.6 Композити ZnS-ZnO та ZnS-ZnO-Alg.....	90
3.6.1 Методика синтезу композиту ZnS-ZnO.....	91
3.6.2 Методика синтезу композиту ZnS-ZnO-Alg.....	92
3.6.3 Результати дослідження.....	92

3.7 Протимікробні властивості ZnS-ZnO та ZnS-ZnO-Alg, як компонентів композитних біоматеріалів.....	96
<b>4 Розробка технології отримання мультишарових покриттів на імплантати з підвищеними фізико-механічними властивостями .....</b>	<b>99</b>
<b>5 Отримання біоактивних покриттів на основі хітозану та НА, нанесених на модифіковану титанову поверхню, дослідження їх морфології та структури та механічних властивостей. <i>In vitro</i> дослідження протимікробних властивостей покриттів на основі НА та хітозану .....</b>	<b>104</b>
5.1 Модифікація поверхні титанового субстрату та дослідження її впливу на структуру кальцій фосфатних покриттів .....	104
5.1.1 Модифікація поверхні титанового субстрату шляхом електрохімічного анодування .....	105
5.1.2 Підготовка поверхні шляхом хімічного та ультразвукового обезжирювання.....	108
5.1.3 Модифікація поверхні титанових субстратів біополімерними шарами.....	108
5.2 Формування біоактивних покриттів на основі гідроксиapatиту з додаванням біомолекул .....	109
5.2.1 Кальцій фосфатне покриття на анодованій та механічно відшліфованій поверхнях титанового субстрата .....	111
5.2.2 Біокомпозитні покриття на основі гідроксиapatиту з вмістом хітозану.....	114
<b>6 Дослідження властивостей біоактивних покриттів на основі гідроксиapatиту та натрію альгінату, нанесених на модифіковану поверхню. Дослідження впливу введених біомолекул на морфологію, фазовий склад, кристалічність покриттів з використанням сучасних методів аналізу .....</b>	<b>121</b>
6.1 Формування біоактивних покриттів на основі гідроксиapatиту з додаванням альгінату.....	121

6.2 Структурні та морфологічні характеристики біоактивних покриттів на основі НА та альгінату.....	125
<b>7 Модифікація сполуками цинку покриттів на титанових субстратах</b>	<b>128</b>
7.1 Методика нанесення покриття з ZnS на титановий субстрат.....	129
7.2 Методика нанесення покриття з ZnS, як поверхневий шар на кальцій фосфатне покриття на титановому субстраті.....	129
7.3 Дослідження структурних особливостей покриттів з вмістом НА та ZnS, отриманих методом термодепозиції.....	130
<b>8 Дослідження біоактивності наноструктурованих покриттів в модельних реакціях <i>in vitro</i></b> .....	<b>135</b>
8.1 <i>In vitro</i> дослідження протимікробних властивостей покриттів на основі НА та хітозану .....	135
8.2 Дослідження взаємодії біоактивних покриттів на основі гідроксиапатиту та альгінату натрію з модельним фізіологічним розчином (pbs).....	139
8.3 Дослідження протимікробних властивостей покриттів на основі ZnS	141
<b>Висновки</b> .....	<b>143</b>
<b>Перелік джерел посилання</b> .....	<b>150</b>

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ**

*Alg* – альгінат

*HA (ГА)* – гідроксиапатит

*ЕД* – електронна дифракція

*кdHA* – кальцій дефіцитний гідроксиапатит

*КТ* – кісткова тканина

*МБцК* – мінімальна бактерицидна концентрація

*МІК* – мінімальна інгібуюча концентрація

*ПЕМ* – просвічуюча електронна мікроскопія

*XRD* – рентгенівська дифракція

*ТЕМ* – растрова електронна мікроскопія

*CS* – хітозан

*СТ* – сполучна тканина

*ТКФ* – трикальційфосфат

*УЗ* – ультразвукове випромінювання

*НВЧ* – надвисокочастотне випромінювання

*PBS* – фосфатний буферний розчин

*SBF* – модельний фізіологічний розчин

*ТПФ* – трикальцій фосфат

*РФА* – рентгено-флуоресцентний аналіз



## ПЕРЕДМОВА

При виконанні поставлених завдань в рамках проекту були застосовані наступні сучасні інструментальні методи та методики дослідження отриманих матеріалів:

### *Рентгеноструктурний аналіз.*

Фазовий склад отриманих зразків був визначений методом рентгенівської дифракції (RD) на автоматизованому дифрактометрі ДРОН-3 (НПП «Буревестник», [www.bourevestnik.spb.ru](http://www.bourevestnik.spb.ru)). Система автоматизації ДРОН заснована на мікропроцесорному контролері, який забезпечує управління гоніометром ГУР-8 та передачу даних в цифровому вигляді на ПК. При дослідженні використовувалось випромінення  $\text{CuK}\alpha$  (довжина хвилі 0,154 нм), фокус по Бреггу-Брентано  $\theta$ - $2\theta$  ( $2\theta$  – брегівський кут). Величини струму та напруги складала 20 мА та 40 кВ відповідно. Дослідження зразків проводилося в режимі безперервної реєстрації (швидкість 4 °/хв.), діапазон кутів  $2\theta$  від 10° до 60°.

За умови режиму  $\theta$ - $2\theta$ , фокус рентгенівської трубки та вхідна щілина детектора розміщені на колі гоніометра, в центрі якого знаходиться плоский зразок. Реєстрація дифракційної картини відбувається при синхронному обертанні детектора та зразка навколо осі гоніометра, при чому кутова швидкість обертання детектора вдвічі більша, ніж швидкість обертання зразку. Результати експерименту передаються безпосередньо в програмний пакет підтримки експерименту DifWin-1 (ТОО «Эталон ПТЦ») для попередньої обробки. Ідентифікація кристалічних фаз проводилась за допомогою картотеки JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

За допомогою RD були обраховані міжплощинні відстані  $d_{hkl}$  ( $h$ ,  $k$ ,  $l$  – індекси Міллера) зразків, встановлено їх фазовий склад та розраховані параметри елементарної комірки  $a$  та  $c$  (для JCPDS 9-432  $a = 0,942$  нм,

$c = 0,688$  нм) по дифракційних лініях, що відповідають кристалографічним площинам (310) та (002), за наступними формулами:

$$a_{hk0} = 2d_{hk0} \frac{\sqrt{3}}{3} \sqrt{h^2 + hk + k^2} \quad \text{і} \quad c_{00l} = l \cdot d_{00l},$$

де  $a_{hk0}$  – параметр елементарної комірки, обчислений в площині (hk0),  
 $d_{hk0}$  – міжплощинна відстань площини (hk0); h, k, l – індекси Міллера,  
 $c_{00l}$  – параметр елементарної комірки, обчислений в площині (00l),  
 $d_{00l}$  – міжплощинна відстань площини (00l)

За даними RD було встановлено фазовий склад зразків та розраховано розміри кристалітів та рівень мікродеформацій за методом, описаним нижче, в кристалографічному напрямку [00C].

Середній розмір кристалітів за Шерером розраховується за наступною формулою [1]:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta_m \cos\theta},$$

де K – безрозмірна константа, залежна від форми кристалітів (приймаємо K=1),  $\lambda$  – довжина хвилі рентгенівського випромінювання,  $\beta_m$  – інтегральна ширина дифракційного профілю, фізичне розширення в якому відбувається лише через малі розміри ОКР,  $\theta$  – кут дифракції.

Рівень мікродеформацій  $\epsilon$  вимірюється як зміна міжплощинної відстані досліджуваного зразка у порівнянні з еталоном, в якому мікродеформації відсутні. Якщо фізичне розширення дифракційних ліній відбувається лише через мікродеформації кристалічної решітки, то рівень мікродеформацій визначається за наступною формулою:

$$\varepsilon = \frac{\beta_n}{4\text{tg}\theta},$$

де  $\beta_n$  – інтегральна ширина дифракційного профілю, фізичне розширення в якому відбувається лише через мікродеформації кристалічної решітки.

Експериментальне розширення дифракційних ліній  $B$  складається з фізичного  $\beta$  та інструментального  $b$ . Оскільки в нашому випадку дифракційні лінії найбільш точно апроксимуються функцією Коші, то  $B = \beta + b$ . Якщо на величину фізичного розширення впливають як малий розмір ОКР, так і присутність мікродеформацій кристалічної решітки, то  $\beta = \beta_m + \beta_n$ . Звідси отримаємо:

$$\beta = \frac{\lambda}{L \cos \theta} + 4\varepsilon \text{tg} \theta.$$

#### *Електронна мікроскопія та електронографія*

Електронно-мікроскопічні дослідження структури і фазового складу зразків проводилось з використанням просвічуючого електронного мікроскопу ПЕМ-125К при роботі у світлопольному та мікродифракційному режимі без введеної селекторної діафрагми. Прискорююча напруга складала 90 кВ.

При роботі у режимі мікродифракції дифракційна картина отримувалась від вибраної, незначної за розміром ділянки зразка, площа якої менша, ніж при звичайній дифракції. Цей метод дозволяє отримати результати з малої площі зразка, що важливо при дослідженні мікроструктури та багатофазних зразків.

Для розміщення об'єктів у предметній площині об'єктивної лінзи ПЕМ використовувались опорні сітки з міді (30×30 мкм) та нікелю (50×50 мкм). Оскільки об'єкти мали розміри менші за отвори сітки, вони розміщувались на тонких, прозорих для електронів, суцільних плівках вуглецю товщиною 20

нм. Дані зразки наносились на опорну сітку з плівкою вуглецю, попередньо закріплену в об'єктотримачі, завдяки диспергації суспензії ультразвуковим методом. Суспензія отримувалась методом розчинення гелю (порошку) дистильованою водою.

Дослідження зразків за допомогою просвічуючої електронної мікроскопії виконується після попередньої їх підготовки на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-А (ВАТ «СЕЛМІ», м. Суми). Просвічуюча електронна мікроскопія дозволяє безпосередньо виміряти розміри частинок (груп кристалів, окремих кристалів чи кристалітів) зразка, електронна дифракція дозволяє встановити фазовий склад зразків та параметри елементарної комірки.

Використовуючи знімки ПЕМ було виміряно розміри наночастинок у довжину  $D$ , оскільки у всіх випадках вони мають ниткоподібну структуру. За допомогою ЕД були обраховані міжплощинні відстані  $d_{hkl}$  ( $h, k, l$  – індекси Міллера) зразків, встановлено їх фазовий склад та розраховані параметри елементарної комірки  $a$  та  $c$  (для JCPDS 9 432  $a = 0,942$  нм,  $c = 0,688$  нм) по дифракційних лініях, що відповідають кристалографічним площинам (310) та (002), за наступними формулами:

$$a_{hk0} = 2d_{hk0} \frac{\sqrt{3}}{3} \sqrt{h^2 + hk + k^2} \quad \text{і} \quad c_{00l} = l \cdot d_{00l},$$

де  $a_{hk0}$  – параметр елементарної комірки, обрахований в площині (hk0),  
 $d_{hk0}$  – міжплощинна відстань площини (hk0),  $h, k, l$  – індекси Міллера,  
 $c_{00l}$  – параметр елементарної комірки, обрахований в площині (00l),  
 $d_{00l}$  – міжплощинна відстань площини (00l).

Морфологія поверхні сферичних частинок була досліджена за допомогою оптичного мікроскопа Primo star (Karl Zeiss Group).

#### *Рентгено-флюоресцентний аналіз*

Рентгено-флюоресцентний аналіз є одним із методів, який широко

застосовується для аналізу мінерального складу біологічних зразків завдяки можливості визначення великої кількості елементів в одній пробі з широким діапазоном концентрацій. В межах даної роботи проводили якісний аналіз ряду елементів у досліджуваних зразках на спектрометрі «Elvax-light» (Україна, Київ), який дозволяє визначати хімічні елементи в діапазоні від Na (Z=11) до U (Z=92). Технічні характеристики приладу: рентгенівська трубка Rh анод, берилієве вікно 140 мкм, рентгенівський детектор 165 еВ при 5,9 кеВ; програмне забезпечення Windows 98/NT/2K/XP. Рентгенограми отримували з використанням алюмінієвого фільтра протягом 120 ÷ 180 секунд.

#### *ІЧ спектроскопія*

Дослідження проводили на інфрачервоному спектрометрі на основі Фур'є перетворення Agilent Cary 63 FTIR (компанія Agilent Technologies, США), в якому застосовується сучасний метод ідентифікації молекулярних сполук і їх кількісного аналізу. Промені від ІЧ-джерела світла проходять через зразок і падають на детектор, який вимірює поглинання світла зразком. Величина поглинання дозволяє точно ідентифікувати молекулярну структуру зразка та визначити кількість речовини в суміші. Ядром спектроскопічної системи Agilent є інтерферометр Міхельсона.

#### *Вимірювання пористості та набухання композитів*

Для визначення пористості отриманих композитних матеріалів зразок масою  $m_0$  поміщали в мірний циліндр з відомим об'ємом етанолу ( $V_1$ ) і витримували протягом 30 хв. Об'єм етанолу з зануреним зразком відповідає  $V_2$ . Потім зразок, в пори якого проник етанол, витягували з циліндра, зважували ( $m_1$ ) і визначали об'єм спирту, що залишився ( $V_3$ ).

Пористість ( $\Pi$ ) розраховували за формулою [2]:

$$\Pi = \frac{m_1 - m_0}{\rho_{\text{ет}} \cdot (V_2 - V_3)} \cdot 100\%$$

де  $\rho_{\text{ет}}$  – густина етанолу.

Рівноважний ступінь набухання композитних матеріалів вивчали ваговим методом. Для цього висушені зразки заливали надлишком фізіологічного розчину і ставили в термошафу при заданій температурі. Через 24 години зразки діставали, фільтрувальним папером видаляли надлишок рідини з поверхні та зважували з точністю до четвертого знаку.

Розрахунок рівноважного ступеня набухання  $Q$  проводили за формулою:

$$Q = \frac{m - m_0}{m_0},$$

де  $m_0$  – маса сухого зразку, г;

$m$  – маса зразку, що набухнув до рівноважного стану, г.

#### *Оцінка протимікробної активності in vitro*

Вивчення протимікробної дії проводили із застосуванням поживних середовищ: Мюлера-Хінтона виробництва “Государственный научный центр прикладной микробиологии, отделение “Питательные среды” МЗРФ (г. Оболенск Московской обл., РФ), м'ясо-пептонного бульйону (МПБ) виробництва НВО “Питательные среды” (г. Махачкала, РФ).

У якості еталонних культур використано *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 6538-R, *C. albicans* ATCC 885-653, які одержано з лабораторії загальної мікробіології з музеєм мікроорганізмів ДУ “ІМІ НАМН”, Україна.

Приготування суспензії мікроорганізмів з концентрацією, яка відповідала 0,5 одиницям оптичної густини за шкалою Mc Farland, проводили з використанням приладу Densi-La-Meter (виробник PLIVA-Lachema, Чехія, довжина хвилі 540 нм) згідно інструкції до приладу та методики [3, 4]. При проведенні досліджень використовували однодобові культури мікроорганізмів.

Вивчення чутливості мікроорганізмів проводили модифікованим методом серійних розведень в рідкому поживному середовищі. Оскільки експериментальні композити є важкорозчинними речовинами, для

експерименту готували суспензії досліджуваних зразків заданих концентрацій у МПБ та вносили по 0,1 мл мікробної зависі досліджуваних тест-штамів мікроорганізмів. Мікробне навантаження становило  $10^7$  колоніє утворюючих одиниць на мілілітр (КУО/мл). Зразки вміщували в термостат, а результати визначали візуально за наявністю або відсутністю каламутності середовища в пробірках. Концентрація препарату в останній пробірці з прозорим середовищем (відсутність видимого неозброєним оком росту тест-штаму) відповідала мінімальній інгібуючій концентрації препарату (МІК).

Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБцК) з 2-3 останніх пробірок з прозорим середовищем проводили висів 0,1 мл вмісту з кожної пробірки на чашки Петрі з твердим поживним середовищем. Витримували в термостаті 18÷24 години при  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  і відмічали ту мінімальну концентрацію препарату, висів з якої не давав росту на агарі. Дана кількість препарату відповідає його МБцК. Метод серійних розведень у рідких поживних середовищах дозволяє дати кількісну оцінку протимікробної активності.

Додатково вивчення чутливості мікроорганізмів до експериментальних зразків проводили методом дифузії в агар у модифікації колодязів.

*Інтегральний показник протимікробної активності (А)* розраховували згідно методики [5] за наступною формулою:

$$A = \sqrt{\left(\frac{a_1 \cdot D_1}{25}\right)^2 + \dots + \left(\frac{a_n \cdot D_n}{25}\right)^2},$$

де  $a_n$  – частка хворих із виділеним патогенним мікроорганізмом при конкретному захворюванні, (діапазон 0 – 1);

$D_n$  – середня величина діаметра зон затримки росту досліджуваних тест-штамів мікроорганізмів;

А – інтегральний показник протимікробної активності препарату;

25 – нормуюча константа.

Діапазони ефективності показника складають:

1,0-1,5 – препарат проявляє слабку протимікробну активність;

1,5-2,5 – препарат проявляє середню протимікробну активність;

понад 2,5 – препарат проявляє виражену протимікробну активність.

Обробку результатів експериментів здійснювали за допомогою програми Microsoft Office Excel 2003. Для порівняння відмінностей дослідних груп з контрольною використовували однофакторний дисперсійний аналіз і критерій Даннета.

#### *In vitro дослідження біоактивності*

Біоактивність досліджуваних зразків визначали за зміною значення рН фізіологічного розчину (SBF), який за складом та концентрацією компонентів наближений до сировотки крові людини:  $\text{Na}^+$  -142 мМ,  $\text{K}^+$  – 5 мМ,  $\text{Mg}^{2+}$  – 1,5 мМ,  $\text{Ca}^{2+}$  – 2,5 мМ,  $\text{Cl}^-$  – 148,8 мМ,  $\text{HCO}_3^-$  – 4,2 мМ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  – 1,0 мМ,  $\text{SO}_4^{2-}$  – 0,5 мМ, рН=7,4 [6]. Зразки композитів однакової маси були занурені в розчин SBF об'ємом 5 мл та витримані в термошафі з постійною температурою 37°C протягом 7 днів. Вимірювання рН здійснювалося щоденно за допомогою рН-метра рН-150МІ.

#### *Дослідження механічних властивостей*

Дослідження механічних властивостей (стиснення) проводились на деформаційній машині МРК-1, гвинтового типу, яка призначена для дослідження механічних властивостей матеріалів шляхом їх квазістатичного навантаження з постійною швидкістю з автоматичним записом діаграм. Опорні площини повинні бути перпендикулярні напрямку прикладеного навантаження при стисненні і паралельні між собою. Сутність методу полягає у визначенні межі міцності та модуля пружності (модуля Юнга) при стисненні як відношення приросту напруги до відповідного приросту відносної деформації стиснення. Перед випробуванням вимірювали розміри зразків. Зразки встановлювали на опорних плитах випробувальної машини



так, щоб поздовжня вісь зразка співпадала з напрямом дії сили. Зразок навантажували при швидкості зближення плит випробувальної машини, що забезпечувало деформацію зразка.

Модуль пружності при стисненні ( $E$ ) в МПа розраховували за формулою

$$E = \frac{(F_1 - F_2) \cdot h_0}{S \cdot (h_2 - h_1) \cdot \frac{v_{зв.}}{v_{стр.}}},$$

де  $F_1$  - сила пружності, що відповідає навантаженню  $P_1$  на діаграмі деформації, Н;

$F_2$  - сила пружності, що відповідає навантаженню  $P_2$  на діаграмі деформації, Н;

$h_0$  – початкова висота зразка, мм;

$S$  – площа поперечного перерізу зразка, мм<sup>2</sup>;

$h_1$  – зміна висоти зразка, що відповідає навантаженню  $P_1$ , мм;

$h_2$  - зміна висоти зразка, що відповідає навантаженню  $P_2$ , мм;

$V_{гв.}$  – швидкість гвинта деформаційної машини, 0,25мм/хв;

$V_{стр.}$  – швидкість стрічки самописця, 12 мм/хв.

#### *Методика проведення експериментів на дослідних тваринах*

Експерименти на тваринах проводили у відповідності до вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших цілях» [7]. Моделювання дефекту в метафізарному відділі щурів виконували під загальним внутрішньом'язовим наркозом (аміназин – 10 мг/кг, кетамін – 50 мг/кг). Дефект кістки моделювали з допомогою стоматологічного бора (діаметр 2мм). Тварин після операції виводили з експерименту на 30 добу шляхом передозування ефіру для наркозу.

### *Гістологічний метод дослідження*

Для гістологічного дослідження у щурів виділяли стегнові кістки з ділянкою дефекту та фіксували їх в 10 мас.% розчині нейтрального формаліну, декальціювали в 4мас.% розчині азотної кислоти, обезвожували в спиртах з наростаючою концентрацією та поміщували в целлоїдин — в'язка речовина, яка виготовляється з коллодію та застосовується у вигляді спиртово-ефірного розчину для заливки кусочків тканини в процесі виготовлення гістологічних препаратів. Після виготовлення гістологічних зрізів з допомогою мікротому «Reichert», їх фарбували гематоксилином або еозином, а також пірофуксином за ван-Гізоном для світлової мікроскопії [8]. Метод фарбування мікропрепаратів в гістології за ван Гізоном призначений для вивчення структури сполучної тканини. Барвником служить суміш кислого фуксину і пікринової кислоти, причому перший компонент забарвлює колагенові волокна в яскраво-червоний колір, а другий додає іншим структурам тканини жовтого забарвлення. Аналізували та фотографували пофарбовані зрізи під мікроскопом «Olympus BX63».

## ВСТУП

Дослідження, розробка та виробництво матеріалів із заданим складом та властивостями, близькими до нативної кісткової тканини, є актуальною проблемою сучасного медичного матеріалознавства впродовж останнього десятиліття. Існує два основних напрямки створення матеріалів на основі нанокристалічних фосфатів кальцію: нанокристалічна кераміка та композиційні матеріали з біополімерними матрицями, армованими наночастинками фосфатів.

Загальновідомо, що кісткова тканина людини (КТ) являє собою складний композиційний матеріал з організованою на декількох рівнях мікроструктурою, що володіє унікальними механічними властивостями. Основною органічною складовою КТ є колаген типу I, вміст якого складає ~ 20 мас.%. Основною мінеральною фазою (~ 60 мас.%) є кальцій дефіцитний гідроксиапатит (кдНА), хімічний склад якого представлений формулою  $(Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x})$ . До складу КТ також входять вода ~ 9%, неколагенові білки ~ 3%, залишок – полісахариди, ліпіди [9]. НА найчастіше використовують для заміщення дефектів КТ завдяки його біосумісності, біоактивності, остеокондуктивності, нетоксичності [10-13].

Біологічний апатит формується на макромолекулах колагену шляхом утворення зародків кристалізації і подальшого зростання кристалів за рахунок іонного транспорту необхідних компонентів з рідини організму [14]. Кристаліти НА орієнтовані паралельно осі колагенової фібрили, мають голчасту форму, їх довжина складає ~ 40-60 нм, ширина ~ 20-30 нм і товщина ~ 1,5-5 нм та. Нанокристаліти НА володіють двома найважливішими для фізіології кісткової тканини якостями: знаходяться в динамічній рівновазі з біологічним оточенням в циклі ремоделювання (резорбції / мінералізації) і виявляють високий рівень механічних властивостей [15]. Нанокристалічний НА має підвищену здатність адсорбувати білки, необхідні для

життєдіяльності клітин, проявляє вибірковість по відношенню до функцій клітин, що утворюють кісткову і фіброзну тканини [16].

Контрольована морфологія, розмір, анізотропія неорганічних кристалітів, їх рівномірний розподіл в органічній матриці – основні вимоги в створенні біоміметичного продукту. Полімери, в тому числі природного походження, широко використовуються для вирішення вказаних задач, оскільки їх полярні функціональні групи  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{PO}_4\text{H}_2$ ,  $-\text{OH}$  проявляють високу спорідненість до катіонів кальцію, сприяючи нуклеації НА. Крім того, хітозан, як один з небагатьох природних полікатионітів, може утворювати полімерну матрицю з іншим аніонним полімером природного походження – альгінатом натрію [17].

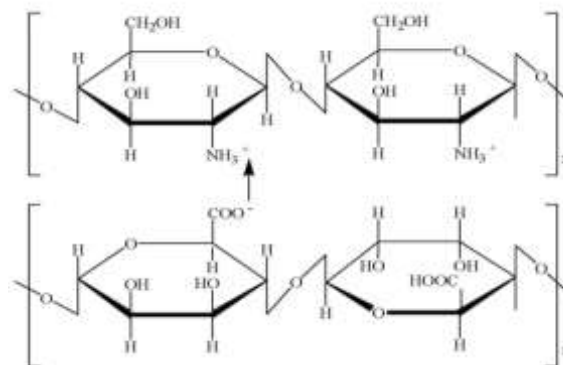


Рисунок 1 – Хімічна структура CS, Alg та схема їх взаємодії

Нанокмпозитні гідрогелі на основі таких полісахаридів, як хітозан (CS) та альгінат натрію (Alg) є дуже перспективними для тканинної інженерії. Alg утворює гідрогелі шляхом іонотропного «зшивання» в присутності двовалентних катіонів, таких, як кальцій [19]. Гідрогелі на основі «зшитого» кальцієм альгінату широко досліджуються з метою їх використання, наприклад, для доставки лікарських засобів в задані зони організму, також в ін'єкційних системах [18-21]. Відомо, що CS, Alg та НА мають властивість біодеградації в фізіологічних умовах [22]. Композитний матеріал на основі вказаних компонентів може поєднати такі їх переваги, як біоактивність, еластичність та остеокондуктивність.

## **1 ВСТАНОВЛЕННЯ УМОВ ТА МЕХАНІЗМІВ УТВОРЕННЯ НАНОКРИСТАЛІТІВ НА В СТРУКТУРІ ПОЛІСАХАРИДНИХ МАТРИЦЬ. ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПРИРОДНИХ БІОПОЛІМЕРІВ НА МІНЕРАЛЬНУ СКЛАДОВУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ**

Відомо, що природна кісткова тканина є композиційним матеріалом, що складається з НА, колагену та інших білків, завдяки чому є механічно міцною і, водночас, еластичною. Значні перспективи для підвищення механічних властивостей синтезованої НА-кераміки, призначеної для виготовлення кісткових імплантатів, має принцип формування композиційних структур з застосуванням полімерів природного та синтетичного походження. Формування нанорозмірних частинок НА у полімерному скеффолді наближує за структурою отримані матеріали до КТ та сприяє їх більш ефективній імплантації. В якості органічної складової в рамках даної роботи були обрані альгінат натрію, хітозан та желатина. Альгінат натрію – природний аніонний полімер, отриманий переробкою бурих морських водоростей. Хітозан є одним з природних нетоксичних, здатних до біодеградації полісахаридів, який широко застосовують в якості антимікробного компоненту. CS отримують шляхом деацетилювання в лужному середовищі природного полімеру хітину- складової панцирів ракоподібних. В комбінації з НА він є дуже перспективним, зокрема для ортопедії та стоматології [23]. Желатина — продукт денатурації основної органічної складової кісткової тканини – колагену; це білковий продукт тваринного походження, який являє собою суміш лінійних поліпептидів з різною молекулярною масою. Його основними компонентами є гліцин, пролін і окипролін. Названі полімери проявляють високу біосумісність з нативними тканинами, низьку токсичність, здатність підсилювати регенеративні процеси при загоюванні ран, біодеградувати з утворенням сполук, що мають хемотаксисну активність до фібробластів та остеобластів. [24,25].

## 1.1 Полімер-композитні матеріали

### 1.1.1 Нанокompозитний матеріал на основі НА та Alg. Методика синтезу

Метою даної роботи було створення наноструктурованих апатит-біополімерних композитів з різним співвідношенням органічної та неорганічної компонент, встановлення умов утворення нанокристалітів НА в структурі полісахаридних матриць, дослідження їх властивостей і вивчення впливу полімеру на формування кристалів кальцій-фосфатної фази.

#### Матеріали

Кальцій нітрат тетрагідрат ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), гідрофосфат амонію ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), гідроксид амонію ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) класифікації «ХЧ» (виробництво «Мерск»); натрію альгінат молекулярною масою 150 кДа, (E401), Китай).

#### Методика синтезу

- Розчинити ALG в 0,1 М водному розчині гідрофосфату амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  та залишати в сушильній шафі при температурі 37°C протягом 1 доби, після чого обробити ультразвуком протягом 2 хвилин до утворення гомогенної субстанції (P1). Кількість альгінату натрію задається у відношенні до утворюваного в результаті реакції синтезу НА. В умовах даного дослідження масове співвідношення НА до Alg було наступним: 4:1 (зразок №1), 3:2 (зразок №2), 1:1 (зразок №2), 2:3 (зразок №4), 4:1 (зразок №5).

- Приготувати 0,167 М водний розчин кальцій нітрату тетрагідрату (P2)
- Додати розчин P2 до суміші P1 крапельним методом при постійному перемішуванні для утворення суспензії P3.

- До суспензії P3 додати 25% мас.водного розчину аміаку до досягнення значення рН=12 реакційної суміші (P4)

- Нагрівати суміш P4 при температурі 80°C протягом 20 хвилин.

- «Зістарювання» при температурі навколишнього середовища протягом 24 годин
- Багаторазово промити дистильованою водою до рН~7,4
- Відділити тверду фракцію за допомогою центрифуги, в результаті чого отримати гелеподібну субстанцію вологістю  $\approx 90\%$ .
- Висушити продукт при  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Висушений продукт механічно подрібнити та просіяти для розділення на фракції з заданою дисперсністю.

### *1.1.2 Результати дослідження*

#### *Рентгенівська дифракція*

Рентгенограми НА/ Alg композитів, висушених при  $37^{\circ}\text{C}$ , наведені на рис. 1.1. Рентгенівські спектри підтверджують формування кристалітів гідроксиапатиту в присутності альгінату. Всі піки на рентгенівських дифрактограмах зразків №1-4 (a-d) ідентифікуються як стехіометричний НА № 9-432 згідно з базою даних JCPDS, окрім зразку №5 (e), в якому із-за низького ступеню кристалічності, в результаті впливу альгінату натрію, відсутня чітка ідентифікація піків і його скоріше можна віднести до аморфного кальцій фосфату.

Значення мікродеформацій та розмір кристалітів, розрахований за допомогою рівняння Шеррера, наведені в таблиці 1.1. Мікродеформації зразків №1-4 майже не відрізняються між собою, окрім зразка №5, в якому вказана величина збільшується в 2 рази в площині (112). Розмір кристалітів НА зменшується із збільшенням кількості альгінату, введеного в реакційну систему при синтезі. Крім того, у всіх зразках спостерігається зміщення базового піку високої інтенсивності (211) для чистого НА до більш високого значення  $2\theta$  (112) тобто, від  $2\theta = 31,88^{\circ}$  до  $32,04^{\circ}$  для НА у складі

композиту. Вказані зміни у спектрах свідчать про вплив ALG на формування НА.

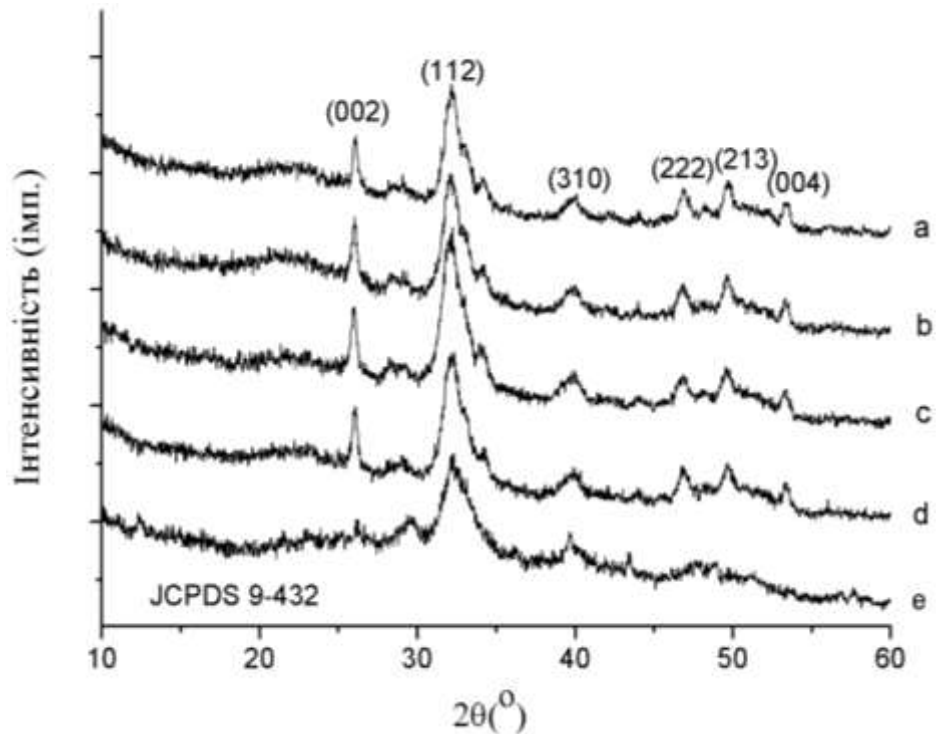


Рисунок 1.1 – Рентгенограми зразків НА/ Alg 4:1(a), НА/ Alg 3:2(b), НА/ Alg 1:1(c), НА/ Alg 2:3(d), НА/ Alg 1:4(e), висушених за температури 37 °С

Таблиця 1.1 – Розміри кристалітів НА в композитному матеріалі НА/ Alg висушених при 37°С

Зразок	Індекс Мілера	Розмір кристалітів за Шерером, нм	Мікродеформації, $\cdot 10^3$
НА/ Alg 4:1(№1)	(002)	27,66	0,006
	(112)	9,07	0,015
НА/ Alg 3:2(№2)	(002)	23,06	0,007
	(112)	9,16	0,015
НА/ Alg 1:1(№3)	(002)	22,17	0,007
	(112)	12,11	0,011
НА/ Alg 2:3(№4)	(002)	24,63	0,007
	(112)	7,25	0,019
НА/ Alg 1:4(№5)	(002)	17,855	0,009
	(112)	5,28	0,026



Для подальшого дослідження та контролю наявності додаткових фаз зразки були прогріті при 900°C протягом 1 години, оскільки при такій температурі відбуваються процеси рекристалізації та фазового розпаду, що може призвести до утворення інших кальцій-фосфатних фаз [26]. Результати дослідження, наведені на рис.1.2 та в табл.1.2 показують, що єдиною фазою після прожарювання у всіх зразках був висококристалічний стехіометричний НА (JCPDS №09-0432), але у зразку №5 ступінь кристалічності значно менший. Відпал полімеру після прожарювання призводить до збільшення середнього розміру кристалітів від 23 до 65 нм в зразках №1-4 та від 17 до 38 нм в зразку №5. Для порівняння, після прожарювання при 900 °C чистого НА, синтезованого без полімеру, середній розмір кристалітів складає 23 нм. Таке збільшення розмірів кристалітів свідчить про більш високий ступінь агломерації наночастинок, утворених при синтезі НА в присутності полімеру, завдяки їх високій реакційній здатності. Середнє значення мікродоформацій у зразках, синтезованих в присутності полімеру (№1-5) складає 0,0025 та є значно меншим в порівнянні зі значенням мікродоформації чистого НА, яке становить 1,197.

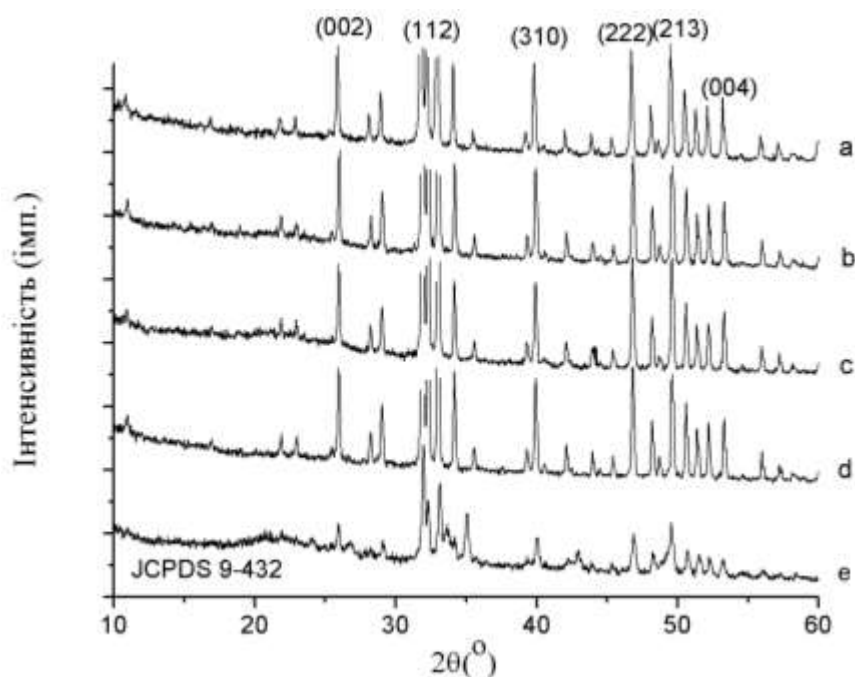


Рисунок 1.2 – Рентгенограми зразків НА/ Alg 4:1(a), НА/ Alg 3:2(b), НА/ Alg 1:1(c), НА/ Alg 2:3(d), НА/ Alg 1:4(e), після відпалу за температури 900°C

Таблиця 1.2 – Розміри кристалітів НА після відпалу зразків при 900°C протягом 1 години

Зразок	Індекс Мілера	Розмір кристалітів за Шерером, нм	Мікродеформації, $\cdot 10^3$
НА/ Alg 4:1(№1)	(002)	67,76	0,0025
	(112)	51,22	0,0027
НА/ Alg 3:2(№2)	(002)	65,95	0,0026
	(112)	53,41	0,0026
НА/ Alg 1:1(№3)	(002)	67,37	0,0025
	(112)	52,39	0,0026
НА/ Alg 2:3(№4)	(002)	62,97	0,0027
	(112)	50,89	0,0027
НА/ Alg 1:4(№5)	(002)	38,66	0,0044
	(112)	34,41	0,004

#### *Інфрачервона спектроскопія*

ІЧ спектри альгінату натрію та композитних матеріалів зображені на рис.3. Чистий альгінат представлений двома характеристичними абсорбційними смугами з вершинами при 1592  $\text{см}^{-1}$ , що відповідає асиметричним валентним коливанням  $\text{COO}^-$  груп, та 1406  $\text{см}^{-1}$ , що відноситься до симетричних валентних коливань  $\text{COO}^-$  груп, та перекриваються з коливаннями С-Н зв'язків в метилових групах. С-Н коливання також спостерігаються при 2923  $\text{см}^{-1}$ . Адсорбційна смуга з піком 1026  $\text{см}^{-1}$  та невеликими «плечами» при 1082  $\text{см}^{-1}$  та 1128  $\text{см}^{-1}$  відповідає С-О-С коливанням, С-О та ОН коливанням у вторинних спиртових групах відповідно. Коливання 1298  $\text{см}^{-1}$  відповідає коливанням С-О карбосильних кислот. Широка смуга біля 3192  $\text{см}^{-1}$  належить валентним коливанням ОН груп [27].

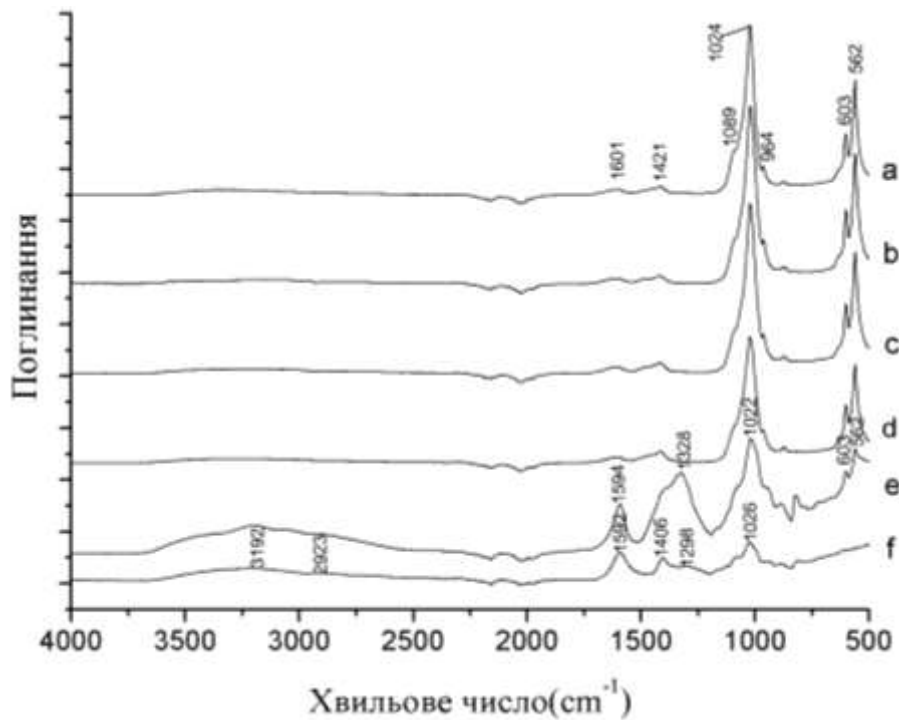


Рисунок 1.3 – ІЧ спектри HA/Alg 4:1(a), HA/ Alg 3:2(b), HA/ Alg 1:1(c), HA/ Alg 2:3(d), HA/ Alg 1:4(e), Alg (f)

У всіх зразках синтезованого композитного матеріалу HA/Alg з'являються нові піки коливань груп  $\text{PO}_4^{3-}$ : антисиметричні коливання  $\nu_4$  при 562,603  $\text{cm}^{-1}$  [28] та симетричні коливання  $\nu_1$  при 964  $\text{cm}^{-1}$  [29], які перекриваються з смугою C-O-C коливань альгінату та  $\nu_3$  асиметричними коливаннями P-O (1039-1050  $\text{cm}^{-1}$ ) [30]. Про це свідчить «плече» при 1089  $\text{cm}^{-1}$ . Інтенсивність піків при 1022-1024  $\text{cm}^{-1}$  значно зросла у всіх спектрах композиту HA/Alg порівняно зі спектром чистого альгінату, а інтенсивність коливань  $\text{COO}^-$  груп (1592 та 1406  $\text{cm}^{-1}$ ) значно знизилась зі зсувом вбік менших хвильових довжин у спектрах a,b,c,d. Коливання у спектрі зразка з найбільшим вмістом альгінату (e) є близькими до спектру чистого альгінату. Однак, коливання при 1592  $\text{cm}^{-1}$  у спектрі чистого альгінату, які відповідають асиметричним коливанням  $\text{COO}^-$  груп, виявилися зсунутими до 1594  $\text{cm}^{-1}$  та більш інтенсивними у спектрі композитного матеріалу. Відбувся зсув адсорбційної смуги C-O-C коливань з 1026  $\text{cm}^{-1}$  до 1020  $\text{cm}^{-1}$ , інтенсивність цих коливань зросла втричі. Пік 1406  $\text{cm}^{-1}$  у чистому

альгінаті є зсунутим до  $1328\text{ см}^{-1}$  у випадку композиту, його інтенсивність та ширина також значно збільшилися порівняно зі спектром чистого альгінату. Інтенсивність піків, які відповідають коливанням фосфатних груп  $562, 603\text{ см}^{-1}$  навпаки знизилась. Останній факт свідчить про зменшення долі кальцій фосфатної сполуки у композитному матеріалі та значний вплив альгінату на формування та ступінь росту кристалів НА.

Зсув та збільшення інтенсивності основних коливань у спектрі композитного матеріалу свідчить про формування хімічних зв'язків між мінеральною фазою та органічною компонентою шляхом взаємодії між позитивним зарядом іонів кальцію та негативним зарядом карбоксильних груп в альгінаті натрію [31]. Наявність міжмолекулярної взаємодії між неорганічним мінералом та хімічним ланцюгом альгінату в полімерному середовищі забезпечує контрольовану нуклеацію та ріст кристалітів неорганічної фази [32], що і підтверджується результатами аналізу методом рентгенівської дифракції.

#### *Просвічуюча електронна мікроскопія*

Зображення ПЕМ зразків №1-5 наведені на рис.1.4. Знімки ПЕМ демонструють голчасту структуру частинок гідроксиапатиту у складі композитного матеріалу у зразках № 1-4 (рис.1.4, а-г). Збільшення кількості полімеру при синтезі (рис.4д) призводить до зміни форми кристалітів, утворення наночастинок НА, оточених полімерною оболонкою. Із зображень ПЕМ видно, що зі збільшенням вмісту альгінату натрію в реакційній суміші під час синтезу композитного матеріалу відбувається зменшення розміру частинок від  $120\text{ нм}$  (№1) до  $50\text{ нм}$  (№4). ПЕМ зразка №5 з найбільшим вмістом альгінату демонструє зміну форми і зменшення розмірів кристалітів НА.

