

УДК 615.31:541.64:539.6:615.28:617-089.844:616.71-74

КП

№ держреєстрації 0118U003581

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

**Фізичні основи формування складу апатит-біополімерних пористих
матриць для контрольованої доставки лікарських засобів в зону
імплантації
(проміжний)**

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

2018

Рукопис закінчено 20 грудня 2018 р.

Результати даної роботи розглянуті науковою радою СумДУ протокол від 27 грудня 2018р. № 7

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, чл.-кор. НАНУ, д-р. фіз.-мат. наук, професор, завідувач кафедри ББФБІ СумДУ		Л.Ф.Суходуб (вступ, розділ 4, висновки)
	20.12.2018	
Відповідальний виконавець – канд. хім. наук., старш.наук.співроб. ННЦ «Нано- і біоматеріали» СумДУ		Л.Б. Суходуб (розділ 1-4, висновки)
Виконавці:	20.12.2018	
д-р. фіз.-мат. наук, професор кафедри біофізики та медичної інформатики ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ ім.Т.Шевченка		Ю.І.Прилуцький (підрозділи 2.2, 3.2).
	20.12.2018	
д-р. техн. наук, професор кафедри прикладного матеріалознавства і технології констр. матеріалів СумДУ		К.О.Дядюра (вступ)
	20.12.2018	
магістр за спеціальністю «Біомедична інженерія» СумДУ		М.О.Кумеда (підрозділ 3.2)
	20.12.2018	
магістр за спеціальністю «Біомедична інженерія» СумДУ		В.І.Гапон (підрозділ 3.2)
	20.12.2018	

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 83 с., 28 рис., 14 табл., 77 джерел.

НАНОКОМПОЗИТИ, ГІДРОКСИАПАТИТ, ХІТОЗАН, АЛЬГІНАТ, КАРБОНОВІ НАНОТРУБКИ, МІКРОХВИЛЬОВЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ, СТРУКТУРА, ФІЗИКО-МЕХАНІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

Об'єкт дослідження – процеси формування гібридних біоматеріалів з інкорпорацією лікарських препаратів та *in vitro* дослідження кінетики вивільнення цих препаратів у модельне біологічне середовище; фізичні властивості, структура, склад та біоактивність апатит-полімерних зразків; механічні властивості композитів; біосумісність та цитотоксичність біоматеріалів з вмістом іонів та наночастинок оксидів металів.

Мета роботи – синтез та структурно-спектральні дослідження новітніх біополімер-apatитних матеріалів для ремоделювання кісткової тканини і забезпечення контрольованого вивільнення лікарських засобів; розробка методик отримання функціональних наноструктурованих матеріалів в різних лікарських формах (порошки, гідрогелі, плівки, гранули, скафолди)

Зроблено наступне: розроблена методика отримання еластичних наноструктурованих полімер-apatитних плівок товщиною ≤ 1 мм для потенційного застосування в стоматології; розроблена методика отримання композитів зі структурно імобілізованими багатостінними карбонowymi нанотрубками з вмістом іонів заліза; розроблена методика отримання під впливом мікрохвильового випромінювання хітозан-apatитних композитів, як систем доставки і вивільнення лікарських засобів; проведені біологічні дослідження синтезованих матеріалів на основі ГА з вмістом іонів Ag^+ , частинок магнетиту Fe_3O_4 та цинку оксиду ZnO довели, що добавки неорганічного походження в застосованих концентраціях не впливають на цитотоксичність, а матеріали є біосумісними.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ЗМІСТ	4
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	6
ПЕРЕДМОВА	7
ВСТУП	14
1 Отримання біоактивних матеріалів на основі природних полімерів та ГА для застосування в стоматології	18
1.1 Композитні матеріали на основі ГА та альгінату з вмістом іонів металів у формі порошків	18
1.2 Композитні матеріали з вмістом іонів Ca^{2+} та пропіленгліколю.....	21
Даний розділ присвячений дослідженню впливу технологічних параметрів на форму утвореного продукту.....	21
1.3 Полімер-апатитні біоматеріали з вмістом іонів металів у формі тонких плівок та скафолдів.....	23
1.3.1 Дослідження впливу методу фінішної обробки на структуру зразків з вмістом іонів металів Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}	23
1.3.2 Дослідження впливу УЗ на структуру зразків зі співвідношенням ГА:2% Alg = 0,5:2.....	28
2 Дослідження морфології, структури та властивостей біоактивних матеріалів для стоматології та щелепно-лицьової хірургії.....	31
2.1 Дослідження структури біоактивних композитних плівок HA-Alg-Me.....	31
2.2 Наноструктуровані апатит-полімерні композити: залежність кінетики вивільнення лікарського засобу від фінішної обробки матеріалу.	34

3	Розробка біополімер-апатитних композитних матеріалів з іммобілізованими в їх структуру неорганічними наночастинками та іонами металів.....	49
3.1	Альгінат-апатитні матеріали з іммобілізацією MWCNT та Fe.....	49
3.2	Дослідження впливу мікрохвильового випромінювання (MW) на синтез та властивості композитних матеріалів з вмістом хітозану	62
4	Дослідження біоактивності в модельних реакціях <i>in vitro</i> . Вплив форми та складу композитних матеріалів на основі ГА з вмістом іонів Ag ⁺ , магнетиту Fe ₃ O ₄ , цинку оксиду ZnO на цитотоксичність і біосумісність.....	64
	ВИСНОВКИ.....	71
	ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	75

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

Alg – альгінат

HA (ГА) – гідроксиапатит

ЕД – електронна дифракція

кдНА – кальцій дефіцитний гідроксиапатит

КТ – кісткова тканина

МБцК – мінімальна бактерицидна концентрація

МІК – мінімальна інгібуюча концентрація

Me – метал

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, RFA – рентгено-флуоресцентний аналіз

TGA – термогравіметричний аналізатор

TDA – диференційний термічний аналізатор

СН – хлоргексидину біглюконат

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.bourestnik.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 θ - 2θ (2θ – брегівський кут). Величини струму та напруги склали 20 мА та 40 кВ відповідно. Дослідження зразків проводилося в режимі безперервної реєстрації (швидкість $4^\circ/\text{хв.}$), діапазон кутів 2θ від 10° до 60° .

За умови режиму θ - 2θ , 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 (3 1 0) та (0 0 2), за наступними формулами:

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

де a_{hko} – параметр елементарної комірки, обрахований в площині (h k 0);

d_{hko} – міжплощинна відстань площини (h k 0);

h, k, l – індекси Міллера;

c_{00l} – параметр елементарної комірки, обрахований в площині (00l);

d_{00l} – міжплощинна відстань площини (0 0 l).

За даними RD було встановлено фазовий склад зразків та розраховано розміри кристалітів та рівень мікродеформацій за методом, описаним нижче, в кристалографічному напрямку [0 0 c].

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 $K=1$);

λ – довжина хвилі рентгенівського випромінення;

β_m – інтегральна ширина дифракційного профілю, фізичне розширення в якому відбувається лише через малі розміри ОКР;

θ – кут дифракції.

Рівень мікродеформацій ϵ 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 β_n – інтегральна ширина дифракційного профілю, фізичне розширення в якому відбувається лише через мікродеформації кристалічної решітки.

Експериментальне розширення дифракційних ліній B складається з фізичного β 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:

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

Рентгено-флуоресцентний аналіз

Рентгено-флуоресцентний 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.

Електронна мікроскопія

Просвічуюча електронна мікроскопія. 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 голкоподібну структуру.

Скануюча електронна мікроскопія

Електронно-мікроскопічні дослідження морфології зразків проводилися методом електронної мікроскопії на скануючому електронному мікроскопі JSM-6390LV. Субстрат досліджувався в електронному мікроскопі в режимі вторинних електронів при прискорюючій напрузі 10-20 кВ. Роздільна здатність мікроскопу складала 10 нм. Фотографії, отримані при збільшеннях до X500.

ІЧ спектроскопія

Спектри FTIR отримували за допомогою спектрометра PerkinElmer Spectrum BX. Зразки готували у вигляді дисків. Спектри реєструвалися в діапазоні 4000–400 см⁻¹ при роздільній здатності 1 см⁻¹. Дослідження проводили на інфрачервоному спектрометрі на основі Фур'є перетворення, 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. Зразки готували у формі дисків з використанням КВг.

Вимірювання пористості та ступеню набрякання 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 (Π) розраховували за формулою [2]:

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

де $\rho_{ет}$ – густина етанолу.

Рівноважний ступінь набрякання 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 набрякання 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.

In vitro дослідження біоактивності

Біоактивність досліджуваних зразків визначали за зміною значення рН фізіологічного розчину (SBF), який за складом та концентрацією компонентів наближений до сироватки крові людини: Na^+ -142 мМ, K^+ – 5 мМ, Mg^{2+} – 1,5 мМ, Ca^{2+} – 2,5 мМ, Cl^- – 148,8 мМ, HCO_3^- – 4,2 мМ, HPO_4^{2-} – 1,0 мМ, SO_4^{2-} – 0,5 мМ, рН=7,4 [3]. 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

Втрата ваги при термічному впливі та теплову поведінку зразків досліджували за допомогою одночасного TGA/DTA аналізатора Shimadzu DTG-60Н. Зразки нагрівали в платиновому тиглі на повітрі зі швидкістю 10°C/хв від кімнатної температури до 600°C. В якості стандартного зразка використовували $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$. Визначали максимальні відносні деформації ϵ до руйнування, силу B_c при одноосному стискуванні.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)

Визначення кінетики вивільнення лікарських засобів із складу композитного матеріалу проводили на хроматографі Agilent 1200 з детектуванням UV-Vis Abs ($\lambda = 280$ нм) та хроматографічною колонкою C18 (Zorbax SB-C18 4.6x150 мм, 5мкм). Було використано програмне забезпечення Empower 2. Мобільна фаза: буфер 0,05 М розчин гідрофосфату калію в суміші з 0,2% триетиламіном (рН = 3,1 при 21 °С) - 68%; ацетонітрил - 32%. Був застосований ізостатичний режим при швидкості подачі елюента 2 мл/хв. Температура аналітичної колонки становила 40°C. Для зменшення похибок при вимірюванні малих концентрацій був використаний спосіб попереднього змішування компонентів елюенту, з подальшою обробкою ультразвуком протягом 30 хв для видалення розчиненого повітря.