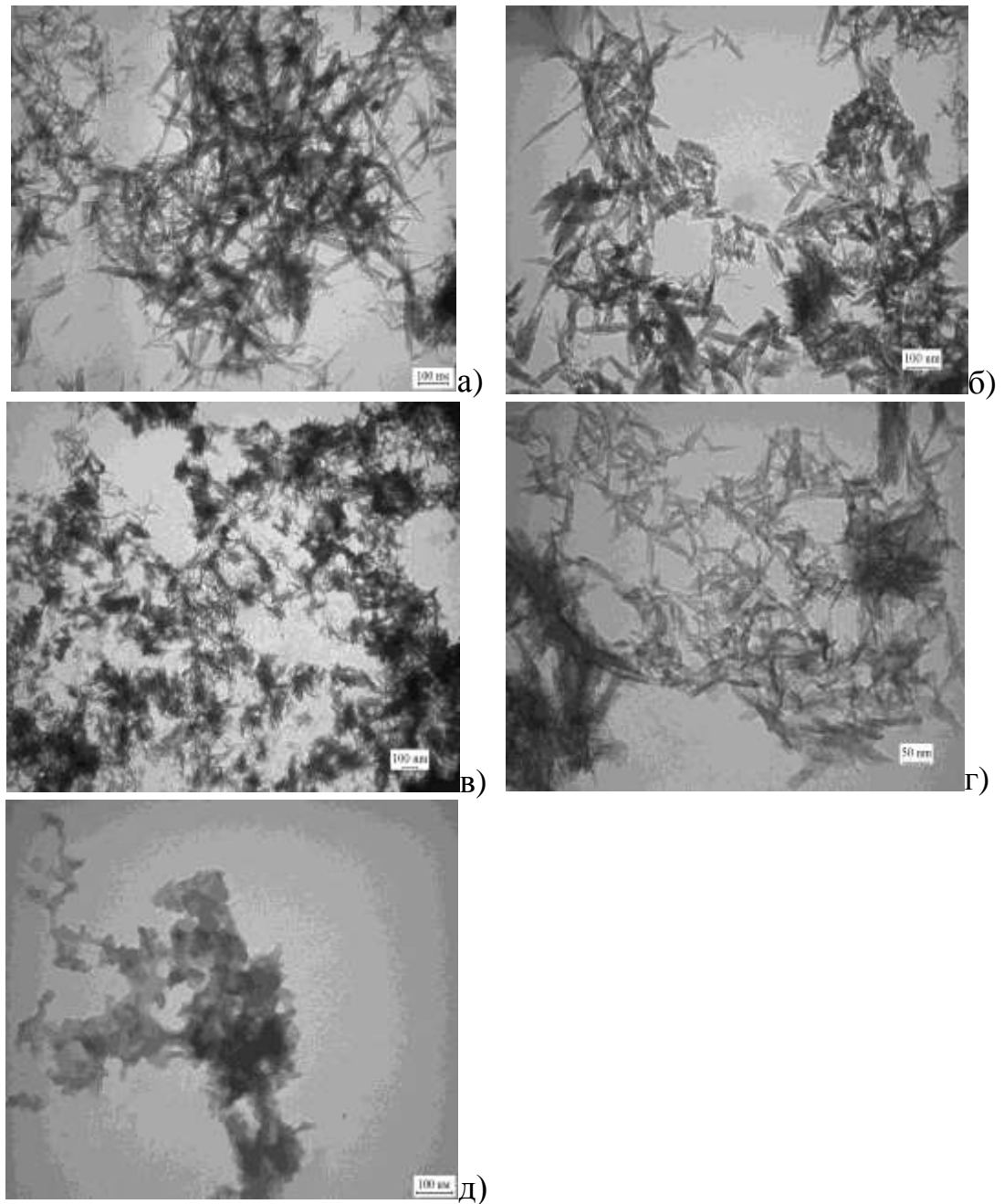


Рисунок 1.4 – ПЕМ зображення водних суспензій HA/Alg 4:1(а), HA/Alg 3:2(б), HA/Alg 1:1(в), HA/Alg 2:3(г), HA/Alg 1:4(д)

### 1.1.3 Дослідження біоактивності *in vitro*

Вивчення біоактивності *in vitro* HA/Alg композитів (рис.1.5) було проведено шляхом дослідження зміни рН розчину SBF, в якому знаходились зразки біокомпозитного матеріалу протягом 7 днів. Початкове значення рН фізіологічного розчину складало 7,46. Дослідження показали, що значення

pH контрольного розчину SBF (без композитного матеріалу) залишалося сталим протягом всього періоду спостереження. У присутності експериментальних зразків протягом перших трьох діб відбувалося зниження pH розчину SBF з поступовим підвищенням цього значення з четвертої доби і до кінця спостереження. Очевидно, зниження pH відбувається в результаті формування НА на поверхні зразка з іонів  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{OH}^-$ , присутніх в розчині SBF. Після збіднення розчину на вказані іони відбувається зворотній процес розчинення утвореного кальцій-фосфату. При цьому відбувається зв'язування іонів  $\text{H}^+$  з іонами  $\text{PO}_4^{3-}$ , що призводить до збільшення значення pH середовища [33]. Даний факт підтверджує високу біоактивність НА/Alg композитного матеріалу у фізіологічному середовищі.

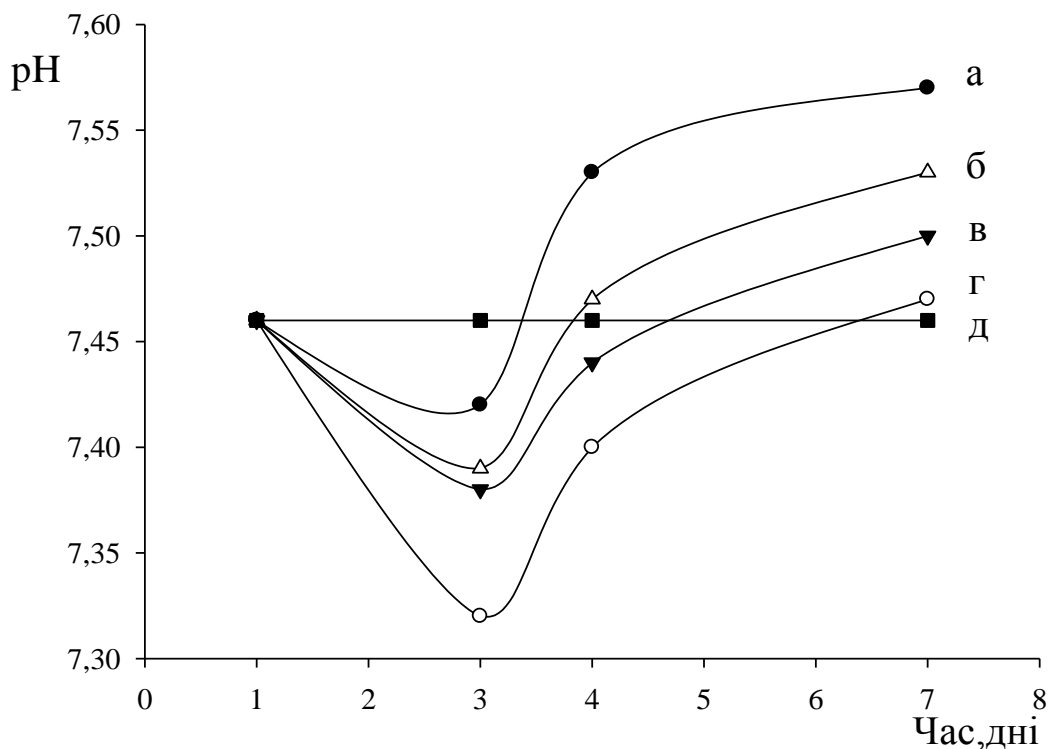


Рисунок 1.5 – Дослідження біоактивності композиційних матеріалів *in vitro*: а) зразок НА/Alg 4:1, б) зразок НА/Alg 3:2, в) зразок НА/Alg 2:3, г) зразок НА/Alg 1:1, д) розчин SBF

### *Пористість та набухання композитів*

Було проведено вивчення ступеня набухання та пористості досліджуваних зразків №1-4 (табл.1.3). Зразок №5 не був досліджений, оскільки знаходився у вигляді стабільної емульсії з рівномірним розподілом дисперсної фази (наночастинки НА) у дисперсійному середовищі. Даний факт не дозволив підготувати тверду форму зразка для дослідження вказаних характеристик.

Таблиця 1.3 – Значення пористості та набухання синтезованих композитних матеріалів

Зразок	Пористість,%	Набухання,%
НА/Alg 4:1(№1)	82,97	104,7
НА/Alg 3:2(№2)	41,41	116,7
НА/Alg 1:1(№3)	37,65	130
НА/Alg 2:3(№4)	35,26	221,4

Набухання отриманих зразків відбувається за рахунок вмісту полімеру та пористості матеріалу. Виходячи з даних таблиці можна сказати, що більшу частку в набухання зразків НА/Alg 3:2, НА/Alg 1:1, НА/Alg 2:3 вносить полімерна складова, оскільки ступінь набухання в декілька раз перевищує пористість матеріалу, окрім зразка НА/Alg 4:1, набухання якого в більшій мірі відбувається за рахунок пористості. Серед усіх досліджених зразків найвищим ступенем набухання володіє зразок НА/Alg 2:3 за рахунок найбільшого вмісту полімеру. Отриманий результат зменшення пористості у зразках зі збільшенням вмісту альгілату є прогнозований, оскільки дослідження пористості проводилось на виготовлених у кубічній формі та висушених при 37°C зразках, а доданий полімер надає висушеному зразку більш щільної структури.

Таким чином, апатит-біополімерні наноструктуровані композитні матеріали для медичного використання були отримані з різним співвідношенням полімерної (альгінат натрію) та неорганічної

(гідроксиапатит) фаз. Рентгеніські спектри підтверджують формування кристалітів НА в присутності Alg, розмір яких зменшується із збільшенням кількості альгінату, введеного в реакційну систему при синтезі. Вивчення морфології синтезованих нанокомпозитів показало утворення кристалітів НА голчатої форми з розміром частинок від 50 (№4) до 120 (№1) нм. У випадку зразка №5 відбувається утворення наночастинок НА (розмір кристалітів < 20 нм) в полімерній оболонці, які знаходяться у вигляді стабільної емульсії. Методами рентгенівської дифракції та ІЧ спектроскопії підтверджено міжмолекулярну взаємодію між НА і Alg. Наявність міжмолекулярної взаємодії між неорганічним мінералом та хімічним ланцюгом альгінату забезпечує контрольовану нуклеацію та ріст кристалітів неорганічної фази. Про біоактивність утворених композитних матеріалів свідчить зміна рН розчину SBF із досліджуваними зразками. Дослідження пористості та ступеня набухання показує, що зі збільшенням вмісту полімерної складової пористість композитних матеріалів зменшується, а ступінь набухання збільшується. Це дослідження являє собою платформу для подальших досліджень НА/Alg композитів для біомедичних застосувань.

### *1.2 Порівняльна характеристика матеріалів з різною полімерною складовою*

Для порівняння впливу двох полімерів – Alg та желатини – на процес кристалізації НА та механічні властивості отриманих композитів, було синтезовано по 4 типи зразків НА/полімер за технологією, описаною вище (п.1.1.1). Масовий вміст кожного з досліджених полімерів склав 10, 20, 30, та 40мас.% щодо кількості теоретично утворюваного НА в результаті реакції синтезу. Дослідження методом ПЕМ (Рис.1.6) показали утворення кристалітів НА голчастої форми в обох типах зразків. При цьому у випадку



синтезу в присутності желатини розмір кристалітів більший в 3-4 рази порівняно з кристалітами, утвореними в присутності альгінату.

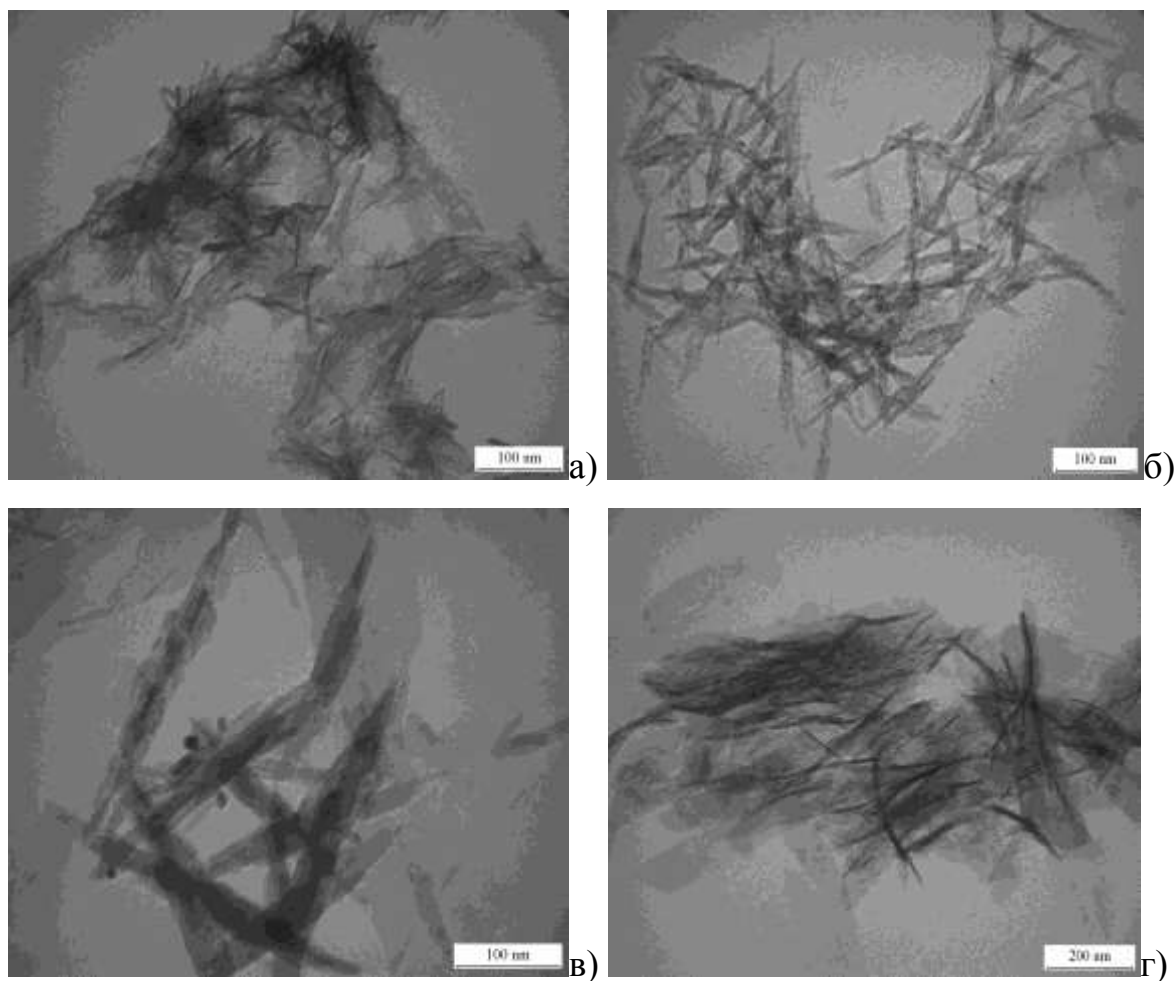


Рисунок 1.6 – ПЕМ зображення синтезованих композитних матеріалів:  
а) – HA+10% Alg; б) – HA+40% Alg; в) – HA + 10% желатини; г) – HA+40% желатини

На рис.1.7 та 1.8 представлені дифрактограми зразків, відпалених при 900 °С.

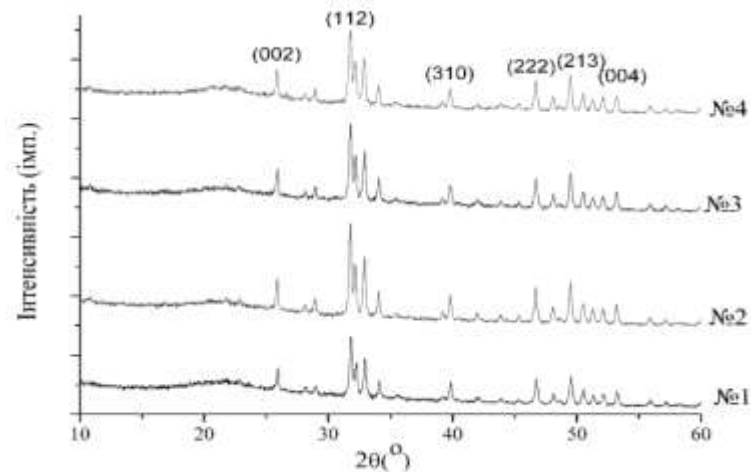


Рисунок 1.7 – Рентгенограми зразків НА/Alg: №1-10% Alg, №2-20% Alg, №3-30% Alg, №4-40% Alg, висушених за температури 900 °С

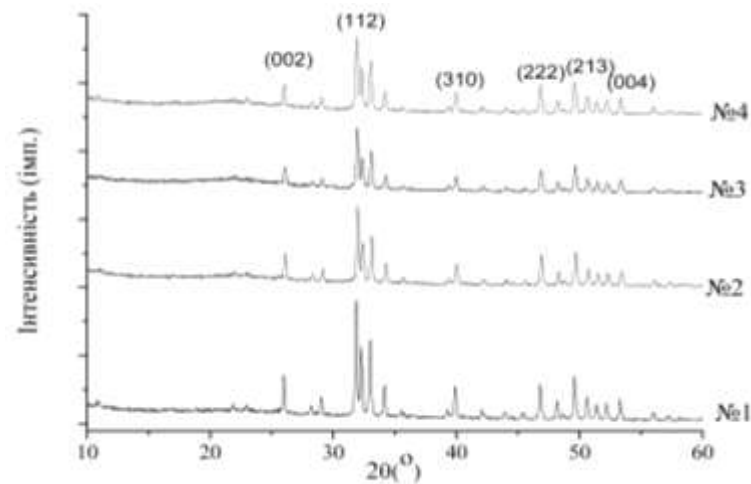


Рисунок 1.8 – Рентгенограми зразків НА/желатина: №1-10% желатини, №2-20% желатини, №3-30% желатини, №4-40% желатини, висушених за температури 900 °С

Фаза полімерів відсутня, а кальцій фосфат представлений гідроксиапатитом у обох варіантах синтезу. Розрахунки, проведені на основі рентгенівських дифрактограм, показали, що концентрація альгінату в реакційній системі під час синтезу мало впливає на розмір кристалітів НА. Так, у площині 002 розмір кристалітів, які формуються в присутності 10 і 40 мас.% альгінату, становить 46,1 та 47,6 нм відповідно. В той же час, при збільшенні концентрації желатини від 10 до 40 мас.% розмір кристалітів збільшується з 45,5 до 53,5 нм відповідно (таб.1.4).

Таблиця 1.4 – Структурні параметри кристалітів НА у складі апатит-полімерних композитів

Зразок	Індекси Міллера	Розмір кристалітів
НА + 10% Alg	(002)	46,1
	(211)	39,2
	(004)	47,5
НА + 20% Alg	(002)	45,1
	(211)	39,3
	(004)	43,8
НА + 30% Alg	(002)	44,6
	(211)	41,9
	(004)	43,7
НА + 40% Alg	(002)	47,6
	(211)	35,8
	(004)	40,3
НА + 10% Желатини	(002)	45,5
	(211)	44,2
	(004)	45,1
НА + 20% Желатини	(002)	47,4
	(211)	44,9
	(004)	45,2
НА + 30% Желатини	(002)	51,9
	(211)	48,6
	(004)	51,7
НА + 40% Желатини	(002)	53,5
	(211)	44,7
	(004)	46,2

### 1.3 Нанокompозитний матеріал на основі НА з вмістом ZnO

В останні роки інтерес до наночастинок оксиду цинку (ZnO) значно збільшився, головним чином, через їх фізичні, хімічні і біологічні властивості. Дослідження показали, що Zn має прямий специфічний проліферативний ефект на клітини остеобластів, проявляє селективну інгібуючу дію на резорбцію кісткової тканини остеокластами [34]. Завдяки своїй гігроскопічності інгібує життєдіяльність і ріст мікроорганізмів, бере участь у багатьох метаболічних клітинних процесах (репарація і регенерація), у

синтезі колагену- життєво важливого елемента для загоєння і відновлення клітинних тканин[35]. Серед іонів металів, цинк присутній в якості мікроелемента в кісткових мінералах [36], крім того, цинк сприяє щільності кісткової тканини і запобігає втраті кісткової маси [37].

Апатит-біокомпозитні матеріали з додаванням наночастинок ZnO можуть забезпечити покращені фізико-хімічні та механічні властивості матеріалів для заміщення кісткової тканини. Завдяки присутності монодисперсного нанорозмірного кальцій дефіцитного НА ефективність остеогенезу та інших регенеративних процесів значно зростатиме, а наявність гідрогелевої матриці забезпечить високу біосумісність композиту. Саме ці фактори і обумовили мету нашого дослідження.

#### *Матеріали.*

Використовувалися наступні хімічні речовини: кальцій нітрат тетрагідрат ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), гідрофосфат амонію ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), гідроксид амонію ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), цинк нітрат гексагідрат  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  класифікації «ХЧ», «Merck»; натрію альгінат (АН) (E401) молекулярною масою 150 кДа, Китай.

#### *1.3.1 Методика синтезів*

Чотири типи методик було застосовано, а саме:

##### *Зразок НА-ZnO-1*

- Приготувати 0,167 М водний розчин кальцій нітрату тетрагідрату в кількості 100 мл (P1)
- Приготувати 0,1 М розчин гідрофосфат амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  в кількості 100 мл (P2)
- Додати розчин P2 до розчину P1 крапельним методом при постійному перемішуванні для утворення суспензії P3.
- До суспензії P3 додати цинк нітрат гексагідрат  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в кількості 50 мл 0,1М розчину(P4)

- До суспензії Р4 додати 25 мас.% водний розчин аміаку до досягнення значення рН=12 реакційної суміші (Р5)
- Нагрівати суміш Р5 при температурі 80°C протягом 20 хвилин.
- «Зістарювання» при температурі навколишнього середовища протягом 24 годин
- Багаторазово промити дистильованою водою до рН~7,4
- Відділити тверду фракцію за допомогою центрифуги, в результаті чого отримати гелеподібну субстанцію вологістю  $\approx 90\%$ .
- Висушити продукт при 37°C.

#### *Зразок НА-ZnO-2*

- Приготувати 100 мл 0,167 М водний розчин кальцій нітрату тетрагідрату (Р1)
- До розчину Р1 додати 50 мл 0,1М розчину цинку нітрату гексагідрату  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (Р2).
- Приготувати 100мл 0,1 М розчин гідрофосфату амонію  $((NH_4)_2HPO_4$  (Р3)
- Додати розчин Р3 до суміші Р2 крапельним методом при постійному перемішуванні для утворення суспензії Р4.
- До суспензії Р4 додати 25мас.% водний розчин аміаку до досягнення значення рН=12 реакційної суміші (Р5)
- Нагрівати суміш Р5 при температурі 80°C протягом 20 хвилин.
- «Зістарювання» при температурі навколишнього середовища протягом 24 годин
- Багаторазово промити дистильованою водою до рН~7,4
- Відділити тверду фракцію за допомогою центрифуги, в результаті чого отримати гелеподібну субстанцію вологістю  $\approx 90\%$ .
- Висушити продукт при 37°C.
- Висушений продукт механічно подрібнити та просіяти для розділення на фракції з заданою дисперсністю.

### *Зразок НА-ZnO-3*

- Приготувати 0,167 М водний розчин кальцій нітрату тетрагідрату в кількості 100 мл (P1)
- Приготувати 0,1 М розчин гідрофосфат амонію  $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  в кількості 100 мл (P2)
- Альгінат натрію в кількості, яка забезпечує вміст 5 мас.% даного полімеру щодо вмісту НА в кінцевому продукті(83,5 мг у випадку даного прикладу), розчинити в P2 при температурі 37°C протягом 1 доби (P3).
- Додати розчин P1 до розчину P2 крапельним методом при постійному перемішуванні для утворення суспензії P4.
- До суспензії P4 додати цинку нітрат гексагідрат  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в кількості 50 мл 0,1М розчину(P5).
- До суспензії P5 додати 25 мас.% водний розчин аміаку до досягнення значення рН=12 реакційної суміші (P6)
- Нагрівати суміш P6 при температурі 80°C протягом 20 хвилин.
- «Зістарювання» при температурі навколишнього середовища протягом 24 годин
- Багаторазово промити дистильованою водою до рН~7,4
- Відділити тверду фракцію за допомогою центрифуги, в результаті чого отримати гелеподібну субстанцію вологістю  $\approx 90$  %.
- Висушити продукт при 37°C.

### *Зразок НА-ZnO-4*

- Приготувати 0,167 М водний розчин кальцій нітрату тетрагідрату в кількості 100 мл (P1)
- До P1 додати цинку нітрат гексагідрат  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в кількості 50 мл 0,1М розчину(P2).
- Приготувати 0,1 М розчин гідрофосфат амонію  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  в кількості 100 мл (P3)

- Альгінат натрію в кількості, яка забезпечує вміст 5 мас.% даного полімеру щодо вмісту ГА в кінцевому продукті (83,5 мг у випадку даного прикладу), розчинити в Р3 при температурі 37°C протягом 1 доби (Р4).
- Додати суміш Р2 до суміші Р4 крапельним методом при постійному перемішуванні для утворення суспензії Р5.
- До суспензії Р5 додати 25 мас.% водний розчин аміаку до досягнення значення рН=12 реакційної суміші (Р6)
- Нагрівати суміш Р6 при температурі 80°C протягом 20 хвилин.
- «Зістарювання» при температурі навколишнього середовища протягом 24 годин
- Багаторазово промити дистильованою водою до рН~7,4
- Відділити тверду фракцію за допомогою центрифуги, в результаті чого отримати гелеподібну субстанцію вологістю  $\approx 90\%$ .
- Висушити продукт при 37°C.

### 1.3.2 Результати дослідження

#### *Рентгенівська дифракція*

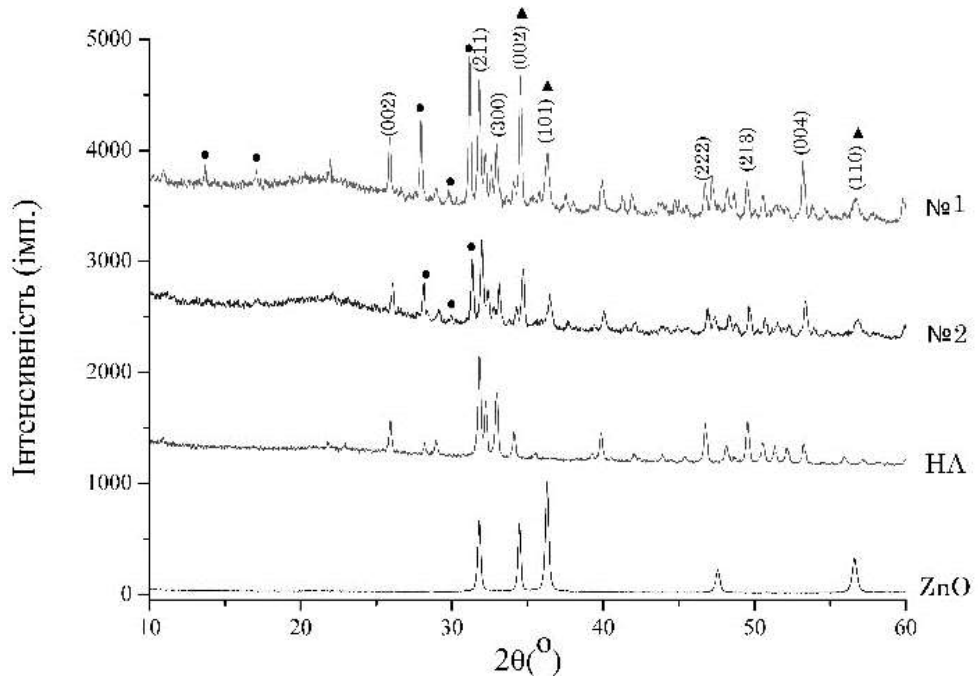
За допомогою методу рентгенівської дифракції був визначений фазовий склад отриманих композитів. Основною фазою висушених при 37°C порошоків є аморфний дрібнокристалічний НА (JCPDS № 09 432). В результаті відпалу зразків при 900°C утворилося 2 додаткові фази – трикальцій фосфату (ТКФ) JCPDS № 09-169 та кальцій цинк фосфату (КЦФ) JCPDS № 48-1196, інтенсивності піків яких перекриваються на дифрактограмі (рис.1.9). Присутність останньої фази може бути наслідком вбудовування в кристалічну структуру композитного матеріалу іонів  $Zn^{2+}$  під час проходження температурної обробки [38]. Очевидно, що в результаті реакцій синтезу композитних матеріалів утворюється нестехіометричний кальцій дефіцитний гідроксиапатит, який при нагріванні до  $T=900\text{ }^\circ\text{C}$

трансформується в  $\beta$ -ТКФ [26]. Наявність частки ТКФ свідчить про присутність як частки аморфного кальцій фосфату, так і дефектів кристалічної решітки, спричинених частковим заміщенням іонів  $\text{Ca}^{2+}$  іонами  $\text{Zn}^{2+}$ . Зареєстровані на рентгенограмах інтенсивні піки були ідентифіковані як відбивання від площин (002), (101), (110) фази оксиду цинку (JCPDS № 79 205). Таким чином, рентгенівські спектри підтверджують формування кристалітів гідроксиапатиту в присутності оксиду цинку та альгінату натрію. У таблиці 1.5 наведені результати розрахунку структурних характеристик синтезованих композит-них матеріалів, відпалених при  $900^\circ\text{C}$  в порівнянні з чистим НА.

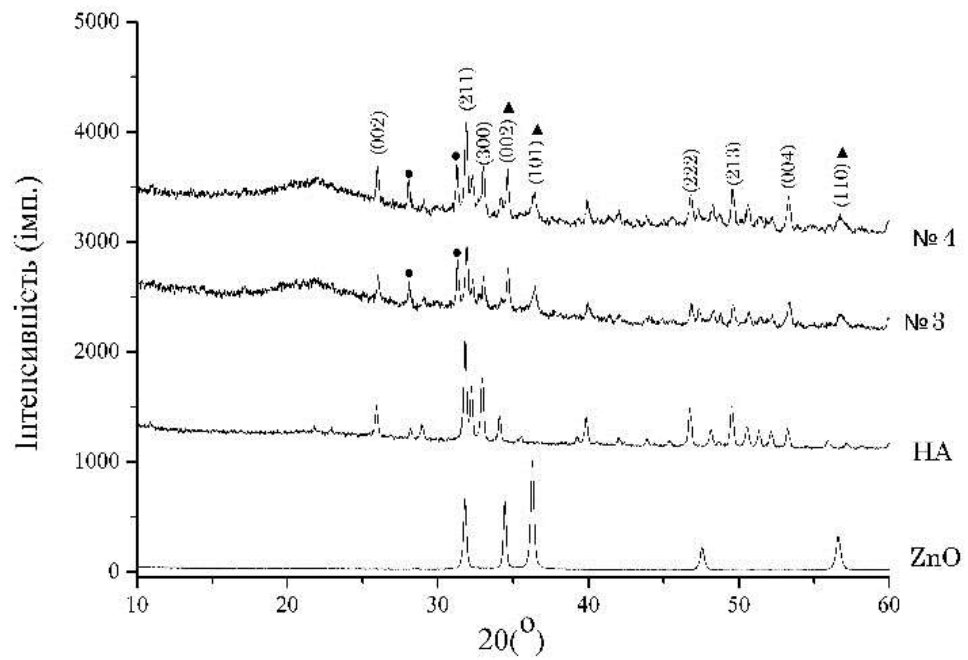
Таблиця 1.5 – Структурні параметри кристалітів НА та ZnO за даними рентгеноструктурного аналізу

Зразок	Індекс Міллера	L, нм	a, нм	c, нм	Вміст, %		
					НА	ТКФ та КЦФ	
НА-ZnO-1	НА	(002)	66,8	0,936	0,688	47,4	52,6
		(211)	50,1				
		(004)	53,2				
	ZnO	(101)	32,6				
НА-ZnO-2	НА	(002)	51,9	0,934	0,686	60	40
		(211)	44,4				
		(004)	45,7				
	ZnO	(101)	30,9				
НА-ZnO-3	НА	(002)	58,2	0,935	0,686	69	31
		(211)	44,8				
		(004)	37,7				
	ZnO	(101)	28,1				
НА-ZnO-4	НА	(002)	53,6	0,933	0,686	59	41
		(211)	42,8				
		(004)	31,9				
	ZnO	(101)	26,4				
НА		(002)	49,8	0,942	0,688	100	-





а



б

Рисунок 1.9 – Рентгенівські дифрактограми синтезованих композитних матеріалів без додавання альгінату (методика №1, №2) (а) та з додаванням альгінату (методика №3, №4) (б). Індexами Міллера відмічені основні піки HA (JCPDS № 09 432) та ZnO (JCPDS № 79-205). Символом ● позначені основні піки фази ТКФ та кальцій цинк фосфату, символом ▲ - ZnO

Результати свідчать, що параметри кристалічної решітки НА ( $a$  та  $c$ ) у складі синтезованих композитних матеріалів відрізняються від параметрів чистого НА. Це є наслідком часткового заміщення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  іонами  $\text{Zn}^{2+}$ . Так, параметри  $a$  і  $c$  зменшились у всіх дослідних зразках в результаті іонного включення  $\text{Zn}$  в елементарні комірки НА, який має менший іонний радіус (0,074 нм) в порівнянні з кальцієм (0,104 нм).

Присутність іонів цинку та альгінату натрію під час синтезу впливає на розмір кристалітів НА, а саме: середній розмір кристалітів у зразках НА-ZnO-1, НА-ZnO-2, НА-ZnO-3 та НА-ZnO-4 збільшився в порівнянні з чистим НА з 49,8 до 66,8 нм, 51,9 нм, 58,2 нм та 53,6 нм відповідно. Спосіб отримання композиційного матеріалу впливає на фазовий склад кінцевого продукту: вміст НА в зразку НА-ZnO-2 на 12 мас.% більший в порівнянні з НА-ZnO-1, а вміст НА в зразку НА-ZnO-3 більший на 10 мас.%, ніж в зразку НА-ZnO-4.

Мікроелементний склад зразків був визначений за допомогою рентгенофлуоресценого спектрометру «ElvaX Light SDD». Типовий для всіх досліджених зразків рентгенофлуоресцентний спектр наведений на рис. 1.7.

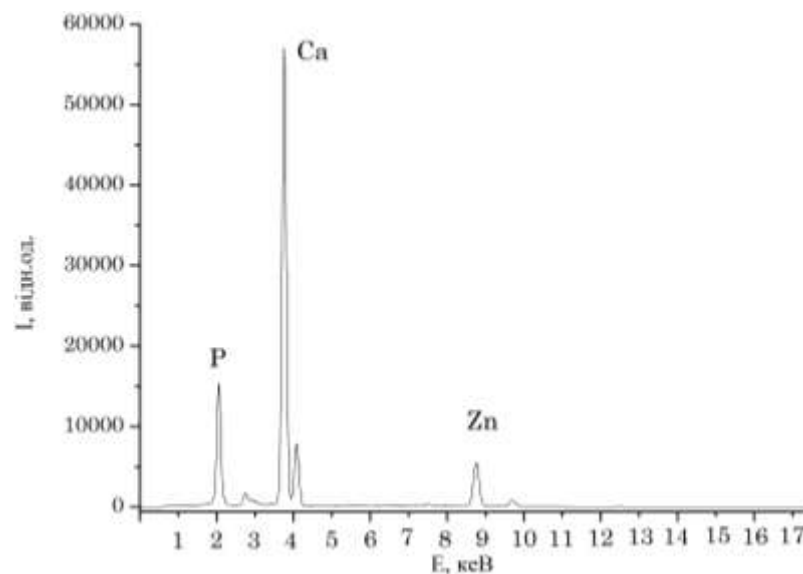


Рисунок 1.10 – Характеристичний рентгенівський спектр синтезованих композитних матеріалів

Результатом аналізу підтверджено наявність іонів Ca, P і Zn у складі композитних матеріалів.

Атомні співвідношення Ca/P в композитних матеріалах, відпалених при 900°C, розраховані за результатами рентгено-флуоресцентного аналізу (РФА), рентгенівської дифракції та растрової електронної мікроскопії, представлені в таблиці 1.6.

Результати розрахунків співвідношення Ca/P за допомогою цих методів дещо відрізняються між собою, але всі чисельні дані відповідають утворенню саме нестехіометричного кальцій дефіцитного гідроксиапатиту.

Таблиця 1.6 – Атомні співвідношення Ca/P композитних матеріалів

Зразок	Ca/P 900°C РФА	Ca/P 900°C РЕМ	Ca/P 900°C РД
HA-ZnO-1	1,54	1,60	1,62
HA-ZnO-3	1,57	1,61	1,63
HA-ZnO-3	1,59	1,63	1,64
HA-ZnO-4	1,57	1,62	1,63

#### *Просвічуюча електронна мікроскопія*

Представлені на рис.1.11 зображення синтезованих зразків, отриманих за допомогою ПЕМ, демонструють голчасту структуру частинок HA у складі композитного матеріалу розміром до 50 нм. Включення ZnO та Alg до складу композитного матеріалу призводить до зміни форми кристалітів HA та їх розмірів, що було підтверджено рентгеноструктурним аналізом.

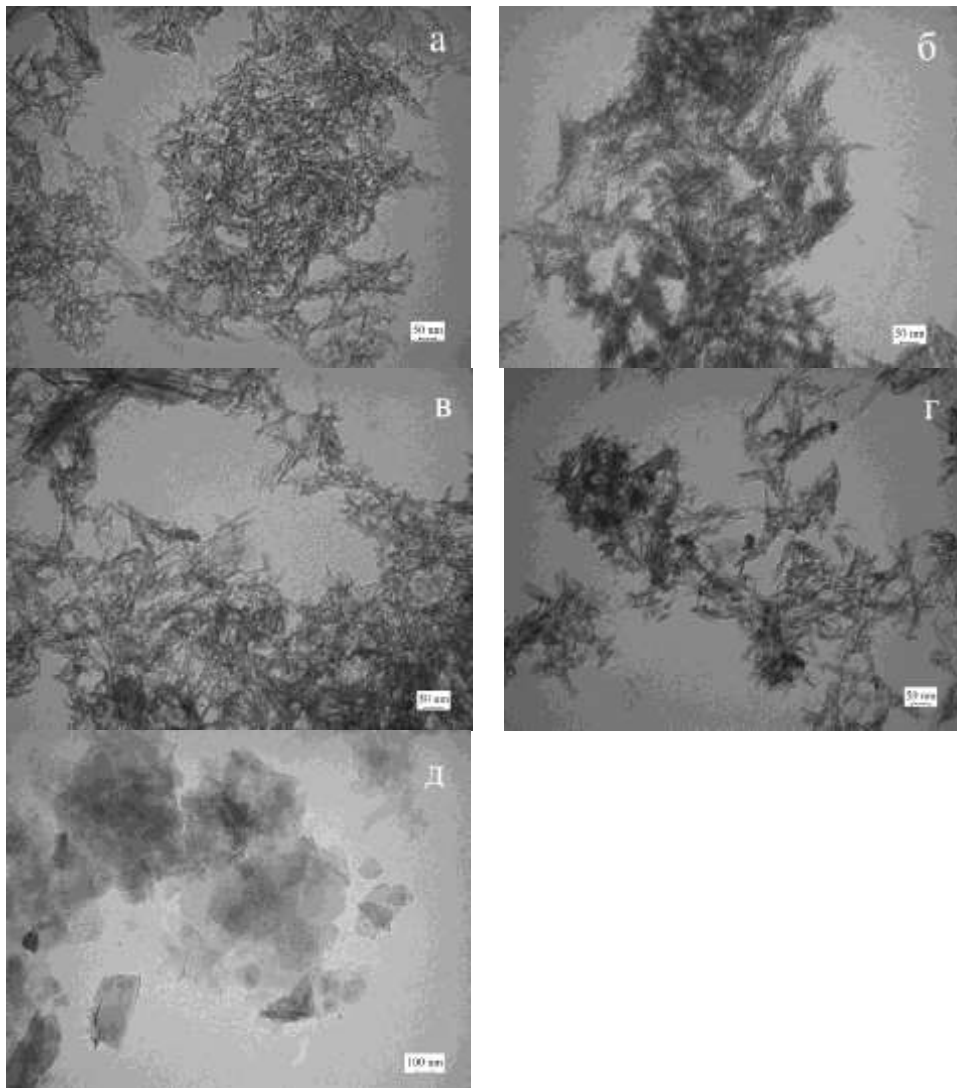


Рисунок 1.11 – ПЕМ зображення синтезованих композитних матеріалів:  
 а) – HA-ZnO-1; б) – зразок HA-ZnO-2; в) – зразок HA-ZnO-3;  
 г) – зразок HA-ZnO-4; д) – ZnO

#### *1.4 Механічні властивості апатит полімерних композитів*

##### *1.4.1 Механічні властивості композитів з вмістом ZnO*

Результати досліджень показали, що зі зменшенням розмірів кристалів від 50,1 нм до 44,4 нм в зразках без додавання полімеру (HA-ZnO-1 та HA-ZnO-2 відповідно), відбувається збільшення межі міцності даних матеріалів від 0,63 МПа до 0,78 МПа. Дана тенденція зберігається і для зразків, синтезованих у присутності полімерної складової. Отримані результати не суперечать літературним даним, які свідчать, що механічні

характеристики погіршуються із збільшенням вмісту аморфної фази, мікропористості і розмірів кристалітів, в той час як висока ступінь кристалічності, низька пористість мають тенденцію давати вищу жорсткість, більш високі міцність на стиск, на розрив та руйнівну міцність [39]. В той же час модуль пружності зростає в зворотньому напрямку. Результати вимірювань та обчислень механічних властивостей отриманих зразків наведені в табл.1.7.

Таблиця 1.7 – Механічні властивості композитів, синтезованих у присутності іонів цинку

Зразок	Межа міцності $\sigma$ , МПа	Модуль пружності E, МПа
HA-ZnO-1	0,63	18,2
HA-ZnO-2	0,78	17,5
HA-ZnO-3	0,88	15,2
HA-ZnO-4	0,91	14,3

Для порівняння механічних властивостей було додатково приготовано композити шляхом механічного змішування з допомогою ультразвуку HA та HA/Alg (у формі гелю, 90% вологості) з порошком ZnO, кількість якого складала 5 мас.% від вмісту HA. Перелік матеріалів та дані про їх механічні властивості приведені в таблиці 1.8.

Таблиця 1.8 – Механічні властивості композитів, отриманих механічним змішуванням HA та ZnO

№ п/п	Зразок	Метод висушування		Межа міцності $\sigma$ , МПа	Модуль пружності E, МПа
		Потуж.мікрохвильової печі ,Вт	Час, хв.		
1	HA+ZnO	100	30	1,73	55,3
2	HA/Alg+ZnO	100	30	1,92	49,2
3	HA+ZnO	200	20	1,22	37,4
4	HA/ Alg +ZnO	200	20	1,55	32,8
5	HA+ZnO	-	2 доби	1,8	59,4
6	HA/ Alg +ZnO	-	2 доби	1,93	47,7

Результати свідчать, що композити, приготовані шляхом механічного змішування з оксидом цинку, мають кращі механічні властивості, в порівнянні із матеріалами, в яких цинку оксид утворювався в процесі синтезу синхронно з утворенням НА. Було з'ясовано, що всі зразки з вмістом полімеру мають вище значення межі міцності в порівнянні зі зразками без полімерної складової. Найвищу межу міцності 1,92 МПа та 1,93 МПа мають зразки які, з одного боку, містять полімери, а з іншого - висушені при невисокій температурі (при 25°C або в мікрохвильовій печі при 100 W). Загалом вміст полімеру в композитних матеріалах позитивно впливає на покращення механічних властивостей.

#### *1.4.2 Механічні властивості композитів з вмістом Alg та желатини*

Для порівняння впливу двох полімерів - Alg та желатини – на процес кристалізації НА та механічні властивості отриманих композитів, було синтезовано по 4 типи зразків НА/полімер за технологією, описаною вище (п.1.1). Масовий вміст кожного з досліджених полімерів склав 10, 20, 30, та 40мас.% щодо кількості теоретично утворюваного НА в результаті реакції синтезу.

Дослідження механічних властивостей (таб.1.9) показало, що як межа міцності, так і модуль пружності збільшуються пропорційно збільшенню вмісту желатини. В той же час у зразках з вмістом альгінату такої прямої залежності не спостерігалось. Найбільша межа міцності спостерігалася у зразках з найменшим вмістом альгінату (10 мас.%), а модуль пружності був найбільшим при додаванні 40 мас.% альгінату.

Таким чином, застосування обох полімерів у композитних матеріалах збільшує їх еластичність, причому еластичність зразків з желатиною є вищою. Зразки з додаванням альгінату мають значно вищу межу міцності. Таким чином, композити НА/Alg рекомендовано застосовувати переважно як

матеріал для заповнення кісткових дефектів, а НА/желатина в якості покриттів, що механічно наносяться на поверхню імплантатів.

Таблиця 1.9 – Механічні характеристики полімер-апатитних композитних матеріалів

Зразок	Межа міцності $\sigma$ , МПа	Модуль пружності E, МПа
НА+10% Альгілату	1,716082	14,31244
НА+20% Альгілату	1,247953	30,81236
НА+30% Альгілату	1,033706	10,68332
НА+40% Альгілату	1,416596	16,03576
НА+ 10% Желатини	0,684263	16,1166
НА+ 20% Желатини	0,773351	18,1599
НА+ 30% Желатини	1,022112	23,2265
НА+ 40% Желатини	1,259901	28,29807

## **2 РОЗРОБКА БІОМІМЕТИЧНИХ МЕТОДІВ ОТРИМАННЯ КОМПОЗИТНИХ ПОРОШКІВ, ГЕЛІВ, ПАСТ, ГРАНУЛ НА ОСНОВІ НА ТА ПРИРОДНИХ ОБО СИНТЕТИЧНИХ ПОЛІМЕРІВ, А САМЕ: АЛЬГІНАТ НАТРІЮ, ХІТОЗАН, ПОЛІАКРИЛАМІД, ВИГОТОВЛЕННЯ НА ОСНОВІ ГІДРОГЕЛІВ ІН'ЄКЦІЙНОГО БІОМАТЕРІАЛУ ДЛЯ НЕІНВАЗИВНИХ МЕТОДІВ ЛІКУВАННЯ ТРАВМ КІСТКИ**

### *2.1 Біоматеріал для ін'єкцій у формі гідрогелю*

Гідрогелі представляють собою тривимірну полімерну сітку, яка може утримувати у своїй структурі велику кількість рідини. Дослідження останнього десятиліття свідчать, що гідрогелі, в основі яких лежать природні протеїни та полісахариди, є ідеальним матеріалом для тканинної інженерії. Вони мають не тільки переваги над синтетичними полімерами на неорганічними скафолдами, але й забезпечують утворення 3-D форм з морфологією, наближеною до екстраклітинної матриці природних тканин. [40-42]. Завдяки вираженій гідрофільності, біосумісності, здатності до біодеградації, гідрогелі служать в якості скафолдів в тканинній інженерії [43-44], носіями для систем доставки лікарських засобів [45]. З метою покращення механічних характеристик пропонуються гідрогелі з подвійною полімерною сіткою [46-48], а також нанокомпозитні гідрогелі [45].

В даній роботі запропоновані гідрогелі на основі НА та хітозану з додаванням натрію альгінату. Два полімери природнього походження формують матрицю через «зшивання» їх макромолекул шляхом взаємодії між аміно- та карбонільними групами. Також іони кальцію  $Ca^{2+}$ , які знаходяться у фізіологічному оточенні імплантату (*in vivo*), або в розчині SBF (*in vitro*), або частково вивільняються в процесі розчинення НА, включаються в процес зшивання макромолекул альгінату. В результаті відбувається формування гідрогелю з більш стабільною структурою без застосування допоміжних зшиваючих агентів хімічного походження.



### *Матеріали*

Натрію альгінат низької в'язкості (E407, Китай), кальцію хлорид  $\text{CaCl}_2$ , ортофосфорна кислота  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd), хітозан (М.М.150 kDa, Fluka, Німеччина).

#### *2.1.1 Методика синтезу*

- Приготувати 0,1М розчин  $\text{CaCl}_2$ ; додати 10 М водний розчин  $\text{NaOH}$  до значення  $\text{pH} \sim 11$ , (P1).
- Розчинити хітозан в 0,06М розчині  $\text{H}_3\text{PO}_4$  при температурі  $37^\circ\text{C}$  протягом 24 годин. Кількість хітозану має складати 40 мас.% по відношенню до вмісту ГА в готовому продукті (P2).
- P2 додати до P1 крапельним методом (100мл/10 хвилин) при перемішуванні (P3).
- P3 суміш нагрівати при температурі  $60^\circ\text{C}$  протягом 10 хвилин.
- Відкорегувати  $\text{pH}$  до значення  $\sim 7,4$  (P4).
- «Зістарювання» P4 суміші протягом 1 доби.
- Промити дистильованою водою.
- Відділити тверду фракцію за допомогою центрифуги, в результаті чого отримати гелеподібну субстанцію вологістю  $\approx 90\%$  (P5). На цій стадії матеріал може після стерилізації бути застосований для ін'єкцій у зону кісткового дефекту, як HA/CS композит.
- До P5 додати порошок натрію альгінату в кількості 1 або 1,5 мас.%, перемішати з застосуванням ультразвуку до гомогенної маси та залишити на 24 години. На даній стадії утворюються нанокompозити HA/CS/Alg<sub>1,0</sub> та HA/CS/Alg<sub>1,5</sub> відповідно.
- Стерилізувати матеріал 20 хвилин під ультрафіолетовим випромінюванням.

### 2.1.2 Результати дослідження

#### *Просвічуюча електронна мікроскопія*

Наноструктура НА/CS була досліджена з допомогою ПЕМ (рис. 2.1). Кристаліти НА мають голчасту форму з середнім розміром кристалітів біля 30 нм. При формуванні НА/CS/Alg композиту натрію альгінат був введений до реакційної суміші вже після формування кристалітів НА, тому не впливав на їх наноструктуру. Тому структурні характеристики, отримані в результаті мікроскопічних та рентгенівських досліджень, приводяться тільки для НА/CS композитів, і не приводяться для НА/CS/Alg.

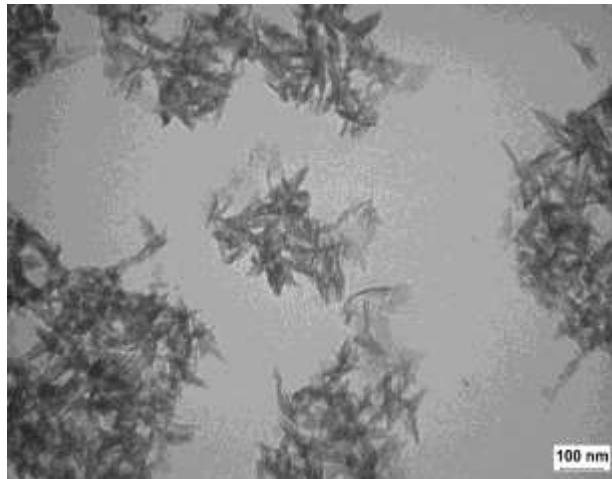


Рисунок 2.1 – НА/CS композит: ПЕМ зображення кристалітів НА

#### *Рентгенівська дифракція*

Спектри рентгенівської дифракції висушених при 37°C та прожарених при 900°C протягом 1 години зразків представлено на рис. 2.2. Фазовий склад щойно приготованих зразків гідрогелів представлений низько кристалічним НА (JCPDS 9-432). Середній розмір кристалітів був розрахований за формулою Шерера в (002) та (004) площинах. Значні мікродеформації, визначені для експериментальних зразків, очевидно є наслідком впливу хітозану на формування НА (таб.2.1).

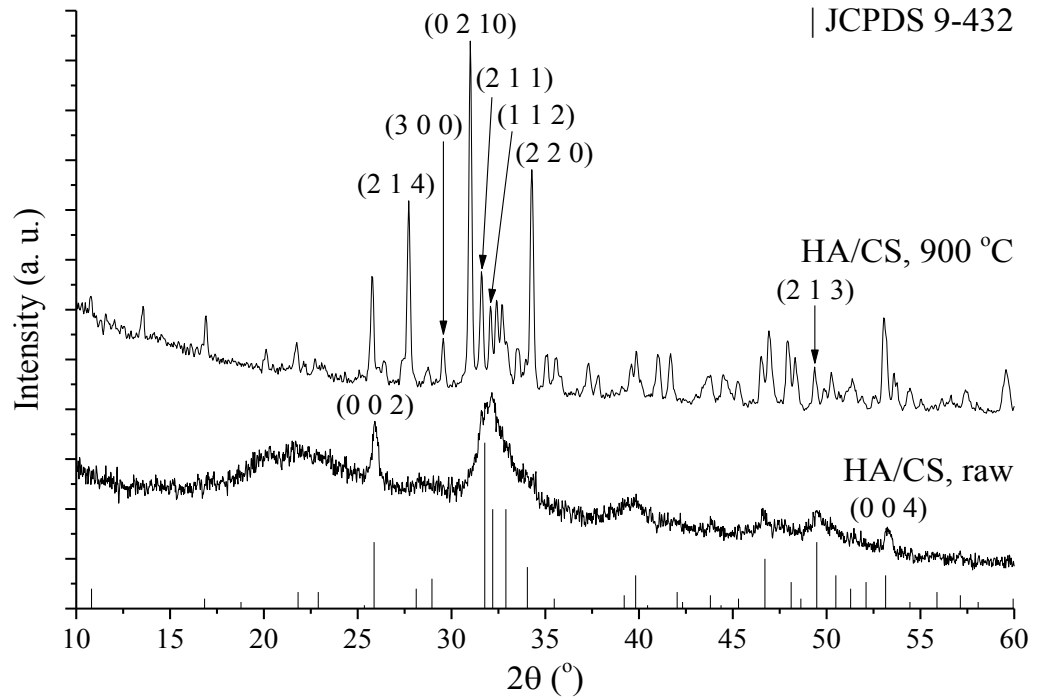


Рисунок 2.2 – Спектри рентгенівської дифракції HA/CS до (нижній) та після(верхній) термічної обробки

Таблиця 2.1 – Структурні параметри висушеного при 37°C HA/CS композиту

Зразок	L (Шерер), нм		Метод апроксимації	
	(002)	(004)	L, нм	$\varepsilon \cdot 10^3$
HA/CS, 37°C	25,7	22,9	12,1	3

Дві фази були ідентифіковані в відпаленому зразку - трикальцій фосфат (JCPDS 9-432) та гідроксиапатит (JCPDS 9-432). Відпалювання було проведено з метою визначення Ca/P співвідношення [49]. Результат свідчить про утворення не стехіометричного гідроксиапатиту у складі композитного матеріалу (таб.2). Середній розмір кристалітів після відпалювання в результаті рекристалізації збільшився більше, ніж вдвічі.

Таблиця 2.2 – Структурні параметри відпалених зразків

Зразок	L (Шерер), нм							Вміст TCP, %
	TCP (JCPDS 70-2065)				HA (JCPDS 82-1943)			
	(214)	(300)	(210)	(220)	(211)	(112)	(213)	
HA/CS, 900 °C	50	52,8	53,5	50,7	44,1	48,2	51,3	7,8

### ІЧ спектроскопія

Дослідження методом ІЧ спектроскопії були проведені з метою оцінити функціональні групи компонентів досліджуваного матеріалу та їх зв'язки.

Дослідження методом ІЧ спектроскопії були проведені з метою встановити зміни в структурі досліджуваних матеріалів, які відбуваються під час синтезу та після знаходження зразків протягом 6 діб в умовах, що імітують фізіологічні: SBF розчин, 37°C . На рис.2.3 представлений спектр HA/CS композиту до та після дії SBF в порівнянні з чистим CS.

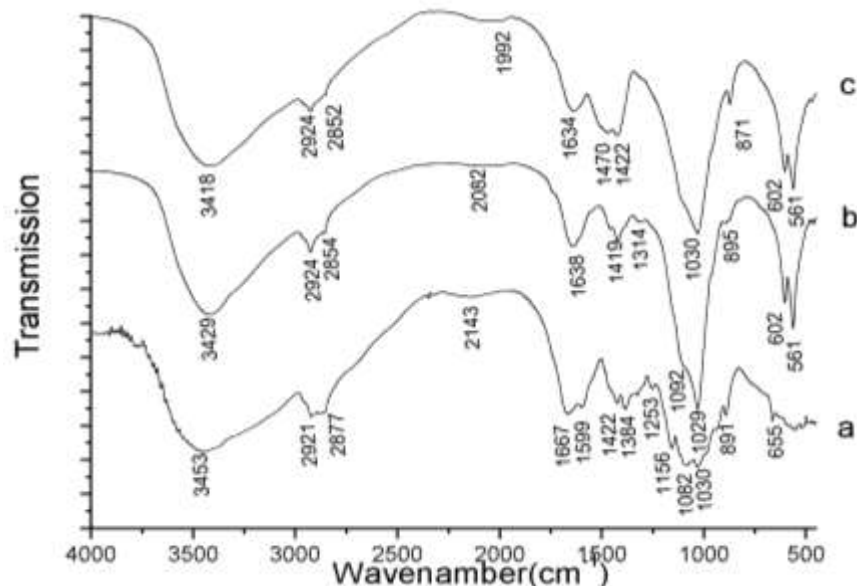


Рисунок 2.3 – ІЧ спектри а) CS, б)HA/CS нанокompозит, с)HA/CS нанокompозит після 6 діб в SBF розчині

Характеристичні хвильові числа для функціональних груп досліджуваної групи зразків приведені в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3 – Характеристичні хвильові числа HA, CS та HA/CS  
нанокомпозиту

Функціональні групи	Тип сполуки та відповідні хвильові числа, см <sup>-1</sup>			
	HA	CS	HA/CS нанокомпозит (до SBF розчину)	HA/CS нанокомпозит (після SBF розчину)
-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [51,52]	564 952 1033 1080		561 960 1029 1098 плече	561 963 1030 1098 плече
-OH [50]	3431 630		3429 602	3419 602
-CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> [50]			876	871,7
-OH валент, -OH водн.зв'язані, NH <sub>2</sub> as. валент, N-H валентні в NH-O-C [50]		3453	3430	3419
-CH <sub>2</sub> -as.		2921 2877	2924 2854	2924 2852
C=O валент. $\nu_{as}$ (1650-1590)		1667	1638	1634
Деформац. $\delta N-H$ and $\nu C-N$ (AmidII)		1599	1541	відсутні
Деформац. -OH в C-O-H [53]		1422	1419	1423 (зростання інтенсивності)
-CH <sub>2</sub> -deformation $\delta$		-	1457	1470
C-N валентні поєдн.з NH. (amide III)		1384	1384 (зменшення інтенсивності)	відсутні
CH <sub>2</sub> поєдн. з OH		1326	1310	відсутні
C-N валентні (1220-1020)		1156	відсутні	відсутні
C-O валентні (-CH-OH, вторинні гідроксил.групи) [54]		1082	1029	1030
C-O валент (-CH <sub>2</sub> -OH первинні гідроксилгрупи) [55]		1031		
Деформац. N-H в первин.амінах		891 941 665	895 відсутні відсутні	відсутні відсутні відсутні

Зміни в ІЧ спектрах зразків HA/CS порівняно з HA та CS, як до так і після витримання їх в розчині SBF, свідчать про взаємодію функціональних груп компонентів нанокompозитного матеріалу. Зокрема, в HA/CS спектрі з'явився новий пік, який відноситься до  $-CH$  коливань при  $1457\text{ cm}^{-1}$  та відбулося його зміщення до  $1470\text{ cm}^{-1}$  після SBF дії протягом 6 діб. Відбулися зміни в смугах, асоційованих з N-H та C-N коливаннями в HA/CS порівняно з CS. Крім того, деякі з цих піків відсутні на спектрі зразків після їх перебування в SBF. Отримані дані свідчать, що композитний матеріал взаємодіє з іонами SBF розчину, тобто проявляє біоактивність.

ІЧ спектри другої групи зразків, а саме Alg, HA/CS/ Alg<sub>1,0</sub> та HA/CS/Alg<sub>1,0</sub> після перебування в SBF, приведені на рис.2.4, а основні характеристичні хвильові числа в табл. 2.4. ІЧ спектр HA/CS/Alg<sub>1,5</sub> не демонструє відмінностей порівняно з HA/CS/ Alg<sub>1,0</sub>, тому не приводиться.

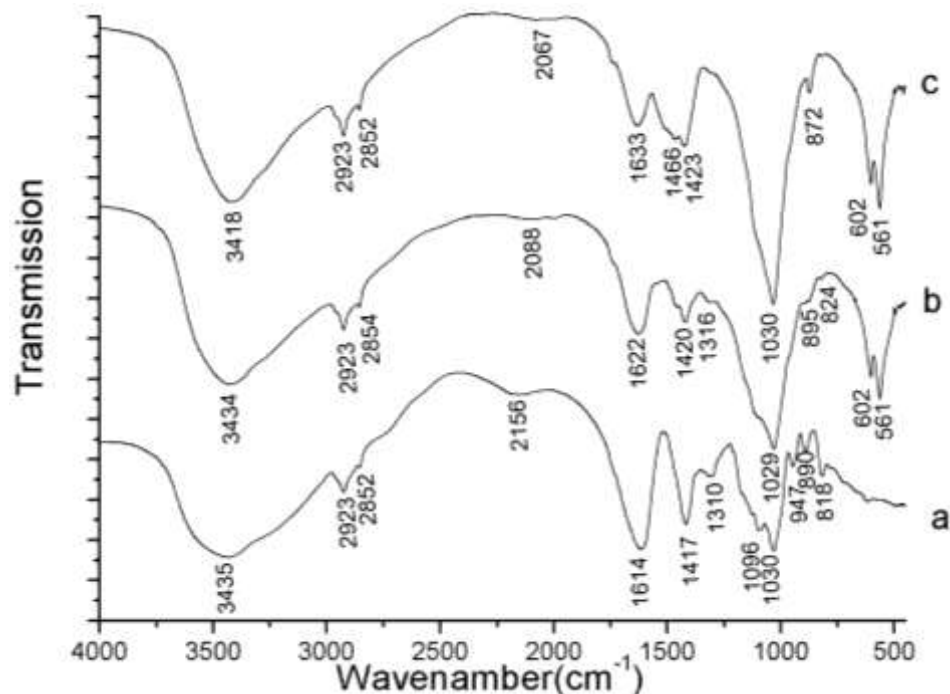


Рисунок 2.4 – ІЧ спектр а) Alg, б) HA/CS / Alg<sub>1,0</sub> в) HA/CS / Alg<sub>1,0</sub> після 6 діб в SBF

Таблиця 2.4 – Характеристичні хвильові числа Alg та HA/CS/Alg<sub>1,0</sub>

Функціональні групи	Тип сполуки та відповідні хвильові числа, см <sup>-1</sup>		
	Alg	HA/CS/Alg <sub>1,0</sub> до SBF	HA/CS/Alg <sub>1,0</sub> після SBF
-ОН валент. в – COOH (3550- 3500)	3435	3434	3418
-ОН валент. в – COOH (воднево- зв'язані, 3300- 2500)	2923	2923	2924
-CH <sub>2</sub> -валентні (2870-2845)	2852	2852 (збільшення інтенсивності)	2852(збільшення інтенсивності)
-C=O валент. (Amid1-1650- 1590)	1615	1622	1634
C-O валент. симетр. в COO <sup>-</sup> (≈1400- 1300)	1417	1420	1425
Деформац. –ОН в COOH (1450- 1250)	1340	1304	відсутні
Деформац. –О-Н в С-О-Н (вторинні гідрокс. групи 1125-1030)	1030 1097	1029 1092	1031 відсутні
Деформац. ОН груп в COOH (955-890)	947 890	відсутні 893 (збільшення інтенсивності)	відсутні відсутні

У спектрі Alg смуги коливань при 3435 см<sup>-1</sup> та 2923 см<sup>-1</sup> відповідають валентним коливанням вільних та воднево зв'язаних ОН груп в карбонових кислотах [56]. Смуга коливань з піком при 1615 см<sup>-1</sup> в чистому Alg, яка відноситься до валентних коливань в карбонільній групі –C=O, зміщується до 1622 см<sup>-1</sup> та 1634 см<sup>-1</sup> в композиті HA/CS/Alg<sub>1,0</sub> до та після перебування в SBF відповідно. Також С-О симетричні валентні коливання в групі COO<sup>-</sup> при

1417  $\text{cm}^{-1}$  для Alg зміщуються в HA/CS/Alg<sub>1,0</sub> до 1420  $\text{cm}^{-1}$  та 1425  $\text{cm}^{-1}$  до та після SBF розчину відповідно. Причиною таких змін може бути формування зв'язків між карбоксилат аніоном  $\text{COO}^-$  в Alg та протонною аміногрупою  $\text{NH}_3^+$  в CS. В SBF розчині спостерігається утворення комплексів між функціональними групами композитного матеріалу та іонами фізіологічного розчину. Дані припущення підтверджуються змінами в спектрі HA/CS після додавання Alg: піки 1638  $\text{cm}^{-1}$  та 1541  $\text{cm}^{-1}$ , які належать протонним аміногрупам в HA/CS, зсуваються до 1622  $\text{cm}^{-1}$  and 1543  $\text{cm}^{-1}$  в спектрі HA/CS/Alg<sub>1,0</sub>, а після дії SBF останній пік відсутній. Зміни в коливаннях OH в карбоксильних групах альгінату при 1340, 1030, 1097, 947, 890  $\text{cm}^{-1}$  також мають місце. Це пояснюється тим, що карбоксильні групи альгінату іонізуються до  $\text{COO}^-$  та утворюють водневі і інші зв'язки під час формування HA/CS/Alg<sub>1,0</sub> композиту з подальшим утворенням нових зв'язків у SBF розчині.

## *2.2 Дослідження впливу альгінату натрію на структурну цілісність та деградацію матеріалу для ін'єкцій на основі HA та хітозану*

Біоматеріал, створений для доставки в зону кісткового дефекту методом ін'єкцій, повинен бути структурно цілісним для запобігання його вимивання потоком крові [57,58]. Тестування структурної цілісності проводили на зразках HA/CS, HA/CS/Alg<sub>1,0</sub>, HA/CS/Alg<sub>1,5</sub>, шляхом нанесення гідрогелю у формі кільця на поверхню чашки Петрі в розчин SBF. Зразки постійно коливались в шейкері ( $\text{rpm}=60$ ,  $t=37^\circ\text{C}$ ) протягом 7 діб (рис.2.5). Гідрогель HA/CS почав втрачати свою форму вже після 1 доби коливань, HA/CS/Alg<sub>1,5</sub> почав розвалюватись на 5 добі коливань, а повністю втратив свою початкову форму через 7 діб. Зразок HA/CS/Alg<sub>1,0</sub> залишався стабільним, зберігав свою початкову форму після 7 діб коливань.





а)

1 година



б)

1 день



в)

3 дні



г)

7 днів

Рисунок 2.5 – Тест на структурну цілісність зразків HA/CS (справа), HA/CS/Alg<sub>1,0</sub> (зліва), HA/CS/Alg<sub>1,5</sub> по центру

Таким чином, при введенні альгінату натрію в склад HA/CS гідрогелю поліелектролітна реакція між Alg та HA/CS має місце, і в'язкість матеріалу підвищується. Здатність гідрогелю HA/CS підтримувати свою структурну цілісність зростає при додаванні Alg, але вміст останнього більший, ніж 1 мас.%, підвищує ступінь набухання та прискорює втрату форми.

#### *Тест на деградацію та ступінь набухання*

Процес деградації є важливим фактором для будь-якого біоматеріалу, призначеного для імплантації. Досліджувані зразки HA/CS, HA/CS/Alg<sub>1,0</sub>, HA/CS/Alg<sub>1,5</sub> були представлені у формі куба зі стороною 1 см та мали вологість біля 75%. Кожен зразок був поміщений в окреме ситечко та опущений в склянку з SBF розчином. Протягом дослідження всі зразки були поміщені в шейкер (rpm=60, t=37°C) терміном 5 діб. Дослідження ступеню

набухання проводили в короткий термін- перші 5 хвилин з інтервалом 1 хвилинка. Ступінь деградації визначали протягом 5 діб з інтервалом 1 доба. Результати дослідження наведені на рис.2.6.

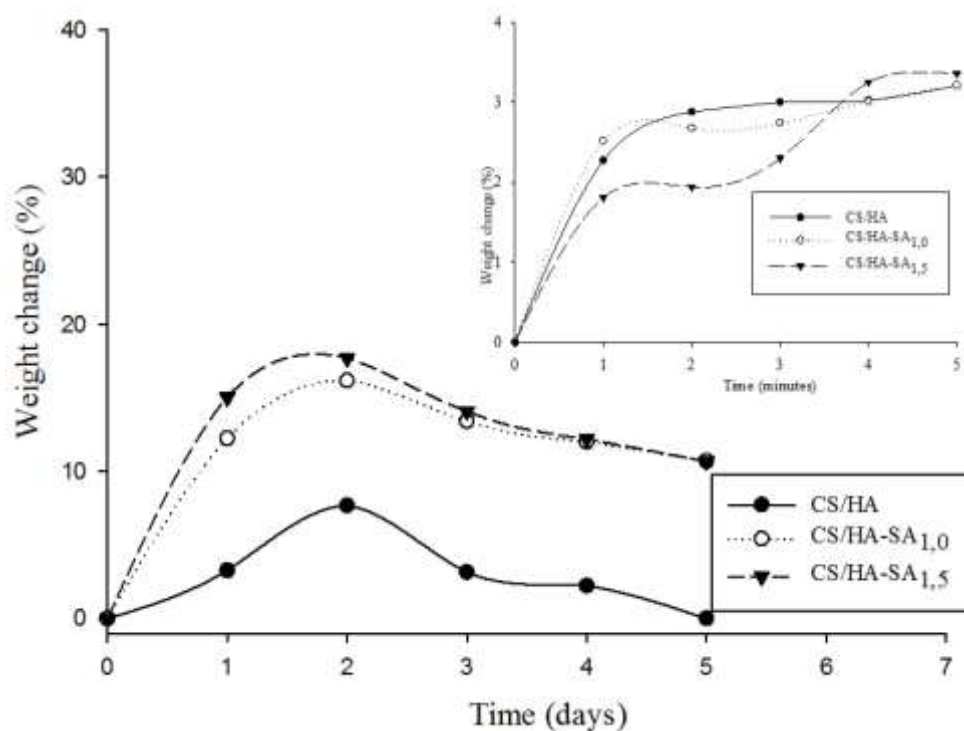


Рисунок 2.6 – Ступінь набухання та ступінь деградації зразків HA/CS, HA/CS/Alg<sub>1,0</sub>, HA/CS/Alg<sub>1,5</sub>

### Висновок

Гідрогелі на основі гідроксиапатиту і хітозану (CS) з додаванням альгінату натрію (Alg) були синтезовані методом «мокрої хімії». Структура, морфологія, хімічний та фазовий склад гідрогелів HA/CS/Alg охарактеризовані SEM, ACM, FT-IR та XRD методами. HA/CS/Alg гідрогелі мають у своєму складі низько- кристалічний HA (JCPDS 9 432) з середнім розміром голчатих кристалітів 25 нм. Після введення порошку альгінату до складу HA/CS/Alg гідро гелю спостерігається підвищення в'язкості композиту в результаті поліелектролітної реакції між альгінатом і хітозаном. Два природних полімери та іони  $Ca^{2+}$ , які частково вивільнюються зі складу HA, утворюють полімерну матрицю шляхом зшивання макромолекул полімеру через гідроксильні, карбонільні та аміногрупи. Ці процеси

сприяють формуванню більш стабільної структури гідрогелю HA/CS/Alg порівняно з HA/CS. Дослідження структурної цілісності та деградації матеріалів показали, що HA/CS/Alg<sub>1,0</sub> зберігає свою початкову форму протягом 7 днів коливального навантаження в розчині SBF в шейкері (50 об/хв), в той час як HA/CS/Alg<sub>1,5</sub> розпадається на фрагменти. HA/CS гідрогель повністю втрачає свою форму через 1 день експозиції. Таким чином, здатність HA/CS гідрогелю підтримувати форму дефекту при імплантації в кісткову тканину підсилюється при додаванні альгінату, але вміст останнього більший, ніж 1мас.% зменшує пластичність матеріалу, збільшує набухання і прискорює деградацію.

### *2.3 Композитний матеріал біомедичного призначення на основі фосфорельованого хітозану у формі порошку та гранул*

#### *2.3.1 Характеристика матеріалу та його складових матеріалу*

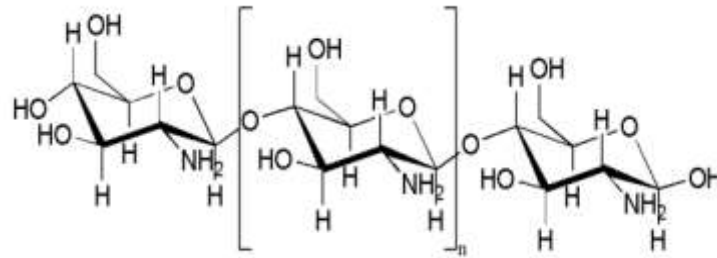
Інженерія кісткової тканини вимагає пошуку новітніх матеріалів, які індують формування нової кістки, запобігають росту небажаних сполучних тканин, поповнюють втрату кісткової маси, а також сприяють росту кровоносних судин та проліферації кісткових остеобластів на ранній стадії.

В даному аспекті найбільш перспективними є композитні матеріали на основі полімерів природного походження та неорганічних фосфатних сполук з розгалуженою системою пор, що сприяє проростанню нативної кісткової тканини в об'єм імплантата з поступовою його біодеградацією та заміщенням природною кісткою. Присутність полімерної складової та введені біологічно активні речовини надають матеріалу біоактивності.

#### *Полімерна складова*

Полісахариди широко застосовуються в біоінженерії завдяки наявності в хімічній структурі функціональних гідроксил-, алкіл-, аміно- груп, які можуть бути здатними до взаємодії з іншими компонентами реакційної системи за фізіологічних умов.

Використання хітозану в якості полімерної складової обумовлене його біосумісністю та здатністю до біодеградації. Хітозан, похідне хітину, є лінійним кристалічним полісахаридом, що складається з мономерів  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) N-ацетил-D-глюкозаміну. Фрагмент макромолекули хітозану представлений наступною структурною формулою:



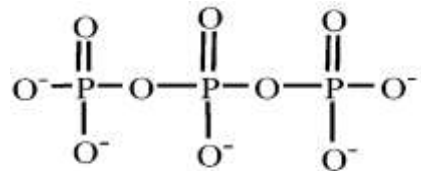
Структурна подібність хітозану до екстраклітинного матриксу глікозаміногліканів робить його привабливим біополімером для кісткової тканини. За рахунок еластичності та пористості хітозанові матрикси легко заповнюють кісткові дефекти різної геометрії. Тим не менше, незважаючи на задовільні результати експериментів на тваринах, а саме збільшення остеогенезу і ангіогенної активності без утворення фіброзної тканини, хітозан не достатньо остеогенний, щоб самостійно викликати бажану швидку кісткову регенерацію на початковому етапі лікування кістки [59].

Желатин – продукт денатурації основної органічної складової кісткової тканини – колагену; це білковий продукт тваринного походження, який являє собою суміш лінійних поліпептидів з різною молекулярною масою. Його основними компонентами є гліцин, пролін і оксипролін.

#### *Мінеральна складова*

В останній час великий науковий інтерес викликають неорганічні полімери - поліфосфати (ПФ), їх загальна формула –  $M_{(n+2)}P_nO_{(3n+1)}$ . Це солі поліфосфорної кислоти, які мають у розчині два типи гідроксильних груп з різною тенденцією до дисоціації: бокові групи (дві у молекулі) є слабкими кислотами, а середні гідроксильні групи, кількість яких дорівнює кількості атомів фосфору, є сильно кислотними. Неорганічні поліфосфати визнані як

терапевтичний агент, який стимулює ростовий фактор фібробластів і підсилює остеогенну диференціацію стовбурових клітин, а також, будучи адсорбованим на пористій поверхні ГА *in vivo*, підсилює кісткову регенерацію[60]. Прикладом низькомолекулярного неорганічного поліфосфату є триполіфосфат натрію  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  (ТПФ), представлений наступною структурною формулою:



Введення фосфатних функціональних груп в структуру хітозану (фосфорелювання) представляє інтерес для тканинної інженерії. Дія поліфосфатів в ролі катіонних іонообмінників базується на їх здатності обмінювати іонно приєднані катіони ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) на катіони біомолекул у розчині. Літературні джерела свідчать, що фосфорельовані хітозанові мембрани індукують біоміметичну депозицію кальцій фосфатів *in vitro*, що надає полімер-апатитним імплантатам остеокондуктивних властивостей [61]. Полімерна сітка, яка формується при «зшиванні» хітозану поліфосфатами, може слугувати як система для іммобілізації лікарських засобів з подальшою їх доставкою в проблемну зону шляхом дифузії [62].

#### *Біологічно активні речовини*

*Наночастинки хітозану* були отримані відомим методом іотропного гелеутворення з використанням натрієвої солі триполіфосфату завдяки взаємодії протилежно заряджених іонів макромолекул хітозану, як полікатіону, та негативно зарядженої молекули натрієвої солі триполіфосфату ( $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ), яка при кислих значеннях ( $\text{pH}=3$ ) присутня в розчині у вигляді фосфонієвого аніону  $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ . Для підсилення протимікробної дії, властивій наночастинкам хітозану, останні були додатково модифіковані іонами  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ . Суспензії наночастинок, легованих іонами металів, проявляють сильнішу

протимікробну дію, ніж суспензія наночастинок чистого хітозану і значно перевищують протимікробну активність відповідних іонів металів. Найбільшу протимікробну активність проявили наночастинки хітозану, леговані іонами  $Ag^+$ . Їх мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) в порівнянні з МІК наночастинок чистого хітозану для мікроорганізмів *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* знизилась в 8, 4, та 2 рази відповідно, а в порівнянні з МІК іону  $Ag^+$  - в 5, 40 та 10 разів відповідно [63]. Позитивно заряджені групи хітозану, приєднуючись до негативно зарядженої поверхні мікробної клітини, порушують її метаболізм[64]. Очевидно, що іони металів, додані до розчину хітозану, зшивають його молекули та роблять структуру більш щільною, в результаті чого збільшується ефект протимікробної дії.

*Комерційні лікарські засоби* – «аквадетрим вітамін Д» та декаметоксин.

*Вітамін Д* має кілька форм. Їх називають кальцифероли і представлені вони переважно у вигляді двох речовин: ергокальциферолу (вітаміну Д<sub>2</sub>), що надходить із дріжджів, та холекальциферолу (вітаміну Д<sub>3</sub>), який отримано із тканин тварин. За недостатності вітамінів групи D, у дітей переважно перших трьох років життя з'являються ознаки рахіту. В дорослих кісткова тканина втрачає кальцій і кістки розм'якшуються.

*Декаметоксин* – синтетичний антисептик та протигрибковий препарат для місцевого застосування. Механізм дії препарату полягає у порушенні проникності цитоплазматичної мембрани бактерій та грибків шляхом з'єднання з фосфатидними групами ліпідів мембрани. До декаметоксину чутливими є наступні збудники: стафілококи, стрептококи, *Corynebacterium spp.*, *Stomatococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp.*, *Microsporium spp.*, *Trichophyton spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, лямблії, трихомонади, препарат має також вірусоцидну дію.

Метою даної роботи було створення біосумісного з нативним оточенням матеріалу для застосування в хірургічній медицині, який має стимулювати процес відновлення кісткової тканини, замінювати ушкоджені чи видалені ділянки кістки. Перевагами даного матеріалу є наступні фактори:

- молекули природного катіоніту хітозану, будучи хімічно «зшитими» триполіфосфатом натрію, утворюють гранульованої (кулькоподібної) форми матеріал,
- форма матеріалу забезпечує заповнення дефектів складної геометрії з мінімальним зазором між кісткою та імплантатом, а простір між гранулами сприяє формуванню нових кісткових тканин по всьому об'єму імплантата;
- на поверхневій мембрані якого присутні фосфатні групи, здатні в умовах організму іммобілізувати сигнальні біомолекули, такі, наприклад, як фактори росту;
- присутність легованих іонами металів наночастинок хітозану надасть матеріалу протимікробних властивостей;
- технологія виготовлення дозволяє отримати готовий до використання матеріал з контрольованою нейтральною кислотністю, без застосування допоміжних хімічних речовин.
- матеріал не спричинює побічних ефектів, є зручним при стерилізації та використанні, має тривалий термін зберігання.

Матеріал складається із двох основних компонентів:

*A* – 2 - 3 мас.% розчин CS з молекулярною масою 50-80 кДа в 1 мас.% оцтовій кислоті;

*B* - ТПФ з концентрацією 2-80 мМ,

Співвідношенням  $A:B = 1:1 \div 1:2$ .

При цьому компонент *A* може бути представлений а) 2-3 мас.% розчином CS (молекулярна маса  $M.M. \geq 200$  кДа, ступінь деацетилювання (СД)  $\geq 85\%$ ) в 1 мас.% оцтовій кислоті або б) сумішшю розчину CS та 4-8 мас.% розчину желатину (1:1, об'ємні частки). Концентрація компоненту *B* складає 25-100 мМ, при цьому до компоненту *A* в якості біологічно активних речовин додані наночастинок CS, модифіковані іонами  $Ag^+$ , або  $Mg^{2+}$ , або  $Cu^{2+}$ , або  $Fe^{3+}$  у вигляді дрібнодисперсного ліофілізованого порошку, а також комерційні лікарські засоби – «аквадетрим вітамін Д» та декаметоксин. Сумарна кількість яких складає від 2 до 4 мас.% від маси компоненту *A*. Таким чином, матеріалів є наступним і складає:

- компонент А: CS або CS +желатин 83-56 мас.%
- Компонент В: ТПФ 15-40 мас.%
- Біологічно активні речовини 2-4 мас.%

Морфологічна картина гранули на основі фосфорельованого хітозану, приведена на рис.2.7, свідчить про шороховату пористу поверхню композитного матеріалу.

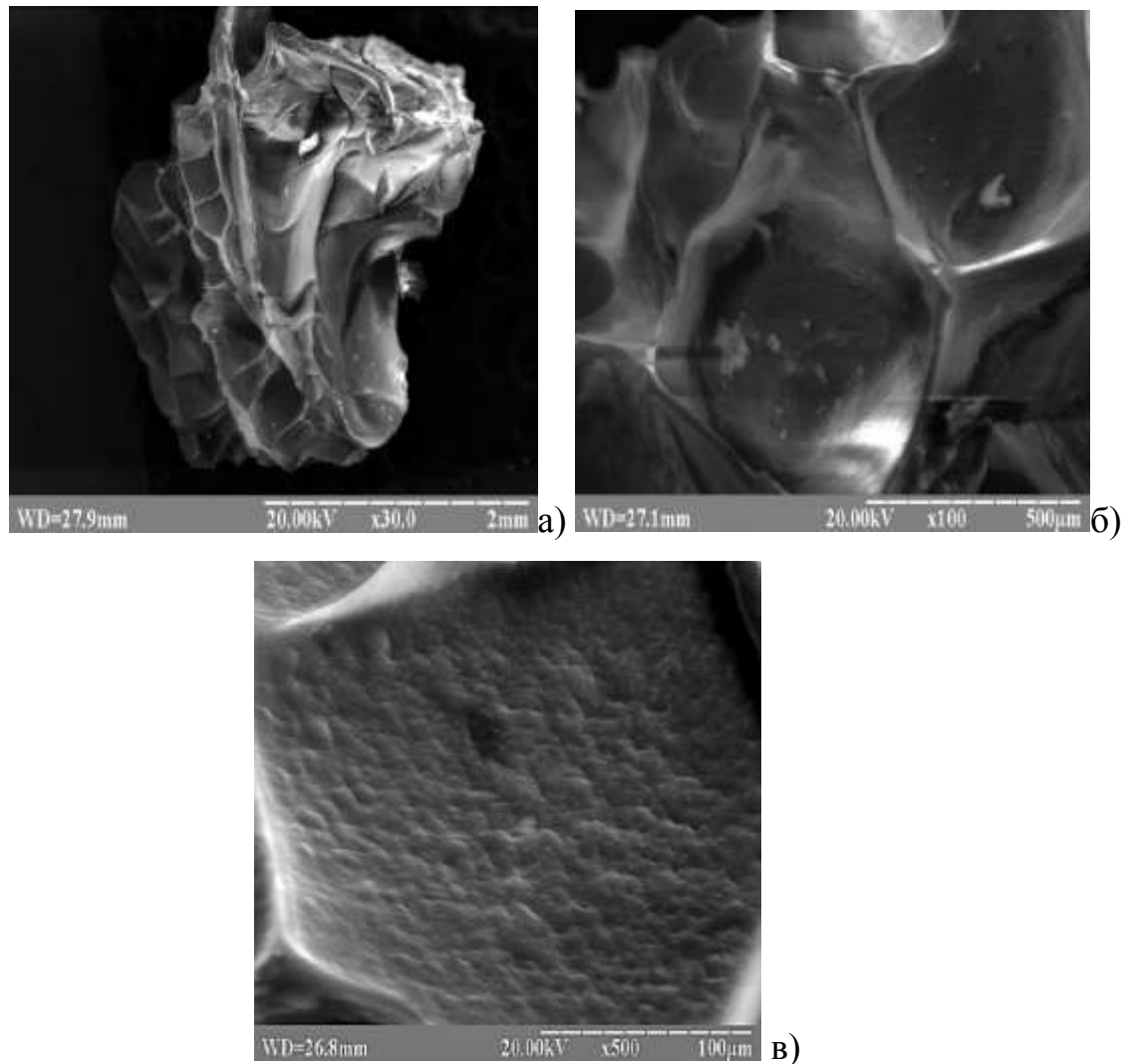


Рисунок 2.7 – Морфологія ліофілізованої гранули композитного матеріалу на основі фосфорельованого хітозану: загальний вигляд (а), поверхня (б) та розріз сферичної гранули(в)



### 2.3.2 Методика синтезу

- Розчиняємо 0,2 г хітозану (М.М. 200 кДа, СД 85%) в 10 мл 1 мас.% розчину оцтової кислоти при температурі 37 °С протягом 6 годин та фільтруємо для отримання однорідної суспензії (P1);
- До P1 додаємо 6 мг дрібнодисперсного ( $\leq 50$  мкм) порошку модифікованих іонами  $\text{Ag}^+$ , або  $\text{Mg}^{2+}$ , або  $\text{Cu}^{2+}$ , або  $\text{Fe}^{3+}$  наночастинок хітозану (P2);
- Суміш P2 перемішуємо з допомогою ультразвуку до отримання гомогенної суспензії (P3);
- До P3 додаємо 2 мкл комерційно придбаного препарату «Аквадетрим вітамін Д», 1мг декаметоксину та застосовуємо УЗ перемішування протягом 1 хвилини (P4).
- Крапельним методом (1мл/хв) вводимо суспензію P4 в 1 мас.% водний розчин ТПФ (25 мМ) при періодичному перемішуванні.
- Утворюються кульки композитного матеріалу, які витримуємо у вказаному розчині протягом 12 год при кімнатній температурі та значенні рН= 9÷10.
- Фільтруванням відділяємо утворений матеріал від розчину ТПФ з наступним промиванням в дистильованій воді до нейтрального значення рН та висушуванням при кімнатній температурі; в іншому випадку промитий матеріал заморожується при температурі -18°C з подальшим ліофільним висушуванням при температурі -180°C.

### 2.3.3 Дослідження композитного матеріалу *in vivo*. Морфологічні особливості регенерації кістки після імплантації отриманого біоматеріалу в її дефект

Композитний матеріал був поміщений в зону дефекту стегнової кістки щурів за методикою, наведеною в розділі «Інструментальні методи» на

термін 30 діб. Після цього стегнова кістка з зоною дефекту була вилучена, спеціально оброблена та досліджена. Результати показали, що на 30добу після імплантації синтезований матеріал знаходився локально в зоні дефекту. Міграції частинок матеріалу в червоний кістковий мозок, розташований в кістково-мозковому каналі, не спостерігалось. Матеріал був щільно оточений новоствореною кістковою тканиною, яка у вигляді піків проникала в його периферичні відділи за рахунок дифузії та резорбції, заміщуючи імплантований матеріал (рис. 2.8).