ВСТУП

Композитні матеріали на основі ГА та полімерів синтетичного або природного походження широко застосовуються в медицині, оскільки жива кісткова тканина відрізняється від них тільки тим, що вона насичена біологічними тканинами й рідинами, які об'єднані в систему [4]. Кістка складається з органічних (40%) і неорганічних (60%) компонентів. Органічні компоненти кісткової тканини переважно складаються з колагену (90 - 95%), який, будучи структуроутворюючим протеїновим елементом кісткової тканини, бере участь в утворенні форми кістки і забезпечує її міцність при розтягуванні [5]. Елементи кристалічної решітки ГА можуть обмінюватися з іонами фізіологічного розчину, що оточує кристал, і змінюватися за рахунок іонів, що знаходяться в цьому розчині. Ця властивість апатитів робить їх високочутливими до іонного складу крові та міжклітинної рідини. Найчастіше зустрічаються такі варіанти обміну іонів: Ca^{2+} заміщається катіонами Na^+ , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mo^{2+} , рідше Mg^{2+} , Pb^{2+} . При цьому відбувається зміна властивостей ГА, змінюються міцність і розміри кристалів [6, 7].

Розвиток багатофункціональних наноструктурних матеріалів для медицини, таких як ортопедія та стоматологія, залишається актуальним предметом медичної науки. Сучасні можливості припускають широкий вибір матеріалів, які за певних умов можна комбінувати і створювати композитні матеріали, щоб досягти кращих властивостей [8]. Композитний скафолд, що складається з двох різних матеріалів, таких як синтетичний органічний полімер та неорганічні матеріали, поєднує переваги кожного окремого матеріалу та мінімізує їх недоліки.

Нещодавні дослідження в галузі інженерії тканин почали зосереджуватися на використанні ін'єкційних композитів, оскільки вони можуть бути введені в дефектну ділянку методом неінвазивної хірургії для запобігання інфікування, хірургічних рубців та великої крововтрати [9-12].

Нанокристалічний гідроксиапатит (ГА) широко використовується в якості матеріалу для інженерії кісткової тканини, в системах доставки ліків, як біосенсор і для багатьох інших застосувань завдяки хімічній і біологічній подібності до мінеральної частини кістки [13]. Але у нього є й багато недоліків, а саме незначна швидкість резорбції, низька механічна міцність і ударна в'язкість, висока усадка і деформація при спіканні і, нарешті, нерегульовані біологічні властивості. З цих причин у багатьох випадках ГА використовується тільки в поєднанні з біополімером як композитний матеріалу.

Полісахаридний ланцюг хітозану здобув велику увагу в сфері заміни кісток и регенерації хрящів через структурну подібність з глікозаміногліканом, що є основним компонентом позаклітинної матриці кісток [14]. ГА-хітозанові скафолди показали гарну цитоактивність з остеобластами, що є свідченням можливості застосування ГА в інженерних матеріалах для кісткової тканини [15].

Альгінат натрію (Alg) в свою чергу дуже часто використовується через його низьку вартість, біосумісність, нетоксичність, хелатируючу здатність і його потенційне використання в системах доставки ліків [16,17].

Типові синтетичні біокомпозити на основі ГА включають такі біополімери, як колаген, хітозан, полілактид, целюлозу і багато інших біоактивних речовин [18], включаючи багатостінні вуглецеві нанотрубки (MWCNT), в якості багатообіцяючого кандидата для запобігання ерозії зубів. Чудова біодоступність ГА може бути доповнена механічними властивостями CNT в композиційному матеріалі [19]. Стимулом для використання в матеріалознавстві CNT, відкритих у 1991 р [20], є сукупність їх властивостей: чудові механічні та унікальні електричні властивості, висока термічна і хімічна стабільність [21]. Вуглецеві нанотрубки мають невеликі розміри, високу міцність і жорсткість, високе співвідношення довжини до діаметру, що дає їм потенціал для використання. Багатошарові нанотрубки складаються з безлічі графенових листів, розташованих концентрично.

Оскільки ГА, як хімічна сполука, корисна для поділу білків або нуклеїнових кислот за допомогою адсорбційної хроматографії, гібридні композити на основі ГА також можуть потенційно використовуватися в аналогічних областях застосування.

В даний час MWCNT вважаються найпривабливішими функціональними наповнювачами для наномедицини [22, 23], оскільки вони здатні проникати через клітинну плазматичну мембрану [24], взаємодіяти з ДНК [25], можуть бути націлені на пухлину і мають центральне порожнє ядро, в яке можуть бути внесені терапевтичні препарати [26]. З іншого боку, присутність CNT у біокомпозиті не має шкідливих побічних ефектів і може навіть підвищити його біологічну активність [27].

Широке застосування ліків з антимікробною дією призвело до формування стійкості мікроорганізмів до широкого спектру антибіотиків. Одним із підходів до розв'язання цієї проблеми у всьому світі є активний пошук неорганічних та органічних речовин та їх модифікація неорганічними біологічно активними іонами для ініціювання контрольованої реакції в тканинах та забезпечення антимікробної активності [28, 29]. Складні органічні сполуки, модифіковані перехідними елементами, відіграють важливу роль у синтезі матеріалів, каталізі, фотохімії, біологічних системах, виявляють антимікробні властивості [30]. Біологічний апатит, який є частиною кісткової тканини, включає в себе ряд неорганічних іонів, таких як Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Fe^{3+} . Встановлено факт збільшення біологічної активності апатитів в результаті включення до їх складу невеликої кількості іонів цинку, магнію, срібла [31]. Ряд недавніх досліджень у галузі медичної науки присвячений сульфіді цинку (ZnS) та оксиду цинку (ZnO). У значній кількості мікроелемент цинк знаходиться в кістковій тканині і сприяє підвищенню щільності кісткової тканини, запобігає втраті кісткової тканини [32], покращує адгезію білків та антимікробну активність [33]. Дослідники також звернули увагу на наночастинки сульфіді цинку у зв'язку із застосуванням в оптоелектроніці,

системах молекулярного розпізнавання та використанням їх люмінесцентних та флуоресцентних властивостей у створенні зондів [34]. Відомо, що матеріали на основі ZnO мають яскраво виражену біосумісність, характеризуються високою граничною міцністю, механічною твердістю, а також здатністю протистояти жорстким умовам експлуатації. Нещодавно, [35], було показано наявність сильних антибактеріальних властивостей для синтезованого композиційного сульфід цинку з альгінатом (ZnS + альгінат) щодо ряду грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів

Таким чином, робота в рамках даного проекту присвячена створенню біополімерних композитних матеріалів на основі ГА, визначенню фізичних основ формування їх складу, застосуванню в апатит-біополімерних пористих матриць для контрольованої доставки лікарських засобів в зону імплантації.

1 Отримання біоактивних матеріалів на основі природних полімерів та ГА для застосування в стоматології

Використання матеріалів з остеоінтегруючими та бактерицидними властивостями є важливою стратегією стоматології. З цією метою в ході даної роботи були розроблені та досліджені методики виготовлення композитного матеріалу у формі плівки на основі гідроксиапатиту та природнього полімеру (альгінату) з додаванням неорганічних іонів та подальшим насиченням лікарськими засобами та активними речовинами. Іони кальцію, магнію, алюмінію, цинку та міді сприяють зміцненню кісткової тканини, саме тому їх обрали для «зшивання» альгінатної матриці при виготовленні матеріалу у формі плівок. Іони металів також відомі своїми антимікробними властивостями [36].

1.1 Композитні матеріали на основі ГА та альгінату з вмістом іонів металів у формі порошків

Матеріали

Кальцій нітрат тетрагідрат 0,167 М ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), гідрофосфат амонію 0,1М ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), гідроксид амонію (NH_4OH) класифікації «ХЧ» (виробництво «Мерск»); 1% водний розчин альгінату натрію молекулярною масою 15 кДа, (Е401), Китай). 0,5 М розчини металовмісних сполук: хлориду кальцію CaCl_2 , сульфату міді CuSO_4 , сульфату цинку ZnSO_4 , сульфату магнію MgSO_4 , хлориду алюмінію AlCl_3 .

Основним компонентом утворених композитів є ГА, синтезований за класичною технологією, згідно наступної реакції:



Синтез відбувався при рН 10,5, що досягалось додаванням 25% розчину NH_4OH . Реакційну суміш нагрівали до 80 °С протягом 10 хвилин з наступним 24 годинним «зістарюванням» та ретельною промивкою осаду. Утворений гідрогель ГА був відділений від дисперсійного середовища шляхом центрифугування. Вологість отриманого ГА складала 90 %. Частину продукту відпалювали при 900 °С протягом 1 години для подальших досліджень методом рентгенівської дифракції.

Результат рентгенівської дифракції (рис.1.1) свідчить про утворення гідроксиапатиту (JCPDS 00-024-0033). Розраховані на основі XRD аналізу структурні характеристики ГА приведені в табл. 1.1.