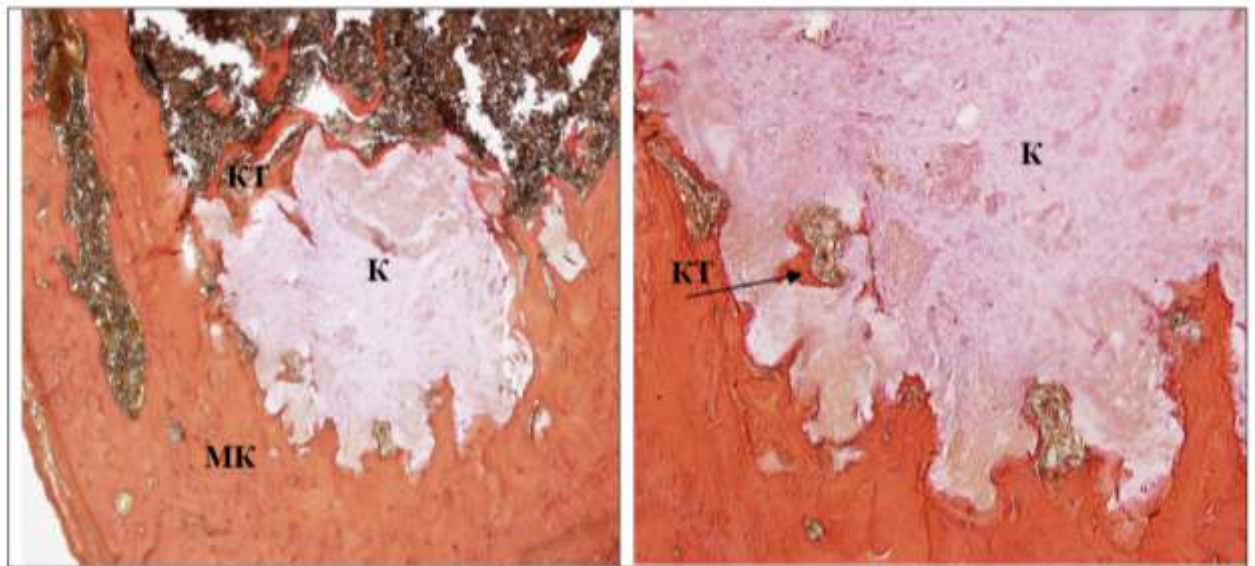


Рисунок 2.8 – Імплантований матеріал, розміщений в зоні дефекту, щільно оточений новоствореною кістковою тканиною, яка проникає в його периферичні відділи, поступово заміщуючи біоматеріал. КТ – кісткові трабекули в об'ємі керамічного матеріалу. МК- материнська кістка. Фарбування за ван Гізоном. Збільшення x20 (зліва), збільшення x40 (справа)

На невеликих ділянках біоматеріалу виявлено проростання кісткової тканини в її глибинні відділи. Особливістю було формування одиничних кісткових трабекул, між якими був розташований червоний кістковий мозок. З боку червоного кісткового мозку кісткомозкового каналу матеріал був відділений тонкими трабекулами кісткової тканини. Ознак деструкції

червоного кісткового мозку та запальних інфільтратів не виявлено, що свідчить про біосумісність досліджуваного матеріалу.

Вростання кісткової тканини в біоматеріал сприяє його щільному розташуванню в зоні дефекту та міцному контакту з кістковою тканиною, що вказує на високі остеointegraційні властивості.

Композитний біоматеріал в зоні дефекту має неоднорідну структуру за рахунок просочування тканинною рідиною та деструктування (рис. 2.9).

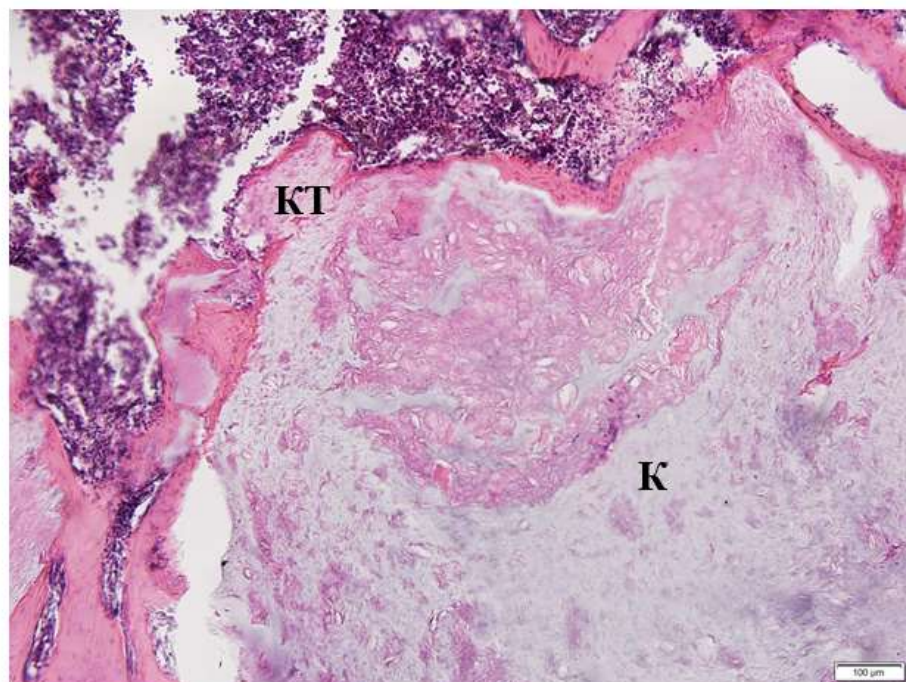


Рисунок 2.9 – Композитний біоматеріал (К) в зоні дефекту по граничній поверхні оточений новоствореною кістковою тканиною (КТ). Наявні осередки просочування матеріалу тканинною рідиною з ознаками перебудови. Фарбування гематоксилином і еозином. Збільшення x400

Таким чином по периметру композитного біоматеріалу, імплантованого в кістковий дефект, формується кісткова тканина, яка проникає у вигляді виступів в матеріал, що забезпечую щільний контакт біоматеріалу з кістковою тканиною. Досліджений матеріал володіє остеointegrативними властивостями, є біосумісним з кістковою тканиною та кістковим мозком.

## 2.4 Вплив ультразвуку та надвисоких частот на формування гідроксиапатиту, як компоненти композитних біоматеріалів

Серед вимог біомедичної інженерії щодо матеріалів для заповнення кісткової тканини на основі НА, нагальною є отримання матеріалів з нанорозмірними кристалітами НА та контрольованою морфологією. Ультразвуковий (УЗ) метод опромінення є дуже ефективним для впливу на морфологію через ультразвукові процеси, які викликають емульгування і гомогенізаційні ефекти в результаті взаємодії ультразвукових хвиль в рідкому середовищі. Ці два ефекти є відповідальними за морфологічні особливості та впорядкованість структури НА [65,66]. З іншого боку, процес синтезу, стимульований УЗ опроміненням, значно скорочує час синтезу ГА. УЗ викликає кавітацію у водному середовищі, яка індукує утворення, зростання і розпад мікробульбашок. Даний інтенсивний процес перемішування призводить до збільшення ступеню зародкоутворення кристалітів, в результаті чого відбувається зменшення розміру частинок і активації поверхні твердих матеріалів [67-71].

Метод синтезу під впливом надвисоких частот (НВЧ) також може бути використаний, щоб усунути недоліки традиційним методом «мокрої хімії». НВЧ метод забезпечує ефективну передачу теплової енергії по всьому об'єму реакційної суміші за рахунок високої частоти і нагріву, що сприяє суттєвому зменшенню часу синтезу [72-78].

### *Результати дослідження*

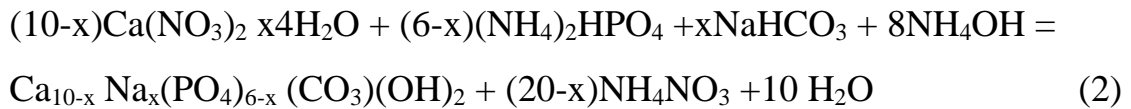
Дві групи зразків були синтезовані та досліджені. До першої групи належать зразки НА, які були отримані за відомою реакцією (1):



з використанням 0,167 М водного розчину нітрату кальцію та 0,1 М водного розчину гідрофосфату амонію при рН=11. Синтез відбувався як при

температурі реакційної суміші 80°C протягом 10 хвилин (зразок НА<sub>80</sub>), так і при кімнатній температурі 20°C (НА<sub>20</sub>). Обидва типи зразків зістарювали протягом 3 діб, після чого промивали та висушували.

До другої групи належать зразки карбонат апатиту сНА, отримані за такою ж технологією згідно наступної реакції (2):



де  $x$  –стехіометричний коефіцієнт, якому надавали значення 1.

Концентрація гідрокарбонату натрію  $\text{NaHCO}_3$ , доданого до розчину нітрату кальцію, становила 0,016 М. Концентрації солей кальцію та фосфору були такими, як у випадку реакції (1), при цьому зразок сНА<sub>80</sub> був отриманий при нагріванні реакційної суміші до 80 °С протягом 10хвилин, а сНА<sub>20</sub>– при кімнатній температурі 20°C.

Зразки НА<sub>80</sub>, НА<sub>20</sub>, сНА<sub>80</sub>, сНА<sub>20</sub> були синтезовані без впливу УЗ, НВЧ та виконували функцію зразків для порівняння. Всі інші експериментальні зразки були отримані згідно реакцій (1) та (2), але традиційні процеси нагрівання та зістарювання при утворенні кальцій фосфатів були замінені дією УЗ та НВЧ випромінювання різної потужності протягом 20 та 3 хвилин відповідно. Зразки НА<sub>50US</sub>, сНА<sub>50US</sub>, НА<sub>75US</sub>, сНА<sub>75US</sub>, НА<sub>100US</sub>, НА-1<sub>100US</sub>, сН<sub>100US</sub> були синтезовані під впливом УЗ потужністю 50 Вт, 75 Вт та 100 Вт. Зразки НА<sub>100MW</sub>, сНА<sub>100MW</sub>, сНА-1<sub>100MW</sub>, НА<sub>300MW</sub>, сНА<sub>300MW</sub>, НА<sub>600MW</sub>, сНА<sub>600MW</sub> були синтезовані під впливом НВЧ потужністю 100 Вт, 300 Вт, 600Вт. Два зразки: НА-1<sub>100US</sub> та сНА-1<sub>100US</sub> були синтезовані одночасно під дією двох факторів: УЗ та охолодженні. Перелік досліджених зразків та показники технологічного режиму відображені в таблиці 2.5.

#### *Вплив дії УЗ та НВЧ на співвідношення Ca/P*

XRD аналіз показав, що у всіх отриманих та досліджених зразках основною фазою є нестехіометричний кальцій дефіцитний апатит, а додатковими фазами є оксид кальцію (CaO) та фаза  $\text{CaNa}(\text{PO}_4)_7$ . Саме наявністю даних фаз, особливо фази CaO, яка часто формується паралельно з

фазою кальцій дефіцитного апатиту в присутності карбонат іонів, пояснюється підвищене ( $>1,67$ ) значення співвідношення Ca/P, яке збільшувалося пропорційно збільшенню потужності УЗ та НВЧ. При високих потужностях застосованого випромінювання відбувалося нагрівання реакційної суміші. Щоб виключити вплив температурного фактору, зразки  $\text{HA-1}_{100\text{US}}$  та  $\text{сHA-1}_{100\text{US}}$  охолоджували під час дії УЗ. В цьому випадку температура синтезу складала  $21^\circ\text{C}$ , а співвідношення Ca/P у продукті становило 1,69, що майже дорівнює співвідношенню в контрольному зразку  $\text{HA}_{80}$ , отриманому при нагріванні до  $80^\circ\text{C}$  (Ca/P=1,7) та є близьким до стехіометричного значення (1,67). При низьких потужностях УЗ ( $\leq 75$  Вт) спостерігалось суттєве зниження співвідношення Ca/P в порівнянні навіть з низькотемпературним контрольним  $\text{HA}_{20}$ . В той же час застосування НВЧ випромінювання потужністю 100 Вт протягом 3 хвилин сприяло отриманню  $\text{HA}$  зі співвідношенням Ca/P 1,69 вже при температурі  $39^\circ\text{C}$ . Підвищення потужності до 600 Вт супроводжувалось збільшенням температури суміші та співвідношення Ca/P до значення 1,8. На рис.2.10 приведені спектри рентгенівської дифракції зразків  $\text{HA}$ , отриманих без впливу фізичних факторів (a, b), під впливом УЗ (c,d), та під дією НВЧ (e). Дана група зразків була обрана також за принципом впливу температурного фактору в ході реакції, а саме:  $\text{HA}_{20}$  та  $\text{HA-1}_{100\text{US}}$  (дифракційні лінії b, d відповідно) були синтезовані при температурі близько  $20^\circ\text{C}$ , а температура синтезу зразків  $\text{HA}_{80}$ ,  $\text{HA}_{100\text{US}}$ ,  $\text{HA}_{300\text{MW}}$  (дифракційні лінії a, c, e) складала  $60-80^\circ\text{C}$ . На рис.2.11 представлені дифрактограми зразків карбонат апатитів, синтезованих як без впливу фізичних факторів ( $\text{сHA}_{80}$ ,  $\text{сHA}_{20}$ ), так і під впливом УЗ та НВЧ ( $\text{сHA}_{50\text{US}}$ ,  $\text{сHA}_{300\text{MW}}$ ).

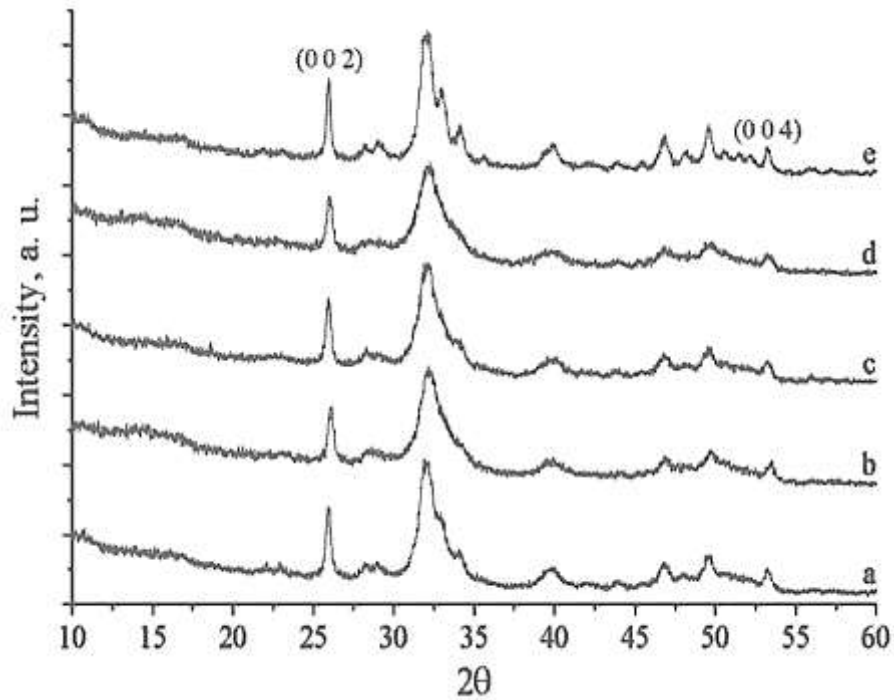


Рисунок 2.10 – XRD дифрактограми зразків НА, висушених при температурі  $37^{\circ}\text{C}$  :  $\text{HA}_{80}$  (a);  $\text{HA}_{20}$  (b);  $\text{HA}_{100\text{US}}$  (c);  $\text{HA-1}_{100\text{US}}$  (d);  $\text{HA}_{300\text{MW}}$  (e)

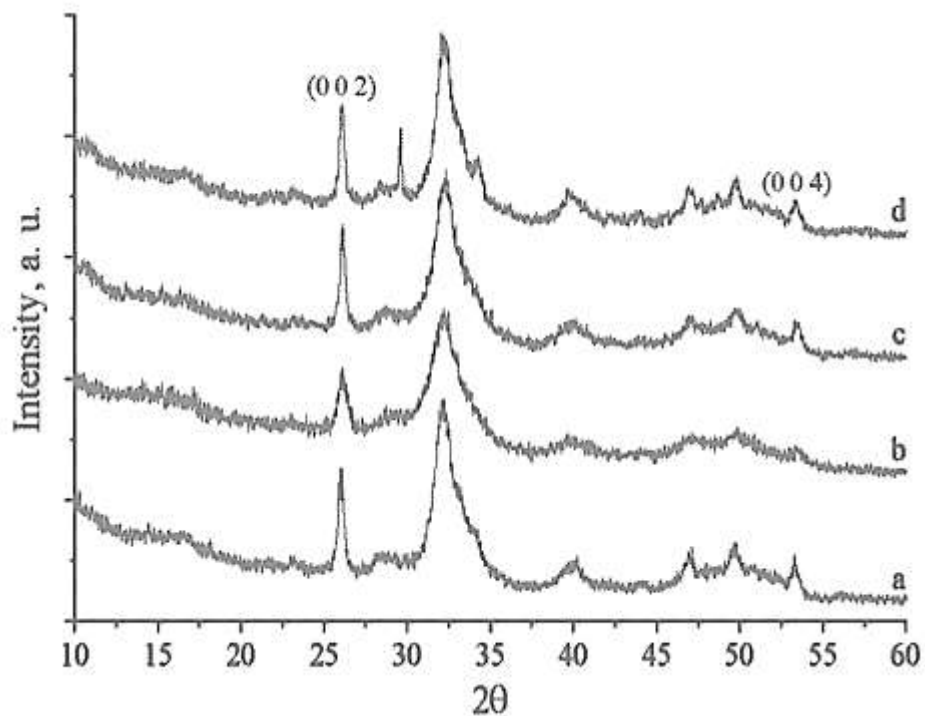


Рисунок 2.11 – XRD дифрактограми зразків карбонат апатитів cHA, висушених при  $37^{\circ}\text{C}$  :  $\text{cHA}_{80}$  (a);  $\text{cHA}_{20}$  (b);  $\text{cHA}_{50\text{US}}$  (c);  $\text{cHA}_{300\text{MW}}$  (d)

Таблиця 2.5 – Вплив технологічного режиму на структурні особливості НА

Зразок	Розмір кристалітів за Шеррером, нм		Параметр и кристалічної гратки, Å		Середній розмір кристаліт ів, нм	Умови синтезу		Ca/P
	(002)	(004)	a	c		T, °C	t, minute	
HA <sub>80</sub>	24,8	33,0	9,415	6,882	19,8	80	0	1,7
HA <sub>20</sub>	22,1	-	9,396	6,854	-	20	0	1,62
HA <sub>50US</sub>	21,1	17,3	9,426	6,856	27,1	21	20	1,28
HA <sub>75US</sub>	15,9	17,4	9,461	6,873	14,7	40	20	1,44
HA <sub>100US</sub>	24,5	26,3	9,420	6,882	22,9	60	20	1,75
HA-1 <sub>100US</sub>	21,6	21,9	9,39	6,884	21,4	21	20	1,69
HA <sub>100M</sub>	22,7	22,2	9,415	6,871	23,1	39	3	1,69
HA <sub>300M</sub>	31,0	40,8	9,394	6,887	25,0	75	3	1,8
HA <sub>600M</sub>	40,1	44,6	9,402	6,888	36,4	100	3	1,8
cHA <sub>80</sub>	23,6	21,9	9,353	6,877	23,3	80	0	1,8
cHA <sub>20</sub>	15,3	-	-	6,856	-	20	0	1,62
cHA <sub>50US</sub>	22,6	21,2	9,378	6,853	22,9	22	20	1,86
cHA <sub>75US</sub>	23,8	24,3	9,373	6,862	27,2	42	20	1,84
cHA <sub>100U</sub>	24,1	28,2	9,412	6,877	11	61	20	1,78
cHA <sub>100M</sub>	25,2	26,8	9,385	6,865	23,8	40	3	1,8
cHA <sub>300W</sub>	26,2	24,3	9,381	6,865	21,7	76	3	1,9
cHA <sub>600W</sub>	22,4	23,2	9,378	6,863	38,5	100	3	1,9

Примітка: HA - зразки, отримані за реакцією 1; cHA-зразки, отримані з додаванням гідрокарбонату натрію за реакцією 2.

#### *Вплив УЗ та НВЧ на розміри кристалітів*

У всіх зразках НА, отриманих під дією УЗ потужністю до 75 Вт за відсутності суттєвого нагрівання, відбувається переважний вплив ультразвуку на формування кристалітів. Спостерігається зменшення розміру кристалітів НА у площині 002 та наближення за розмірами до низькотемпературного (20°C) контрольного НА<sub>20</sub>. Температурні умови отримання зразку НА<sub>100US</sub> були близькими до НА<sub>80</sub>, то ж за розмірами кристаліти обох цих зразків були практично однаковими. У площині 004 під впливом УЗ відбулося суттєве зниження розміру кристалітів, в тому числі у зразку НА-1<sub>100US</sub>, отриманому при охолодженні системи, у порівнянні з контрольним НА<sub>80</sub> (21,9 нм та 33 нм відповідно). Таким чином, якщо розміри кристалітів у площині 002 в більшій мірі залежать від температурних умов синтезу, то в площині 004 очевидний вплив як температури, так і УЗ. Зразки



НА, отримані під дією НВЧ показали, що при потужності 100 Вт (температура синтезу до 39°C) розміри кристалітів в обох площинах є наближеними до низькотемпературного контрольного НА<sub>20</sub>, але при збільшенні потужності розміри кристалітів ростуть, перевищуючи майже вдвоє кристаліти у контрольному НА<sub>80</sub>.

У випадку зразків сНА під дією НВЧ до 300 Вт розмір кристалітів збільшується порівняно з контрольним сНА<sub>80</sub>, а при 600 Вт розмір кристалітів дорівнює контрольному. Аналогічний ефект спостерігається під дією УЗ високої потужності (100 Вт). У зразках сНА при збільшенні потужності УЗ спостерігається збільшення розміру кристалітів в обох площинах. Таким чином, при утворенні карбонат апатиту вплив УЗ та ПВЧ малої потужності призводить до збільшення розмірів кристалітів порівняно з контрольним зразком, а при збільшенні потужності випромінювання температурний фактор відіграє переважну роль, при цьому утворюються кристаліти, близькі за розміром до контрольного зразка.

Згідно даних просвічуючої мікроскопії було побудовано гістограми розподілу кількості часток залежно від їх розміру (рис.2.12) та мікроснімки скупчення наночастинок апатиту (рис.2.13).

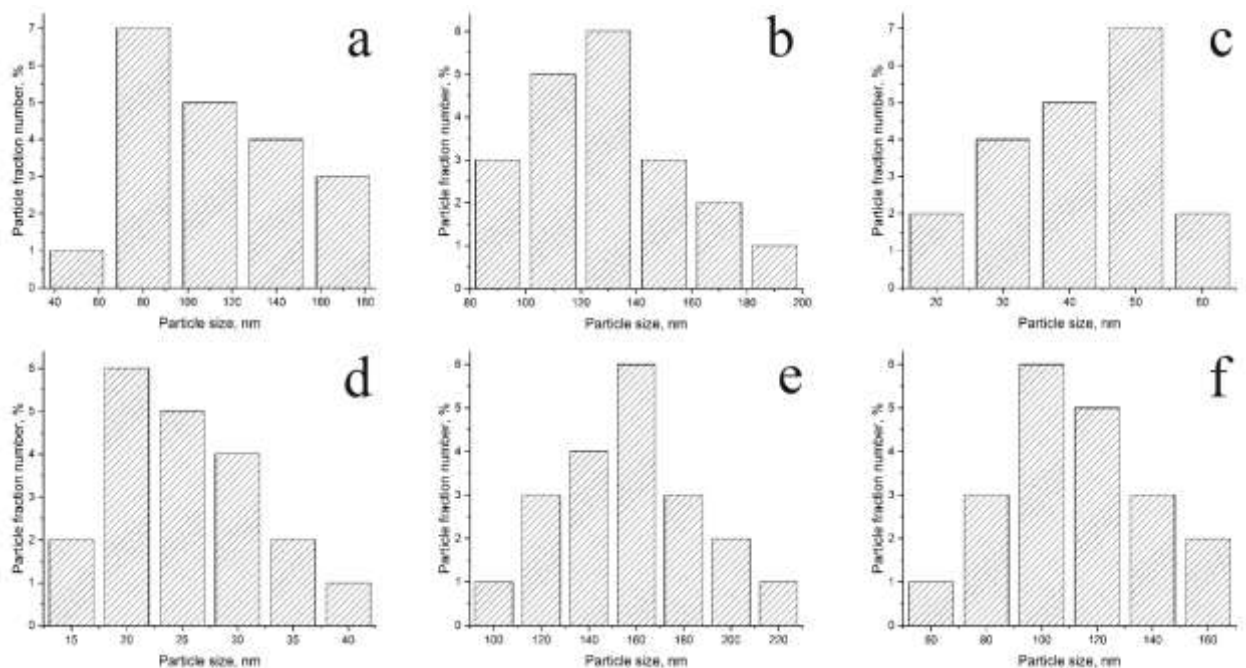


Рисунок 2.12 – Розподіл наночастинок за розмірами: НА<sub>80</sub> (a); сНА<sub>80</sub> (b); НА<sub>75US</sub> (c); сНА<sub>75US</sub> (d); НА<sub>600MW</sub> (e); сНА<sub>600MW</sub> (f)

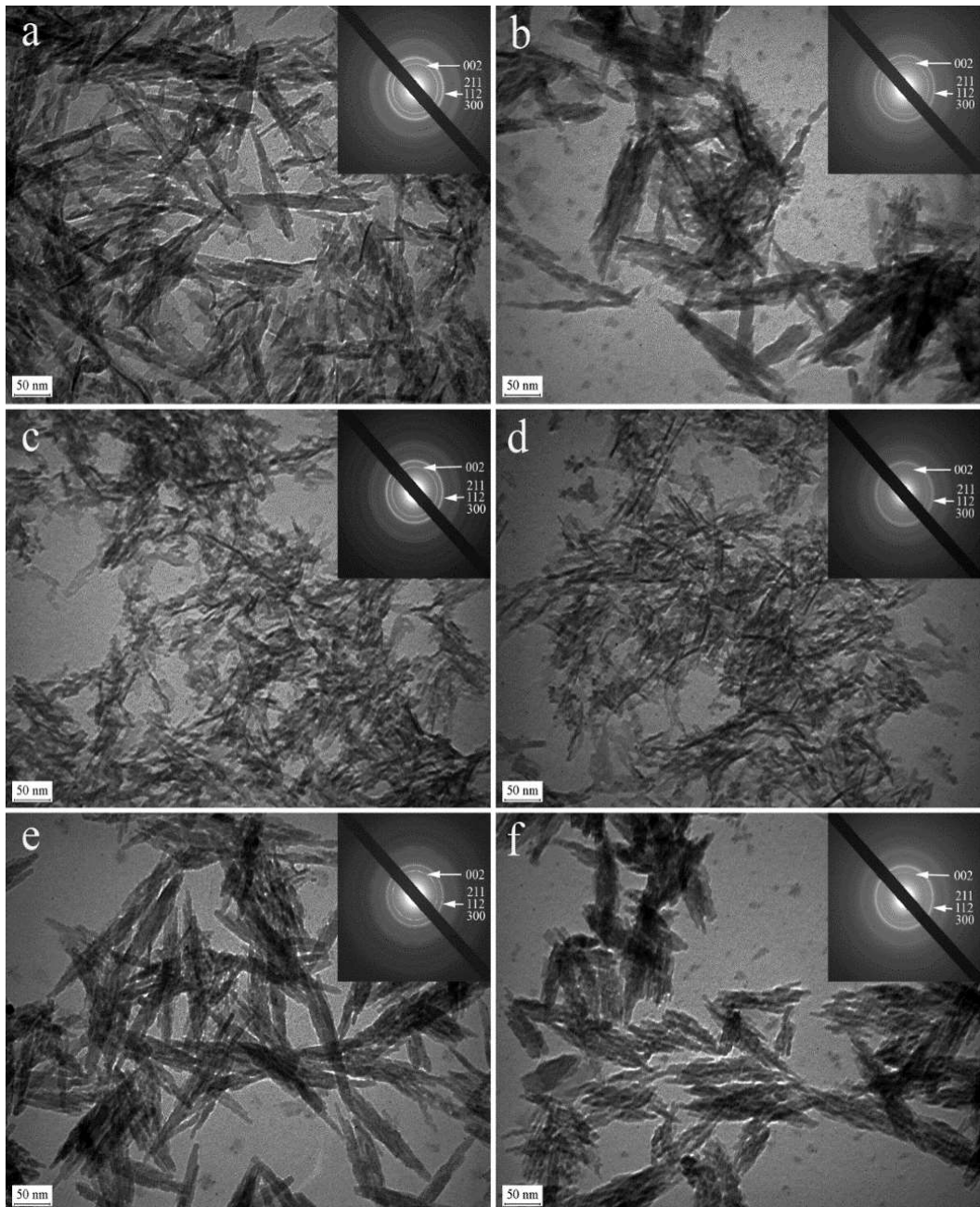


Рисунок 2.13 – ТЕМ зображення та електронна дифракція НА та сНА частинок: НА<sub>80</sub> (a); сНА<sub>80</sub> (b); НА<sub>75US</sub> (c); сНА<sub>75US</sub>(d); НА<sub>600MW</sub> (e); сНА<sub>600MW</sub> (f)

Електронна дифракція підтвердила утворення НА. Контрольні зразки НА<sub>80</sub> та сНА<sub>80</sub> мають розміри гольчатих кристалічних частинок 40-180 нм та 80-200 нм відповідно. Зразки, синтезовані під дією УЗ мають найменші розміри та становлять: НА<sub>75US</sub> – 20-60 нм та сНА<sub>75US</sub> – 15-40 нм. Зразки синтезовані під дією НВЧ потужністю 600 Вт мають розміри 100-220 нм (НА<sub>600MW</sub>) та 60-160 нм (сНА<sub>600MW</sub>).

### ІЧ спектроскопія

На рис.2.14 представлено ІЧ спектри двох груп зразків-гідроксиапатитів та карбонат апатитів, синтезованих без впливу фізичних факторів та під впливом УЗ та НВЧ:

- НА зразки, синтезовані згідно реакції (1): НА<sub>80</sub> та НА<sub>300MW</sub>)
- сНА зразки, синтезовані згідно реакції (2): сНА<sub>80</sub>, сНА<sub>50US</sub>, сНА<sub>300MW</sub>.

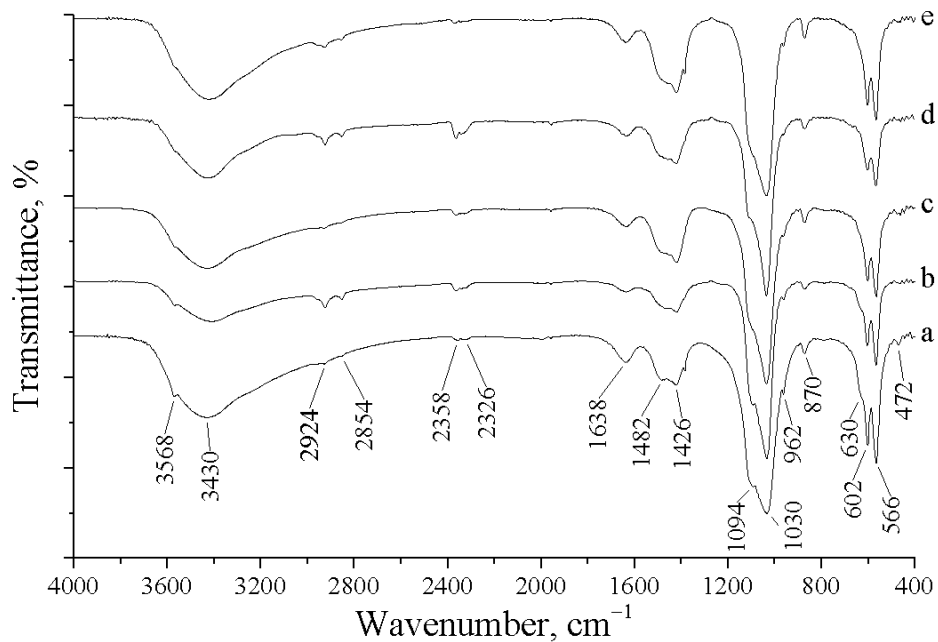
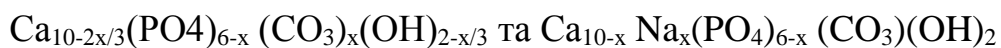


Рисунок 2.14 – ІЧ спектри НА та сНА отриманих зразків: НА<sub>80</sub> (a); сНА<sub>80</sub> (b); НА<sub>300MW</sub> (c); сНА<sub>50US</sub>(d); сНА<sub>300MW</sub> (e)

В таблиці 2.6 наведені дані про основні коливання в ІЧ спектрах для вказаних зразків.

Результати дослідження показують, що у обох випадках синтезу був сформований кальцій дефіцитний гідроксиапатит з карбонатною складовою, а саме:



Не зважаючи на те, що зразки були синтезовані як з додаванням гідрокарбонату натрію, тобто у присутності  $\text{CO}_3^{2-}$  або  $\text{HCO}_3^-$  іонів та одновалентного іону  $\text{Na}^+$ , так і без їх додавання, частоти коливань у всіх

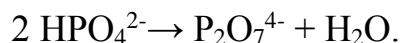
наведених ІЧ спектрах відповідають коливанням гідроксиапатитів з карбонатною компонентою.

Таблиця 2.6 – Хвильові числа ( $\text{см}^{-1}$ ) та їх віднесення для досліджуваних зразків

Зразок/ частота					Віднесення коливань
НА <sub>80</sub>	НА <sub>300MW</sub>	сНА <sub>80</sub>	сНА <sub>50US</sub>	сНА <sub>300MW</sub>	
472	-	462	-	474	$\nu_2 \text{PO}_4$
566	566	564	566	566	$\nu_4 \text{PO}_4$
602	604	602	604	604	$\nu_4 \text{PO}_4$
~630 плече	~630 плече	-	-	-	ОН libration
870	874	874	874	872	$\nu_2 \text{CO}_3$
962	962	962	964	964	$\nu_1 \text{PO}_4$
1030	1034	1034	1036	1036	$\nu_3 \text{PO}_4$
1094	~1096	1094	~1096	~1098	$\nu_3 \text{PO}_4$
1426	1424	1420	1424	1422	$\nu_2 \text{CO}_3$
1482	~1464	~1472 плече	~1488 плече	~1488 плече	$\nu_2 \text{CO}_3$
1638	1636	1636	1638	1639	$\nu_2 \text{H-O-H}$
2326	~2324	~2320	2330	~2340	$\nu_2 \text{CO}_2$
2358	2360	2364	2364	2372	$\nu_3 \text{CO}_2$
2854	2852	2856	2854	2858	$\nu_1 \text{HPO}_4^{2-}$
2924	2922	2924	2926	2926	$\nu_1 \text{HPO}_4^{2-}$
3430	3406	3426	3430	3428	ОН stretch
3568	3568	3568	~3568 плече	~3568 плече	ОН stretch

Вказаний продукт утворюється в результаті часткового заміщення групи  $\text{PO}_4^{3-}$  карбонат іонами (тип В), джерелом яких може бути як реакційна суміш, так і оточуюче середовище. Відомо, що дрібнодисперсний гідроксиапатит має розвинену поверхню ( $68 \text{ м}^2/\text{г}$ ) і у формі водної суспензії дуже легко поглинає карбонат іони. Так, було показано, що протягом 5 хвилин при кімнатній температурі та  $\text{pH}=7,4$  гідроксиапатит адсорбував  $0,2 \text{ мас.}\% \text{ CO}_2$  [79]. Полоси деформаційних  $\nu_2$  коливань групи  $\text{CO}_3^{2-}$  в смугах близько  $874 \text{ см}^{-1}$ ,  $1420 \text{ см}^{-1}$ ,  $1465 \text{ см}^{-1}$  свідчать про утворення карбонат апатиту типу В. Крім того, смугу  $\sim 870 \text{ см}^{-1}$  відносять до асиметричних валентних  $\nu_3 \text{ P-O}$  коливань в іонах  $\text{HPO}_4^{2-}$  в кальцій дефіцитному ГА, вміст яких залежить від ступеню кристалічності. Смуги коливань близько  $2924$  та  $2854 \text{ см}^{-1}$  також належать

валентним коливанням  $\nu_1$  групи  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Відомо, що при нагріванні від 400 до 700 °С в результаті конденсації утворюється пірофосфат :



Подальше нагрівання до 900 °С призводить до утворення трикальційфосфату:



Присутність карбонату у реакційній суміші під час синтезу значно сприяє утворенню пірофосфату [80]. Підтвердженням цього факту в умовах даного експерименту є XRD аналіз, який довів, що після відпалу зразків протягом 1 години при 900 °С утворювалася доля трикальцій фосфату.

Смуга деформаційних коливань  $\nu_2$   $\text{CO}_3^{2-}$  з піком 1482  $\text{cm}^{-1}$  у спектрі зразку  $\text{HA}_{80}$  зміщена в бік більш низьких частот (1464 $\text{cm}^{-1}$ ) для зразку  $\text{HA}_{300\text{MW}}$ , отриманого під дією НВЧ. Дані смуги втратили свою інтенсивність у зразках, синтезованих у присутності  $\text{CO}_3^{2-}$  та  $\text{Na}^+$  під впливом УЗ та НВЧ. Є припущення, що ця смуга відноситься до поверхнево адсорбованих  $\text{CO}_3^{2-}$  груп, оскільки у зразку  $\text{HA}_{80}$  не відбувається суттєвих змін параметрів  $a$  та  $c$  кристалічної ґратки (див.таб.2.5) в порівнянні з синтетичним стехіометричним  $\text{HA}$ , для якого  $a=9,412$ ;  $c=6,878$ . В той же час під дією НВЧ у  $\text{HA}_{300\text{MW}}$  відбувається суттєве зменшення параметру  $a$  до 9,394Å, що є наслідком входження карбонат іону до структури апатиту. При зростанні вмісту карбонату зменшується інтенсивність  $\text{OH}^-$  коливань, при чому більшою мірою інтенсивність лібраційних коливань, ніж валентних. Так, лібраційне  $\text{OH}^-$  коливання при 630  $\text{cm}^{-1}$  є слабко вираженими у зразках, синтезованих за реакцією (1), що згідно літературних даних свідчить про те, що вміст  $\text{CO}_3^{2-}$  є більшим, ніж 2.5 мас.%. Вказана смуга відсутня в зразках, синтезованих за реакцією (2), що відбувається у випадку вмісту  $\text{CO}_3^{2-}$  10 і більше мас.% [81].

Зростання вмісту карбонатної складової спричинило також зміни у декількох  $\text{PO}_4^{3-}$  абсорбційних смугах коливань. Так, у зразках, синтезованих за реакцією (2) під дією УЗ та НВЧ відбувся зсув смуги валентних

симетричних коливань  $\nu_1$   $\text{PO}_4$  з 962 до 964  $\text{cm}^{-1}$ , коливання  $\nu_3$   $\text{PO}_4^{3-}$  при  $\sim 1094$   $\text{cm}^{-1}$  зникли, дещо змінилися інтенсивності двох смуг асиметричного деформаційного коливання  $\nu_4$   $\text{PO}_4^{3-}$  при  $\sim 566$  та 602  $\text{cm}^{-1}$ . Отримані результати можна пояснити тим, що відбувається поєднане еквімолярне заміщення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  іонами  $\text{Na}^+$  та заміщення іонів  $\text{PO}_4^{3-}$  іонами  $\text{CO}_3^{2-}$  в кристалічній ґратці. Пік коливань ОН груп при 3568  $\text{cm}^{-1}$  зникає в зразках сНА<sub>50US</sub> та сНА<sub>300MW</sub>. Але за свідченням літературних даних, навіть у високо насичених карбонатом зразках с-вектор кристалічної решітки має декілька ОН<sup>-</sup> іонів. Тому припускають, що зникнення абсорбційної смуги коливань відбувається внаслідок часткового сполучення ОН<sup>-</sup> іонів з деякими  $\text{CO}_3^{2-}$  групами, які замістили  $\text{PO}_4^{3-}$  [80]. Смуґа коливань біля 1636  $\text{cm}^{-1}$  у всіх зразках відноситься до деформаційних коливань Н-О-Н в адсорбційній воді.

#### *Висновок.*

В даній роботі були отримані зразки НА та сНА під впливом фізичних факторів- УЗ та НВЧ. Результати ІЧ та XRD дослідження засвідчили формування кальцій дефіцитного та карбонат апатиту типу В. В усіх випадках застосування УЗ розмір кристалітів у площині 004 зменшився в порівнянні з контрольними (без УЗ дії) зразками. Зразки НА, отримані при низьких (до 40°C) температурах, а також всі сНА зразки продемонстрували зменшення параметру  $a$  кристалічної ґратки.

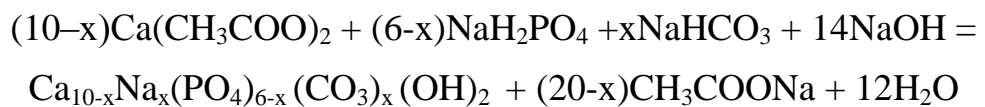
Дія НВЧ силою 100 та 300 Вт призвела до зменшення середнього розміру НА та сНА кристалітів в порівнянні з контрольними зразками, однак збільшення потужності НВЧ до 600 Вт призвело до різкого збільшення розміру кристалітів в обох групах досліджуваних зразків. При синтезі сНА застосування НВЧ призвело до зменшення параметру  $a$  кристалічної ґратки в усіх досліджуваних зразках. Доля додаткових фаз після прожарювання до 900°C, а також співвідношення Са/Р зростали пропорційно збільшенню потужності НВЧ, що є додатковим доказом утворення нестехіометричного гідроксиapatиту з карбонатною складовою.

Таким чином, застосування УЗ та НВЧ випромінювання дозволяє в короткий строк отримати кальцій дефіцитний НА та карбонат апатит типу В, які за своїм складом та структурою є наближеними до біологічного НА.

## 2.5 Технологія синтезу апатит-полімерного матеріалу у формі гелю для стоматологічного застосування

### 2.5.1 Методика синтезу аквагелю та його характеристика

Вихідними речовинами для синтезу методом «мокрої хімії» кальцій дефіцитного з вмістом карбонатних іонів аквагелю були ацетат кальцію  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$ , дигідрофосфат натрію  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , гідрокарбонат натрію  $\text{NaHCO}_3$ , 18 мас. % розчин  $\text{NaOH}$ . Синтез проводили при кімнатній температурі та  $\text{pH} = 10,3$ . Утворення кальцій дефіцитного гідроксиapatиту відбувалося згідно наступної реакції:



#### Технологія утворення аквагелю

- Приготувати 0,5М розчин кальцію ацетату  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$  (P1)
- Приготувати 0,3М розчин дигідрофосфату натрію  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (P2)
- До розчину P2 додати гідрокарбонат натрію  $\text{NaHCO}_3$  в кількості, необхідній для досягнення кінцевої концентрації 0,05М (P3)
- Розчин P3 додати до розчину P1 крапельним методом (P4)
- Додаванням 18 мас. % розчину  $\text{NaOH}$  до суміші P4 довести рН до значення 10,3 (P5)
- «Зістарювання» суміші P5 протягом 10 діб при кімнатній температурі.
- Промивання дистильованою водою до нейтрального значення рН
- Відділення осаду з допомогою центрифуги до ступеню вологості близько 90%.

Для ряду подальших досліджень зразки матеріалу були висушені при 37 °С та відпалені при температурі 900 °С.

Дослідження з допомогою просвічуючої мікроскопії показали утворення наночастинок НА голчатої форми.

На основі проведених аналізів методами РД та ПЕМ з ЕД розраховані структурні параметри наночастинок НА в зразку «аквагель». Результати зведені в таблиці 2.7.

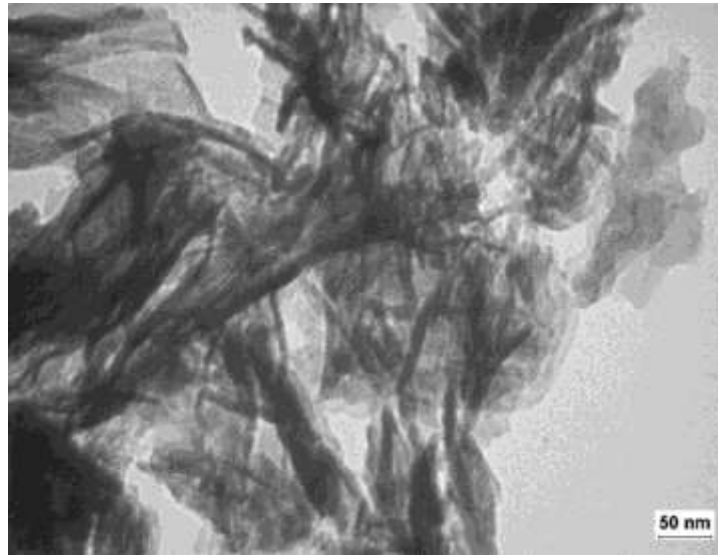


Рисунок 2.15 – ТЕМ зображення зразку «аквагель»

Таблиця 2.7 – Структурні та субструктурні параметри зразку «аквагель» за даними ПЕМ з ЕД та РД

Зразок	Вихідні					Після відпалу	
	ПЕМ та ЕД			РД		РД	
	$a$ , нм	$c$ , нм	$D$ , нм	$L$ , нм	$\varepsilon \cdot 10^3$	$L$ , нм	$\varepsilon \cdot 10^3$
Гідрогель	0,912	0,676	~80	17,2	0,647	45,7	0,28

На рис.2.16 приведений ІЧ спектр зразку «аквагель»



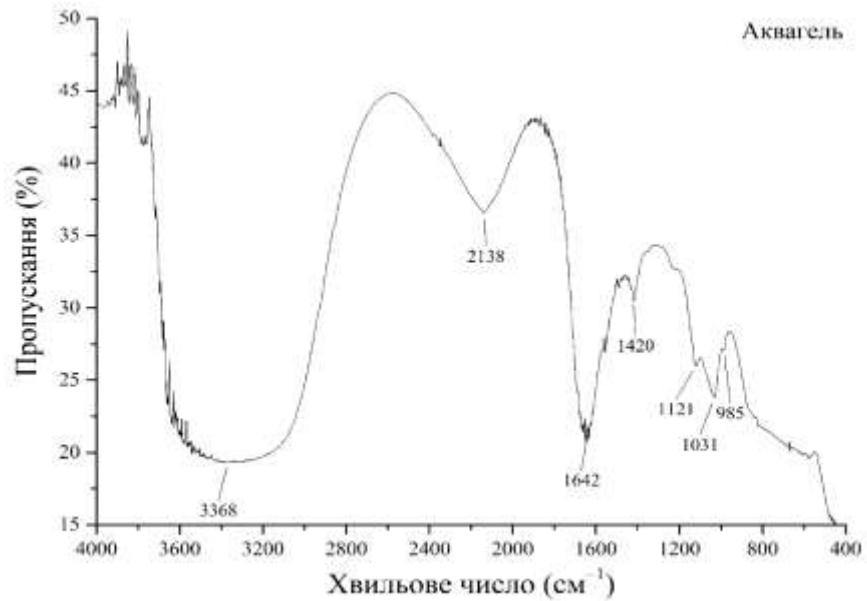


Рисунок 2.16 – ІЧ-спектр аквагелю

В таблиці наведено віднесення смуг коливань у зразку, які підтверджують формування кальцій дефіцитного гідроксиапатиту з частковим заміщення групи  $\text{PO}_4^{3-}$  групою  $\text{CO}_3^{2-}$ . Коливання при  $1121 \text{ cm}^{-1}$  свідчить про наявність  $\text{HPO}_4^{2-}$  групи в нестехіометричному НА.

Таблиця 2.8 – Хвильові числа ( $\text{cm}^{-1}$ ) та їх віднесення для досліджуваних зразків

Зразок/ хвил.число, $\text{cm}^{-1}$	Віднесення коливання
870	$\nu_2 \text{CO}_3$
985	$\nu_1 \text{PO}_4$
1031	$\nu_3 \text{PO}_4$
1121	$\nu_3 \text{PO}_4$
1420	$\nu_2 \text{CO}_3$
1482	$\nu_2 \text{CO}_3$
1642	$\nu_2 \text{H-O-H}$
2138	$\nu_2 \text{CO}_3$
3368	OH stretch

*2.5.2 Апатит-полімерний матеріал у формі гелю для стоматологічного застосування*

Компонентний склад на 50 мл матеріалу:

Поліакриламід 0,4 г

Поліетиленгліколь 2,5 г

NaOH (18%) -300 мкл

Гідрогель гідроксиапатиту (отриманий за технологією п.2.5.1), 70% вологості- 5,0г

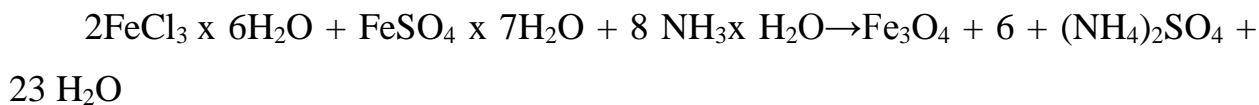
Вода 30 мл

**3 РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ІНКОРПОРУВАННЯ КАЛЬЦІЙ ФОСФАТНИХ МАТЕРІАЛІВ НАНОЧАСТИНКАМИ ХІТОЗАНУ, ІОНАМИ СРІБЛА, НАНОЧАСТИНКАМИ СПОЛУК ОКСИДУ ТА СУЛЬФАТУ ЦИНКУ, МАГНЕТИТУ, РОЗРОБКА МЕТОДИКИ УТВОРЕННЯ НАНОЧАСТИНОК СПОЛУК ЦИНКУ (ZnO, ZnS) ТА МАГНЕТИТУ (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ФІЗИЧНИХ ТА СТРУКТУРНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ, ПРОТИМІКРОБНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ У СКЛАДІ АПАТИТ-ПОЛІМЕТНИХ БІОКОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ**

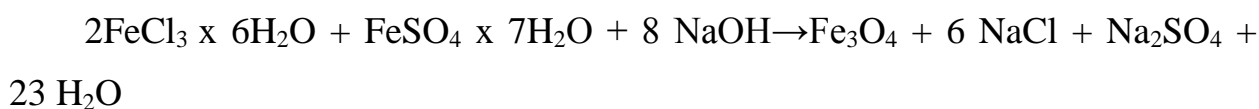
*3.1 Методики утворення наночастинок магнетиту (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)*

Унікальні властивості магнетиту Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> широко використовується в медицині для діагностики та лікування. Вважається, що магнетит біологічного походження відіграє важливу роль в процесах збереження та обробки даних в головному мозку людини. Літературні дані свідчать, що сигнали, спричинені фізіогенними та патогенними магнітними біомінералами, зареєстровані в тканинах головного мозку [82]. Для детального вивчення ролі магнітних біомінералів у функціях мозку необхідно розвивати біоміметичні технології створення їх синтетичних аналогів, близьких за умовами формування до біоматеріалів живого організму. Оскільки магнітні наночастинки проявляють здатність до підвищеної агломерації, виникає необхідність їх стабілізації полімерами. В даній роботі були розроблені методики синтезу композитних матеріалів магнетит-полімер, які дозволяють отримати наноструктурований магнетит з одночасним формуванням полімерної матриці. В якості полімерів при синтезі були застосовані альгінат, хітозан, желатина та колаген. Методом ПЕМ було оцінено вплив полімерів на розмір наночастинок синтезованого магнетиту. Методом ІЧ спектроскопії було показано взаємодію функціональних груп альгіанату з магнетитом.

Отримання магнетиту  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  проводили методом хімічного осадження за наступною реакцією:



Оскільки при утворенні композитів полімер-магнетит за даною реакцією з використанням водного розчину аміаку паралельно формувалась значна доля важкорозчинного  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , яка за даними XRD аналізу, зберігалась в якості додаткової фази навіть після ретельного промивання та висихання осаду. Для уникнення хімічної взаємодії аміаку з полімерами отримання полімер-магнетитних комплексів проводили за наступною реакцією:



На рисунках 3.1-3.6 представлені електронно-мікроскопічні зображення магнітних наноконкомпозитів. Лінійні розміри частинок і статистична обробка результатів представлена в вигляді гістограм.

### 3.2 *Методика синтезу композитного матеріалу магнетит- альгінат*

- приготувати 1мас.% розчин натрію альгінату (P1)
- до 5 мл P1 додати 18 мас.% розчин NaOH до рН=10 (P2)
- до P2 додати 10 мл 0,4М розчину  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  та гомогенізувати з допомогою ультразвуку (P3)
- до P3 додати 10 мл 0,2М розчину  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (P4)
- суміш P4 прогрівати до 80 °С протягом 10 хвилин (P5)
- до P5 додати 18 мас.% розчин NaOH до рН близько 12 та зберігати суміш при кімнатній температурі протягом 1 доби.
- промити суміш дистильованою водою до нейтрального значення рН.
- відділити осад від рідкої фази з допомогою центрифуги та висушити при кімнатній температурі.

В результаті застосування даної методики синтезу утворюється композит наступного складу: магнетит/Alg = 10:1

На рис.3.1 (а, б) представлено ПЕМ зображення синтезованих частинок магнетиту та гістограму розподілу розміру частинок від їх кількості:

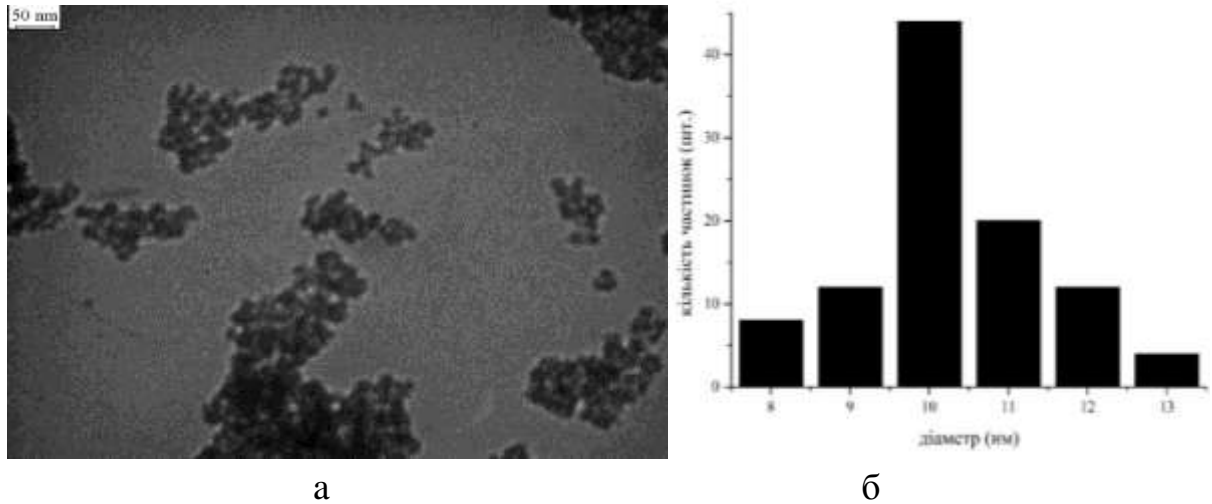


Рисунок 3.1 – ПЕМ зображення частинок магнетиту (а) та гістограма розподілу їх за розмірами (б)

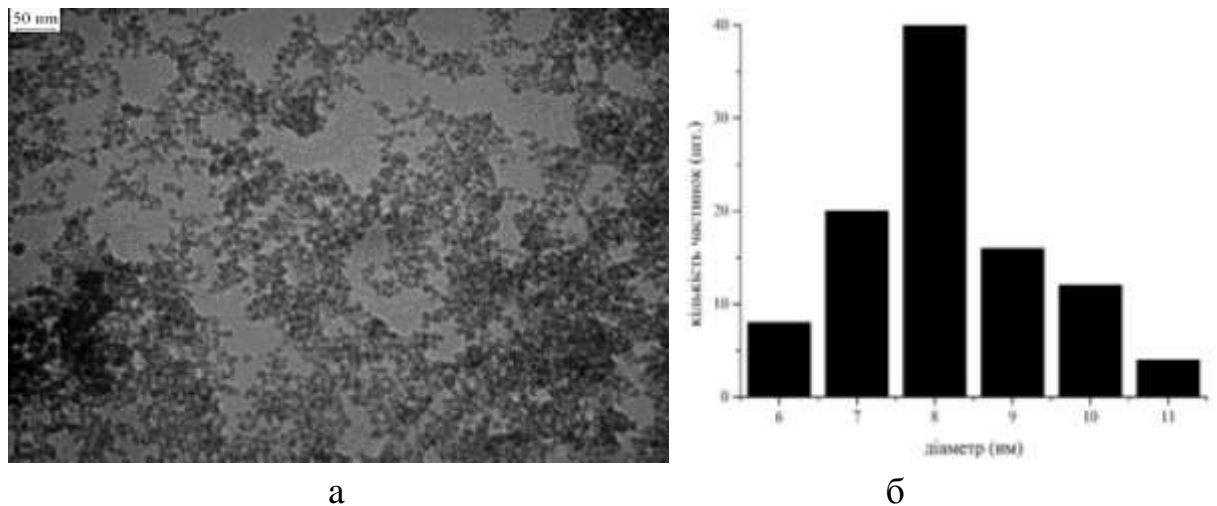


Рисунок 3.2 – ПЕМ зображення частинок композиту магнетит/ Alg (а) та гістограма розподілу їх за розмірами (б)

Дослідження показали, що в присутності альгінату натрію відбувається зменшення розміру наночастинок магнетиту. Так, приблизно 40% частинок мають розмір 8нм, в той час, як у випадку утворення магнетиту без присутності полімеру найбільша частка наночастинок має розмір 10 нм.

Дослідження методом ІЧ спектроскопії (рис.3.3, таблиця 3.1) довели наявність хімічних зв'язків між функціональними групами альгінату та магнетиту. Так, відбулось ряд змін в спектрі альгінату та магнетиту в порівнянні з коливаннями, віднесеними до їх функціональних груп після утворення композиту.

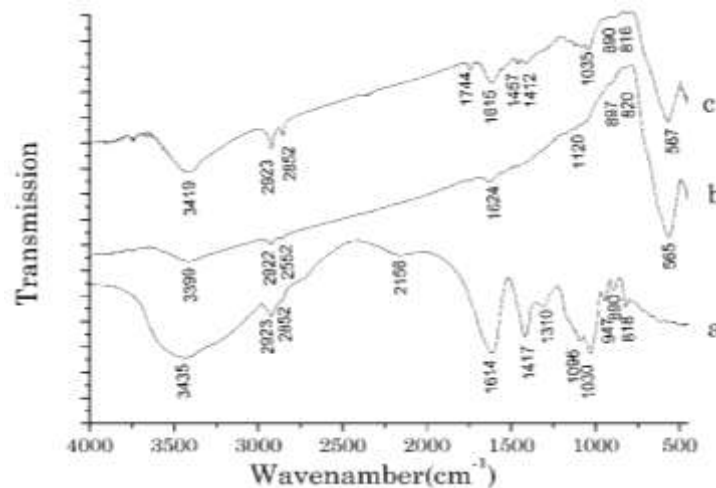


Рисунок 3.3 – ІЧ-спектри зразків альгінату натрію(а), магнетиту (б), та альгінат-магнетитного композиту (с)

Таблиця 3.1 – Характеристичні хвильові числа та їх віднесення

Функціональні групи	Тип сполуки та відповідні хвильові числа, $\text{cm}^{-1}$		
	Alg	Магнетит	Композит Alg/магнетит
-ОН валент. в -COOH (3550-3500)	3435	-	3419
-CH <sub>2</sub> -валентні (2870-2845)	2852	-	2852(збільшення інтенсивності)
	2156	-	-
-C=O валент. (Amid1-1650- 1590)	1614	-	1615 значне зменшення інтенсивності
	2156	-	-
C-O валент. симетр. в COO <sup>-</sup> ( $\approx$ 1400-1300)	1417	-	1412 значне зменшення інтенсивності
Деформац. -ОН в COOH (1450-1250)	1310	-	Відсутні
	-	1120	-
Деформац. -О-Н в С-О-Н (вторинні гідрокс. групи 1125-1030)	1030 1097	-	1035 значне зменшення інтенсивності
Деформац. ОН груп в COOH (955-890)	947 890	-	значне зменшення інтенсивності
Fe		565	567

### 3.3 Методика синтезу композитного матеріалу магнетит-хітозан

- Хітозан (М.М.150 кДа) розчинити в 1мас.% розчині оцтової кислоти при температурі 37°C до утворення гомогенного розчину з концентрацією 2,4мас.% (P1)
  - До 5 мл P1 додати 10 мл 0,4М розчину  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  та гомогенізувати з допомогою ультразвуку (P2)
  - До P2 додати 10 мл 0,2М розчину  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  та гомогенізувати з допомогою ультразвуку (P3)
  - Суміш P3 підігріти до температури близько 60 °C та додати 18 мас.% розчин NaOH до досягнення рН близько 10; зберігати суміш при кімнатній температурі протягом 1 доби (P4).
  - промити суміш P4 дистильованою водою до нейтрального значення рН.
  - відділити осад від рідкої фази з допомогою центрифуги та висушити при кімнатній температурі.

В результаті застосування даної методики синтезу за даними термогравіметричного аналізу утворюється композит наступного складу: магнетит/хітозан = 5:1.

На рис.3.4 (а, б) представлено ПЕМ зображення та гістограма композиту магнетит/хітозан. Утворені наночастинки магнетиту у складі композиту мають розмір від 8 до 14 нм. Найбільша кількість частинок (35%) має розмір 10 нм.

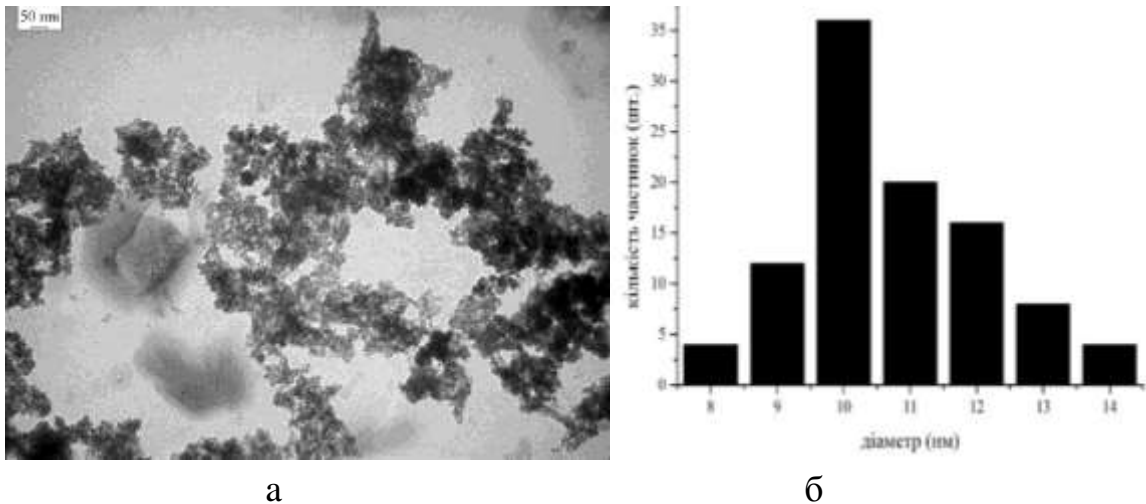


Рисунок 3.4 – ПЕМ зображення частинок магнетит/CS (а) та гістограма розподілу їх за розмірами (б)

#### 3.4 Методика синтезу композитного матеріалу магнетит-желатина

- Приготувати розчин желатини концентрацією 4 мг/мл (P1);
- до 5 мл P1 додати 18 мас.% розчин NaOH до рН=10 (P2)
- до P2 додати 10 мл 0,4М розчину  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  та гомогенізувати з допомогою ультразвуку (P3)
- до P3 додати 10 мл 0,2М розчину  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (P4)
- суміш P4 прогрівати до 80 °С протягом 10 хвилин (P5)
- до P5 додати 18 мас.% розчин NaOH до рН близько 12 та зберігати суміш при кімнатній температурі протягом 1 доби.
- промити суміш дистильованою водою до нейтрального значення рН.
- відділити осад від рідкої фази з допомогою центрифуги та висушити при кімнатній температурі.

В результаті застосування даної методики синтезу утворюється композит наступного складу: магнетит/желатина = 13:1

На рис.3.5 (а, б) представлено ПЕМ зображення наночастинок магнетит/желатина та гістограма розподілу їх за розмірами. Дослідження



показали суттєве збільшення розміру частинок, синтезованих у присутності желатини. Найбільша фракція (30%) частинок має розмір 16 нм.

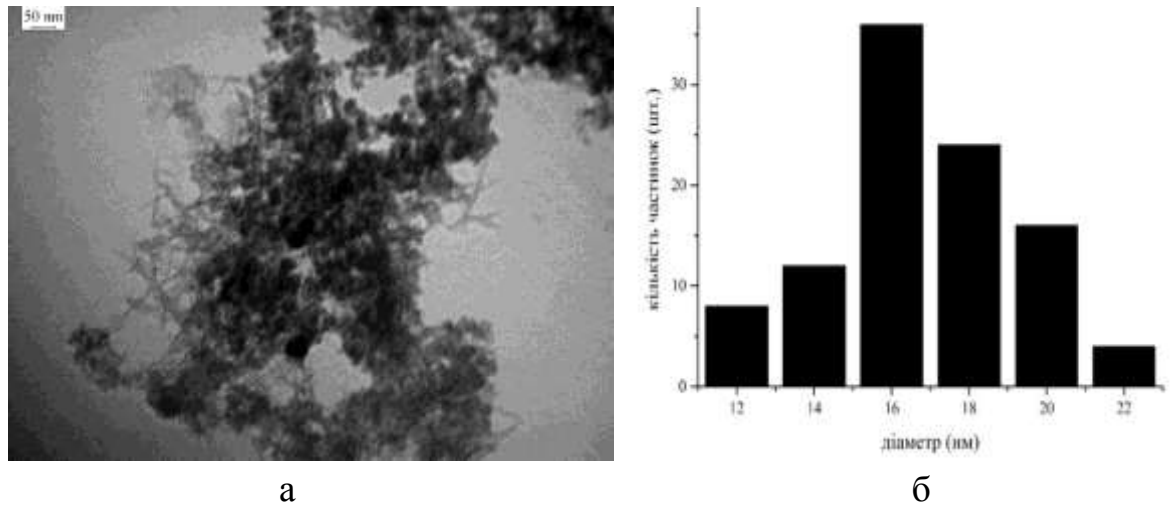


Рисунок 3.5 – ПЕМ зображення частинок магнетит/желатина (а) та гістограма розподілу їх за розмірами (б)

### 3.5 Методика синтезу композитного матеріалу магнетит – колаген

- Приготувати розчин колагену (тип1) концентрацією 4 мг/мл (P1);
- до 5 мл P1 додати 18 мас.% розчин NaOH до рН=10 (P2)
- до P2 додати 10 мл 0,4М розчину  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  та гомогенізувати з допомогою ультразвуку (P3)
  - до P3 додати 10 мл 0,2М розчину  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (P4)
  - суміш P4 прогрівати до 80 °С протягом 10 хвилин (P5)
  - до P5 додати 18 мас.% розчин NaOH до рН близько 12 та зберігати суміш при кімнатній температурі протягом 1 доби.
    - промити суміш дистильованою водою до нейтрального значення рН.
    - відділити осад від рідкої фази з допомогою центрифуги та висушити при кімнатній температурі.

В результаті застосування даної методики синтезу утворюється композит наступного складу: магнетит/желатина = 27:1

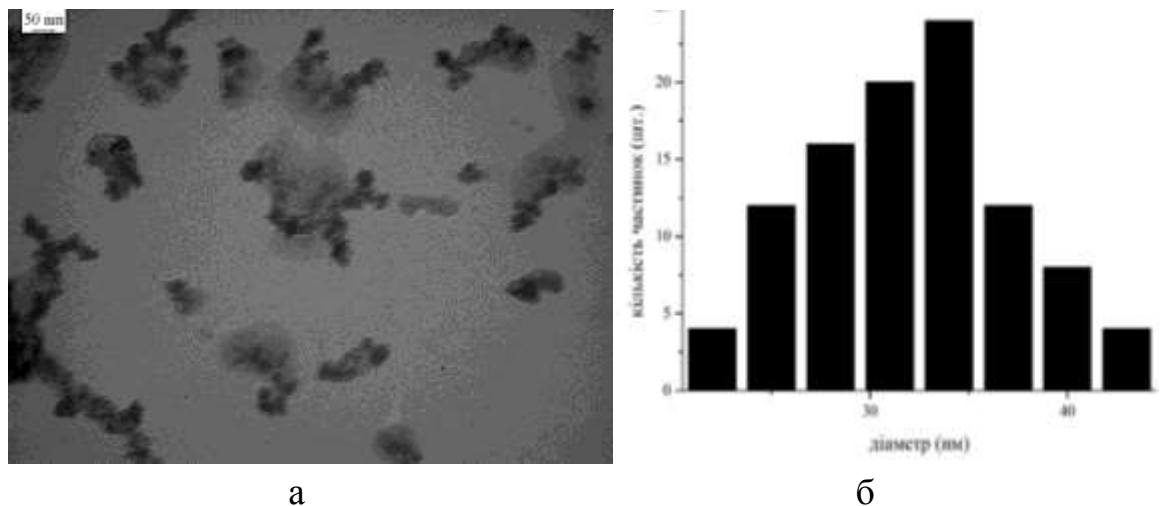


Рисунок 3.6 - ПЕМ зображення частинок магнетит/колаген (а) та гістограма розподілу їх за розмірами (б)

Дослідження показали, що до 30 відсотків наночастинок магнетиту мають розмір 30-35 нм.

#### *Висновок*

Таким чином, включення полімерів природного походження до складу композитів на основі магнетиту впливає на середній розмір наночастинок та попереджує їх агломерацію. Зокрема, застосування альгінату та хітозану в процесі синтезу сприяє зменшенню розміру наночастинок в порівнянні з магнетитом, синтезованим без додавання полімерів. В той же час присутність в реакційному середовищі желатини та колагену, які мають подібну хімічну структуру, призводить до збільшення середнього розміру наночастинок майже втриє.

### *3.6 Композити ZnS-ZnO та ZnS-ZnO-Alg*

Ряд останніх досліджень в галузі медичного матеріалознавства присвячено сполукам цинку: цинку сульфід (ZnS) та цинку оксиду (ZnO). В значній кількості означений мікроелемент знаходиться в кістковому матеріалі, що сприяє щільності кісткової тканини та попереджує втрату

кісткової маси [83], покращує адгезію протеїнів, покращує протимікробну активність [84]. Увагу дослідників також привернули наночастки сульфїду цинку у зв'язку із застосуванням в оптоелектронїці, каталїзі, у системах молекулярного розпізнавання та використанні їх люмінесцентних та флуоресцентних властивостей у створенні зондів [85]. Відомо, що матеріали на основі ZnO мають виражену біосумісність, характеризуються високою межею міцності, абсолютною механічною твердістю і хімічною інертністю, а також можливістю витримувати жорсткі умови експлуатації.

Метою даної роботи є створення та дослідження властивостей композитного матеріалу на основі сульфїду та оксиду цинку (ZnS-ZnO) та його комплексу з органічною речовиною – натрію альгїнатом (ZnS-ZnO-Alg) для подальшого застосування у складі композитних матеріалів біомедичного призначення.

При виконанні експерименту були використані наступні реактиви аналітичного ступеню чистоти: цинку нітрат  $Zn(NO_3)_2$ , тіокарбамід  $CS(NH_2)_2$ , розчин аміаку  $NH_4OH$ , натрію альгїнат (харчова добавка E 401, виробництво Китай)

### *3.6.1 Методика синтезу композиту ZnS- ZnO*

- Приготувати 0,2М розчин цинку нітрату (P1)
- Приготувати 0,2М розчин тіокарбамїду  $CS(NH_2)_2$  (P2)
- До 50 мл P1 додати 50мл P2 та перемішати в шейкері протягом 60 хвилин (P3)
- До P3 додати поступово водний 25 мас.% розчин аміаку до рН=12 (P4)
- Суміш P4 прогрівати при температурі 80 °C протягом 30 хвилин, після чого залишити утворену суспензію при кімнатній температурі для охолодження протягом 2 годин (P5).

- P5 ретельно відмити дистильованою водою до нейтрального рН промивної води.
- Відділити осад шляхом центрифугування та висушити в термошафі при 37 °С.

### *3.6.2 Методика синтезу композиту ZnS-ZnO-Alg*

- Приготувати 0,2М розчин цинку нітрату (P1)
- Приготувати 0,2М розчин тіокарбаміду  $CS(NH_2)_2$  (P2)
- До P2 додати 1 мл водного 3 мас.% розчину натрію альгінату, попередньо доведеного до лужного значення рН~ 9 додаванням 25 мас.% розчину аміаку. Суміш гомогенізувати за допомогою ультразвуку (P3)
  - До 50 мл P1 додати 50мл P3 та перемішати в шейкері протягом 60 хвилин (P4)
  - До P4 додати поступово водний 25 мас.% розчин аміаку до рН=12 (P5)
  - Суміш P5 прогрівати при температурі 80 °С протягом 30 хвилин, після чого залишити утворену суспензію при кімнатній температурі для охолодження протягом 2 годин (P6).
- P6 ретельно відмити дистильованою водою до нейтрального рН промивної води.
- Відділити осад шляхом центрифугування та висушити в термошафі при 37 °С.

### *3.6.3 Результати дослідження*

Дослідження проводили на зразках ZnS-ZnO-Alg та ZnS-ZnO, що представляли собою дрібнодисперсний важкорозчинний порошок світло-жовтого кольору, який в подальшому планується включати до складу композитного матеріалу для заповнення кісткової тканини на основі

гідроксиапатиту. Добуток розчинності (ДР) цинку сульфіді за різними інформаційними джерелами складає від  $7 \times 10^{-27}$  до  $1,1 \times 10^{-21}$  [11]. В той же час ДР синтетичного НА складає  $1 \times 10^{-64}$ , а біологічного апатиту -  $2,87 \times 10^{-36}$ . Таким чином, розчинність ZnS є значно вищою порівняно з НА. Останнє означає, що в умовах організму під дією ферментів досліджувані зразки, внесені до складу композитного матеріалу на основі НА, мають розчинятися значно швидше, ніж основний матеріал і виконувати протимікробну функцію протягом післяопераційного періоду.

Результати проведеного рентгеноструктурного аналізу (рис.3.7) свідчать, що в зразках композитного матеріалу, синтезованого як в присутності натрію альгінату (ZnS-ZnO-Alg), так і без його додавання (ZnS-ZnO) наявні дві фази: ZnS та ZnO. Утворені в процесі синтезу кристаліти ZnS мають кубічну фазу типу сфалерит (JCPDS 5-566) з середніми розмірами кристалітів 23 нм, а кристаліти ZnO мають гексагональну фазу (JCPDS 80-75) з середнім розміром кристалітів близько 35 нм. При синтезі зразків у присутності речовини органічного походження – натрію альгінату - кристаліти як ZnS, так і ZnO суттєво зменшуються і їх середній розмір становить близько 10 нм та 12 нм відповідно. Значення параметру  $a$  для синтезованого ZnS відповідає стандартному розміру кристалічної решітки даної сполуки (приблизно 0,54 нм). Кристаліти синтезованого у складі композиту ZnO відзначаються збільшенням параметру  $a$  в порівнянні зі стандартом: 0,54 нм проти 0,32 нм.

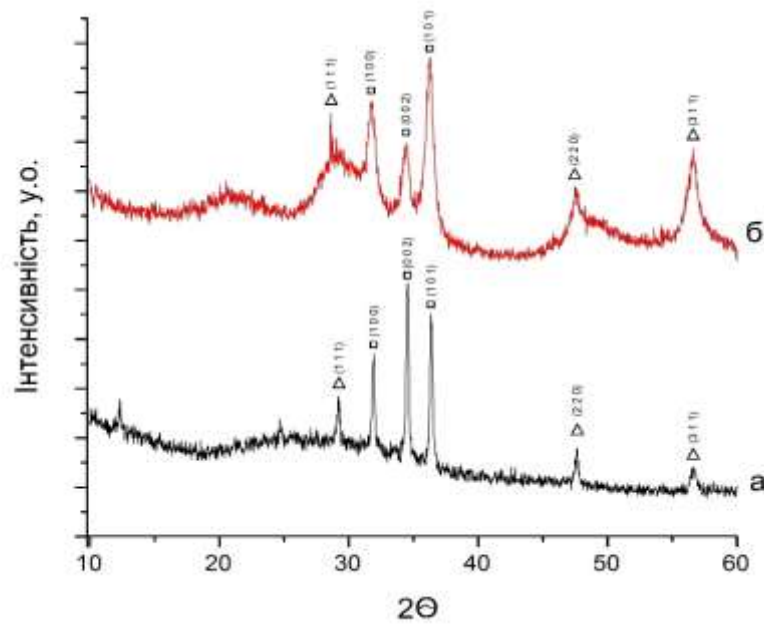


Рисунок 3.7 – Дифрактограми висушених при температурі 37°C зразків а) ZnS- ZnO, б) ZnS- ZnO-Alg .Індexами Міллера позначені площини сполук:  $\Delta$  - ZnS;  $\square$  – ZnO

В таблиці 3.2 приведені структурні характеристики кристалітів ZnO та ZnS, отримані за даними XRD аналізу.

Таблиця 3.2 – Структурні характеристики ZnO та ZnS у складі досліджуваних композитів

Зразок	Фаза	Вміст у композиті, %	Індекс Міллера	Розмір кристалітів, нм	Параметри кристалічної решітки, нм	
					<i>a</i>	<i>c</i>
ZnS- ZnO- Alg	ZnS (кубічна, сфалерит)	75	(111)	13.902	0.539	-
			(220)	7.941	0.541	-
			(311)	8.514	0.538	-
	ZnO (гексагональна)	25	(002)	13.07	0.563	0.519
(110)	10.792					
ZnS- ZnO	ZnS (кубічна, сфалерит)	50	(111)	22.911	0.529	-
			(220)	31.011	0.539	-
			(311)	14.856	0.545	-
	ZnO (гексагональна)	50	(002)	36.96	0.56	0.518
			(110)	32.088		

Мікроелементний склад зразків, визначений за допомогою методу РФА, представлено на рис. 3.8. Розрахунки, проведені на основі РФА, показують, що зразок ZnS-ZnO містить до 50 мас.% цинку оксиду, а вміст цинку оксиду у зразку ZnS-ZnO-Alg складає близько 25 мас.%. (табл. 3.2)

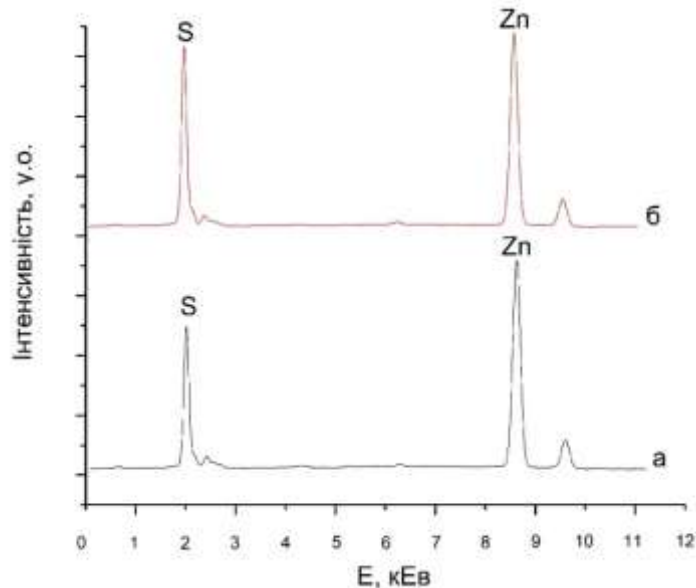


Рисунок 3.8 – Мікроелементний склад зразків а) ZnS- ZnO, б) ZnS- ZnO-Alg за даними рентгено-флуоресцентного аналізу

### *Висновок*

Застосований метод синтезу дозволив отримати матеріали у вигляді композитів ZnS- ZnO та ZnS-ZnO-Alg. За даними XRD в обох зразках доведено присутність фази ZnO та ZnS та визначено їх структуру: ZnS має кубічну кристалічну структуру типу сфалерит (JCPDS 5-566) з середніми розмірами кристалітів 23 нм, а ZnO – гексагональну структуру (JCPDS 80-75) з середнім розміром близько 35 нм. Встановлено, що введення до реакційної суміші в процесі синтезу натрію альгінату сприяє зменшенню розміру кристалітів ZnS та ZnO до 10 нм та 12 нм відповідно. У зразках ZnS- ZnO-Alg, синтезованих з додаванням альгінату натрію, вміст фази ZnS в порівнянні з фазою ZnO збільшився на 25%, що підтверджено даними РФА.

### 3.7 Протимікробні властивості ZnS-ZnO та ZnS-ZnO-Alg, як компонентів композитних біоматеріалів

Мікробіологічними дослідженнями доведено наявність протимікробної активності зразків щодо грампозитивних бактерій *S. aureus*, грамнегативних *E. coli* та грибів *C. albicans*. Мінімальну бактерицидну концентрацію визначали шляхом нанесення надосадкової рідини з пробірки із зразком на тверде поживне середовище Мюллера-Хінтона. При цьому об'єкт залишався на дні пробірки у вигляді малорозчинного осаду. МБцК зразків ZnS- ZnO-Alg щодо всіх штамів досліджуваних мікроорганізмів становила 1,25 мг/мл. МБцК зразків ZnS-ZnO склала від 5 щодо *C. albicans* до 12,5 мг/мл щодо *E. coli*. Можливо, що в умовах експерименту *in vitro* в результаті малої розчинності зразка та незначної дифузії іонів діючої речовини не відбувається повного контакту бактеріальних клітин з усім об'ємом досліджуваного зразка. Оскільки зразки ZnS-ZnO-Alg відрізняються від зразків ZnS-ZnO меншим розміром кристалітів та більшою розчинністю, вони проявляють більш виразний протимікробний ефект. У той же час при безпосередньому контакті всієї поверхні зразку з бактеріальними клітинами за умови дослідження методом дифузії в агар у модифікації колодязів, зразки обох типів показали високий рівень протимікробної активності, що наведено у табл. 3.4.

Для визначення протимікробної активності експериментальних зразків в цілому з урахуванням всіх досліджуваних тест-штамів мікроорганізмів, було проведено розрахунок інтегрального показника протимікробної активності зразків  $A$ . Застосована векторна теорія дозволила представити інтегральний показник  $A$  як вектор у  $n$ -вимірному просторі з координатами у вигляді зони затримки росту по кожному дослідженому тест-мікроорганізми.

Результати показали, що значення інтегрального показника  $A$  для зразків ZnS- ZnO та ZnS- ZnO-Alg складає 1,57 і 1,9 відповідно. Таким чином, згідно методичних рекомендацій за діапазоном ефективності показника обидва типи зразків відносять до таких, які проявляють середню протимікробну активність.



Таблиця 3.4 – Біоцидна здатність сполук цинку,  $M \pm m$ 

Тест-штами мікроорганізмів	МБцК (мг/мл) за методом двократних серійних розведень		Зона затримки росту (мм) за методом дифузії в агар у модифікації «колодязів»	
	ZnS-Alg	ZnS	ZnS-Alg	ZnS
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,25±0,04	11,25±0,6	–	–
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	–	–	20,0±1,33	16,0±1,0
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	1,25±0,2	12,5±0,8	20,5±1,0	15,5±0,66
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,25±0,4	12,5±1,2	27, 0±0,66	24,0±2,0
<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	1,25±0,3	5,0±0,4	25,0±1,33	22,0±1,77

Примітка:  $p \leq 0,05$ 

Літературні джерела дають два основні механізми протимікробної дії ZnO: а) токсичний вплив іонів цинку на клітинну мембрану бактерії; б) токсичний ефект ROS (reactive oxygen species), які утворюються за участі ZnO та ZnS, щодо складових бактеріальної клітини. Антибактеріальна активність проявляється в результаті утворення таких ROS, як перекис водню ( $H_2O_2$ ), пероксид аніон ( $O^{2-}$ ), гідроксил радикали ( $OH^-$ ). Вказані частинки ушкоджують такі клітинні складові як ДНК, ліпіди, білки [86]. Позитивно заряджені іони цинку можуть безпосередньо взаємодіяти з негативно зарядженими компонентами бактеріальної стінки [87]. За даними TEM, FE-SEM and AFM аналізів дія композитів з вмістом ZnO проявляється в порушенні клітинної мембрани, що призводить до ушкодження мембранних протеїнів та ліпідного шару [88]. Аналіз отриманих в ході експерименту даних показав, що більш виражену протимікробну дію виявляють зразки з більшим вмістом ZnS. Протимікробні властивості наночастинок цинку сульфїду забезпечуються, по-перше, їх високою реакційною здатністю, визначеною розміром (до 100 нм) [89]. Також при розчиненні ZnS відбувається утворення сульфїд-аніона, в якому атом сірки має неподілену

електронну пару, за рахунок чого даний аніон може утворювати донорно-акцепторні зв'язки з атомами функціональних груп компонентів клітинної стінки бактерій, порушуючи їх метаболізм.

#### *Висновок*

Виявлено біоцидну дію композитів на основі ZnS та ZnO по відношенню до тест-штамів мікроорганізмів *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. Розраховані за векторною теорією значення інтегральних показників досліджуваних зразків ZnS-ZnO та ZnS-ZnO-Alg (1,57 і 1,9 відповідно) дозволяють охарактеризувати обидва типи зразків як протимікробні сполуки середньої активності.

#### **4 РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ МУЛЬТИШАРОВИХ ПОКРИТТІВ НА ІМПЛАНТАТИ З ПІДВИЩЕНИМИ ФІЗИКО-МЕХАНІЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ**

Поверхнєве модифікування металів і сплавів є одним з найбільш перспективних сучасних методів боротьби з корозією, а також покращення фізико-механічних властивостей поверхні матеріалів. В сучасних умовах військових дій в Україні проблема пошуку та виробництва універсального та відносно дешевого матеріалу для протезування та відновлення цілісності кісткової тканини є однією з найгостріших проблем. Інженерія кісткової тканини вимагає пошуку новітніх матеріалів, які індукують формування нової кістки, запобігають росту небажаних сполучних тканин, поповнюють втрату кісткової маси, а також сприяють росту кровоносних судин та проліферації кісткових остеобластів на ранній стадії. Металічні матеріали, переважно титан та його сплави широко використовуються медицині в якості різноманітних імплантатів, однак їм притаманний ряд недоліків, таких як слабкі остеоіндуктивні властивості, низькі корозійні та зносостійкі характеристики. Для покращення біосумісності імплантатів створюють апатит-полімерні покриття. В результаті комплексного застосування різноманітних фізико-хімічних методів на модифікованій і наноструктурованій поверхні імплантату можна одержати багатошарові багатофункціональні покриття, що складаються з біоінертного внутрішнього шару пористого титану та біоактивного зовнішнього шару на основі ГА та різноманітних біомолекул.

Формування поверхневих шарів з тугоплавких нітридів, карбідів і інших металоподібних сполук та доповнення їх покриттями на основі НА дозволяє поєднувати технологічні і експлуатаційні властивості металевої основи з високою корозійною стійкістю, зносостійкістю та біосумісністю поверхні.

Методи вакуумної технології займають особливе місце серед існуючих способів поверхневої обробки. Їх широке впровадження в різні технологічні

процеси обумовлене високою продуктивністю, екологічною чистотою, можливістю отримання покриттів практично з будь-якого матеріалу: металів, сплавів, полімерів, композиційних структур.

У даній роботі були отримані покриття з використанням вакуумних технологій. Такі покриття названі *конденсаційними*, оскільки вони формуються на поверхні (субстраті) шляхом конденсації парів матеріалу покриття при відповідному тиску у вакуумній камері. Цей метод дозволяє наносити найрізноманітніші покриття контрольованої товщини практично на будь-які матеріали. Перевагою вакуумної технології перед «відкритими» методами нанесення покриттів (металізація розпилюванням, електролітичне осадження) є її екологічна чистота, оскільки процес нанесення покриттів є «замкнутим» без контакту з навколишнім середовищем. Конденсаційні покриття відрізняються фізико-хімічними основами їх формування і мають свої конструктивні відмінності. Проте загальними для всіх видів конденсаційних покриттів є такі стадії процесу:

- попередня обробка поверхні субстрату;
- нагрівання субстрату до необхідної температури;
- випаровування або розпилювання матеріалу покриття;
- його конденсація на субстраті (формування покриття).

В даній роботі були застосовані вакуумний плазмово-дуговий метод та метод магнетронного розпилення.

#### *Плазмово-дугові покриття*

Покриття формуються, в основному, потоком іонів, джерелом яких є плазма вакуумної дуги (вакуумний плазмово-дуговий метод). Залежно від параметрів розряду це може бути дуга, що горить у мікроплямах на катоді, який витрачається (випаровується) – матеріал покриття; вакуумна дуга з розподіленим розрядом на катоді, який витрачається; вакуумна дуга з анодом, який витрачається, а також порожнистим катодом, що не витрачається.

Ступінь іонізації плазми вакуумної дуги для атомів металу досягає більше 90 %. Енергія іонів при їх русі з катодної плями складає 20...120 еВ. Катод (матеріал покриття) і субстрат, на якому формується покриття, знаходяться в загальному об'ємі вакуумної камери. У багатьох випадках для збільшення енергії іонів, що конденсуються, на підкладку подається негативний потенціал. При цьому при енергії іонів більше 400 еВ на поверхні підкладки переважатимуть процеси розпилування.

Отже, отримання плазмово-дугових нітридних покриттів відбувається внаслідок конденсації плазмового потоку, який генерується вакуумною дугою у присутності реактивного газу (азоту). Регулюючи енергію і склад потоку, який формується з плазми вакуумної дуги, можна відповідно змінювати фазовий стан, структуру і властивості покриттів, тобто отримувати покриття з чистих металів, їх твердих розчинів, сполук, гетерогенних сплавів, багатошарових композицій і ін.

#### *Магнетронне покриття*

Найбільш широкого поширення останнім часом набув метод магнетронного розпилування. Постійні магніти на зворотному боці катода формують на лицьовій стороні замкнуте магнітне поле, перпендикулярно якому направлено електричне поле, що створюється між анодом і катодом (мішенню, що розпилюється). Високі швидкості розпилування матеріалів у магнетронах обумовлені інтенсивним захопленням електронів у схрещених електричному і магнітному полях поблизу поверхні мішені, яка розпилюється. Окрім високих швидкостей осадження покриттів, метод магнетронного розпилування дозволяє отримувати покриття з високою адгезією до основи і порівняно низькою пористістю. Проте метод магнетронного розпилування має недоліки: 1) високий тиск газу в робочому об'ємі, що призводить до забруднення покриття в процесі його формування; 2) неможливість управління струмом розпилюючих іонів без зміни параметрів розряду; 3) труднощі відтворення режиму горіння розряду при переході до мішені з іншого матеріалу (оскільки змінюється коефіцієнт вторинної електронно-іонної емісії); 4) нагрів (часто небажаний) субстрату

із-за наявності біля її поверхні інтенсивного газового розряду; 5) досить низький коефіцієнт використання матеріалу мішені (0,25...0,60); 6) обмеження, пов'язані з розпилюванням магнітних матеріалів (залізо, нікель, кобальт) і багатокомпонентних мішеней. В наш час набули широкого поширення незбалансовані магнетрони, які дозволяють одночасно з нанесенням покриття проводити інтенсивне іонне бомбардування зростаючої плівки.