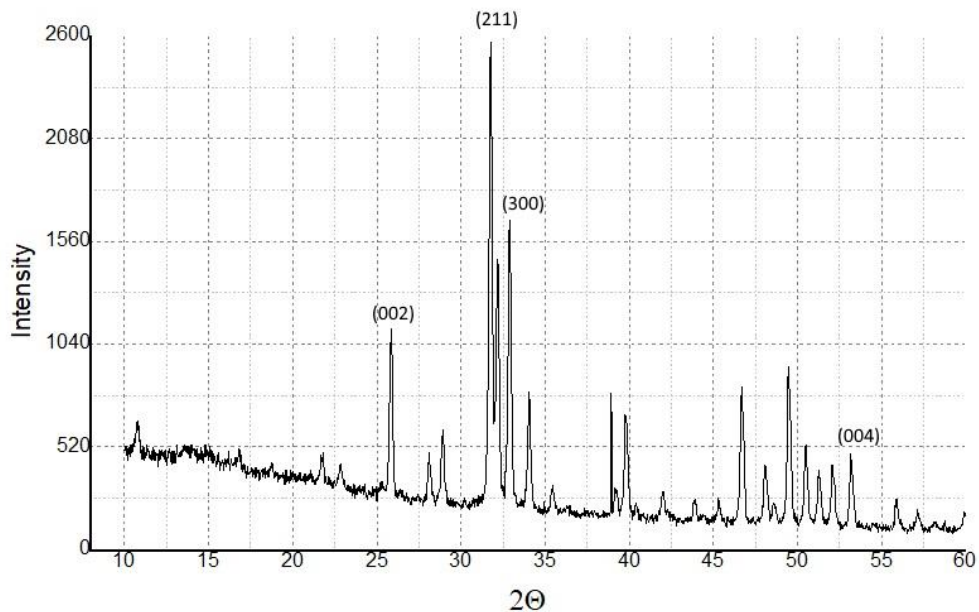


Рисунок 1.1 – Рентгенівська дифрактограма зразка ГА, синтезованого при рН=10,5 та відпаленого при 900 °С.

Таблиця 1.1 – Структурні характеристики ГА.

Умови		Параметри кристалічної решітки			Склад, %		Ca/P
рН	t, оС	a, нм	c, нм	L, нм	HA	b-TCP	
10,5	80	0,942	0,688	50,16	100	0	1,66

Завданням даного етапу роботи було утворення серії зразків у формі порошків на основі ГА та альгінату з вмістом іонів металів (Me), які мають надавати матеріалам додаткових протимікробних властивостей та слугувати додатковим джерелом мікроелементів. Для утворення даної серії зразків біокомпозитного матеріалу були приготовані гідрогель ГА з вологістю 90 % за описаною вище технологією, та 1% розчин альгінату. Вказані компоненти були сполучені в ваговій пропорції 2:3 відповідно та оброблені ультразвуком для отримання гомогенної суспензії ГА/Alg. Дана суспензія в подальшому була використана в якості основної складової для серії зразків.

Основні моменти технології виготовлення композитів приведені в таб.1.2.

Таблиця 1.2 – Методика приготування та результат дослідження полімер-апатитних композитів у формі порошків.

Зразок	Метод змішування		Спрей метод	Фінальна обробка	
	Внесе ні іони металів	Кількість розчину Me, внесеного у суміш, ваг.%	Об'ємне співвідношення розчину Me до ГА/Alg суміші	Час експозиції у заливочному розчині, год	Метод висушування
ГА-Alg-Ca ²⁺ (1)	Ca ²⁺	8	-	-	Ліофіліз.
ГА-Alg-Ca ²⁺ (2)	Ca ²⁺	-	1:1	24	Ліофіліз.
ГА-Alg-Cu ²⁺ (1)	Cu ²⁺	30	-	-	Ліофіліз.
ГА-Alg-Cu ²⁺ (2)	Cu ²⁺	-	1:1	24	Ліофіліз.
ГА-Alg-Zn ²⁺ (1)	Zn ²⁺	5	-	-	Ліофіліз.
ГА-Alg-Zn ²⁺ (2)	Zn ²⁺	-	1:1	24	Ліофіліз.
ГА-Alg-Mg ²⁺ (1)	Mg ²⁺	9	-	-	Ліофіліз.
ГА-Alg-Mg ²⁺ (2)	Mg ²⁺	-	1:1	24	Ліофіліз.
ГА-Alg-Al ³⁺ (1)	Al ³⁺	8	-	-	Ліофіліз.
ГА-Alg-Al ³⁺ (2)	Al ³⁺	-	1:1	24	Ліофіліз.

Іони металів вносили до складу композиту двома способами, а саме:

а) додаванням 0,5 М розчину металовмісної сполуки до суміші ГА/Alg з подальшою гомогенізацією в УЗДН;

б) розчин металовмісної сполуки наносили спреєм-методом на дно форми, після чого відповідну кількість суміші ГА/Alg рівномірно розподіляли шаром товщиною 2 мм по поверхні форми, з подальшим нанесенням спреєм методом розчину металовмісної сполуки на поверхню суміші ГА/Alg. Розчин металовмісної сполуки також названий, як заливочний розчин.

Висновок:

Всі зразки після ліофілізації (24 години) мають форму дрібнодисперсного порошку з розміром частинок ≤ 50 мкм.

1.2 Композитні матеріали з вмістом іонів Ca^{2+} та пропіленгліколю

Даний розділ присвячений дослідженню впливу технологічних параметрів на форму утвореного продукту.

При виготовленні даної серії зразків був застосований гідрогель ГА, отриманий за вище описаною технологією, та водний 2% розчин альгінату натрію. Вагове співвідношення ГА:2%Alg=1:2. Пропіленгліколь (ПГ) був застосований в якості поверхнево-активно речовини (ПАР). Пропіленгліколь -гігроскопічна рідина без кольору, яка містить асиметричний атом вуглецю, розчинна у воді, етанолі, ацетоні, має дуже низьку летючість і характеризується дуже низькою токсичністю. ПГ не чутливий до зміни рН, проявляє стійкість до мікробної контамінації (має у молекулі первинні гідроксильні групи, що зумовлюють слабку бактерицидну дію). Володіє властивістю вбирати в себе, поглинати та утримувати вологу, надаючи таким

чином матеріалу певної еластичності. Широко застосовується в медичній та фармацевтичній практиці.

Зразки були виготовлені з різними параметрами технологічного процесу, а саме: різночерговим внесенням компонентів, з гомогенізацією в УЗДН або без неї, дворазовим заморожуванням-розморожуванням та ліофілізацією. Був досліджений вплив вказаних факторів на форму отриманого композитного матеріалу. Результати дослідження приведені в таблиці 1.3.

Таблиця 1.3 – Методика приготування та вплив технологічних параметрів на форму утвореного продукту.

Зразок	Вміст ПГ, ваг.% до ГА/Alg суміші	Вміст 0,1М CaCl ₂ ваг.% до ГА/Alg	Порядок внесення компонентів	УЗ обробка, хв.	Час ліофілізації, год	Форма отриманого матеріалу
№1 ГА-Alg-Ca ²⁺	10	-	ГА+Alg+ПГ	10	4,5	Порошок
№2 ГА-Alg-Ca ²⁺	10	30	ГА+ Alg+ПГ+Ca ²⁺	-	4,5	Еластична плівка
№3 ГА-Alg-Ca ²⁺	-	30	ГА+ Alg+ПГ+Ca ²⁺	1	4,5	Еластична плівка
№4 ГА-Alg-Ca ²⁺	10	15,0	(Alg+ПГ)+(ГА+Ca ²⁺)	10	16	Порошок
№5 ГА-Alg-Ca ²⁺	-	11	(Alg+ПГ+ГА)+Ca ²⁺	1	10	Зберігає форму, але крихкий на розлом

Висновок:

Параметри технологічного процесу впливають на форму синтезованого продукту.

Введення 0,1м хлориду кальцію в кількості 30% по відношенню до маси суміші сприяє утворенню молекулярно «зшитій» еластичній плівці.

Застосування уз обробки терміном $>1,5$ хвилини для матеріалу об'ємом 2-5 мл, а також довготривала (>5 годин) ліофілізація сприяє утворенню матеріалу у формі порошку.

1.3 Полімер-апатитні біоматеріали з вмістом іонів металів у формі тонких плівок та скафолдів

В основі процесу отримання композитного матеріалу у формі тонких плівок або скафолдів лежить здатність макромолекул природного полімеру альгінату до гелеутворення. Гідрогелі альгінату представляють собою «зшити» в даному випадку іонами металів тривимірну сітку, здатну іммобілізувати та утримувати в своїй структурі наночастинки гідроксиапатиту. На рис.1.2. схематично представлена структура композитного біоматеріалу.

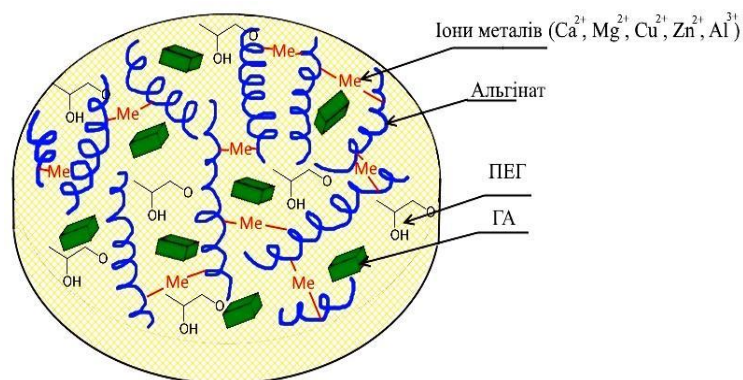


Рисунок 1.2 – Схематичне зображення структури альгінат-апатитних біокомпозитів.

1.3.1 Дослідження впливу методу фінішної обробки на структуру зразків з вмістом іонів металів Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}

Даний етап дослідження присвячений впливу фінішної обробки (методу висушування) на структуру та форму отриманих композитів. Композити були виготовлені з різним вмістом ГА, а саме: 1) ГА: 2%Alg = 1:2; 2) ГА: 2%Alg = 0.5:2.

Композити зі співвідношенням ГА: 2%Alg = 1:2

Вихідними матеріалами для даної групи зразків були: суспензія ГА вологістю близько 90%; 2% водний розчин альгінату натрію; пропіленгліколь; 0,1М водні розчини металовмісних сполук (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}), які додавалися з розрахунку 0,08 мл на 1 г суміші.

На першому етапі була приготована суміш альгінату та ПГ, до якої порціями додавався ГА. Після цього при ретельному перемішування (без застосування УЗ) додавалася розрахована кількість розчину металовмісних сполук.

Було підготовано 2 групи зразків: №1- №6 та № 1а -6а від 14.03.2018.

Перша група зразків (рис.1.3, нижній ряд) після розливу у форми була заморожена протягом 2 годин, з періодичними стадіями розморожування-заморожування, після чого ліофілізована протягом 6,5 годин.

Друга група зразків (рис.1.3, верхній ряд) була висушена протягом 2 діб при кімнатній температурі.

Результати дослідження наведені в таблиці 1.4.



Рисунок 1.3 – Зовнішній вигляд зразків : нижній ряд – (№1- №6) ліофілізовані; верхній ряд – (№ 1а–6а) висушені при кімнатній температурі.

Матеріали зі співвідношенням ГА: 1%Alg = 0,5:2.

Вихідними матеріалами для даної групи зразків були: суспензія ГА №6 від 12.02.2018 вологістю близько 80%;1% водний розчин альгінату натрію;

пропіленгліколь; 0,1М водні розчини металовмісних сполук (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}). До всіх зразків було застосовано УЗ перемішування.

Таблиця 1.4 – Методика приготування та результат дослідження зразків №1–№6 та № 1а–6а щодо впливу методу висушування на кінцеву форму матеріалу.

Зразок	Іони металів	Співвідношення ГА: Alg	Метод кінцевої обробки	Примітка
№1_14.03.18	-	1:2	Ліофілізація 6,5год	Крихкий, форма скафолда, товщина 4мм, діам.20мм
№2_14.03.18	Ca^{2+}	1:2	Ліофілізація 6,5год.	Форма скафолда, товщина 5мм, діам.20мм
№3_14.03.18	Cu^{2+}	1:2	Ліофілізація 6,5год	Форма скафолда, товщина 4мм
№4_14.03.18	Zn^{2+}	1:2	Ліофілізація 6,5 год	Форма скафолда, товщина 4мм
№5_14.03.18	Mg^{2+}	1:2	Ліофілізація 6,5 год	Форма скафолда, товщина 4мм
№6_14.03.18	Al^{3+}	1:2	Ліофілізація 6,5 год	Форма скафолда, товщина 5мм
№1а_14.03.18	-	1:2	сушіння при кімн. темп.24год	плівка товщ.1мм, низькоеластична
№2а_14.03.18	Ca^{2+}	1:2	сушіння при кімн. темп.24 год	Плівка товщ.1мм низькоеластична
№3а_14.03.18	Cu^{2+}	1:2	сушіння при кімн. темп.24 год	Плівка товщ.1мм низькоеластична
№4а_14.03.18	Zn^{2+}	1:2	сушіння при кімн. темп.24 год	Плівка товщ.1мм низькоеластична
№5а_14.03.18	Mg^{2+}	1:2	сушіння при кімн. темп.24 год	Плівка товщ.1мм низькоеластична
№6а_14.03.18	Al^{3+}	1:2	сушіння при кімн. темп.24 год	Плівка товщ.1мм низькоеластична

На першому етапі була приготована суміш альгінату та ПГ, яку порціями додавали до ГА. Після цього при ретельному перемішування додавалася розрахована кількість розчину металовмісних сполук. Зразки були оброблені УЗ протягом 1 хвилини після додавання розчинів металовмісних сполук.

Було підготовано 2 групи зразків: №1- №6 від 21.03.2018, які були заморожені та ліофілізовані протягом 4,5 год. Зразки № 1а -6а були висушені при кімнатній температурі.

Об'єм суспензії 1 зразка становив 2,5 мл, зразки були розлиті в пластикову форму з діаметром окремої соти- 2,5 см.

Результати досліджень наведені в таблиці 1.5, а зображення ряду зразків приведено на рис. 1.4.

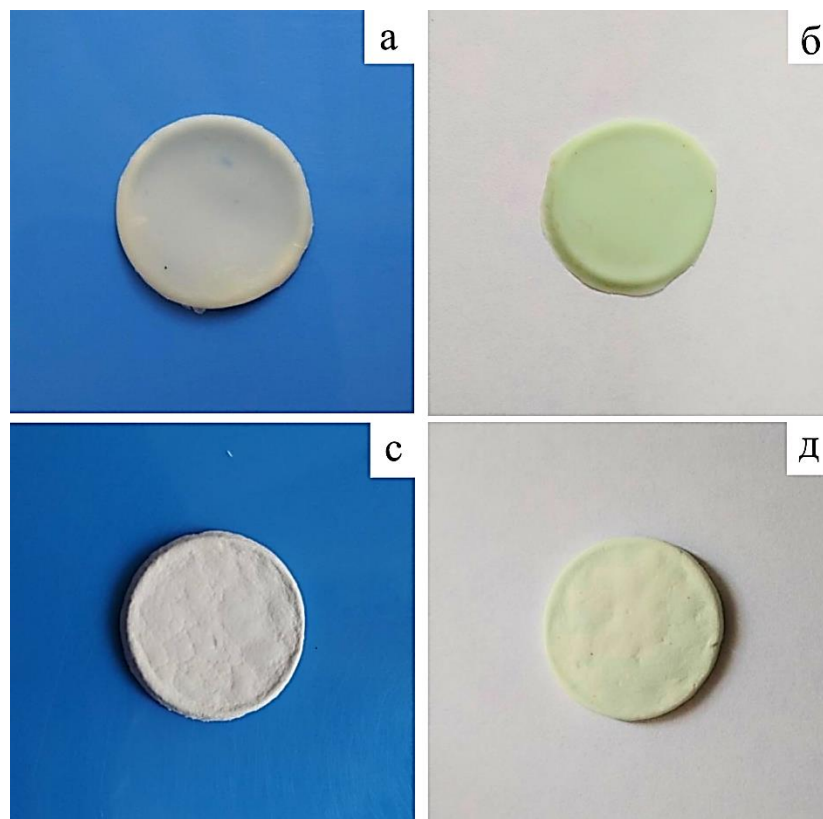


Рисунок 1.4 – Композитні матеріали на основі ГА, альгінату та іонів металів: а), б) - з додаванням Al^{3+} та Cu^{2+} , висушені при кімнатній температурі; с), д) - з додаванням Al^{3+} та Cu^{2+} відповідно, ліофілізовані при $-53\text{ }^{\circ}C$.

Таблиця 1.5 – Методика приготування та результат дослідження зразків №1- №6 та № 1а -6а від 21.03.2018.

Зразок	Іони металів	Співвідношення ГА: Alg	Метод кінцевої обробки	Примітка
№1_21.03.18	-	0,5:2	Ліофілізація	Зразок слабо еластичний, товщина 2мм, діам.20мм
№2_21.03.18	Ca ²⁺	0,5:2	ліофілізація	Зразок крихкий, товщина 2мм, діаметр 20мм
№3_21.03.18	Cu ²⁺	0,5:2	ліофілізація	Зразок слабо еластичний, товщина 2мм, діаметр 20мм
№4_21.03.18	Zn ²⁺	0,5:2	ліофілізація	Зразок крихкий, товщина 4мм, діаметр 20мм
№5_21.03.18	Mg ²⁺	0,5:2	ліофілізація	Зразок слабо еластичний, товщина 2мм, діам.20мм
№6_21.03.18	Al ³⁺	0,5:2	ліофілізація	Зразок слабо еластичний, товщина 2мм, діаметр 20мм
№1а_21.03.18	-	0,5:2	сушка на повітрі	Зразок еластичний, товщина 1 мм, діаметр 20мм
№2а_21.03.18	Ca ²⁺	0,5:2	сушка на повітрі.	Зразок еластичний, товщина 1 мм, діаметр 20мм
№3а_21.03.18	Cu ²⁺	0,5:2	сушка на повітрі	Зразок еластичний, товщина 1 мм, діаметр 20мм
№4а_21.03.18	Zn ²⁺	0,5:2	сушка на повітрі	Зразок еластичний, товщина 1 мм, діаметр 20мм
№5а_21.03.18	Mg ²⁺	0,5:2	сушка на повітрі	Зразок еластичний, товщина 1 мм, діаметр 20мм
№6а_21.03.18	Al ³⁺	0,5:2	сушка на повітрі	Зразок еластичний, товщина 1 мм, діаметр 20мм

Висновок:

Вид кінцевої обробки впливає на форму матеріалу.

Ліофільне висушування сприяє утворенню високопористого матеріалу у формі скафолда, в той час як висушування при кімнатній температурі призводить до утворення тонкої плівки. Додавання іонів металів сприяє утворенню продукту у формі твердого об'ємного скафолда.

Висушені при кімнатній температурі зразки є еластичними та претендують на використання у формі «чипів» для заповнення пародонтозних кишень.

Ліофілізовані протягом 4,5 годин зразки мають невеликий ступінь еластичності. Час ліофілізації зразка об'ємом 2,5 мл з діаметром форми 2,5 см має не перевищувати 5 годин.

1.3.2 Дослідження впливу УЗ на структуру зразків зі співвідношенням ГА:2% Alg = 0,5:2

Вихідними матеріалами для даної групи зразків були: суспензія ГА №6 від 12.02.2018; вологість = 80%; в кількості 0,5г на 1 зразок; 2% водний розчин альгінату натрію; в кількості 2,0 г на 1 зразок; пропіленгліколь, який додавався з розрахунку 10 ваг.% від повної маси суміші або 0,25 мл на 1 зразок; 0,1М водні розчини металовмісних сполук (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}), які додавалися з розрахунку 0,08 мл на 1 г суміші або 0,2 мл на 1 зразок.

На першому етапі була приготована суміш альгінату та ПГ, яку порціями додавали до ГА. Після цього при ретельному перемішування додавалася розрахована кількість розчину металовмісних сполук.

Було підготовано 2 групи зразків: №1- №6, до яких не застосовували УЗ обробки, та № 1а - 6а, до яких був застосований УЗ вплив після додавання розчинів металовмісних сполук. Всі зразки були ліофілізовані протягом 6,5 годин.

Результати досліджень наведені в таблиці 1.6, а зовнішній вигляд утворених структур приведено на рис. 1.5.

Таблиця 1.6 – Методика приготування та результат дослідження ліофілізованих зразків №1- №6 та № 1а -6а від 19.03.2018.