Для нанесення покриттів і плівок на основі нітриду металів в основному використовують так зване реактивне розпилювання. В даному випадку це розпилювання металеві мішені в суміші залишкових газів і реактивного газу – азоту. На субстраті формується покриття зі сполук твердого компоненту розпилюваної мішені з азотом.

Процес формування покриттів залежить від багатьох параметрів (форми і взаємного розташування мішені і субстрату, коефіцієнта конденсації, температури субстрату, швидкості конденсації, напруги зміщення, яка подається на субстрат.

В ході виконання даної наукової роботи за допомогою методу вакуумно-дугового випаровування катодів MoN/CrN були отримані багат шарові покриття з мікронним і нанодіапазоном товщин покриття, а саме від 1,2 мкм до 40 нм. Дослідженнями доведено високий рівень фізико-механічних властивостей, в тому числі твердість покриттів досягала 38 ГПа. При цьому характеристики були стабільними при температурі 800 °С у вакуумі.

Методом магнетронного розпилення була отримана інша серія зразків, з багатоелементними покриттями нанометрової товщини з TiN/SiC. Покриття були осаджені на різні субстрати з Si, сталі, титанового сплаву. Було виявлено збільшення твердості від 28 до (48÷53) ГПа при підвищенні температури підкладки від 25 до 350 °С. За допомогою молекулярної динаміки були розраховані параметри структури (B1 і B4) для цих систем і показано їх непогані перспективи для подальшого осадження на них гідроксилапатиту для біомедичних цілей.

На рисунку 4.1 представлено перетин зразків з покриттям з MoN/CrN (результати РЕМ аналізу).

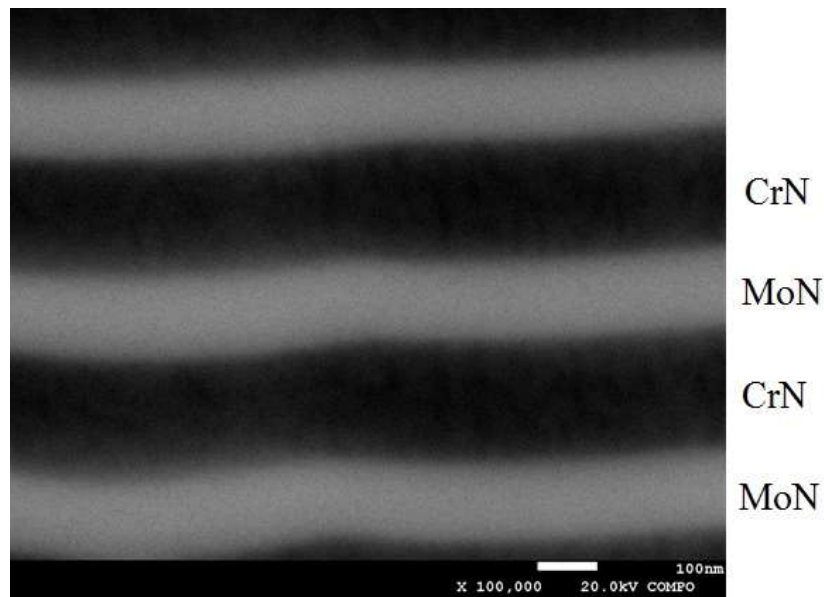


Рисунок 4.1 - РЕМ-знімок бічного перерізу покриття, знятий зі збільшенням 100 000 раз

Як метод одержання покриттів на основі НА, нанесених на модифіковану одним з вище описаних методів титанову поверхню [90], ми будемо використовувати метод термодепозиції (thermal substrate method), вперше запропонований японським вченим Kuroda et al., що був нами вдосконалений та доповнений. Цей метод полягає в осадженні покриттів з водних розчинів, які містять іони органічного та неорганічного походження, на нагрітій змінним електричним струмом титановий (або виготовлений з широко вживаного в ортопедії та в травматології сплаву Ti 6Al-4V) субстрат. Використання цього методу дозволяє отримувати покриття при відносно низьких ( $<100^{\circ}\text{C}$ ) температурах та значеннях рН, близьких до фізіологічних. Технологічні умови нанесення покриттів дозволяють застосовувати методику термодипозиції для внесення в покриття різноманітних біологічно активних молекул.

## **5 ОТРИМАННЯ БІОАКТИВНИХ ПОКРИТТІВ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ ТА НА, НАНЕСЕНИХ НА МОДИФІКОВАНУ ТИТАНОВУ ПОВЕРХНЮ, ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ МОРФОЛОГІЇ ТА СТРУКТУРИ ТА МЕХАНІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ. *IN VITRO* ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОКРИТТІВ НА ОСНОВІ НА ТА ХІТОЗАНУ**

Вирішальним фактором в остеointegraції біоінертних металевих імплантатів є стан їх поверхні, яка граничить з кістковою тканиною пацієнта. Біоактивні покриття з розвинутою пористою поверхнею, функціоналізованою біомолекулами та лікарськими засобами, повинні сприяти активному проростанню нової кісткової тканини в пори імплантату. Основною органічною складовою кістки є колаген, який в біотехнології часто замінюють природними та синтетичними речовинами. Особлива увага приділяється гідрофільним полімерам, які мають у структурі гідроксильні функціональні групи, як полівініловий та поліаліловий спирти, полісахариди. Серед полісахаридів найчастіше використовують заміщені целюлози, декстрини, крохмали, глікозаміноглікани, хітозан, альгірати.

### *5.1 Модифікація поверхні титанового субстрату та дослідження її впливу на структуру кальцій фосфатних покриттів*

Титан та його сплави є найбільш вживаним матеріалом, який використовують для заміщення щільної кісткової тканини, не вважаючи на те, що ці матеріали характеризуються низькою зносостійкістю при терті. Крім того, відсутність біоактивності не сприяє адаптації протезу та формуванню нової кісткової тканини на металічній поверхні. Потрапляючи в агресивне оточення фізіологічних рідин, титановий протез, імплантований в тіло людини, піддається біологічній корозії. Виникає небезпека потрапляння в м'які тканини продуктів корозії та спричинення токсичного впливу. Одним



з методів модифікації поверхні металевого імплантату є формування на ньому оксидних плівок ( $\text{TiO}_2$ ), які покращують його протикорозійну стійкість та характеризуються високими адсорбційними властивостями. Крім того, літературні дані свідчать, що нанотрубчаста структура  $\text{TiO}_2$  сприяє формуванню та покращенню адгезії НА на субстраті, трансформації аморфного НА до кристалічного стану. [91].

### *5.1.1 Модифікація поверхні титанового субстрату шляхом електрохімічного анодування*

В даному дослідженні було розроблено лабораторний прилад для електрохімічного формування оксидної плівки (анодування) на титановому субстраті.

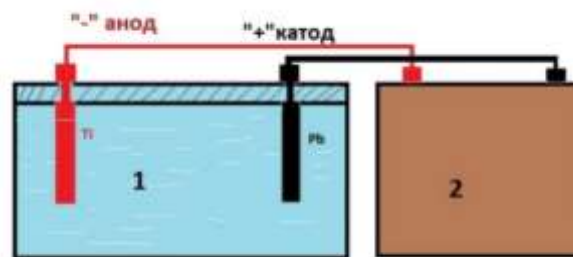


Рисунок 5.1 – Схема приладу для електрохімічного анодування субстрату  $\text{Ti-6Al-4V}$ : 1) ємність для електроліту; 2) джерело постійного струму. Анод – титановий субстрат, катод – свинцева пластина

Анодування титанового субстрату проводили в наступних умовах:

1.) Склад електроліту:

Кислота сірчана  $\text{H}_2\text{SO}_4$  -200 г/л

Натрій фтористий  $\text{NaF}$  – 0,5 мас.%

2.) Технологічний режим:

Щільність струму 1-1,5 а/дм<sup>2</sup>; при цьому протягом перших 5 хвилин підтримували задану щільність струму. При цьому напруга зростає до 90-100 В, а щільність струму падає до 0,2 а/дм<sup>2</sup>. Подальший процес анодування проводили без регулювання струму.

Температура електроліту кімнатна.

Катод свинцевий, анод – титановий субстрат.

Термін анодування 1 година.

Після закінчення процесу анодування субстрат був ретельно промитий водою та відпалений при температурі 500 °С протягом 1 години.

Знімки РЕМ, які демонструють зміну морфології титанового субстрату після застосування різних методів обробки поверхні представлені на рис.5.2- 5.4.

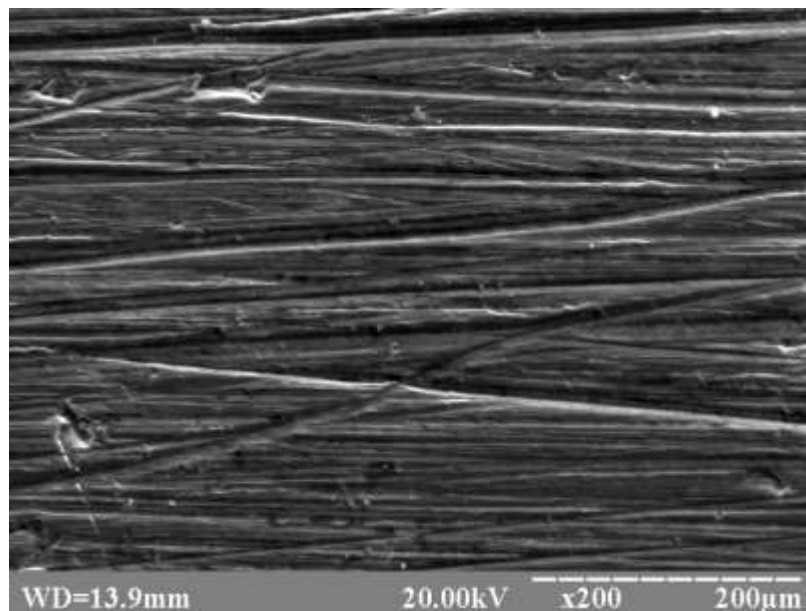


Рисунок 5.2 – Морфологія поверхні механічно відшліфованої пластини Ti-6Al-4V

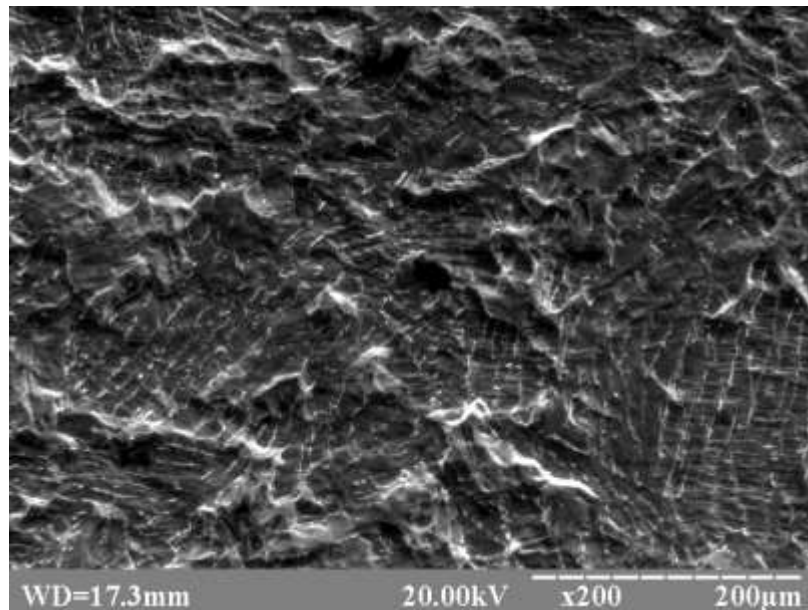


Рисунок 5.3 – Морфологія поверхні пластини Ti-6Al-4V після електрохімічного анодування

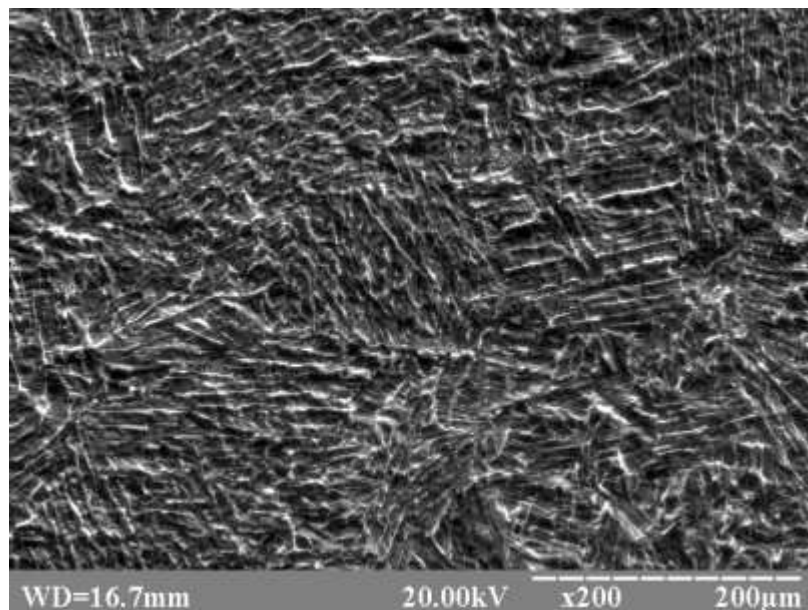


Рисунок 5.4 – Морфологія поверхні пластини Ti-6Al-4V після електрохімічного анодування з подальшим відпаленням при 500 °C протягом 1 години

### *5.1.2 Підготовка поверхні шляхом хімічного та ультразвукового обезжирювання*

Для підготовки поверхні перед покриттям застосовували наступні технології:

а) титанові субстрати обезжирювали в 10 М розчині натрію гідроксиду при температурі 60 °С протягом 20 хвилин, промивали водою, після чого опускали в 0,1 М розчин соляної кислоти на 30 секунд та ретельно промивали водою;

б) титанові субстрати занурювали в водний розчин гідрокарбонату натрію та піддавали ультразвуковій обробці протягом 10 хвилин, після чого ретельно промивали дистильованою водою з наступним обезжирюванням 96% етанолом.

### *5.1.3 Модифікація поверхні титанових субстратів біополімерними шарами*

Апатит-полімерні покриття створюються з метою покращення біосумісності імплантатів. В результаті комплексного застосування різноманітних фізико-хімічних методів на модифікованій і наноструктурованій поверхні імплантату можна одержати багат шарові багатофункціональні покриття, що складаються з біоінертного внутрішнього шару пористого титану та біоактивного зовнішнього шару на основі ГА та різноманітних біомолекул.

а). Модифікацію титанової пластини проводили нанесенням плівки з 2% розчину альгінату натрію на її поверхню з наступним зрошуванням альгінатної плівки 0,25 М розчином кальцію хлориду. Перед нанесенням апатитного покриття модифікована пластина висушувалась при температурі 37°C.

б). Модифікацію титанової пластини проводили нанесенням плівки з 3% розчину хітозану (М.М.300 кДа) в 0,1% розчині оцтової кислоти. Плівку наносили шляхом однократного окунання титанової пластини в вище вказаний розчин з наступним зрошуванням хітозанової плівки 10 М розчином кальцію гідроксиду. Перед нанесенням апатитного покриття модифікована пластина висушувалась при температурі 37°C.

## *5.2 Формування біоактивних покриттів на основі гідроксиапатиту з додаванням біомолекул*

В якості методу для одержання покриттів на основі ГА ми використовуємо метод термодепозиції (thermal substrate method), вперше запропонований японським вченим Kuroda et al., який був нами вдосконалений та доповнений. Метод полягає в осадженні покриттів з водного розчину, що містить іони  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{PO}_4^{3-}$ , на нагрітій змінним електричним струмом титановий або виготовлений з широко вживаного в ортопедії та в травматології сплаву Ti6Al-4V) субстрат. В основу методу покладена властивість ГА зменшувати свою розчинність з підвищенням температури. При низьких температурах (5-40°C) і рН 3.7-6.7 розчинність ГА може бути розрахована за формулою [92]:

$$\log K_s = -8219.41/T - 1.6657 - 0.098215 T$$

де  $K_s$  – константа розчинності,  $T$  – температура (К)

Відповідно до формули величина  $K_s$  для ГА є максимальною при 16°C. Подальший нагрів водного розчину, який містить  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{PO}_4^{3-}$  при відповідному рН приводить до осадження кальцій фосфатної фази на поверхні металевого субстрата.

Використання застосованого в даній роботі методу дозволяє отримувати біоміметичні покриття на основі ГА на титановому субстраті при відносно низьких (<100°C) температурах та значеннях рН, близьких до фізіологічних.

Удосконалена робоча установка для отримання покриттів методом термодепозиції представлена на рис. 5.5.

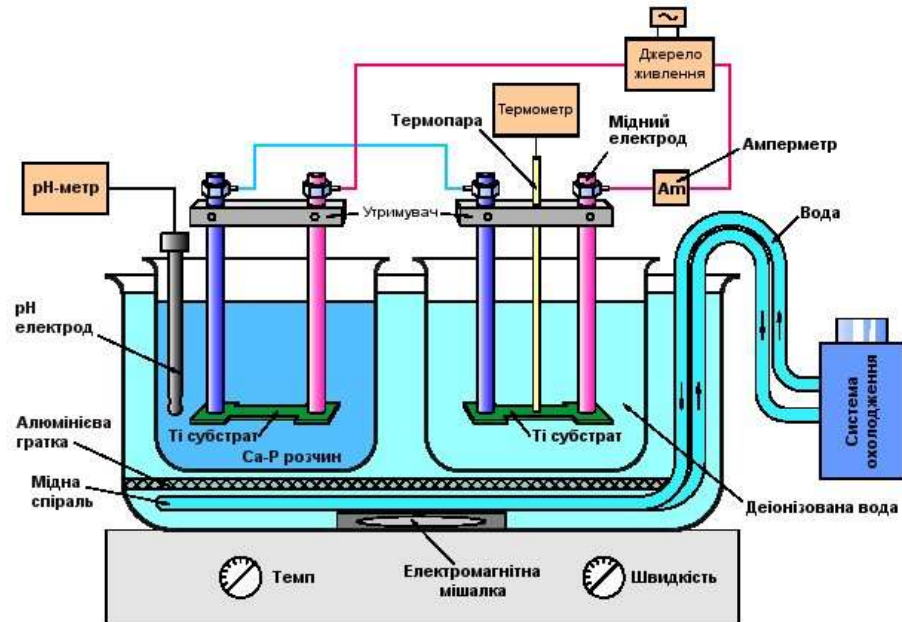


Рисунок 5.5 – Експериментальна установка з системою охолодження для отримання біоактивних покриттів на титанових субстратах

Низькотемпературний процес нанесення покриттів дозволяє отримувати нанокристалічний НА в поєднанні з біологічно активними полімерними молекулами, такими, як хітозан, альгінат. Застосована система охолодження дозволяє створити градієнт температур між субстратом і маточним розчином розчином та нагрівати невеликий об'єм робочого розчину навколо субстрату, що попереджує попередню сидементацію кальцій фосфатних кластерів і збіднення робочого розчину.

#### *Технологічний процес:*

Для нанесення покриття субстрат (пластину з титану або Ti-6Al-4V-сплав) прикріплювали до мідних електродів і занурювали в робочий розчин відповідного хімічного складу (лівий стакан на рис.1). Інша така ж пластина була референтною, її занурювали в правий стакан, заповнений дистильованою водою. До цієї пластини стаціонарно прикріплена термопара

для контролю температури поверхні субстрату. Пластини нагрівали до температури 37-120°C пропусканням змінного струму.

Обидві склянки з титановими субстратами вміщували в ємність, заповнену дистильованою водою, в якій розміщена система охолодження. Через пластини пропускали змінний електричний струм, сила якого відповідала нагріву пластини для досягнення заданої температури.

Загальний вигляд субстрату схематично представлений на рис. 5.6.

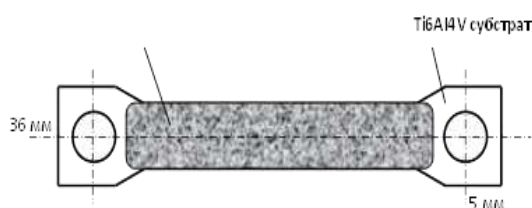


Рисунок 5.6 – Загальний вигляд титанового субстрату

### 5.2.1 Кальцій фосфатне покриття на анодованій та механічно відшліфованій поверхнях титанового субстрата

На дві титанові пластини, з яких одна була механічно відшліфована, а друга анодована і відпалена при 500 °С було нанесено кальцій фосфатне покриття.

#### Методика нанесення покриття:

- готують 200 мл 0,01 М розчин хлориду кальцію ( $\text{CaCl}_2$ ), P1 та додають розраховану кількість ортофосфорної кислоти ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) P2 , при цьому концентрація кислоти в суміші становить 0,006 М/л;

- компоненти P2 та P1 та ретельно перемішують, утворюється суміш P3;

- за допомогою рН метра вимірюють кислотність утвореної суміші P3 та доводять до значення 6,5 додаванням 18М розчину гідроксиду натрію, P4;

- в скляний хімічний стакан, який містить 200 мл P4, опускають закріплену на електродах титанову пластину, а в хімічний стакан з дистильованою водою опускають референтну пластину;

- установку підключають до джерела змінного струму заданої величини та контролюють задану 90-95 °С температуру поверхні пластини;

- після закінчення процесу покриття, який становить 1 годину, установку відключають від джерела струму, а пластину промивають дистильованою водою та висушують.

Дослідження морфології поверхні НА покриттів, нанесених на анодовану (рис.5.7) та механічно відшліфовану (рис.5.8) поверхні, проводили методом растрової електронної мікроскопії при прискорювальній напрузі 20 кВ на растровому електронному мікроскопі РЕМ-101 (ВАТ «Селмі», Суми, Україна). Цей метод дозволяє візуалізувати поверхню зразка в широкому діапазоні збільшень з роздільною здатністю 10 нм. Зображення були отримані в режимі вторинних електронів. Вторинні електрони забезпечують максимальну у порівнянні з іншими сигналами роздільну здатність порядку 5-10 нм.

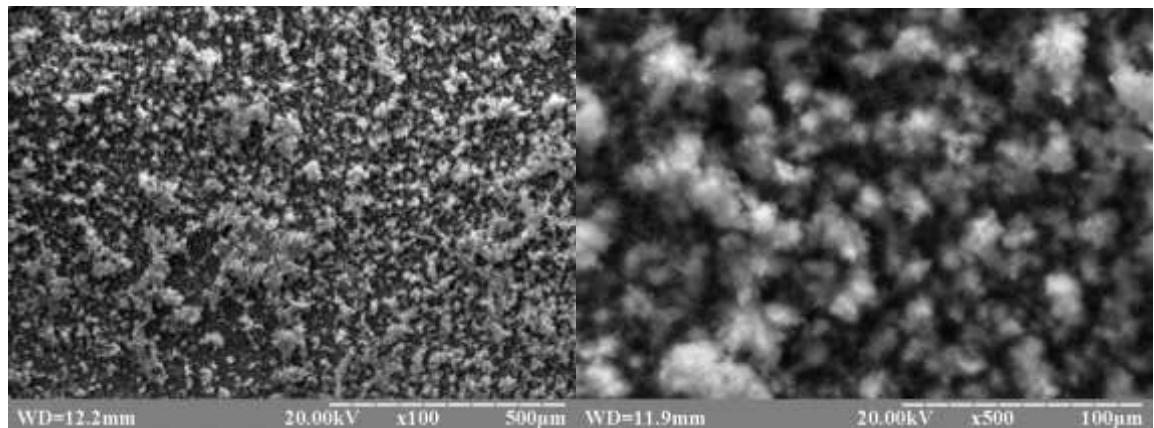


Рисунок 5.7 – Морфологія кальцій фосфатного покриття, нанесеного на анодовану відпалену титанову пластину при різних збільшеннях

Для порівняння на рис. 5.8 приведені мікрофотографії кальцій фосфатного покриття, нанесеного на механічно відшліфовану поверхню титанового субстрата. Знімки демонструють зменшення зернистості та збільшення щільності кальцій фосфатної плівки, нанесеної на анодовану



поверхню. Крім того, при збільшенні  $\times 500$  очевидне утворення голкоподібних гідроксиапатиних структур на анодованій титановій поверхні.

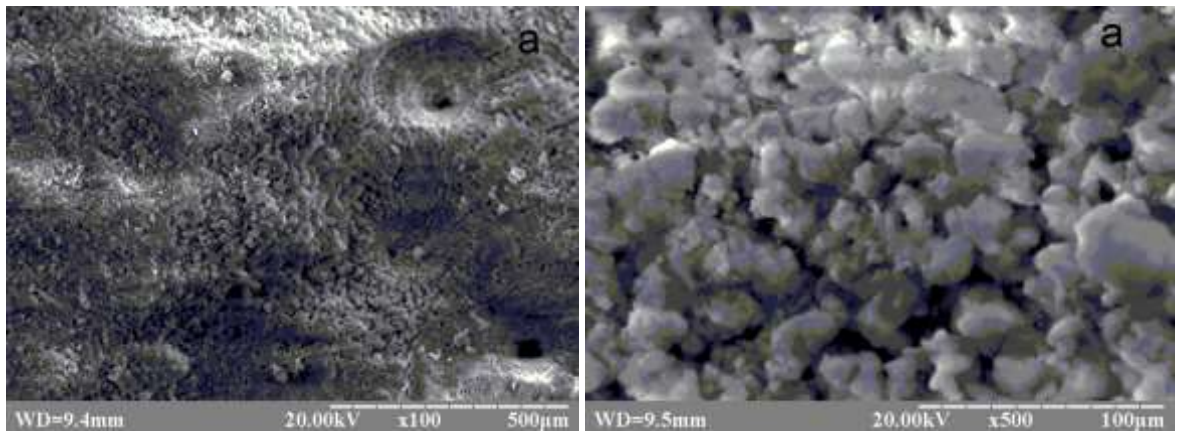


Рисунок 5.8 – Морфологія кальцій фосфатного покриття, нанесеного на механічно відшліфовану поверхню титанового субстрата

Структура отриманих покриттів була досліджена з допомогою методу рентгенівської дифракції.

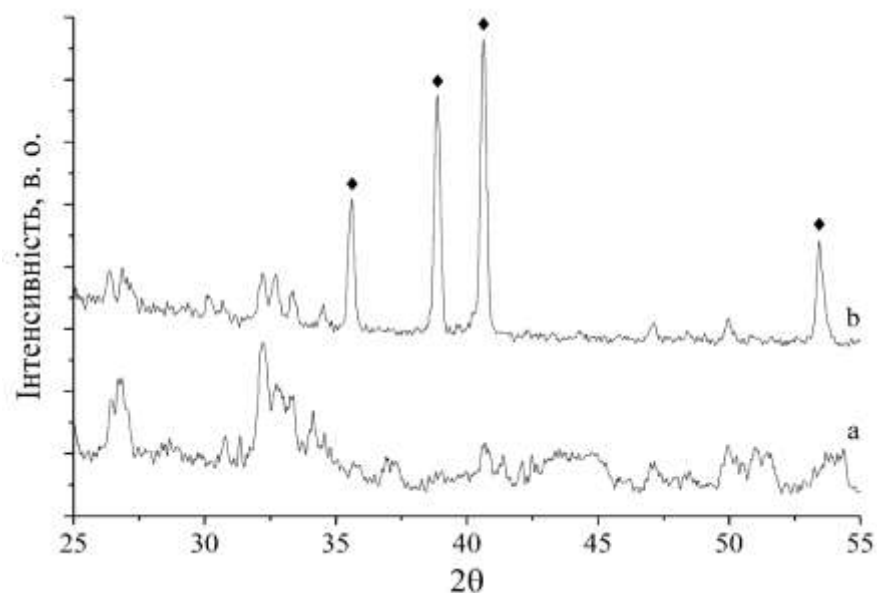


Рисунок 5.9 – Дифрактограми зразків кальцій фосфатного покриття, нанесеного на а) механічно відшліфовану титанову пластину; б) анодовану відпалену при  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Символами  $\blacklozenge$  позначені піки від титанової пластини

Згідно наведених на рис. 5.9 дифрактограм, в обох зразках присутні кальцій-фосфатні фази, найбільш ймовірно з яких є гідроксиапатит (JCPDS 86-740). Слід зазначити, що через умови отримання (метод термодепозиції та кількість покриття) його кристалічність є низькою. У зразку б) достатньо чітко реєструються піки від титанової підкладки, що свідчить про незначну товщину покриття. Дифрактограми свідчать, що кристалічність гідроксиапатиту у випадку зразка б) є вищою порівняно зі зразком а). Однак в обох зразках присутня певна кількість неідентифікованих піків, які, на нашу думку, слід віднести до фосфатів кальцію. Таким чином, анодована поверхня титанової пластини сприяє отриманню більш кристалічної структури. Очевидно, що структура анодованої поверхні є пористою і утворення гідроксиапатиту відбувається в першу чергу на більш енергетично вигідних ділянках. Тому частково не покриті апатитом ділянки відображаються піками титану на дифрактограмі. Для отримання покриття з більшою товщиною термін його нанесення на таку поверхню має бути збільшеним.

### *5.2.2 Біокомпозитні покриття на основі гідроксиапатиту з вмістом хітозану*

Утворення полімер-апатитних композитних покриттів проводили двома способами: а) нанесенням кальцій фосфатного покриття на модифіковану полімером поверхню; б) осадженням кальцій фосфатного покриття з розчину, який містив полімерні та неорганічні молекули.

а) *Методика нанесення кальцій фосфатного покриття на модифіковану хітозаном поверхню.*

Для модифікації поверхні був підготований 3% розчин хітозану (М.М.300 кДа) в 0,1% розчині оцтової кислоти. Плівку наносили шляхом однократного окунання титанової пластини в розчин хітозану з наступним зрошуванням хітозанової плівки 10 М розчином натрію

гідроксиду. Відомо [93], що ізоелектрична точка хітозану знаходиться приблизно при  $\text{pH}=8,7$ . Дані іншої літератури [94] свідчать, що депротонування полімеру і перехід його з розчинного стану в нерозчинний відбувається при  $\text{pH}=7,5$ . Перед нанесенням апатитного покриття модифікована пластина висушувалась при температурі  $37^{\circ}\text{C}$ .

На висушену плівку хітозану був нанесений шар кальцій фосфатного покриття згідно методики, описаної в п.5.2.1, за виключенням того, що значення  $\text{pH}$  робочого розчину складало 6,1. Співвідношення  $\text{Ca/P}$  в робочому розчині становило 1,67, а температура поверхні титанової пластини –  $60^{\circ}\text{C}$ .

Морфологія кальцій фосфатного покриття, нанесеного на модифіковану хітозаном поверхню, представлена на рис. 5.10. Спостерігаємо утворення агломератів НА розміром від 1 до 30 мкм.

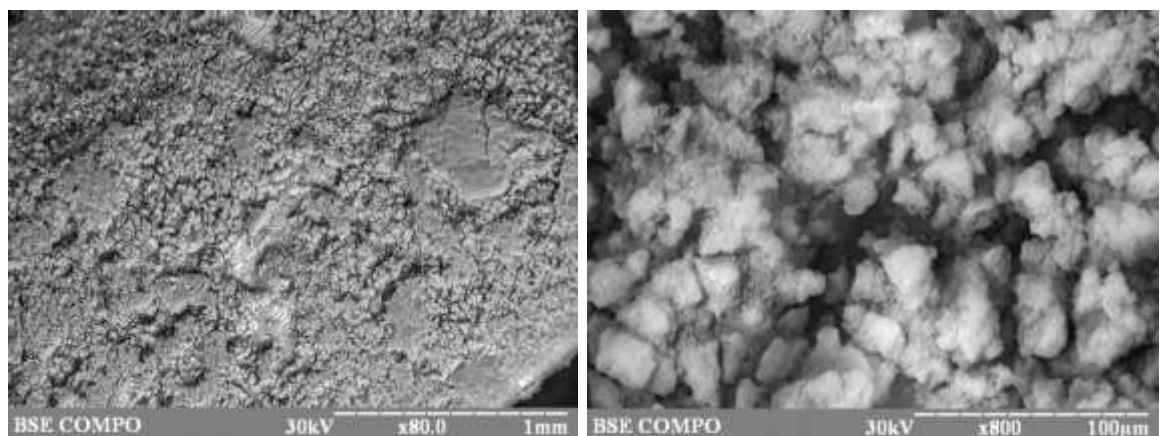


Рисунок 5.10 – Морфологія кальцій фосфатного покриття, нанесеного на модифіковану хітозаном поверхню титанового субстрата

На рис.5.11. представлена дифрактограма від отриманого зразку, яка свідчить, що основною фазою утвореного покриття є кристалічний гідроксиапатит. Наявність піків від матеріалу пластини – титану- є результатом відносно малої товщини покриття (близько 20 мкм).

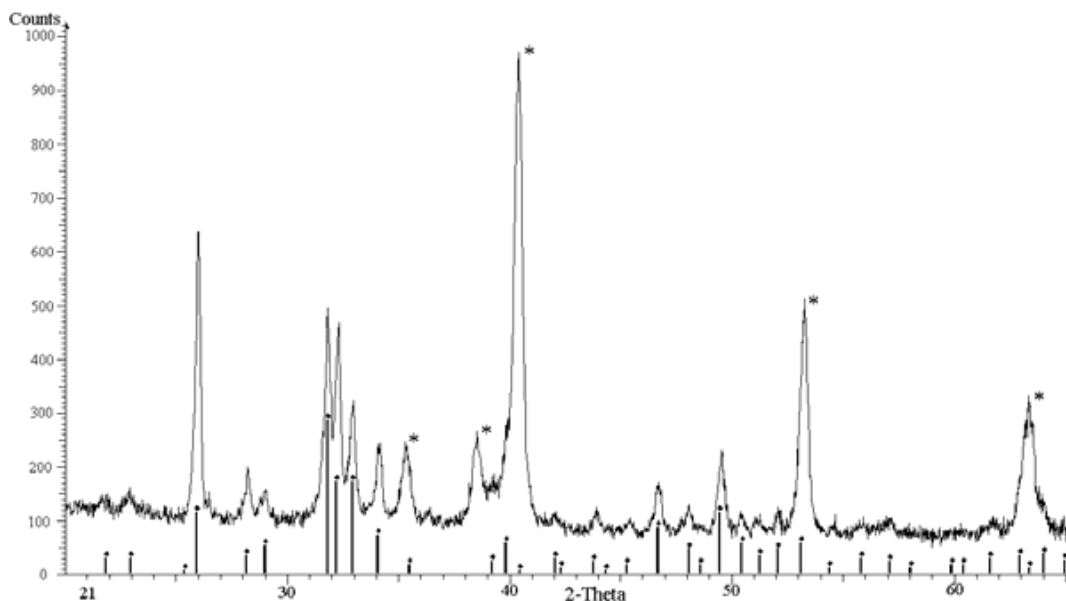


Рисунок 5.11 – Дифрактограма зразку кальцій фосфатного покриття, нанесеного на поверхню, модифіковану хітозаном при різних збільшеннях. Зірочками позначені піки, які належать титану

*б) Методика нанесення кальцій фосфатного покриття з розчину, який містить хітозан*

Біокомпозитне гідроксиапатитне покриття з вмістом хітозану на металевому субстраті отримують наступним чином:

1. 1 г хітозану з молекулярною масою 200кДа та ступенем деацетилювання 87% розчиняють в 1000 мл 1 мас. % розчину оцтової кислоти ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) в шейкері (200rpm) при температурі 37 °С протягом 3 годин, (P1);

2. Для приготування робочого розчину для нанесення кальцій фосфатного, в т.ч. гідроксиапатитного покриття готують водний розчин  $\text{CaCl}_2$  з концентрацією 10 ммоль/л та водний розчин  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  з концентрацією 6ммоль/л; по 100 мл кожного з цих розчинів змішують (P2);

3. До P2 додають 5мл розчину P1, для досягнення кінцевої концентрації хітозану у робочому розчині 0,025 г/л, (P3);

4. Вимірюють кислотність утвореної суміші P3 та регулюють до значення  $pH=6,3$  розчину, отриманого на стадії 2, здійснюють додаванням, водного 10 М розчину NaOH, (P4) ;

5. Для отримання біокомпозитного покриття у розчин P4 об'ємом 200 мл, занурюють підготований згідно п.1.2(б) титановий субстрат, прикріплений до мідних електродів; в контрольну ємність з дистильованою водою поміщують прикріплену до електродів титанову пластину, до якої щільно прикріплена термopара.

6. Підключають установку до мережі змінного струму та пропускають через субстрат струм, сила якого забезпечує нагрівання поверхні до температури 80-90 °С. температуру субстрату контролюють з допомогою термopари, приєднаної до мультиметра. Термін утворення покриття складає 2 години.

7. Отримане на стадії 6 покриття багаторазово промивають дистильованою водою та висушують в термошафі при температурі 37 °С.

Покриття має наступні характеристики: Співвідношення Ca/P (ат%)=1,67; товщина покриття 10 мкм. На рис.5.12 представлено зображення поверхні кальцій фосфатного покриття, нанесеного з розчину, який містить хітозан в концентрації 0,025 г/л.

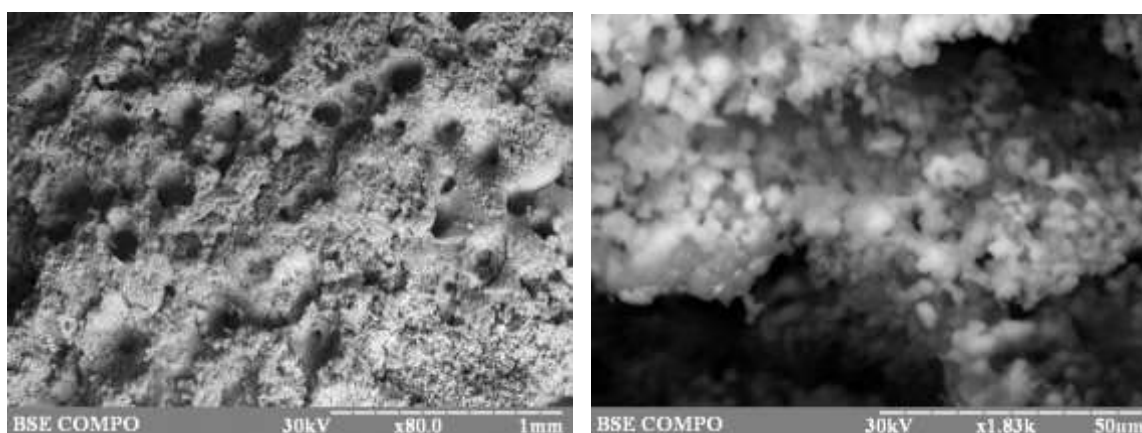


Рисунок 5.12 - Морфологія кальцій фосфатного покриття, нанесеного на поверхню титанового субстрата, з розчину, який містить хітозан, при різних збільшеннях

Аналіз показує, що при даному варіанті синтезу утворюється більш пористе покриття в порівнянні з методикою а).

На рис. 5.13 представлена дифрактограма від зразку, отриманого з розчину з вмістом хітозану, яка свідчить, що основною фазою утвореного покриття є гідроксиапатит. Однак ступінь його кристалічності, виражена уширенням та інтенсивністю піків, є меншою, порівняно зі зразком згідно методики а). Наявність піків від матеріалу пластини – титану – є результатом відносно малої товщини покриття (близько 20 мкм) та низької кристалічності. Очевидною є присутність невеликої долі аморфної фази.

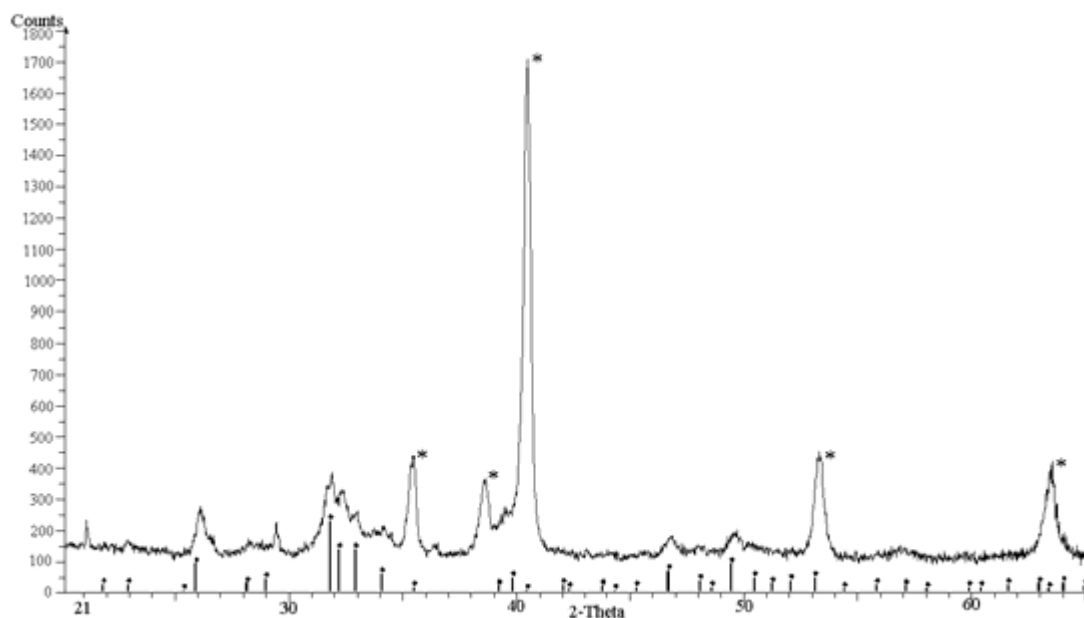


Рисунок 5.13 – Дифрактограма від зразку кальцій фосфатного покриття, нанесеного з розчину з вмістом хітозану. Зірочками позначені піки титану

Аналіз матеріалу методом ІЧ спектроскопії був застосований з метою оцінити взаємодію функціональних груп хітозану та гідроксиапатиту при формуванні композитного апатит-біополімерного покриття. Для цього був використаний матеріал осаду, який утворився в робочих стаканах після проведення процесу термодепозиції: 1) з кальцій фосфатного розчину без органічної складової, (названий НА); 2) з кальцій фосфатного розчину з хітозаном (названий «композит»). Для утворення осаду вказані розчини були

нагріті до температури 60 ° С, після чого утворений осад був промитий дистильованою водою та відфільтрований. Осад НА був додатково відпалений при 900°С з метою отримання вищої роздільності піків. Необхідно зазначити, що склад матеріалу, нанесеного на титанову пластину методом термодепозиції та склад осаду з робочого розчину для термодепозиції є однаковим. Для оцінки та порівняння також був знятий ІЧ спектр порошку хітозану (М.М.300 кДа).