Зразок	Іони металів 0,1М 0,08мл на 1г суміші	Співвідношення ошення ГА: Alg	УЗ	Примітка
№1_19.03.18	-	0,5:2	-	Скафолд, товщина 2мм, діам.20мм
№2_19.03.18	Ca ²⁺	0,5:2	-	Скафолд, товщина 2мм, діам.20мм
№3_19.03.18	Cu ²⁺	0,5:2	-	Скафолд, товщина 2мм, діам.20мм
№4_19.03.18	Zn ²⁺	0,5:2	-	Скафолд, товщина 2мм, діам.20мм
№5_19.03.18	Mg ²⁺	0,5:2	-	Скафолд, товщина 2мм, діам.20мм
№6_19.03.18	Al ³⁺	0,5:2	-	Скафолд, товщина 2мм, діам.20мм
№2а_19.03.18	Ca ²⁺	0,5:2	1хв.	Скафолд, товщина 2мм, діам.20мм
№3а_19.03.18	Cu ²⁺	0,5:2	1хв	Скафолд, товщина 2мм, діам.15мм
№4а_19.03.18	Zn ²⁺	0,5:2	1хв	Скафолд, товщина 2мм, діам.15мм
№5а_19.03.18	Mg ²⁺	0,5:2	1хв	Скафолд, товщина 2мм, діам.20мм
№6а_19.03.18	Al ³⁺	0,5:2	1хв	Скафолд, товщина 2мм, діам.18мм
№7_19.03.18	-	Alg 100%	3хв	Щільний, м'який, УЗ не впливає на структуру альгілату

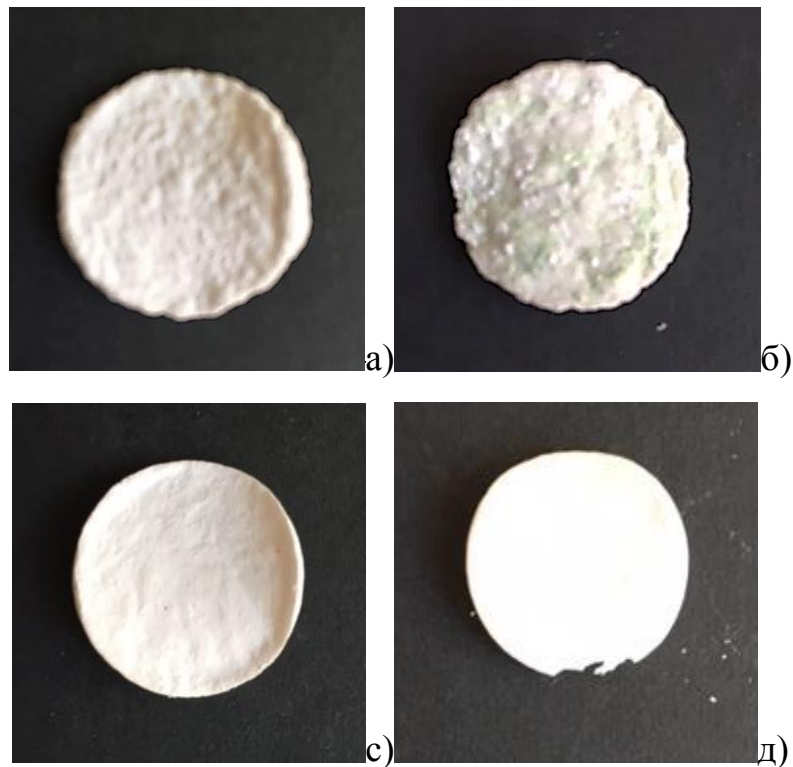


Рисунок 1.5 – Зображення зовнішнього вигляду зразків (таб.1.6): №2 (а) та №3 (б), синтезованих без застосування УЗ обробки; №2а (с) та №3а (д) – з застосуванням УЗ обробки.

Висновок:

Всі зразки є щільними, твердими.

Додавання металічних іонів призводить до збільшення твердості та зменшення еластичності в порівнянні з контрольним зразком №1.

Після застосування уз структура матеріалу є більш гомогенною.

Зразки з Zn^{2+} та Cu^{2+} (рис.3, б,д) дають найбільшу усадку під час висушування, їх кінцевий діаметр становить 15 мм, в той час, як зразок з mg^{2+} має діаметр 20 мм. При цьому діаметр заливочної форми становить 25 мм.

2 Дослідження морфології, структури та властивостей біоактивних матеріалів для стоматології та щелепно-лицьової хірургії

2.1 Дослідження структури біоактивних композитних плівок HA-Alg-Me

XRD аналіз. Для визначення структури композитних матеріалів на основі ГА з вмістом іонів металів були проведений аналіз методом рентгенівської дифракції. На рис.2.1. представлені дифракційні спектри, які свідчать, що основною фазою композитів є гідроксиапатит (JCPDS 9-432). Також наявні піки, які відповідають іонам внесених в структуру металів.

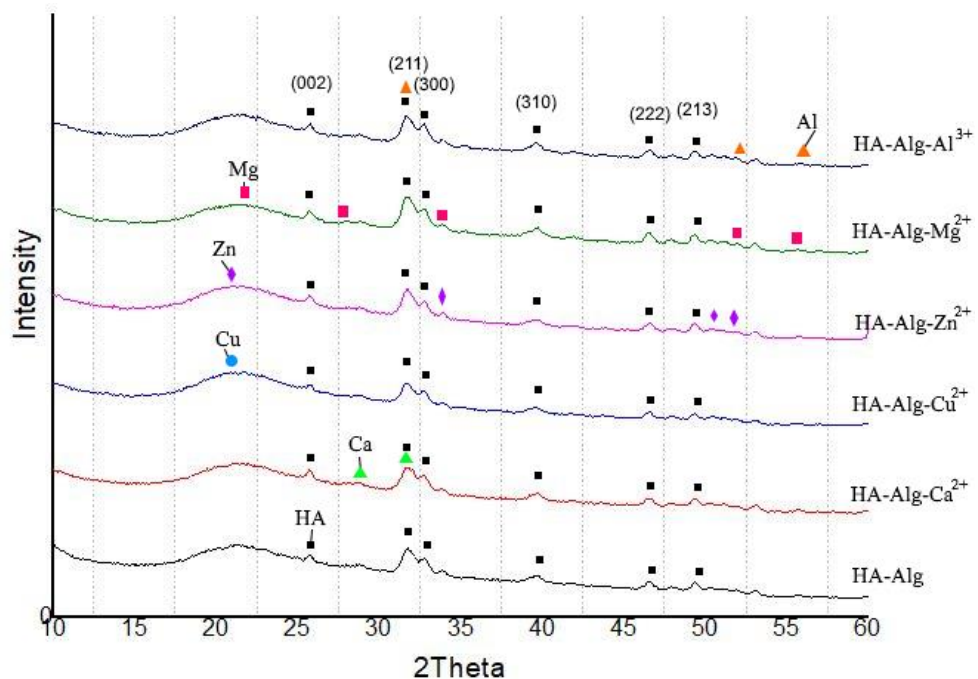


Рисунок 2.1 – XRD спектри альгінат-апатитних плівок з вмістом іонів металів, позначених на спектрах відповідними значками. Основні піки ГА позначені ■.

ІЧ спектроскопія. Дослідження з допомогою ІЧ спектроскопії були проведені з метою дослідити взаємодію функціональних груп альгінату з іонами металів. Рисунок 2.2 демонструє ІЧ спектр для чистого альгінату та

альгінату після його взаємодії з іонами алюмінію. Даний спектр є типовим для Alg-Me сполук, тому ІЧ спектри з іншими досліджуваними іонами Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} не приводяться.

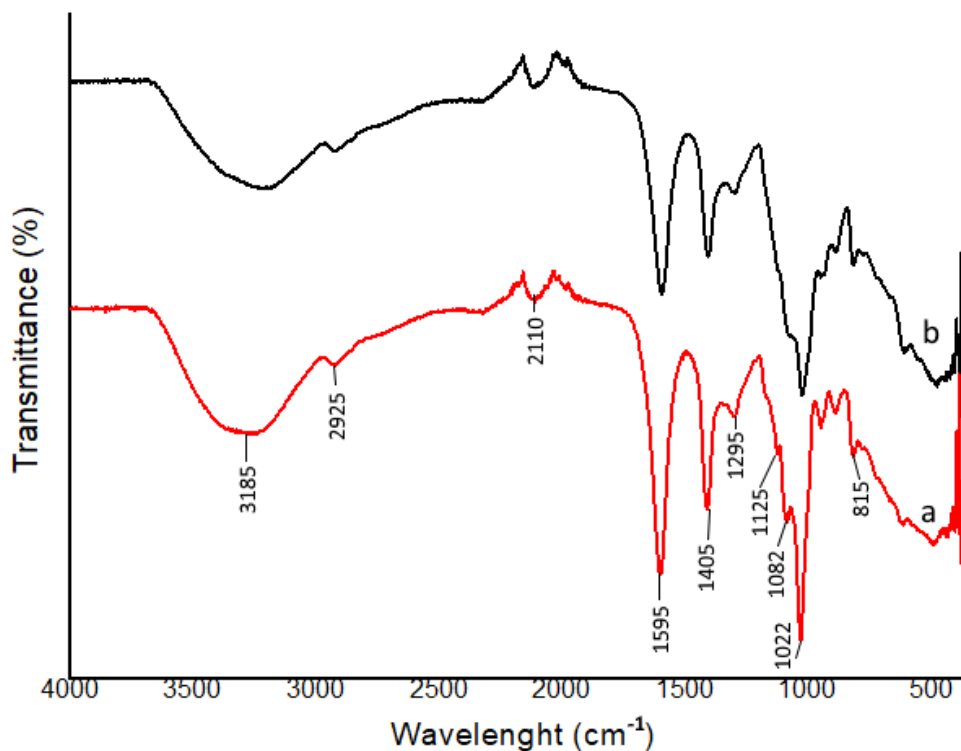


Рисунок 2.2 – FTIR спектри: а)- для альгінату натрію; б) – для Alg- Al^{3+} .

Спектр чистого альгінату натрію використовувався для порівняння. Спектри FTIR отриманих зразків показали характерні смуги вібрації. Пік Alg при 3185 cm^{-1} відповідає коливанням ОН-груп у вуглецевих кислотах. Насичений пік при 1595 cm^{-1} приписується асиметричним валентним коливанням карбонілу $-\text{C}=\text{O}$. Смуга симетричних валентних коливань COO -груп біля 1405 cm^{-1} у спектрі чистого альгінату значно зменшилася за інтенсивністю і змістилася до 1400 cm^{-1} після взаємодії з іонами алюмінію. Даний факт свідчить про взаємодію від'ємно заряджених карбоксильних груп з позитивно зарядженими іонами алюмінію.

Визначення ступеню набрякання. Важливим фактором композитних матеріалів, в тому числі у формі плівок, є їх здатність зберігати форму, поглинати рідину, вивільняти лікарські засоби. Ступінь набрякання

визначали при двох значеннях рН, а саме 4,6 та 7,46 у фосфатному буферному розчині (PBS), який за складом неорганічних іонів близький до фізіологічного розчину. Для цього попередньо зважені експериментальні зразки занурювали у розчин на 30 хвилин, після чого знову зважували та обчислювали ступінь набрякання. Результати експерименту графічно зображені на рис.2.3.

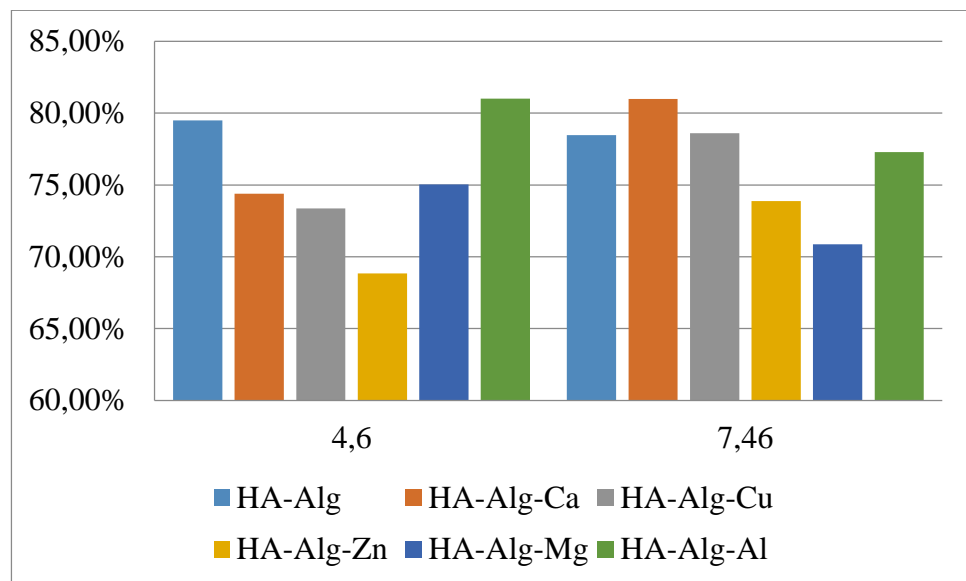


Рисунок 2.3 – Ступінь набрякання плівок у розчині PBS при рН=4,6 та 7,46.

Набрякання зразків відбувається в результаті гідратації як молекул альгінату, так і гідроксиапатиту, який, як відомо, є гігроскопічним. В той же час набрякання зразків відбувається не однаково. Найвищий ступінь набрякання демонструють не «зшиті» іонами металів HA-Alg (біля 80%). Серед «зшитих» зразків найбільш стійкими до набрякання є зразки з Cu^{2+} та Zn^{2+} іонами, а найменш стійкими – зразки з Al^{3+} , що не суперечить загально визнаній концепції енергетичного ступеню зв'язування молекул альгінату іонами металів [16]. Відомо, що в PBS відбувається іонообмін між розчином та зразком, іони металів, які відіграють роль «зшивки», переходять у розчин. Таким чином відбувається набрякання та руйнування стабільної

форми зразку. При цьому значення рН= 7.46, очевидно, є більш сприятливим для іонообміну, оскільки ступінь набрякання всіх зразків дещо вищий, ніж у випадку рН=4,6.

Ще один експеримент щодо контролю стабільності отриманих плівок проводили з використанням просочених PBS пористих губок, які імітують ясна. Губки зі зразками знаходились у закритих стаканах при вологості біля 90% та при температурі 37 °С протягом декількох днів. На рис.2.4 представлений зовнішній вигляд композитного матеріалу, зшитого іонами кальцію, через 1 добу експозиції. Зразок має певний ступінь набрякання, при цьому зберігає свою форму.

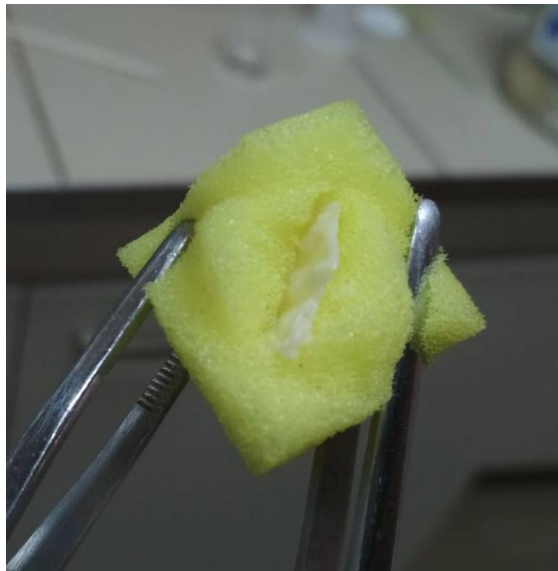


Рисунок 2.4 – Зовнішній вигляд зразку HA-Alg-Ca²⁺, через 1 добу експозиції.

2.2 Наноструктуровані апатит-полімерні композити: залежність кінетики вивільнення лікарського засобу від фінішної обробки матеріалу

В даному дослідженні ми синтезували новий наноструктурований композитний матеріал, який поєднує переваги Alg та ГА, а саме біоактивність, еластичність Alg та остеопровідність НА. Частина роботи

присвячена дослідженню наноструктурних композитних матеріалів на основі ГА та Alg з вмістом лікарського засобу - хлоргексидину біглюконату (СН). Була проведена оцінка синтезованих композитів у якості систем доставки лікарського засобу та пролонгованого його вивільнення. Досліджено також залежність динаміки вивільнення лікарського засобу від вмісту Alg та способу підготовки матеріалу: сушіння при 37 ° С, ліофілізація, відпал при 1100 ° С з метою утворення керамічних скафолдів.

Методика формування композитів НА/Alg. Синтез був проведений з використанням 0,167 М тетрагідрату нітрату кальцію, 0,1 М дигідрофосфату діаммонію, за описаною раніше методикою [37]. Зразки готували з вмістом Alg, який по відношенню до НА складав: 10, 20, 30 і 40 мас.%. Розрахунок змісту Alg був здійснений на основі кількості теоретично отриманого ГА в результаті реакції синтезу. Alg розчиняли у 0,1 М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ при 37°C протягом 2 годин з наступною гомогенізацією. До утворено суспензії додавали краплями водний розчин кальцію нітрату тетрагідрату. Значення рН =10-11 досягали шляхом додавання гідроксиду амонію. Суміш нагрівали при 80 ° С протягом 10 хв із наступним зістарюванням протягом 24 годин при кімнатній температурі. Отриманий осад промивали дистильованою водою до нейтрального рН та центрифугували.

Для досліджень були підготовлені три групи зразків:

- а) висушені при температурі 37°C - (DNA, DNA/Alg10, DNA/Alg20, DNA/Alg30 та DNA/Alg40);
- б) ліофілізовані - (LHA, LHA/Alg10, LHA/Alg20, LHA/Alg30 та LHA/Alg40);
- в) відпалені при 1100 °С у формі керамічного скафолда - (CHA, CHA/Alg10, CHA/Alg20, CHA/Alg30 і CHA/Alg40). Цифрами позначений відсотковий вміст альгінату.

Методика отримання матеріалів у формі скафолдів.

Для отримання CHA/Alg зразків у формі керамічних скафолдів, 2% розчин Alg додатково додавали до НА/Alg зразків, синтезованих за

вищеописаною технологією, у ваговому співвідношенні HA/Alg: Alg = 1: 0,5. Карбонат натрію додавали у якості пороутворюючого реагента. Сформований у таблетки матеріал занурювали в 0,25 М розчину хлориду кальцію на 24 години для зшивання молекул альгінату іонами кальцію та утворення полімерної матриці. Зразки сушили при 37 ° С протягом доби, потім спікали при 1100°C для повного видалення Alg і отримання механічно стійких пористих керамічних скафолдів [38, 39]. Таким чином, в зразках CHA/Alg10, CHA/Alg20, CHA/Alg30 та CHA/Alg40 відсутні полімерні компоненти, а їхні назви відображають вміст альгінату при початковому синтезі. Такі скафолди потенційно придатні для застосування з механічним навантаженням.

У кожній групі представлені зразки, синтезовані без додавання полімеру, а саме: DNA, LHA, CHA. Вони використовувались як контрольні.

Формування композитних матеріалів з вмістом хлоргексидину HA/Alg/CH. Хлоргексидин був використаний як типовий лікарський засіб. Його часто застосовують в стоматологічній практиці як антибактеріальний засіб проти грампозитивних і грамнегативних бактерій і грибів. Він має здатність зменшувати кількість шкідливих бактерій у роті і працює для лікування гінгівіту та сприяє загоєнню запалених ясен. [40-42]. 0,05% розчин СН був введений у композити методом насичення. Композитний матеріал з масою 0,1 г, сформований у таблетки діаметром 5 мм, був занурений у 2 мл розчину СН протягом 15 секунд з подальшою сушкою при 37°C. При цьому позитивно заряджені молекули СН сильно адсорбуються на негативно заряджені Alg-функціоналізовані HA наночастинки за рахунок електростатичної взаємодії між бігуанідними групами хлоргексидину та карбоксильними групами Alg.