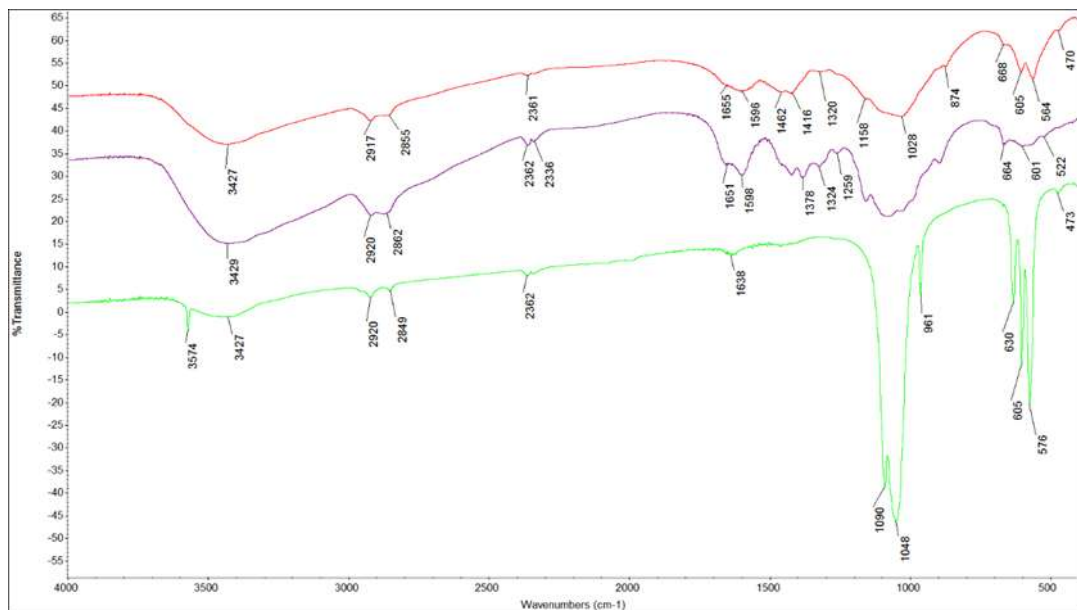


Рисунок 5.14 – ІЧ спектр матеріалів покриття, нанесених методом термодепозиції : знизу вгору: 1-НА без органічної складової; 2- спектр порошку хітозану (М.М.300кДа). 3- НА з вмістом хітозану

Порівнюючи ІЧ-спектр композитного матеріалу, який утворився на поверхні титанової пластини та складається з НА та хітозану (3) зі спектрами компонентів (НА-1, хітозан-2), можна відзначити наступні зміни: пік 576  $\text{cm}^{-1}$  в спектрі НА, який відповідає антисиметричним коливанням  $\nu_2$  груп  $\text{PO}_4^{3-}$ , зміщений до 564  $\text{cm}^{-1}$  в спектрі композиту (3). Гострий пік 961  $\text{cm}^{-1}$  в спектрі НА, який відноситься до симетричних валентних коливань  $\nu_1$   $\text{PO}_4^{3-}$ , відсутній в спектрі композиту (3). Піки 1048  $\text{cm}^{-1}$  та 1090  $\text{cm}^{-1}$ , що відповідають  $\nu_3$   $\text{PO}_4^{3-}$  фундаментальним коливанням в спектрі НА, представлені слабким

рефлексом зі зміщенням до  $1028\text{ см}^{-1}$  в спектрі композиту. Смуги коливань при  $630\text{ см}^{-1}$  та  $3574\text{ см}^{-1}$ , які відповідають коливанням групи  $\text{OH}^-$  в НА, відсутні в спектрі композиту. Новий пік в спектрі композиту  $873\text{ см}^{-1}$  свідчить про заміщення  $\text{PO}_4^{3-}$  групи на  $\text{CO}_3^{2-}$  в НА. Карбонатним групам також належать смуги при  $1416$  та  $1462\text{ см}^{-1}$  в спектрі композиту. Характерний для хітозану пік Амід1 ( $1651\text{ см}^{-1}$ ) є зміщеним до  $1655\text{ см}^{-1}$  та слабо вираженим в спектрі композиту. Також в спектрі композиту дуже слабкими є типові для хітозану (так звані відбитки пальців) коливання в області  $625\text{-}1300\text{ см}^{-1}$ , присутні в спектрі чистого хітозану (2). Коливання в спектрі хітозану первинних та вторинних  $\text{OH}^-$  груп ( $1153\text{-}1158\text{ см}^{-1}$ ) слабо проявляються в спектрі композиту. Деформаційне коливання  $\text{NH}_2$  в спектрі хітозану є слабким та зміщеним до  $1596\text{ см}^{-1}$  в спектрі композиту. Всі вказані відмінності в спектрах композиту та вихідних речовин свідчать про взаємодію та участь у комплексоутворенні функціональних груп як хітозану, так і утворюваного гідроксиапатиту. Зміни в коливаннях  $\text{OH}^-$  груп НА також підтверджують формування карбонат заміщеного НА змішаного типу.

### *Висновок*

Таким чином, на титановому субстраті утворене покриття, що складається з неорганічної складової - гідроксиапатиту, який є однією з найбільш стабільних форм кальцій-фосфатів та складає 60-65% кісткової тканини [95] та органічної складової, представлені природним полісахаридом - хітозаном. Використання хітозану в якості полімерної складової обумовлене його біосумісністю та здатністю до біодеградації [96], також загальновідомими протимікробними властивостями [97].



## **6 ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ БІОАКТИВНИХ ПОКРИТТІВ НА ОСНОВІ ГІДРОКСИПАТИТУ ТА НАТРІЮ АЛЬГІНАТУ, НАНЕСЕНИХ НА МОДИФІКОВАНУ ПОВЕРХНЮ. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВВЕДЕНИХ БІОМОЛЕКУЛ НА МОРФОЛОГІЮ, ФАЗОВИЙ СКЛАД, КРИСТАЛІЧНІСТЬ ПОКРИТТІВ З ВИКОРИСТАННЯМ СУЧАСНИХ МЕТОДІВ АНАЛІЗУ**

*6.1 Формування біоактивних покриттів на основі гідроксиapatиту з додаванням альгінату*

*а)Методика нанесення НА покриття на модифіковану альгінатом поверхню титанового субстрату.*

Для модифікації поверхні був підготований водний 2% розчин альгінату натрію. Плівку наносили шляхом однократного окунання титанової пластини в розчин альгінату з наступним зрошуванням альгінатної плівки 0,25М розчином хлориду кальцію. Перед нанесенням НА покриття модифікована пластина висушувалась при температурі 37°C.

На висушену плівку альгінату був нанесений шар НА покриття згідно методики, описаної в п.5.2.1, за виключенням того, що значення рН робочого розчину складало 6,4. Співвідношення Са/Р в робочому розчині становило 1,67, а температура поверхні титанової пластини – 90 °С.

Морфологія кальцій фосфатного покриття, нанесеного на модифіковану альгінатом поверхню, представлена на рис. 6.1. Спостерігаємо утворення агломератів НА розміром від 1 до 20 мкм. Дифрактограма зразку представлена на рис.6.4(а).

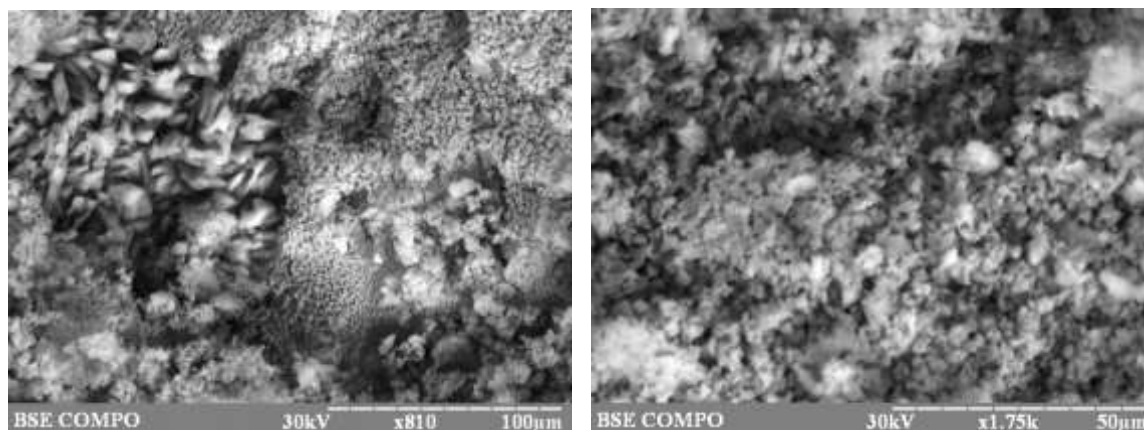


Рисунок 6.1 – Морфологія поверхні НА покриття, нанесеного при температурі 90°C на модифіковану альгінатом поверхню титанової пластини

*б) Методика нанесення покриття з брушиту на модифіковану альгінатом поверхню титанового субстрату.*

Брушит  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  відноситься до кальцій фосфатів, які також застосовуються в інженерії кісткової тканини та мають значно меншу розчинність, ніж гідроксиапатит. Перед нанесенням покриття методом термічної депозиції титанова пластина була модифікована плівкою з альгінату натрію. Для цього був підготований водний 1% розчин альгінату натрію. Плівку наносили шляхом однократного окунання титанової пластини в розчин альгінату з наступним зрошуванням альгінатної плівки 0,125M розчином хлориду кальцію. Перед нанесенням покриття з брушиту модифікована пластина висушувалась при температурі 37°C. Подальша методика нанесення покриття з брушиту полягає в наступному:

- готують 200 мл 0,01 M розчин хлориду кальцію ( $\text{CaCl}_2$ ), P1 та додають розраховану кількість ортофосфорної кислоти ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) P2, при цьому концентрація кислоти в суміші становить 0,006 M/л; співвідношення Ca/P в робочому розчині становить 1,67;

- компоненти P2 та P1 та ретельно перемішують, утворюється суміш P3;

- з допомогою рН метра вимірюють кислотність утвореної суміші P3 та доводять до значення 6,7 додаванням 18M розчину гідроксиду натрію, P4;

- в скляний хімічний стакан, який містить 200 мл Р4, опускають закріплену на електродах титанову пластину, модифіковану плівкою з 1% альгінату, а в хімічний стакан з дистильованою водою опускають референтну пластину;

- установку підключають до джерела змінного струму заданої величини та контролюють задану  $\leq 40^{\circ}\text{C}$  температуру поверхні пластини;

- після закінчення процесу покриття, який становить 1 годину, установку відключають від джерела струму, а пластину промивають дистильованою водою та висушують.

Морфологія кальцій фосфатного (брушит) покриття, нанесеного на модифіковану альгінатом поверхню, представлена на рис. 6.2. Дифрактограма зразку представлена на рис.6.4 (б).

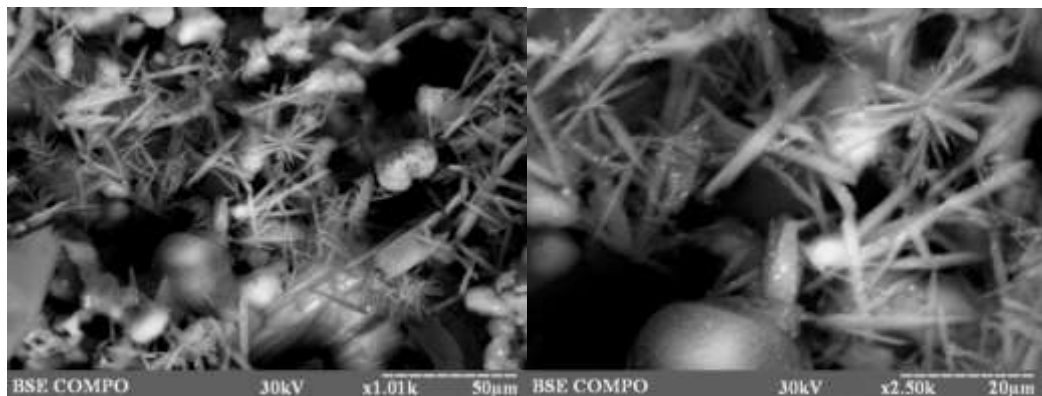


Рисунок 6.2 – Морфологія поверхні покриття з брушиту, отриманого при осадженні на модифікований плівкою альгінату титановий субстрат при температурі  $40^{\circ}\text{C}$

*в) Методика нанесення гідроксиапатитного покриття з розчину, який містить альгінат.*

Біокомпозитне гідроксиапатитне покриття з вмістом альгінату на металевому субстраті отримували наступним чином:

1. Готували 1% розчин альгінату натрію. Для цього 1 г натрію альгінату розчиняли в 100 мл деіонізованої води при температурі 37 °С протягом 8 годин (P1).

2. Для приготування робочого розчину для нанесення кальцій фосфатного, в т.ч. гідроксиапатитного покриття готували водний розчин  $\text{CaCl}_2$  з концентрацією 10 ммоль/л (P2) та водний розчин  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  з концентрацією 6 ммоль/л (P3); 100 мл P3 додавали до 100 мл P2 та ретельно перемішували (P4).

3. До P4 крапельним методом при постійному перемішуванні додавали 4 мл розчину P1, утворювалась суміш (P5). Концентрація альгінату в P5 становить 0,02%.

4. Регулювання рН до значення 6,4 здійснювали додаванням до суміші P5 водного розчину  $\text{NaOH}$  з концентрацією 2 моль/л.

5. Для отримання біокомпозитного покриття методом термічної депозиції у суміш P5 об'ємом 204 мл занурювали підготований та прикріплений до мідних електродів металевий субстрат. Пропусканням змінного струму через підготований згідно п.1.2 субстрат, останній нагрівали до температури  $100 \div 105$  °С, яку контролювали мідь-константовою термопарою. Для підвищення точності вимірювань температури використовували контрольну ємність з дистильованою водою, в якій термопара щільно прикріплена до субстрату. Час утворення покриття становив 1 годину.

6. Отримане на стадії 5 покриття багаторазово промивали дистильованою водою та висушували в термошафі при температурі 37 °С.

Покриття має наступні характеристики: співвідношення  $\text{Ca/P}$  (ат%)=1,65; товщина покриття 10 мкм.

## 6.2 Структурні та морфологічні характеристики біоактивних покриттів на основі НА та альгілату

На рис.6.3 представлена морфологія НА-Alg композитного покриття. Нанесеного з розчину, який містив альгілат натрію. Дифрактограма покриття приведена на рис. 6.4(в).

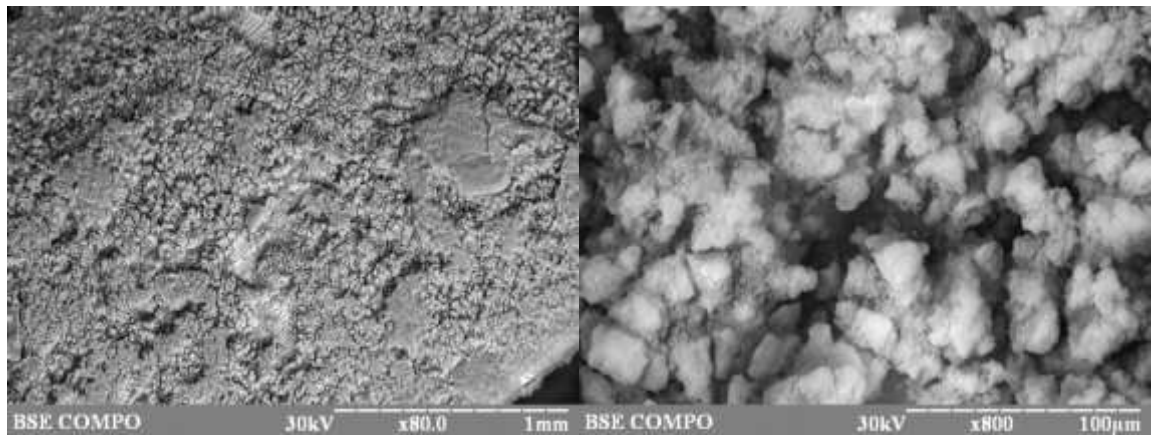


Рисунок 6.3 – Морфологія поверхні НА покриття, нанесеного при температурі 105°C з розчину з вмістом альгілату

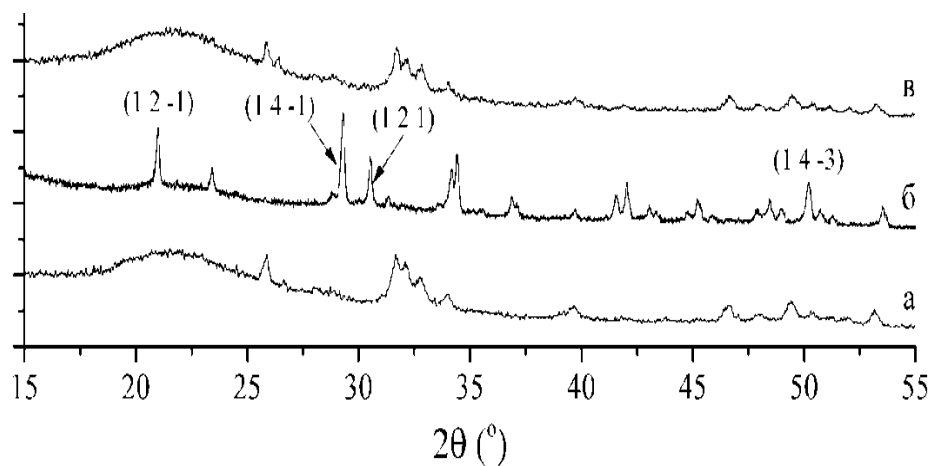


Рисунок 6.4 – Дифрактограми гідроксиапатитних покриттів, отриманих методом термодепозиції: а) покриття НА на титановій пластині, модифікованій плівкою з 2% альгілату при температурі 90°C; б) покриття з брушиту на модифікованій плівкою 1% альгілату пластині при температурі  $\leq$

40 °C в) покриття HA-альгінат, отримане з розчину, що містив альгінат з концентрацією 0,02%

Крім того, був проаналізований кальцій фосфатний осад, який утворюється в робочих розчинах для нанесення покриттів після нагрівання до температури 60° C. Осади з розчину для отримання покриття без органічної складової (HA) та з органічною складовою (HA-Alg) були промиті дистильованою водою, відфільтровані та відпалені при 900°C з метою отримання вищої роздільності піків. Необхідно зазначити, що склад матеріалу, нанесеного на титанову пластину методом термодепозиції та склад осаду з робочого розчину для термодепозиції є однаковим.

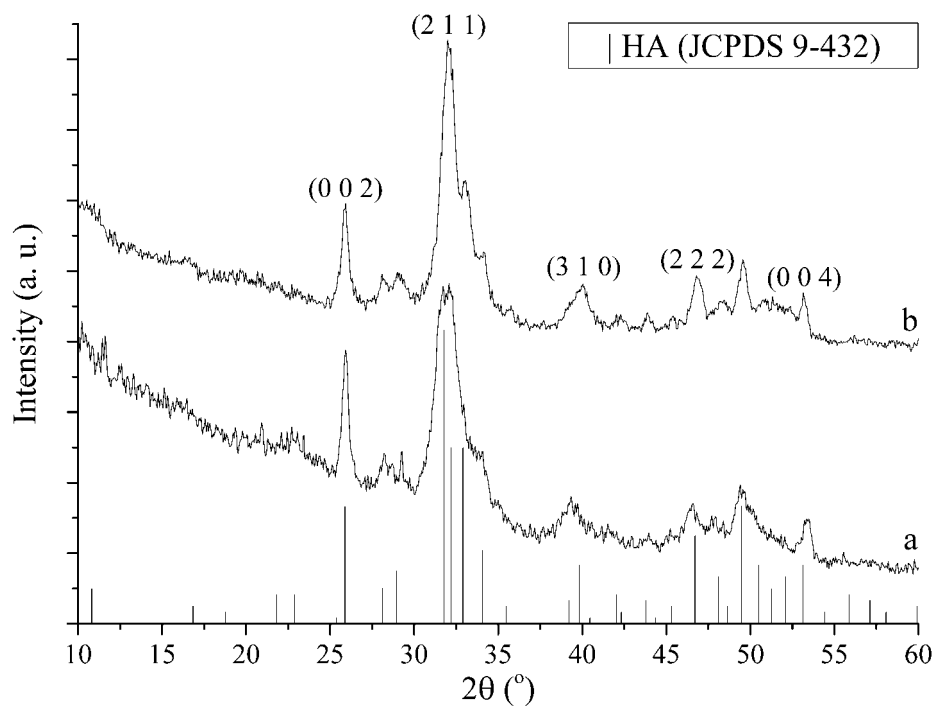


Рисунок 6.5 – Дифрактограма зразків осаду, отриманого з розчинів після нанесення HA покриття та HA-Alg покриття

Таблиця 6.1 Середні розміри кристалітів НА, утворених під час процесу термодепозиції.

Зразок	Кристаліграфічні площини (Індекси Міллера)	Середній розмір кристалітів		
		За Шерером, нм	За Вільямсом-Холом	
			Розмір, нм	Уширення, $\cdot 10^3$
НА	(002)	14,4	10,2	4,28
	(004)	24,5		
НА/Alg	(002)	30	37,1	1,38
	(004)	25		

### *Висновок*

Таким чином, завдяки модифікації органічною складовою (хітозан, альгінат), отримані методом термічної депозиції кальцій фосфатні, в т.ч. гідроксиапатитні покриття на металевих імплантатах, мають пористу високорозвинену поверхню, ступінь їх адгезії до субстрату збільшився в 2-4 разив порівнянні з покриттями без органічної складової, мають протимікробну активність у випадку включення хітозану та є потенціальним носієм лікарських засобів, білків, остеотворюючих клітин у випадку включення альгіанату до їх складу.

Отримані результати показали, що попереднє модифікування поверхні титанових субстратів дозволяють одержати покриття відповідної морфології та фазового складу, а додавання розчину альгіанату до складу вихідного розчину (до 0,02%) сприяє зростанню адгезії отриманих покриттів до поверхні субстрату.

## 7 МОДИФІКАЦІЯ СПОЛУКАМИ ЦИНКУ ПОКРИТТІВ НА ТИТАНОВИХ СУБСТРАТАХ

Розповсюджене використання у медичній практиці природних та синтетичних речовин з антимікробними властивостями призвело до формування у мікроорганізмів полірезистентності та високої стійкості до антибіотиків. Тому одним із сучасних підходів при створенні матеріалів для ортопедії та стоматології є їх модифікація неорганічними біоактивними іонами з метою як ініціації контрольованих реакцій в тканинах, так і виконання протимікробних функцій [98], [99]. Біологічний апатит, який є складовою кісткової тканини, включає ряд неорганічних іонів, таких як  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ . Було встановлено, що біологічна активність апатитів підвищувалась в результаті включення до їх складу незначної кількості іонів цинку, магнію, срібла [100]. Комплексні органічні сполуки, модифіковані іонами перехідних елементів, відіграють важливу роль в синтезі матеріалів, створенні лікарських препаратів, каталізі, фотохімії, біологічних системах, проявляють протимікробні властивості в складі терапевтичних засобів [101]. Серед іонів металів цинк виділяється значною присутністю в якості мікроелемента в кістковому мінералі [102], а також сприяє щільності кісткової тканини та попереджує втрату кісткової маси [103]. В останній час дослідження в області медичного матеріалознавства стосуються сполук цинку- осиду ( $\text{ZnO}$ ) та сульфїду ( $\text{ZnS}$ ). Наночастинки сульфїду цинку привернули велику увагу у зв'язку з застосуванням в оптоелектроніці [104], каталізі у системах молекулярного розпізнавання [105] та використанні їх люмінесцентних та флуоресцентних властивостей у створенні зондів. Матеріали на основі  $\text{ZnS}$  мають дуже виражену біосумісність, характеризуються високою межею міцності, абсолютною механічною твердістю і хімічною інертністю, що робить їх незамінними для вирішення різного роду задач, включаючи жорсткі умови експлуатації.



В даному дослідженні була розроблена технологія нанесення цинку сульфїду в якості покриття на титановий субстрат, а також розроблена технологія модифікації кальцій фосфатного покриття сульфїдом цинку.

### *7.1 Методика нанесення покриття з ZnS на титановий субстрат*

Технологія нанесення покриття включає наступні етапи:

- готують 100 мл 0,2М розчин цинку нітрату  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (P1);
- готують 100 мл 0,2 М розчину тіосечовини ( $NH_2CSNH_2$ ) (P2);
- крапельно додають P2 до P1 та вимірюють значення рН суміші (P3);
- до суміші P3 додають 10 мл 25% розчину аміаку
- в скляний хімічний стакан, який містить 200 мл P3, опускають закріплену на електродах титанову пластину, а в хімічний стакан з дистильованою водою опускають референтну пластину;
- установку підключають до джерела змінного струму заданої величини та контролюють задану  $80^\circ C$  температуру поверхні пластини;
- після закінчення процесу покриття, який становить 30 хвилин, установку відключають від джерела струму, а пластину промивають дистильованою водою та висушують.

### *7.2 Методика нанесення покриття з ZnS, як поверхневий шар на кальцій фосфатне покриття на титановому субстраті*

Технологія нанесення покриттів полягає в наступному:

- готують 200 мл 0,01 М розчин хлориду кальцію ( $CaCl_2$ ), P1 та додають розраховану кількість ортофосфорної кислоти ( $H_3PO_4$ ) P2 , при цьому концентрація кислоти в суміші становить 0,006 М/л;
- компоненти P2 та P1 ретельно перемішують, утворюється суміш P3;
- з допомогою рН метра вимірюють кислотність утвореної суміші P3 та доводять до значення 6,5 додаванням 18М розчину гідроксиду натрію, P4;

- в скляний хімічний стакан, який містить 200 мл Р4, опускають закріплену на електродах титанову пластину, а в хімічний стакан з дистильованою водою опускають референтну пластину;

- установку підключають до джерела змінного струму заданої величини та контролюють задану 90-95 °С температуру поверхні пластини;

- після закінчення процесу покриття, який становить 1 годину, установку відключають від джерела струму, а пластину промивають дистильованою водою.

- на промиту дистильованою водою пластину з нанесеним кальцій фосфатним покриттям наносять поверхневий шар покриття з цинку сульфідну за технологією згідно п.7.1.

### *7.3 Дослідження структурних особливостей покриттів з вмістом НА та ZnS, отриманих методом термодепозиції*

Було досліджено 3 типи покриття:

№1 - кальцій фосфатне покриття (НА);

№2 - ZnS покриття, нанесене на шар кальцій фосфатного покриття (НА+ ZnS);

№3 - ZnS покриття.

На рис. 7.1 представлена морфологія поверхні покриттів, одержаних методом термодепозиції.

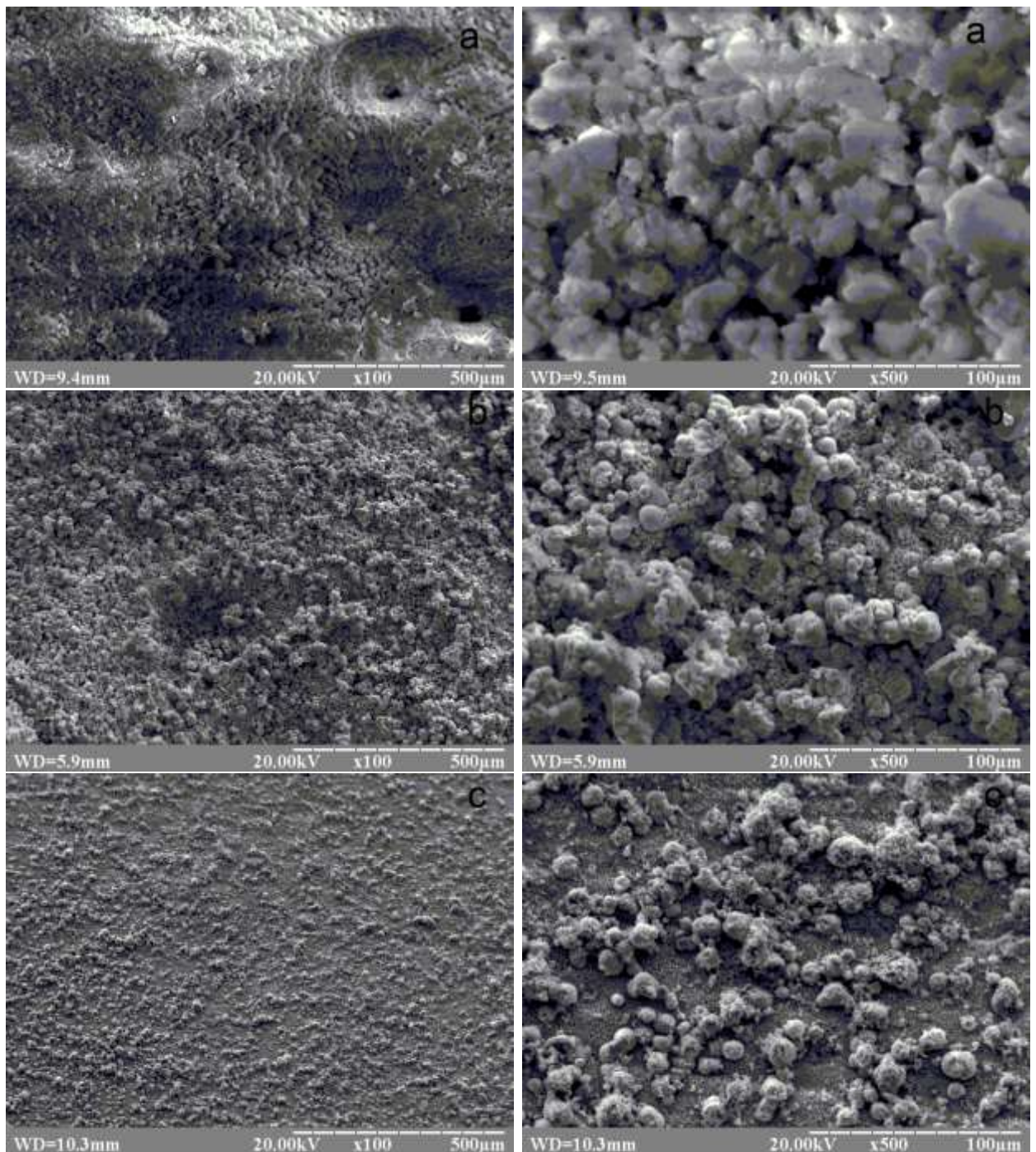


Рисунок 7.1 – Морфологія поверхні покриттів (при різних збільшеннях), нанесених на титановий субстрат методом термодепозиції: а) кальцій фосфатне покриття (НА); б) ZnS покриття, нанесене на шар кальцій фосфатного покриття (НА+ ZnS); (с)-ZnS покриття

Хімічний склад покриттів був досліджений методом рентгенофлуоресцентного аналізу. На рис.7.2 представлені характеристичні спектри для покриттів, нанесених методом термодепозиції.

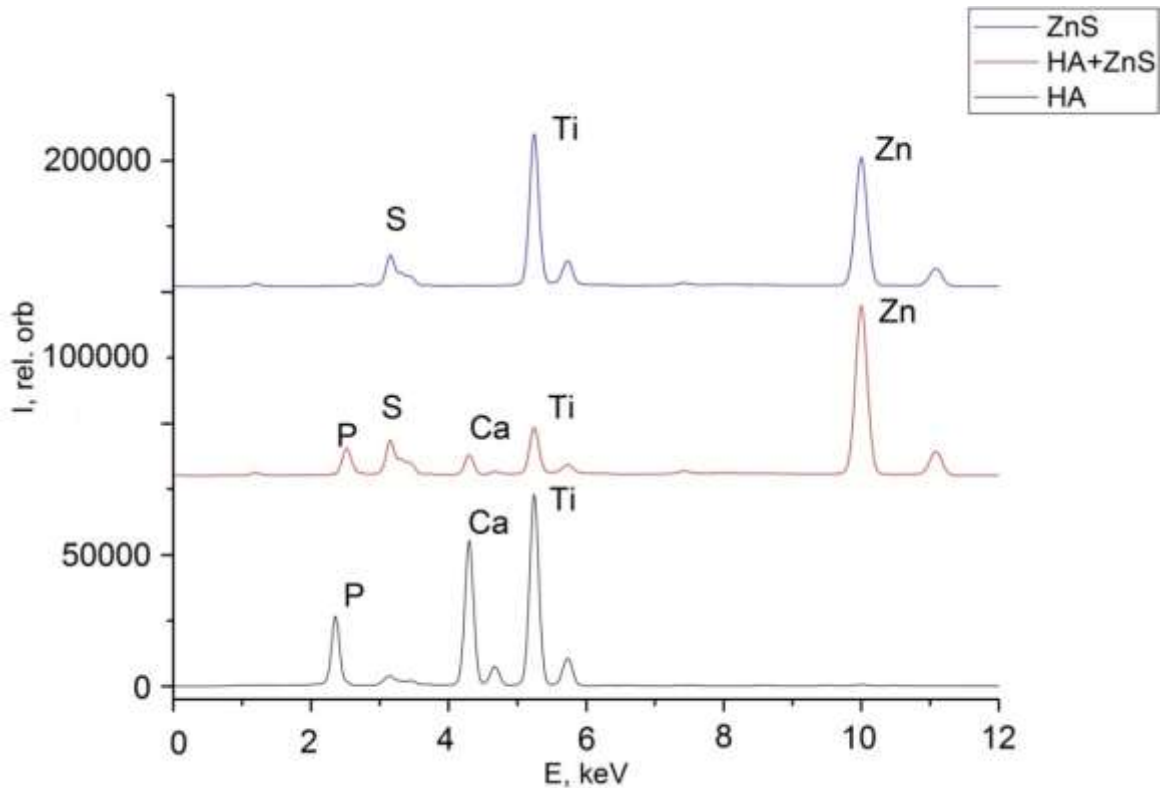


Рисунок 7.2 – Характеристичні рентгено-флуоресцентні спектри наступних покриттів, знизу вверх: 1)гідроксиапатит; 2) гідроксиапатит з цинку сульфідом; 3) цинку сульфід

Результати свідчать, що на спектрах присутні компоненти гідроксиапатиту (Ca, P), цинку сульфїду (Zn, S), а також титану, який є матеріалом пластини. Дифрактограми від матеріалу покриттів приведені на рис.7.3. Рентгено-фазовий аналіз для всіх зразків показав наявність фази титану (Ti) (JCPDS 89-4913) та  $Ti_6O$  (JCPDS 73-1118). В зразку №1 визначено 2 фази – HA (JCPDS 86-740) та доля монетиту (JCPDS 89-5969); в зразку №2- HA (JCPDS 86-740), монетит (JCPDS 89-5969) та кристалічна модифікація сульфїда цинку (вюрцит) (12-688); зразок №3 представлений кристалічною модифікацією сульфїду цинку (вюрцит) (12-688) [106] Структурні параметри матеріалу покриттів приведено в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1. Структурні параметри матеріалу покриттів, отриманих методом термодепозиції.

Зразок, №	2θ	Напів-ширина, нм	Міжплощинна відстань, нм	Розмір кристалітів, нм	Параметри кристалічної ґратки, нм	
					<i>a</i>	<i>c</i>
HA	25,62	0,305	3,4769	29,6680	0,9795	0,6945
	32,16	0,329	2,7832	27,9113	0,9344	0,6790
	53,28	1,032	1,7193	9,56540	0,9487	0,6869
HA+ZnS	25,68	0,316	3,4689	28,6387	0,9712	0,6829
	56,68	0,788	1,6239	12,7222	0,9149	0,6488
	28,44	0,479	3,1382	19,0030	0,3837	2,5076
	47,64	0,6	1,9088	16,0752	0,3808	2,4884
ZnS	28,42	0,496	3,1404	18,3509	0,3811	2,5014
	47,68	0,577	1,9073	16,7185	0,3805	2,4812
	56,24	0,345	1,6356	28,99841	0,3827	2,4809

Дифрактограма досліджених зразків приведена на рис.7.3.

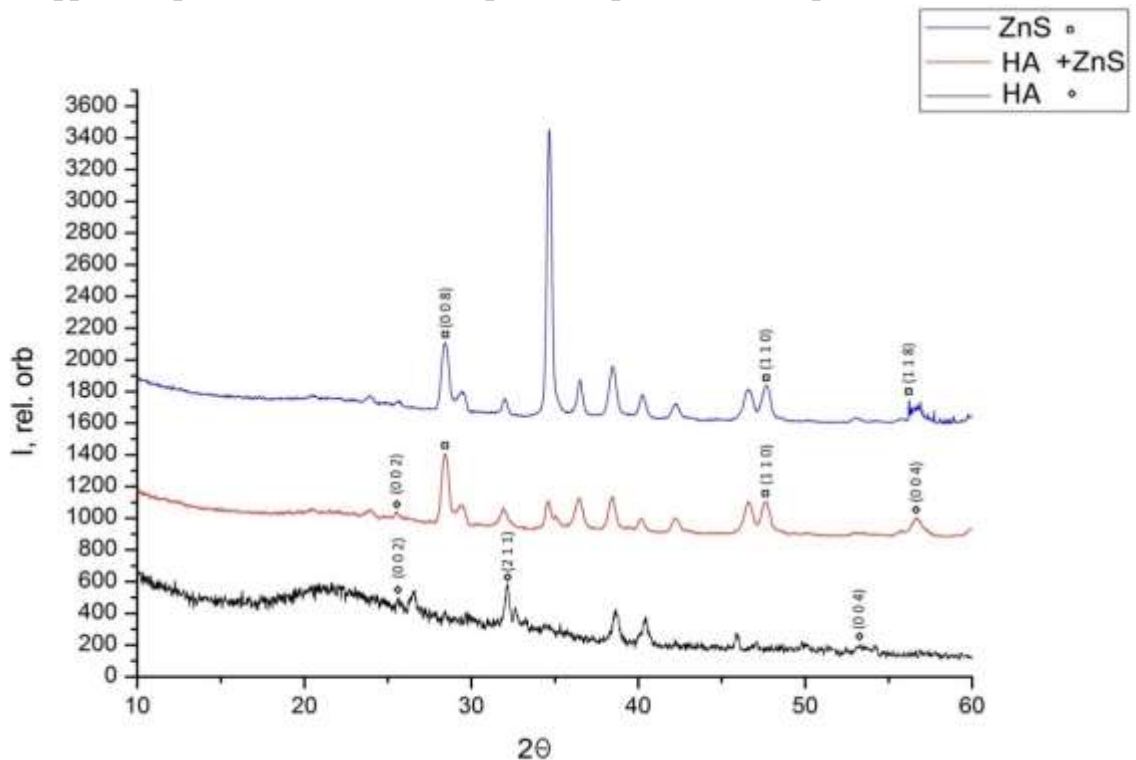


Рисунок 7.3 – Дифрактограми від покриттів:знизу вгору: 1) HA; 2) HA+ZnS; 3) ZnS. Фаза HA позначена ромбом (◇); фаза ZnS-квадратом(□).

*Висновок:*

- було доведено можливість застосування методу термічної депозиції для отримання ZnS покриття на титановому субстраті;
- покриття ZnS може бути нанесене як на титанову поверхню, так і на поверхню, покриту шаром гідроксиapatиту;
- нанесення ZnS шару на НА покриття підвищує адгезію останнього до титанової поверхні.

## 8 ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКТИВНОСТІ НАНОСТРУКТУРОВАНИХ ПОКРИТТІВ В МОДЕЛЬНИХ РЕАКЦІЯХ *IN VITRO*

### 8.1 *In vitro* дослідження протимікробних властивостей покриттів на основі НА та хітозану

На підставі огляду опублікованих наукових досліджень витікає можливість застосування природного нетоксичного, біодеградуючого полісахариду хітозану у якості ефективного протимікробного компоненту для біомедичного використання. Хітозан проявляє протимікробну активність щодо широкого кола грамнегативних та грампозитивних патогенних мікроорганізмів, включаючи гриби. Протимікробні властивості хітозану залежать від ряду факторів. Розглядають декілька механізмів протимікробної дії хітозану [107]. Так, в основі протигрибкової активності хітозану лежить ефект пригнічення процесу утворення та проростання спор [108]. Особливість антибактеріальної активності хітозану щодо грамнегативних та грампозитивних бактерій полягає в відмінностях поверхневих характеристик бактеріальних клітин [109]

В даній роботі був проведений тест на протимікробну активність отриманих апатит-полімерних покриттів на титанових субстратах.

#### *Методика експерименту.*

В експерименті щодо протимікробних властивостей були задіяні титанові пластини з апатит-полімерним покриттям, нанесеним з розчину, який містив хітозан. Перед експериментом пластини стерилізували при температурі 132°C та тиском 1 атм.

Зразки були поділені на 2 наступні групи (по 4 зразки в кожній) :

а) пластини не обробляли лікарським засобом і вони були позначені як контрольні (Контроль);

б) пластини були занурені в 10 мл 0,1% розчину декаметоксину протягом 1 години з метою насичення апатит-полімерного покриття вказаним лікарським засобом.

Було підготовано по дві пробірки для кожної культури мікроорганізму (для контрольного та експериментального зразків), в які наливо по 5 мл, інокульованого відповідними мікроорганізмами. В якості тест-мікроорганізмів були використані штами грампозитивних і грамнегативних бактерій, що належать до різних таксономічних груп: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Протигрибкову дію досліджено на референтному штамі *Candida albicans* ATCC 885-653. Зазначений набір тест-штамів є загальноновизнаним.

При дослідженнях використовували середовище Мюлера-Хінтона виробництва “Государственный научный центр прикладной микробиологии, отделение “Питательные среды” МЗРФ (г. Оболенск Московской обл., РФ)”. Стандартні середовища готували відповідно до вимог виробника. Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин (оптична щільність) проводили за допомогою стандарту каламутності (0,5 од. за шкалою McFarland). Суспензію готували згідно з інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 “Стандартизація приготування мікробних суспензій”, м.Київ .

Для досліджень суспензію мікроорганізмів з концентрацією 0,5 од. за шкалою McFarland додавали до пробірок з рідким поживним середовищем в такій кількості, щоб початкова концентрація мікробних клітин в дослідних пробірках становила  $10^5$  КУО/мл (або  $lg =$  близько 5).

Титанові пластини опускали в пробірки з інокульованим поживним середовищем та залишали в термошафі при 37°C. Облік результатів проводили через 1, 3 та 5 діб.

Визначення чутливості штамів мікроорганізмів до декаметоксину та хітозану, які були складовими покриттів, проводили на твердому поживному середовищі Мюлера-Хінтона (HiMedia, Індія), яке готували відповідно до інструкції виробника. Чутливість грибів визначали на середовищі Сабуро.



Кількість мікроорганізмів визначали за методом Голда, тобто з пробірок з пластинами робили посіви на поживний агар. Для цього пластини з бульйону діставали стерильним пінцетом та прикладали на певний сектор агара в чашках Петрі. З цього сектора робили послідовні розсіви по іншим умовним секторам агару. Чашки залишали в термошафі на 1 добу, потім робили підрахунок колоній, які проросли.

Результати дослідження щодо протимікробних властивостей апатит-полімерних покриттів з вмістом НА, хітозану та декаметоксину приведені в таб.8.1.

Результати дослідження щодо протимікробних властивостей апатит-полімерних покриттів з вмістом НА та хітозану (без декаметоксину) приведені в таб.8.2. Для покращення візуального сприйняття на діаграмі (рис.8.1) ці дані були опосередковані по всіх 4 типах мікроорганізмів) та представлені як **контроль**.

Таблиця 8.1 – Ступінь росту мікроорганізмів після контакту пластини з 0.1% розчином декаметоксину

Час експозиції	Ступінь росту мікроорганізмів, lg КУО/мл, M±m p≤ 0,05			
	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Candida albicans</i> 885/653
1 доба	0	0	0	0
3 доба	0	0	2,6	2
5 доба	1,7	1,9	4,4	3,9

Таблиця 8.2 – Ступінь росту мікроорганізмів в пробірках з пластинами, які не були в контактi з лікарським засобом (контрольні)

Час експозиції	Ступінь росту мікроорганізмів, Іг КУО/мл, М±m				
	<i>S.aureus</i> АТСС 25923	<i>E.coli</i> АТСС 25922	<i>P.aeruginosa</i> АТСС 27853	<i>Candida albicans</i> 885/653	К, середнє значення по всіх мікроорганізмах
1 доба	0,7	0,9	1,4	-	1,0
3 доба	2,6	3,1	3,5	2,8	3,0
5 доба	4,3	4,3	5,1	4,7	4,6

На рис.8.1 представлена діаграма, яка дає можливість порівняти протимікробні властивості апатит-хітозанових покриттів з вмістом лікарського засобу та без нього.

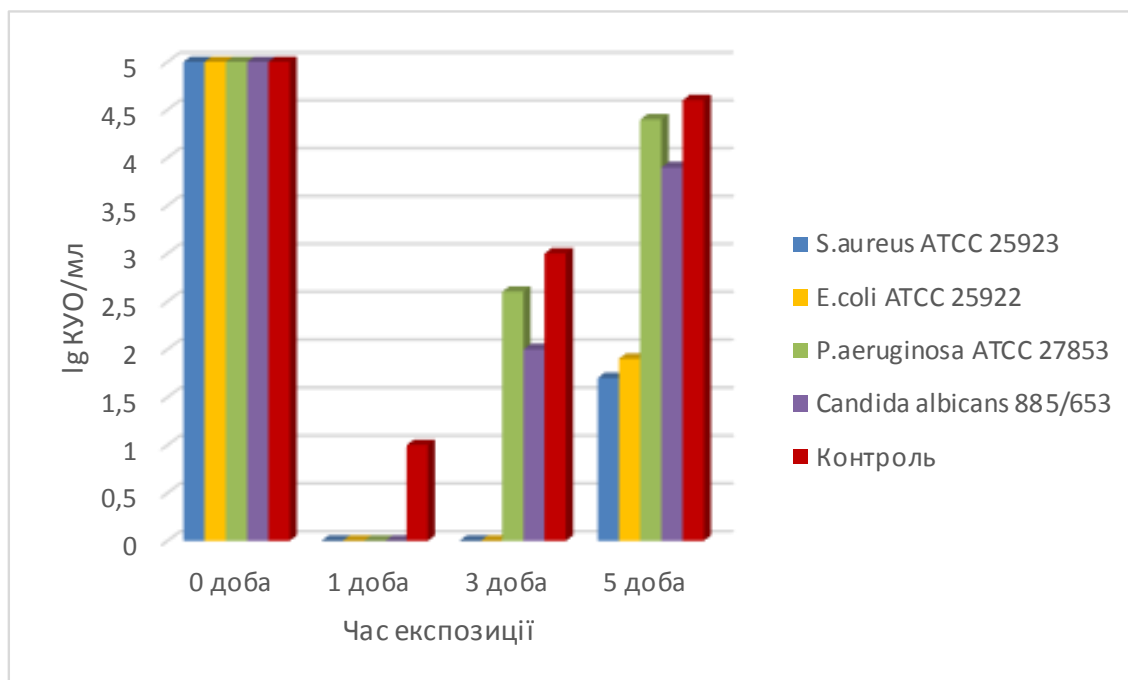


Рисунок 8.1 – Ступінь росту мікроорганізмів після контакту пластини з 0.1% розчином декаметоксину. Контроль-опосередковані дані по пластинах без декаметоксину

Так, на першому етапі (0 доба) всі пластини були занурені в середовище з концентрацією мікробних клітин  $10^5$  КУО/мл і знаходились в однакових умовах. Вже через добу спостерігалася відсутність мікроорганізмів у пробірках з пластинами, які містили декаметоксин та зменшення росту мікроорганізмів у пробірках з пластинами без декаметоксину. Впродовж 3-5 діб спостерігалася збільшення концентрації мікроорганізмів, але ступінь росту відрізнялася. Так, пластини з декаметоксином чинили сильнішу протимікробну дію, ніж пластини, в складі покриття яких був тільки хітозан.