Схематичне зображення процесу синтезу та формування зразків приведено на рис.2.5.

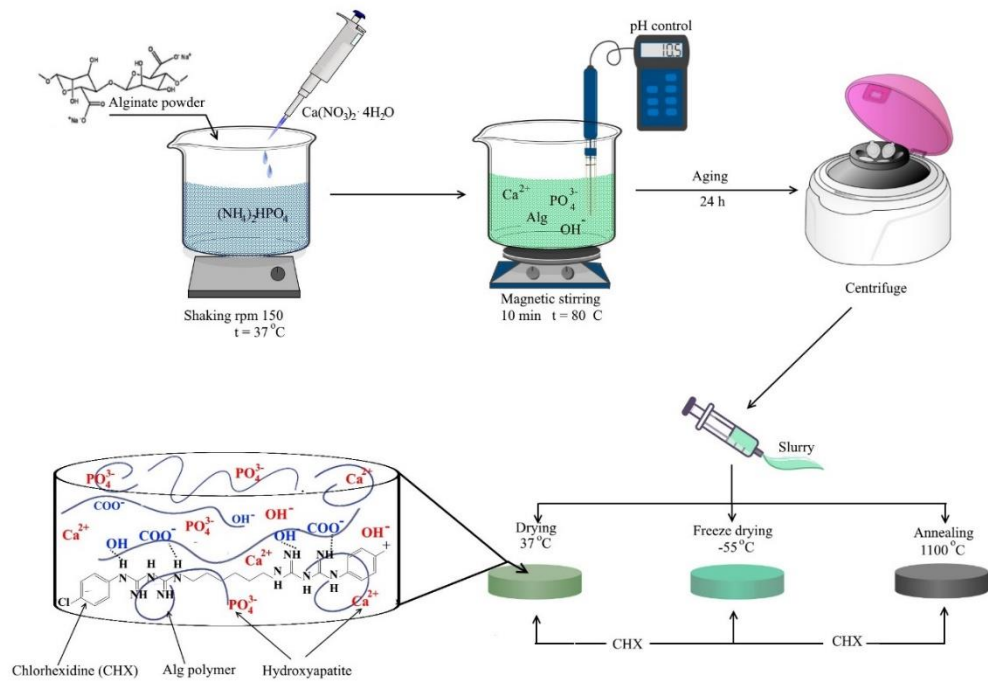


Рисунок 2.5 – Схема процесу отримання композитних матеріалів НА-Alg-CH.

ПЕМ дослідження. Мікроструктури композитів ДНА/Alg з мінімальним (10%) та максимальним (40%) вмістом Alg отримані за допомогою ПЕМ (рис.2.6, а, б відповідно). Кристаліти НА у складі є композиту є голкоподібними з середнім розміром близько 80 нм, але ДНА/Alg10 має вищу кристалічність та вищу щільність розташування кристалів.

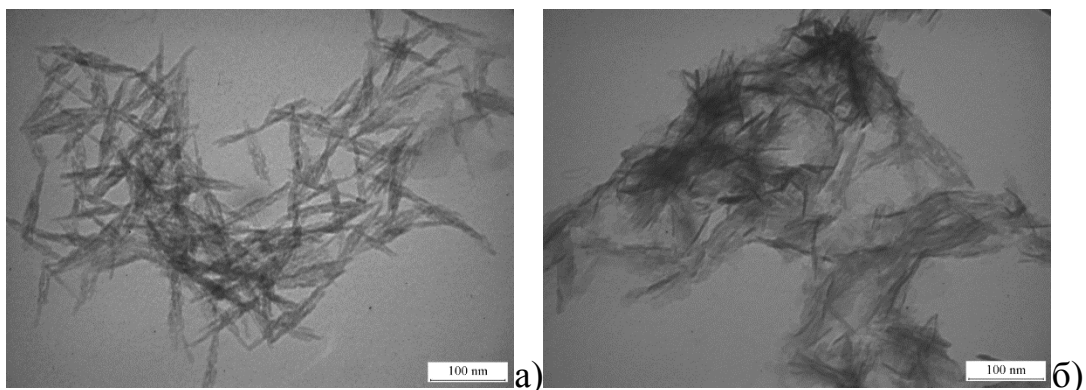


Рисунок 2.6 – ПЕМ зображення мікроструктури ГА в складі композитних :а)- ДНА/Alg10; б)- ДНА/Alg40.

XRD дослідження. Рентгеноструктурний аналіз (XRD) був використаний для визначення якості кристалітів НА у складі синтезованих композитів НА/Alg. Аналіз проводився після відпалу зразків при температурі 1100 °С протягом 1 год. Результати вказують на наявність лише однієї фази - НА JCPDS 84 1998 (рис.2.7).

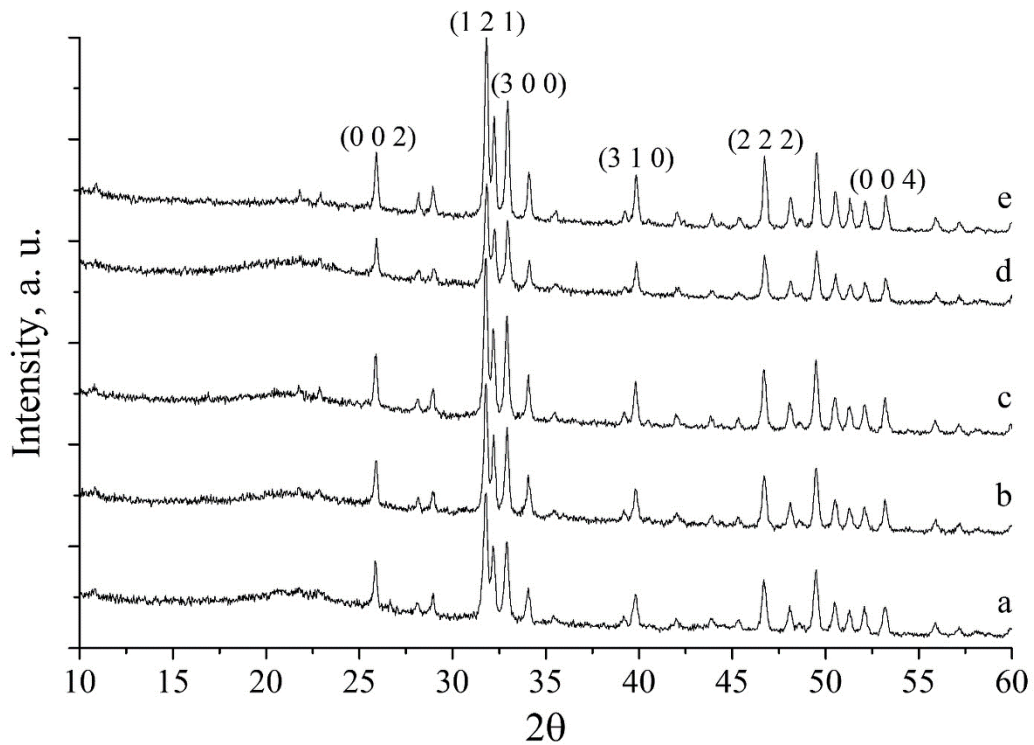


Рисунок 2.7 – XRD спектри від зразків CHA/Alg40 (a), CHA/Alg30 (b), HA/Alg20 (c), HA/Alg10 (d) та HA (e). Всі зразки відпалені протягом 1 години при 1100 °С.

Середні розміри кристалітів були розраховані за формулою Шерера для дифракційних піків (200), (121), (300), (310) та (222). Оскільки кристалічність зразків була достатньою, було визначено середній розмір кристалітів (L , нм) та рівень мікродеформацій (ϵ) у напрямку [00с], використовуючи пік (002) і (004) [33]. Параметри решітки a та c були розраховані в площинах (310) та (004). Отримані дані (табл. 2.1) показують, що збільшення змісту Alg призводить до зменшення середнього розміру кристалітів. Проте рівень мікродеформацій (ϵ) зростає з вмістом Alg.

Таблиця 2.1 – Параметри структури кристалітів НА у складі СНА/Alg з різним початковим вмістом Alg після відпалу при 1100 °С.

Зразок	Розмір кристалітів за Шеррером у напрямках, перпендикулярних до площин, позначених індексами Міллера, нм					Середній розмір кристалітів, нм та рівень мікродеформацій		Параметри кристалітів, нм	
	(002)	(121)	(300)	(310)	(222)	L, nm	$\varepsilon \cdot 10^3$	a	c
СНА	50.3	46.2	44.4	46.0	51.0	46.6	0.365	0.905	0.688
СНА/Alg10	55.4	41.5	42.8	42.8	44.5	50.8	0.401	0.904	0.688
СНА/Alg20	51.7	41.8	42.3	45.1	47.3	49.8	0.617	0.905	0.688
СНА/Alg30	47.8	42.7	41.3	43.6	41.6	43.6	0.654	0.905	0.688
СНА/Alg40	48.6	36.3	36.2	34.0	47.5	49.7	1.098	0.905	0.689

Дослідження SEM. На рисунку 2.8 показані SEM зображення поверхні всіх груп зразків, приготованих в різних умовах. Отримані зображення показують різні поверхневі структури зразків. Найбільш щільна морфологія відповідає композитному матеріалу, висушеному при 37°C; ліофілізований зразок має пористу морфологію; зразок керамічного НА скафолда має найбільш однорідну і пористу морфологію.

ІЧ дослідження. Інфрачервона спектроскопія з Фур'є перетворенням була використана для оцінки взаємодій між функціональними групами НА, Alg, СН. Спектри чистого алгінату натрію та НА були використані для порівняння. Спектри FTIR отриманих зразків показали характерні для присутніх компонентів вібраційні смуги (рис.2.9). Так, коливання при 3572 і 632 cm^{-1} відповідають валентній та лібраційній (νL) модам гідроксильної групи НА відповідно [43].