#### *Висновок*

Хітозан проявляє більш слабку протимікробну дію в порівнянні з лікарським засобом- декаметоксином. В той же час незначний ступінь цієї дії, очевидно, пов'язаний з невеликим вмістом полімеру у матеріалі покриттів.

### *8.2 Дослідження взаємодії біоактивних покриттів на основі гідроксиапатиту та альгінату натрію з модельним фізіологічним розчином (PBS)*

*In vitro* дослідження були проведені в модельному фосфатно-буферному розчині PBS (phosphate-buffered saline), який містить: натрій гідрофосфат (10 ммоль/л), натрій хлорид (137 ммоль/л), калій хлорид (2,7 ммоль/л), калій дигідрофосфат (1,8 ммоль/л). Осмотичність та концентрація компонентів відповідає показникам слини людини.

Титанові пластини з нанесеним покриттям НА та НА- Alg були занурені в пробірки з 10 мл розчину PBS та знаходились в шейкері (100 rpm) при температурі 37 °C протягом 72 годин. Контрольна пробірка містила 10 мл PBS без титанової пластини. Вимір значення рН проводили через 2, 5, 24, 48 та 72 години.

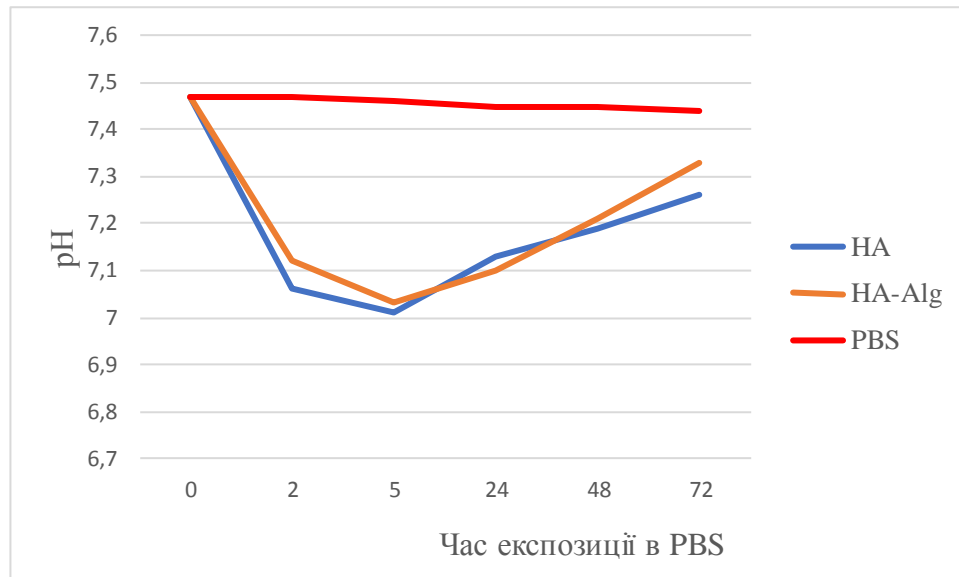


Рисунок 8.2 – Динаміка зміни значення рН PBS розчину в результаті біоактивності титанових пластин з покриттями

*In vitro* дослідження показали, що значення рН контрольного PBS розчину (без експериментального зразку) залишалось практично однаковим протягом всього експерименту. В той же час рН розчинів, в яких знаходились досліджувані зразки з покриттями змінювались протягом експерименту, що свідчило про їх біоактивність, яка залежить від хімічного складу матеріалу покриття, кристалічності, дефектності. Зменшення рН розчинів, які містили пластини з покриттями протягом перших 5 годин було пов'язане очевидно з присутністю долі аморфної кальцій фосфатної фази та її поступовою трансформацією в НА. Підвищення рН між 5 та 72 годинами відбувалося в результаті часткового розчинення поверхні покриття, що свідчить про біоактивність матеріалу. Цей факт узгоджується з механізмом формування нового апатитного шару на біоактивній поверхні- іонообмін між  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{H}^+$  або  $\text{H}_3\text{O}^+$  з розчину. Такий обмін провокує підвищення рН, що сприяє формуванню нових апатитних зародків [110,111].

#### Висновок

Таким чином, покриття з НА та НА+ Alg є біоактивними та такими, що стимулюють утворення нового шару апатиту на поверхні покриття в

модельному фізіологічному розчині. Очевидно, що в реакціях *in vivo* такі покриття будуть сприяти інтеграції імплантату в проблемну зону організму людини та зменшувати ризики відторгнення в післяопераційний період.

### 8.3 Дослідження протимікробних властивостей покриттів на основі ZnS

Метою мікробіологічного тесту було дослідити покриття на основі сульфиду цинку на протимікробну активність щодо грам-позитивних мікроорганізмів - *S.aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538-P, *S. aureus* ATCC 29213. Дослідження було виконано модифікованим методом дифузії в агар. Титанова пластинка з нанесеним ZnS покриттям та осад з робочого розчину після нанесення покриття у вигляді порошку, були опущені в фізіологічний розчин на 5 секунд, після чого поміщені в чашки Петрі на інокульований мікроорганізми агар Мюлера-Хінтона. Ріст бактерій досліджували через 1 добу інкубації зразків при 37 °C (рис. 8.3).



Рисунок 8.3 – Дослідження протимікробної активності ZnS-покриттів та порошку, виконане модифікованим методом дифузії в агар щодо мікроорганізму *S. aureus* ATCC 25923

Таблиця 8.3 – Протимікробна активність ZnS, M±m

Штам мікроорганізму	Зона затримки росту, мм
	ZnS
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	15,0±1,1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	20,0±1,33
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	18,5±1,0

Результати показали, що сполука ZnS як у вигляді покриття, нанесеного на титанову пластину, так і у вигляді порошку проявляють протимікробну активність щодо досліджених штамів *S. aureus*. Через 1 добу інкубації матеріалу зони затримки росту для різних штамів вказаного мікроорганізму складають від 15 до 20 мм.

## ВИСНОВКИ

1. Розроблені методики утворення апатит-біополімерних наноструктурованих композитних матеріалів для медичного використання з різним співвідношенням полімерної (альгінат натрію) та неорганічної (гідроксиапатит) фаз. Рентгенські спектри підтвердили формування кристалітів НА в присутності Alg, розмір яких зменшується із збільшенням кількості альгіанату, введеного в реакційну систему при синтезі. Вивчення морфології синтезованих нанокompозитів показало утворення кристалітів НА голчатої форми з розміром частинок від 50 до 120 нм. Методом ІЧ спектроскопії підтверджено міжмолекулярну взаємодію між НА і Alg. Наявність міжмолекулярної взаємодії між неорганічним мінералом та хімічним ланцюгом альгіанату забезпечує контрольовану нуклеацію та ріст кристалітів неорганічної фази. Зміни рН розчину SBF в присутності досліджуваних зразків свідчить про біоактивність утворених композитних матеріалів. Із збільшенням вмісту полімерної складової пористість композитних матеріалів зменшується, а ступінь набухання збільшується.

2. Розроблено методики синтезу композитних матеріалів на основі НА, модифікованих включенням домішки ZnO, оскільки іони  $Zn^{2+}$  здійснюють прямий специфічний проліферативний ефект на клітини остеобластів, проявляють селективну інгібуючу дію на резорбцію кісткової тканини остеокластами, інгібують життєдіяльність і ріст мікроорганізмів. Результати дослідження свідчать, що параметри кристалічної решітки НА ( $a$  та  $c$ ) у складі синтезованих композитних матеріалів відрізняються від параметрів чистого НА, що є наслідком часткового заміщення іонів  $Ca^{2+}$  іонами  $Zn^{2+}$ , які мають менший іонний радіус (0,074 нм) в порівнянні з кальцієм (0,104 нм) [112, 113].

3. Було зроблено порівняння механічних властивостей композитних матеріалів на основі НА з додаванням полімерів (альгінат, желатина) та ZnO. Було з'ясовано, що вміст полімеру в композитних матеріалах позитивно

впливає на покращення механічних властивостей. Всі зразки з вмістом полімеру мають вищі значення межі міцності в порівнянні зі зразками без полімерної складової. Найвищу межу міцності 1,92 МПа та 1,93 МПа мають зразки, які містять полімери та висушені при температурі близько 25°C або в мікрохвильовій печі при 100 W. При додаванні до складу композиту желатини межа міцності і модуль пружності збільшуються пропорційно збільшенню вказаного полімеру. В той же час у зразках з вмістом альгінату прямої залежності не спостерігалось. Застосування обох полімерів у композитних матеріалах збільшує їх еластичність, причому еластичність зразків з желатиною є вищою. Зразки з додаванням альгінату мають значно вищу межу міцності. Таким чином, композити HA/Alg рекомендовано застосовувати переважно як матеріал для заповнення кісткових дефектів, а HA/желатина в якості покриттів, що механічно наносяться на поверхню імплантатів. Композити, приготовані шляхом механічного змішування з ZnO, мають кращі механічні властивості, в порівнянні із матеріалами, в яких цинку оксид утворювався в процесі синтезу синхронно з утворенням HA.

4. Було розроблено методику утворення біоматеріалу для доставки в зону кісткового дефекту методом ін'єкцій у формі гідрогелю на основі HA і CS з додаванням Alg, який має у своєму складі низько- кристалічний HA (JCPDS 9 432) з середнім розміром голчатих кристалітів 25 нм [114]. Для запобігання вимивання матеріалу потоком крові було підвищено його структурну цілісність та в'язкість шляхом введення порошку альгінату до складу HA/CS/Alg гідрогелю. Методом ІЧ спектроскопії було доведено, що в результаті поліелектролітної реакції між функціональними групами альгінату та хітозану відбувається «зшивання» макромолекул полімерів, що сприяє формуванню більш стабільної структури гідрогелю HA/CS/Alg порівняно з HA/CS. Дослідження структурної цілісності та деградації матеріалів показали, що здатність HA/CS гідрогелю підтримувати форму дефекту при імплантації в кісткову тканину підсилюється при додаванні альгінату, але



вміст останнього більший, ніж 1мас.% зменшує пластичність матеріалу, збільшує набухання і прискорює деградацію.

5. Було розроблено методику створення композитного матеріалу біомедичного призначення на основі фосфорельованого хітозану у формі порошку та гранул [115]. Для підсилення протимікробної дії матеріал був додатково модифікований іонами  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  або комерційними лікарськими засобами – «Аквадетрим вітамін Д» та декаметоксин. Перевагами даного матеріалу є наступні фактори: молекули природного катіоніту хітозану, будучи хімічно «зшитими» триполіфосфатом натрію, утворюють гранульованої (кулькоподібної) форми матеріал; форма матеріалу забезпечує заповнення дефектів складної геометрії з мінімальним зазором між кісткою та імплантатом, а простір між гранулами сприяє формуванню нових кісткових тканин по всьому об'єму імплантата, на поверхневій мембрані якого присутні фосфатні групи, здатні в умовах організму іммобілізувати сигнальні біомолекули, такі, наприклад, як фактори росту; присутність легованих іонами металів наночастинок хітозану надає матеріалу протимікробних властивостей; технологія виготовлення дозволяє отримати готовий до використання матеріал з контрольованою нейтральною кислотністю, без застосування допоміжних хімічних речовин; матеріал не спричинює побічних ефектів, є зручним при стерилізації та використанні, має тривалий термін зберігання. Дослідження *in vivo* щодо морфологічних особливостей регенерації кістки після імплантації отриманого біоматеріалу в її дефект показали, що по периметру імплантату формується кісткова тканина, яка проникає у вигляді виступів в матеріал та забезпечує щільний контакт біоматеріалу з кістковою тканиною. Досліджений матеріал володіє остеointегративними властивостями, є біосумісним з кістковою тканиною та кістковим мозком [116].

6. Було досліджено вплив ультразвуку та надвисоких частот на формування гідроксиапатиту, як компоненти композитних біоматеріалів [117]. Результати ІЧ та XRD дослідження засвідчили формування кальцій

дефіцитного (НА) та карбонат апатиту типу В (сНА). В усіх випадках застосування УЗ розмір кристалітів зменшився в порівнянні з контрольними (без УЗ дії). Зразки НА, отримані при низьких (до 40°C) температурах, а також всі сНА зразки продемонстрували зменшення параметру  $a$  кристалічної ґратки. Доля додаткових фаз після прожарювання до 900°C, а також співвідношення Ca/P зростали пропорційно збільшенню потужності НВЧ, що є додатковим доказом утворення нестехіометричного гідроксиapatиту з карбонатною складовою. Таким чином, застосування УЗ та НВЧ випромінювання дозволяє в короткий строк отримати кальцій дефіцитний НА та карбонат апатит типу В, які за своїм складом та структурою є наближеними до біологічного НА. Було досліджено вплив магнітного поля на структурні особливості кальцій фосфатів [118]

7. Було розроблено технологію синтезу апатит-полімерного матеріалу у формі гелю для стоматологічного застосування. До складу гелю входить мінеральна складова у вигляді дрібнодисперсного НА та органічна складова у вигляді альгінату натрію та акриламідю. Створений матеріал потребує додаткових випробувань *in vivo*.

8. Розроблено методики утворення наночастинок магнетиту ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), в тому числі у присутності полімерів- альгінату, хітозану, желатини, колагену. Досліджено їх структуру та показано, що включення полімерів природного походження до складу композитів на основі магнетиту впливає на середній розмір наночастинок та попереджує їх агломерацію. Зокрема, застосування альгінату та хітозану в процесі синтезу сприяє зменшенню розміру наночастинок в порівнянні з магнетитом, синтезованим без додавання полімерів. В той же час присутність в реакційному середовищі желатини та колагену, які мають подібну хімічну структуру, призводить до збільшення середнього розміру наночастинок майже втричі.

9. Розроблено методику утворення композитів ZnS-ZnO та ZnS-ZnO-Alg з метою внесення їх до складу біоматеріалів для заповнення кісткових дефектів, оскільки мікроелемент Zn є компонентом нативної кістки

та сприяє щільності кісткової тканини, попереджує втрату кісткової маси. За даними XRD в обох зразках доведено присутність фази ZnO та ZnS та визначено їх структуру: ZnS має кубічну кристалічну структуру типу сфалерит (JCPDS 5-566) з середніми розмірами кристалітів 23 нм, а ZnO – гексагональну структуру (JCPDS 80-75) з середнім розміром близько 35 нм. Встановлено, що введення до реакційної суміші в процесі синтезу натрію альгінату сприяє зменшенню розміру кристалітів ZnS та ZnO до 10 нм та 12 нм відповідно. У зразках ZnS- ZnO-Alg, синтезованих з додаванням альгінату натрію, вміст фази ZnS в порівнянні з фазою ZnO збільшився на 25%, що підтверджено даними RFA.

10. Досліджено протимікробні властивості ZnS-ZnO та ZnS-ZnO-Alg, як компонентів композитних біоматеріалів. Виявлено біоцидну дію композитів по відношенню до тест-штамів мікроорганізмів *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. Розраховані за векторною теорією значення інтегральних показників досліджуваних зразків ZnS-ZnO та ZnS-ZnO-Alg (1,57 і 1,9 відповідно) дозволяють охарактеризувати обидва типи зразків як протимікробні сполуки середньої активності [119].

11. За допомогою методу вакуумно-дугового випаровування катодів MoN/CrN були отримані багатошарові покриття товщиною від 1,2 мкм до 40 нм. Дослідженнями доведено високий рівень фізико-механічних властивостей. Методом магнетронного розпилення була отримана інша серія зразків, з багатоелементними покриттями нанометрової товщини з TiN/SiC. Розраховані параметри структури для цих систем доводять їх перспективи як попереднього з підвищеними механічними властивостями шару для подальшого осадження на них покриття з гідроксилапатиту. Дані комплексні покриття планується використовувати для біомедичних цілей.

12. Розроблено методи модифікації поверхні модельного титанового імплантату шляхом анодного формування оксидної плівки з метою покращення протикорозійної стійкості та адсорбційних властивостей

поверхні. Утворена структура сприяє формуванню та покращенню адгезії НА на субстраті, трансформації аморфного НА до кристалічного стану.

13. На модифікованій і наноструктурованій поверхні модельного титанового імплантату методом термічної депозиції було отримано багат шарові покриття, що складаються з біоінертного внутрішнього шару пористого титану та біоактивного зовнішнього шару на основі НА та біомолекул хітозану і альгінату.

14. Завдяки модифікації органічною складовою (хітозан, альгінат), отримані кальцій фосфатні, в т.ч. гідроксиапатитні покриття на металевих імплантатах мають пористу високорозвинену поверхню, ступінь їх адгезії до субстрату збільшився в 2-4 рази в порівнянні з покриттями без органічної складової.

15. Доведено, що попереднє модифікування поверхні титанових субстратів дозволяють одержати покриття відповідної морфології та фазового складу, а додавання розчину альгінату до складу вихідного розчину (до 0,02 %) сприяє зростанню адгезії отриманих покриттів до поверхні субстрату.

16. Розроблена технологія нанесення біоактивного покриття з вмістом цинку сульфіді на титанові субстрати. Було доведено можливість застосування методу термічної депозиції для отримання ZnS покриття на титановому субстраті; показано, що покриття ZnS може було нанесене як на титанову поверхню, так і на поверхню, покриту шаром гідроксиапатиту; нанесення ZnS шару на НА покриття підвищує адгезію останнього до титанової поверхні. Доведено, що покриття на основі ZnS мають протимікробні властивості.

17. Досліджено протимікробну активність НА покриттів з вмістом хітозану та лікарського засобу – декаметоксину. Результати показали, що хітозан проявляє більш слабку протимікробну дію в порівнянні з декаметоксином. В той же час незначний ступінь цієї дії, очевидно, пов'язаний з невеликим вмістом полімеру у матеріалі покриттів.

18. Доведено, що покриття з НА та НА+альгінат є біоактивними та такими, що стимулюють утворення нового шару апатиту на поверхні покриття в модельному фізіологічному розчині. Біомолекули у складі покриттів є потенціальним носієм лікарських засобів, білків, остеоутворюючих клітин. Очевидно, що в реакціях *in vivo* такі покриття будуть сприяти інтеграції імплантату в проблемну зону організму людини та зменшувати ризики відторгнення в післяопераційний період.

**ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ**

1. Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strain from diffraction line broadening / S.N. Danilchenko, O.G. Kukharenko, C. Moseke [et al.] // Cryst. Res. Technol. –2002. – Vol. 37. – № 11. P. 1234–1240.
2. Chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite-poly(ethylene co vinyl alcohol) (EVA) nanocomposite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications / N. Pramani, S. Mohapatra, P. Bhargava [et al.] // Mater . Sci. Eng. C. – 2009. – Vol. 29. – P. 228–236.
3. Бактеріологічний контроль поживних середовищ: інформаційний лист МОЗ України. // Київ. – 2000. – № 05.4.1/1670.
4. Стандартизація приготування мікробних суспензій: інформаційний лист МОЗ України. // Київ. – 2006. № 163.
5. Методи розрахунку інтегральних показників протимікробної активності антибактеріальних лікарських засобів. Методичні рекомендації МОЗ України // Київ 2015. – № 79.15/02.16.
6. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W / T. Kokubo, H. Kushitani, S .Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro // J.Biomed. Mater. Res. – 1990. – Vol. 24 – P. 721-734.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. –P. 52
8. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перова // М.: Медицина, 1996. – С. 542.
9. Materials in particulate form for tissue engineering. Applications in bone / S G.A. Silva, O.P. Coutinho, P. Ducheyene, R.L. Reis. // J. Tissue Eng. Regen. Med.– 2007. – Vol. 1. – №2. – P. 97-109.
10. Murugan R. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite / R. Murugan, S. Ramakrishna // Biomaterials. – 2004. – Vol. 25. – P. 3829–3835.

11. Currey J. Biomaterials: sacrificial bonds heal bone / J. Currey // *Nature*. – 2001. – P. 414-699.
12. Ogiso M. Reassessment of long-term use of dense HA as dental implant: case report / M. Ogiso // *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* – 1998. – Vol. 43. – P. 318–320.
13. Biomimetically synthesized polymer-hydroxyapatite sheet like nanocomposite / S. Nayar, A.K. Pramanick, B.K. Sharma, G. Das, B. Ravi Kumar, A. Sinha // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2008. – Vol.19 – P. 301–304.
14. Omelon S.J. Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization / S.J. Omelon, M.D. Grynblas // *Chem Rev.* – 2008. – Vol. 108. – P. 4694-4715.
15. Hydroxyapatite bioactive glass films produced by a sol-gel method: in vitro behavior / N.C. Koseoglu, A. Buyukaksoy, A.Y. Oral, M.H. Aslan // *Adv. Eng. Mater.* – 2009. – Vol. 11. – P. 194–199.
16. Liu H. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools / H. Liu, T.J. Webster // *Biomaterials*. 2007. – Vol. 28. – P.354-369.
17. Wan Ngah W.S. Adsorption of Cu(II) ions in aqueous solution using chitosan beads, chitosan–GLA beads and chitosan–alginate beads / W.S. Wan Ngah, S. Fatinathan // *Chem. Eng. J.* – 2008. – Vol. 143. – P. 62–72.
18. Drug release profile from calcium-induced alginate–phosphate composite gel beads / Y. Murata, Y. Kodama, T. Isobe, K. Kofuji, S. Kawashima // *Int. J. Polym. Sci.* – 2009. – P. 1–4.
19. El-Sherbiny I.M. Enhanced pH-responsive carrier system based on alginate and chemically modified carboxymethyl chitosan for oral delivery of protein drugs: preparation and in-vitro assessment / I.M. El-Sherbiny // *Carbohydr. Polym.* – 2010. – Vol. 80. – P.1125–1136.
20. El-Sherbiny I.M. Preparation and in vitro evaluation of new pH-sensitive hydrogel beads for oral delivery of protein drugs / I.M. El-Sherbiny, E.M. Abdel-Bary, D.R.K. Harding // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2010. – Vol. 115 – P. 2828–2837.

21. Han Y. The calcium silicate/alginate composite: Preparation and evaluation of its behavior as bioactive injectable hydrogels / Y. Han, Q. Zeng, H. Li, J. Chang // *Acta Biomater.* – 2013. – Vol. 9 – P. 9107–9117.

22. Muzzarelli R.A.A. Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration / R.A.A. Muzzarelli // *Carbohydr. Polym.* – 2011. – Vol. 83. – P.1433–1445.

23. Sukhodub L.F. Chitosan-apatite composites: synthesis and properties /L.F. Sukhodub, L.B. Sukhodub, I.M. Chorna // *Biopolymers and Cell.* – 2016. – Vol. 32. – N2.

24. Hydroxyapatite-alginate biocomposite promotes bone mineralization in different length scales in vivo. F.L. De Paula, I.C. Barreto, M.H. Rocha-Leao, R. Borojevic, A.M. Rossi, F.P. Rosa, et al. // *Front. Mater. Sci.* 2009. – Vol. 3. – P. 145–153.

25. Synthesis and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/collagen/alginate composite / S.M. Zhang, F.Z. Cui, S.S. Liao, Y. Zhu, L. Han // *J. Mater. Sci. Mater. – Med.* – 2003. – Vol. 14. – P. 641–645.

26. Кузнецов В.М. Структурні та субструктурні особливості апатит-біополімерних композитів: порівняння даних рентгенівської дифракції та просвічуючої електронної мікроскопії з електронною дифракцією / В.М. Кузнецов, Л.Б. Суходуб, Л.Ф.Суходуб // *Журнал нано- та електронної фізики.* – 2014. – Т.6. №4. – С. 04039-1-04039-6.

27. Mineralization of Chitosan scaffolds with nano-apatite by double diffusion technigue / I. Manjubala, S. Sheler, J. Bossert, K.D. Jandt // *Acta biomater.* – 2006. – Vol. 2. – P. 75-84.

28. Hu R. A novel ordered nano hydroxyapatite coating electrochemically deposited on titanium substrate / R. Hu, C.J. Lin, H.Y.Shi // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2007. – Vol. 80 – P. 687–692.

29. Choi D. An alternative chemical route for the synthesis and thermal stability of chemically enriched hydroxyapatite / D. Choi, P.N. Kumta // *J. Am. Ceram. Soc.* – 2006. – Vol. 89. – P. 444–449.



30. Haque S. Synthesis and characterization of grafted nanohydroxyapatites using functionalized surface agents/ S. Haque, I. Rehman, J.A. Darr // *Langmuir*. – 2007. – Vol. 23. – P. 6671–6676.

31. Wang L. In situ processing and properties of nanostructured hydroxyapatite/alginate composite / L. Wang, Y. Li, C. Li // *J. Nanopart. Res.* – 2009. – Vol. 11. P. 691–699.

32. Malkaj P. The crystallization of hydroxyapatite in the presence of sodium alginate / P. Malkaj, E. Pierri, E. Dalas // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2005. – Vol. 16. – P. 733–737.

33. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation / A. Farzadi, M. Solati-Hashjin, F. Bakhshi, A. Aminian // *Ceram. Int.* – 2011. – Vol. 37. – P. 65-71.

34. Moonga B.S. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone-resorption invitro / B.S. Moonga, D.W. Dempster // *J. Bone. Mineral. Res.* – 1995. – Vol. 10. – P. 53-57.

35. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold / J.F. Hernandez-Sierra, F. Ruiz, D.C.C. Pena, F. Martinez-Gutierrez, A.E. Martinez et al. // *Nanomed-Nanotechnol.* – 2008. – Vol.10. – P. 237-240.

36. Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation / A. Ito, Otsuka M, et al // *Curr. Appl. Phys.* – 2005. – Vol. 5. – P. 4026.

37. Legeros R.Z. Calcium phosphate-based materials containing Zinc, Magnesium, Fluoride and carbonate. US Patent 7, 419,680. 2.09.2008.

38. Gross A. Efficient zinc incorporation in hydroxyapatite through crystallization of an amorphous phase could extend the properties of zinc apatites/ A. Gross, L. Komarowska, A. Viksna // *J. Aust. Ceram. Soc.* – 2013. – Vol. 49. № 2. – P. 129 – 135.

39. Slow crack growth behaviour of hydroxyapatite ceramics / C. Benaqqa, J. Chevalier, M. Saadaoui, G. Fantozzi // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – P. 6106–6112.

40. One-pot facile synthesis of silica reinforced double network hydrogels based on triple interactions / X. Xu, S. Lü, C. Gao, X. Wang, X. Bai, N. Gao, M. Liu // *Chem. Eng. J.* – 2014. – Vol. 240. – P. 331–337.

41. Hunt N. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine / N. Hunt, L. Grover // *Biotechnol. Lett.* – 2010. – Vol. 32. – P. 733–742.

42. Balakrishnan B., Jayakrishnan A. Self-crosslinking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds / B. Balakrishnan, A. Jayakrishnan // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26 – P. 3941–3951.

43. Drury J.L., Mooney D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications / J.L. Drury, D.J. Mooney // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P. 4337–4351.

44. Chemical hydrogels based on a hyaluronic acid-graft-a-elastin derivative as potential scaffolds for tissue engineering / F.S. Palumbo, G. Pitarresi, C. Fiorica, S. Rigogliuso, G. Gherzi, // *Mater. Sci. Eng. – C*. 2013. – Vol. 33. № 5. – P. 2541–2549.

45. Biodegradable nanocomposite hydrogel structures with enhanced mechanical properties prepared by photo-crosslinking solutions of poly(trimethylene carbonate)–poly(ethylene glycol)–poly(trimethylene carbonate) macromonomers and nanoclay particles / S. Sharifi, S.B.G. Blanquer, T.G. van Kooten, D.W. Grijpma // *Acta Biomater.* – 2012. – Vol. 8. – P. 4233–4243.

46. Ultra-strong thermoresponsive double network hydrogels / R. Fei, J.T. George, J. Park, A.K. Means, M.A. Grunlan // *Soft. Matter*. – 2013. – Vol. 9. – P. 2912–2919.

47. One-pot facile synthesis of silica reinforced double network hydrogels based on triple interactions / X. Xu, S. Lü, C. Gao, V. Wang, X. Bai, N. Gao // *Chem. Eng. J.* – 2014. – Vol. 240. – P. 331–337.

48. Synthesis and characterization of positively charged interpenetrating double-network hydrogel matrices for biomedical applications / M. Jaiswal, S. Lale, N.G. Ramesh, V. Koul // *React. Funct. Polym.* – 2013. – Vol. 73. – P. 1493–1499.

49. Thermal transformations of the mineral component of composite biomaterials based on chitosan and apatite / S.N. Danilchenko, O.V. Kalinkevich, V.N. Kuznetsov [et al.] // *Cryst. Res. Technol.* – 2010. – Vol. 45. № 7. – P. 685–691.

50. Mineralization of Chitosan scaffolds with nano-apatite by double diffusion technique / I. Manjubala, S. Sheler, J Bossert, K.D. Jandt // *Acta biomater.* – 2006. – Vol. 2. – P. 75-84.

51. Rehman I. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR/ I. Rehman, W.Bonfield, // *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* – 1997. – Vol. 8. – P. 1–4.

52. Nayar S. Systematic evolution of a porous hydroxyapatite/poly (vinyl alcohol)-gelatin composite colloids and surfaces /S. Nayar, A. Sinha// *Biointerfaces.* – 2004. – Vol. 35. – P. 29–32.

53. Kumar M.V. Chitosan–Sodium Alginate Nanocomposites Blended With Cloisite 30b As A Novel Drug Delivery System For Anticancer drug curcumin / M.V. Kumar, D. Sahoo, P.L. Nayak . // *Int. J. Appl. Biol. Pharmac. Technol.* – 2011. – Vol 2. №3. – P. 402-411.

54. Gradient Structural Bone-Like Apatite Induced by Chitosan Hydrogel via Ion Assembly / L. Baoqiang, W. Yongliang, J.Dechang Z.Yu// *Journal of Biomaterials Science* – 2011. – Vol. 22. – P. 505–517.

55. Amaral I.F. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study/ I.F. Amaral, P.L. Granja, M.A. Barbosa // *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.* – 2005. – Vol. 16(12). – P. 1575–1593.

56. Kalasanathan C. Structure and properties of titania reinforced nano-hydroxyapatite/gelatin bio-composite for bone graft materials / C. Kalasanathan, N. Selvacumar, V. Naidu // *Ceram. Int.* – 2012. Vol.38. – P. 571-579.

57. Anti-washout carboxymethyl chitosan modified tricalcium silicate bone cement: Preparation, mechanical properties and in vitro bioactivity /Q. Lin Q, X.Lan, Y. Li, Y. Yu, Y. Ni, C. Lu // *J. Mater. Sci-Mater.* – M., 2010. – Vol.(12) – P. 3065–3076.

58. J A novel injectable chitosan/polyglutamate polyelectrolyte complex hydrogel with hydroxyapatite for soft-tissue augmentation / T.F. Kuo, H.D. Wu, J.C Yang, S.Y. Lee // *Carbohydr. Polym.* – 2012. – Vol. 89 – P. 1123–1130.

59. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional // *Biomaterials.* / F. Zhao, Y.I Yin, W.W. Lu, J.C.Leong, W.J. Zhang, I.Y. Zhang, /2002. – Vol.23. – P.3227.

60. Inorganic polyphosphate adsorbed onto hydroxyapatite for guided boneregeneration: An animal study / K. Doi, T. Kubo, R. Takeshita, S. Kajihara, S. Kato, Y. Kawazoe, T. Shiba // *Dent. Mater. J.* – 2014. – Vol. 33(2) – P.179–186.

61. Amaral I.F., Granja P.L., Barbosa M.A. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study / I.F. Amaral, P.L Granja, M.A. Barbosa // *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* – 2005. Vol. 16( 12) – P. 1575–1593.

62. Effect of ionic crosslinking on the drug release properties of chitosan diacetate matrices / K.M. Aiedeh, M.O. Taha, Y. Al-Hiari, Y. Bustanji, H.S. Alkhatib // *J. Pharm. Sci.* – 2007. – Vol. 96. (1). – P.38–43.

63. Суходуб Л.Б. Протимікробна активність наночастинок хітозану, легованих  $Ag^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  іонами /Л.Б. Суходуб // *Annals of Mechnikov Institute.* – 2015. – N. 1. – P. 39-43. – Режим доступу: [www.imiamn.org.ua/journal.htm](http://www.imiamn.org.ua/journal.htm).

64. Singla A.K. Chitosan: Some pharmaceutical and biological aspects an update / A.K. Singla // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2001. – Vol.53. – P.1047–1067.

65. Effect of dilute gelatine on the ultrasonic thermally assisted synthesis of nano hydroxyapatite / K. Brundavanam , Z.T. Jiang, P. Chapman, X.T. Le, N. Mondinos, D. Fawcett, G.E.J. Poinern // *Ultrason. Sonochem.* –Vol. 18. – 2011. – P. – 697–703.

66. Palanivelu R. Nanocrystalline Hydroxyapatite prepared under various pH conditions / R. Palanivelu, A.M. Saral, A.R. Kumar // *Spectrochim. Acta. A.* – 2014. – Vol. 131. –P. 37–41.

67. Lobo A.O. Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites / A.O Lobo,H. Zanin, I.A. Siqueira, N.C. Leite, F.R. Marciano, E.J. Corat // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2013. – Vol. 33.– P. 4305–4312.

68. Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method / G.E Poinern, R.C. Brundavanam, N. Mondinos, Z.T. Jiang // *Ultrason. Sonochem.* – 2009. – Vol. 16. – P. 469–474.

69. The effect of ultrasonic irradiation on the crystallinity of nano-hydroxyapatite produced via the wet chemical method / M.C. Barbosa, N.R. Messmer, T.R. Brazil, F.R.Marciano, A.O. Lobo // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2013 – Vol. 33 – P. 2620–2625.

70. Pomacea sp shell to hydroxyapatite using the ultrasound-microwave method (U-M)/ J.N. Putro, N. Handoyo, V. Kristiani, S.A Soenjaya, O.L. Ki [et al] // *Ceram. Int.* – 2014.- Vol. 40. – P. 11453–11456.

71. Ultrafast synthesis and characterization of carbonated hydroxyapatite nanopowders via sonochemistry-assisted microwave process / H. Zhaoyong, L. Kaili, C. Lei, C. Jiang // *Ultrason. Sonochem.* 2012 – Vol. 19. – P. 1174–1179.

72. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation / A. Farzadi, M. Solati-Hashjin, F. Bakhshi, A. Aminian // *Ceram. Int.* – 2011 – Vol. 37. – P. 65–71

73. Manjubala I. In-situ synthesis of biphasic calcium phosphate ceramics using microwave irradiation / I. Manjubala, M. Sivakumar // *Mater. Chem. Phys.* – 2001 – Vol. 71 – P. 272–278.

74. Kalita J. Nanocrystalline hydroxyapatite bioceramic using microwave radiation: Synthesis and characterization / J. Kalita, S. Verma // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2010 – Vol. 30 – P. 295–303.

75. Sajahan N.A. Microwave Irradiation of Nanohydroxyapatite from Chicken Eggshells and Duck Eggshells / N.A. Sajahan, W.M. Wan Ibrahim // *The Scientific World Journal*. – 2014. – P. 1–7.

76. Defluoridation behavior of nanostructured hydroxyapatite synthesized through an ultrasonic and microwave combined technique /G.E. Poinern, M.K. Ghosh, Y.J. Ng, T.B. Issa[et al]// *J. Hazard. Mater.* – 2011. – Vol. 185. – P. 29–37.

77. Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes / M.N. Hassan, M.M. Mahmoud, A.A. El-Fattah, S. Kandil // *Ceram. Int.* – 2015. – Vol. 42. – P. 3725–3744.

78. Kumar T.S.S. Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave irradiation / T.S.S. Kumar, I. Manjubala, J. Gunasekaran// *Biomaterials*. – 2000 – Vol. 21. – P. 1623–1629.

79. Neuman F.W. The surface chemistry of bone. Carbonate: Phosphate exchange /F.W. Neuman, T.Y. Toribara, B.Y. Mulryan // *Journal of the American Chemical Society*. – 1956. – Vol. 78. – P. 4263–4266.

80. Elliot J.C. Structure and chemistry of the apatites and other Calcium orthophosphates/J.C. Elliot//Amsterdam-London-NewYork-Tokyo. – 1994, P. 389.

81. LeGeros R.Z. Trautz OT, LeGeros JP, Carbonate substitution in the apatite structure / R.Z. LeGeros, O.T. Trautz, J.P. LeGeros// *B. Soc. Chim. Fr.* – 1968. – P. 1712–1718.

82. Brik A.B. Magnetic biominerals localized in brain tissue: anomalous properties, possible functional role and synthetic analogues/ A.B. Brik // *Ukr. J. Phys. Opt.* – 2010. – Vol. 11. – P. 46-61.

83. Ito M. Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation / M.Ito, T. Otsuka // *Curr Appl phys.* – 2005. – V.5. – P. 402-6.

84. Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering/A.Tripathi, S.Saravanan, S.Pattnaic [et al]//*International Journal of Biological Macromolecules*. – 2012. – V. 50. – P.294-299.

85. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles prepared via non-hydrolytic solution route / R. Wahab, A. Mishra, S. Yun [et al] // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2010. – V.87. – P. 1917–1925.

86. Babko A. Quantitative analysis. /A. Babko, I. Pyatnytsky// Ed. "Higher School". –Moskow. – 1962.

87. Ling Chuo A. Antibacterial responses of zinc oxide structures against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes*/ A. Ling Chuo // *Ceram. Int.* – 2014. – Vol. 40. – P. 2993–3001.

88. Sinha R. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells / R. Sinha// *Bioresource Technol.* – 2011. Vol. 102 (2). – P. 1516–1520.

89. Interaction of ZnO nanoparticles with microbes - A physio and biochemical assay / N. Padmavathy, N.Vijayaraghavan// *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2011. – Vol. 7.(6) – P. 813-822.

90. Research of the relief and element Composition of the Surface Coatings Based on Hydroxyapatite Implants from Titanium Alloys /A.D. Pogrebnyak A.S. Krivets, K.A. Djadyura [et al] // *Proceedings of the International Conference: Nanomaterials: Applications and Properties. NAP-2016.* – V.5.No2. – 02NABM06 (6pp).

91. Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite on Titanium after Anodic Oxidation / A. Strzała, W. Simka, M. Marszałek // *Acta Physica Polonica A.* – 2012. – Vol. 121 – P.561-565.

92. Elliot J.C. Structure and chemistry of the apatites and other Calcium orthophosphates /J.C. Elliot // *Amsterdam-London-NewYork-Tokyo*, 1994. –389 p.

93. Cheng W.P. Using Chitosan as a Coagulant in Recovery of Organic Matters from the Mash and Lauter Wastewater of Brewery / W. P. Cheng, F. H. Chi, R. F. Yu, Y. C. Lee // *Journal of polymers and the Environment.* – 2005. – V. 13, № 4. – P. 383 – 388.

94. Wong T. W. Chitosan and its Use in Design of Insulin Delivery System / T. W. Wong // *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. – 2009. – V. 3. – P. 8 – 25.
95. Kim S.K. Bioactive compounds from marine processing byproducts-A review/ Kim S.K., E. Mendis // *Food Res. Int.* – 2006. –V. 39. – P. 383–393.
96. Z. Modrzejewska Determination of Hydrogel Chitosan Membrane Structure /Z. Modrzejewska, W. Maniukiewicz, A. Wojtasz-Pająk// *Polish Chitin Society, Monograph XI*. – 2006. – P.113-121.
97. Nejati Hafdani F. A Review on Application of Chitosan as a Natural Antimicrobial / F. Nejati Hafdani, N. Sadeghinia // *World Academy of Science, Engineering and Technology*. – V.74. – 2011. – P. 257-261.
98. Moseke C. Chemical characterization of hydroxyapatite obtained by wet chemistry in the presence of V,Co,and Cu ions/ C. Moseke, M. Gelinsky, J. Groll, U. Gbureck// *Materials Science and Engineering C*. – 2013. – P.1654-1661.
99. Суходуб Л.Б. Наночастинки хітозану, модифіковані іонами металів / Л.Б. Суходуб // *Journal of Nano- and Electronic Physics*. – 2014. – V.6 No.4, 04034(6pp).
100. Mestres G. Silicon-Stabilized  $\alpha$ -tricalcium phosphate and its use in a calcium phosphate cement: Characterization and cell response / G. Mestres, C. Le Van, M.-P. Ginebra // *Acta Biomaterialia*. – 2012. – V. 8. – P. 1169–1179
101. Imran M. Synthesis, Characterization and Biological Studies of 2-(4-Nitrophenylaminocarbonyl)benzoic acid and its Complexes with Cr(III),Co(II), Ni(II), and Zn(II) / M. Imran, S. Nazir, S. Latif, Z. Mahmood // *J.Chem.Soc.Pak*. – 2010. – V.4. – P.492-495
102. Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation / A. Ito, M. Otsuka [et al] // *Curr Appl phys*. – 2005. – V.5. – P. 402-6.
103. Legeros R.Z. Calcium phosphate-based materials containing Zinc, Magnesium, Fluoride and carbonate / R.Z. Legeros // *US Patent*. – 2008. – V7.419. – 680p.



104. Novel biodegradable nanocomposite based on XG-g-PAM/SiO application of an efficient adsorbent for Pb<sup>2+</sup> ions from aqueous solution/S. Ghorai, A. Sinhamahpatra [et al]//Bioresource technology.-V 119. – P.181-190.

105. Banerjee S.S.Fast removal of copper ions by gum arabic modified magnetic nano-adsorbent /S.S. Banerjee, D.H. Chen // J Hazard Mater. – 2007. – V.147(3). – P. 792-799.

106. Selected powder diffraction data for educations training / Published by the International Centre for diffraction data. – 1997. – 432p.

107. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review / M. Kong, X. Guang Chen, K. Xing, H.J. Park // International Journal of Food Microbiology. – 2010. – V. 144. – P.51-63.

108. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* /A. N. Hernandez- Lauzardo, S. Bautista-Banos, M. G.Velazquez-del Valle [et al]//Carbohydrate Polymers. – 2008. – V.73. – P.541- 547.

109. Ploux L. Bacteria/material interfaces: role of the material and cell wall properties / L. Ploux, A. Ponche, K. Anselme //Journal of Adhesion Science and Technology. – 2010. – V.24. – P. 2165-2201.

110. Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites /A.O. Lobo, H. Zanin, I.A. Siqueira, N.C. Leite// Materials Science and Engineering. – 2013. – V. 33. – P.4305–4312.

111. Hashmia M.U. Dissolution behavior of bioactive glass ceramics with different CaO/MgO ratios in SBF-K9 and r-SBF /M.U. Hashmia, A. Saqlain // Progress in Natural Science:Materials International. – 2014. – V.24. – P.354–363.

112. Мартинюк О.О. Структурні властивості апатит-біополімерних нанокіопозитних матеріалів з ZnO / О.О. Мартинюк, Л.Ф. Суходуб, Л.Б. Суходуб // J. Nano- Electron. Phys. – 2016. – V.8. – No4 (II). – 04090p.

113. Structural properties of the ZnO doped hydroxyapatite nanocomposite material / O.O. Martynyuk, L. F. Sukhodub, L. B. Sukhodub [et al]. // Proceedings

of the International Conference : Nanomaterials:Applications and Properties. – 2016. – V.5(2). – 02NNSA07 (3pp).

114. Injectable Biopolymer-hydroxyapatite Hydrogels: Obtaining and their Characterization / L.B. Sukhodub., G.O.Yanovska, V.M. Kuznetsov [et al] // J.Nano- Electron. Phys. – 2016. – V.8(1). – 01032p.

115. Композиція для заповнення кісткових дефектів: Рішення про видачу патенту №27261/ЗУ/16 від 16.11.2016.

116. Sukhodub L. F. Chitosan-apatite composites: synthesis and properties / L. F. Sukhodub, L. B. Sukhodub, I. V. Chorna // Biopolymers and Cell. – 2016. – Vol. 32. – N 2. – P 83–97.

117. The influence of ultrasound and microwave irradiation on the crystal structural of hydroxyapatite / A. S. Stanislavov, L. F. Sukhodub, L. B. Sukhodub [et al] // Proceedings of the International Conference : Nanomaterials:Applications and Properties. – 2016. – V.5. – No2. – 02NABM04 (3pp).

118. Controllability of brushite structural parameters using an applied magnetic field / V.N. Kuznetsov, A.A. Yanovska, A.S. Stanislavov [et al] // Mat Science and Engineer C. – 2016. – V. 60. – P.547-553.

119. Sukhodub L.B. Composite materials based on zinc sulfide and zinc oxide: structural and biocidal properties / L.B. Sukhodub, E. Khrystian, L.F. Sukhodub // Annals of Mechnikov Institute. – 2016. – №4. – P. 34-39.