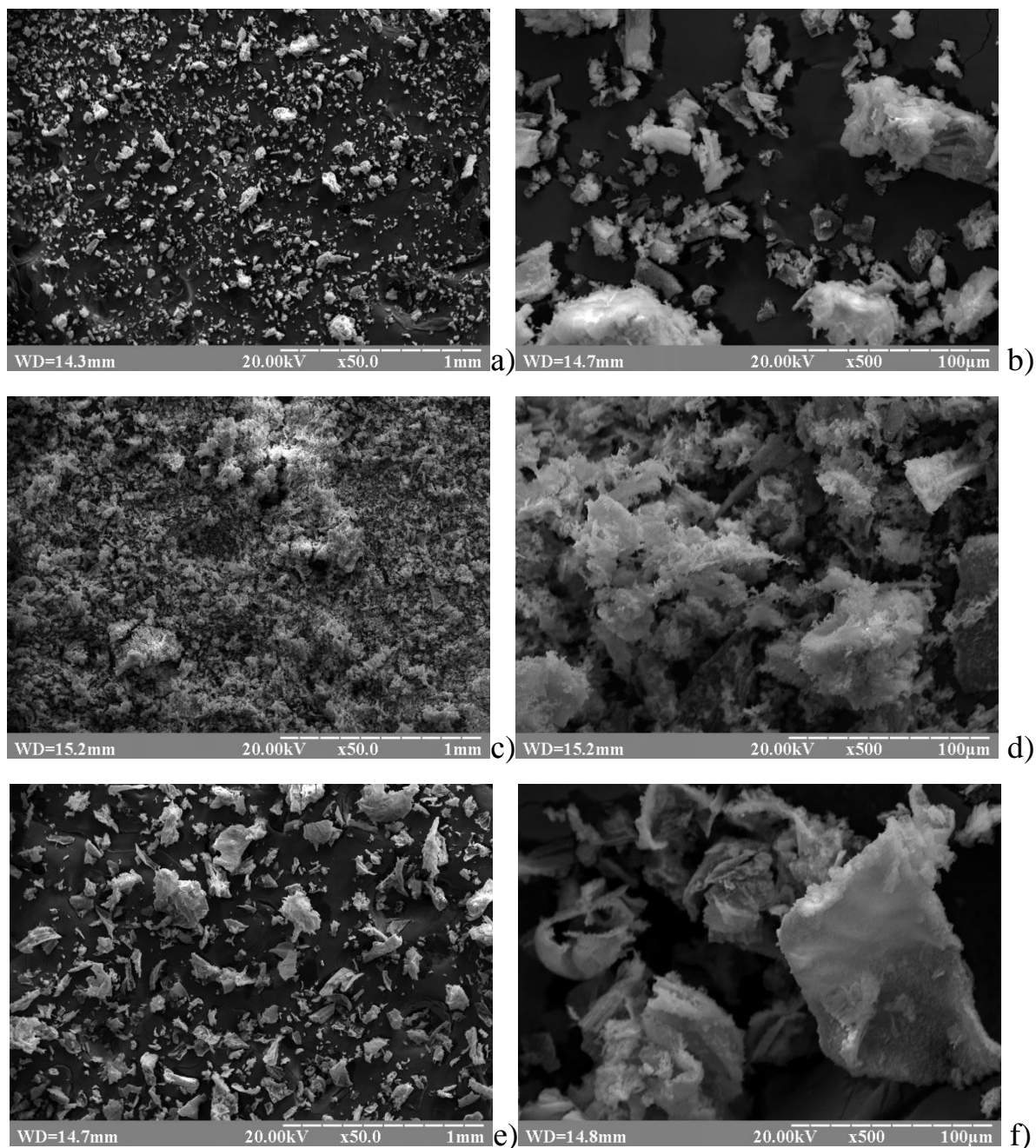


Рисунок 2.8 – СЕМ зображення поверхні зразків: висушених при 37 °С (а, б), керамічних скафолдів, відпалених при 1100 °С (с, d) та ліофілізованих при -55 °С (е, f) при різних збільшеннях (x50 та x500, відповідно).

Слід зазначити, що смуга ОН при 632 см^{-1} є слабкою для зразка ДНА. Це пояснюється наявністю карбонатних груп CO_3^{2-} , для якої смуга вібраційних коливань спостерігається при 1450 см^{-1} , та свідчить про утворення карбонат апатиту типу В [44]. Очевидно, що зсув смуги поглинання обумовлений

частковою взаємодією ОН іонів з CO_3^{2-} групами, які замістили групи PO_4^{3-} [45].

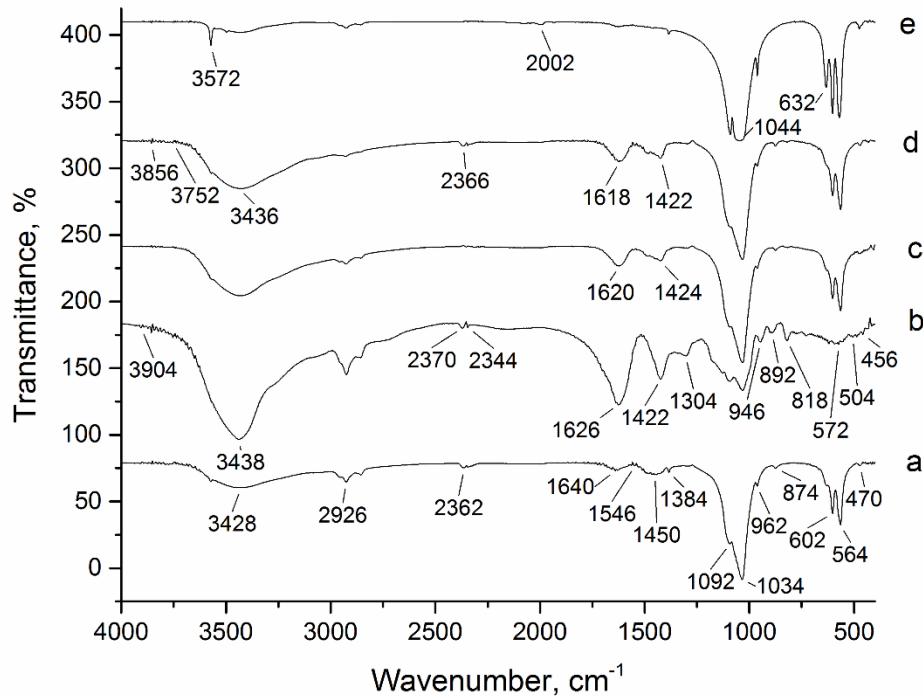


Рисунок 2.9 – FTIR спектри від зразків: НА (a), альгінат (b), композити DHA/Alg40/CHX (c), LHA/Alg40/CHX (d) and CHA/Alg40/CHX(e).

Зі збільшенням вмісту карбонатів, інтенсивність вібрації ОН зменшується. Смуга при 1625 cm^{-1} для цих зразків відповідає деформації молекул Н-О-Н, пов'язаних з НА [46]. Полоси у всіх спектрах при 1034 cm^{-1} відповідають тричі виродженим коливанням ν_3 зв'язку Р-О у фосфатній групі PO_4 в НА. Діапазони з частотою 962 cm^{-1} , 602 та 564 cm^{-1} також належать коливанням фосфатно групи гідроксиapatиту. [47]. Пік альгінату при 3437 cm^{-1} пов'язаний з коливаннями у зв'язках ОН-груп у вуглецевих кислотах [48]. Насичений пік при 1626 cm^{-1} приписується асиметричному вібраційному коливанню карбонілу $-\text{C}=\text{O}$ [49] у чистих спектрах альгінату і зміщується до 1618 cm^{-1} із збільшенням вмісту альгінату в зразках композитів. Смуга поглинання для чистого альгінату навколо 1422 cm^{-1} , що відповідає симетричним валентним коливанням COO -груп [50], значно зменшила

інтенсивність в спектрах композитів і змістилася до 1424 см^{-1} . Вібраційні смуги коливань для карбоксильних груп чистого альгінату при 1303 і 827 см^{-1} зникли в спектрах композитів. Можна припустити, що карбоксильні групи молекул альгінату іонізуються до COO^- -іонів і утворюють водневі зв'язки з НА при формуванні композиції НА/Alg. Після додавання СН всі піки, характерні для композитного матеріалу зберігаються у спектрах ІЧ поглинання, тому було висловлено припущення, що хімічних реакцій між НА/Alg та хлоргексидином не відбувається.

Дослідження ступеню набрякання та пористості. Для контролю стабільності форми НА/Alg композитів та їх здатності поглинати та зберігати в своїй структурі лікарські засоби в ході дослідження було визначено ступінь набрякання та пористість експериментальних зразків (Таблиці 2.2, 2.3). Дослідження показали, що ступінь набрякання для контрольних зразків без вмісту полімеру залежить від способу їх фінальної обробки та коливається від 10% для СНА до 494% для ЛНА. Наявність альгінату у структурі збільшує ступінь набухання композитів.

Таблиця 2.2 – Ступінь набрякання ДНА/Alg та ЛНА/Alg зразків.

Зразок	ДНА/Alg (висушені при $37\text{ }^\circ\text{C}$)					ЛНА/Alg (ліофілізовані при $-55\text{ }^\circ\text{C}$)				
	0	10	20	30	40	0	10	20	30	40
Вміст альгінату, %										
Набрякання, %	52,4	146	196	218	233	464	722	724	730	732

Таблиця 2.3 – Ступінь набрякання та пористість СНА зразків.

Зразок	СНА/Alg (відпалені при $1100\text{ }^\circ\text{C}$, в формі керамічних скафолдів)				
Вміст Alg, %	0	10	20	30	40
Набрякання, %	10.1	101.7	117.5	121.5	128
Пористість, %	30.6	35.7	36.7	37.8	39.0

Зразки групи CHA/Alg після процедури відпалу фактично не містять полімеру. Але їх набрякання залежить від початкового вмісту альгінату при синтезі та збільшується від 10 до приблизно 13 разів для CHA/Alg10 та CHA/Alg40 відповідно, у порівнянні з CHA, синтезованого без Alg (табл. 2.3). Пористість відпалених зразків збільшувалася з збільшенням вмісту альгінату, який додавався до материнського розчину при синтезі. Неможливо було точно визначити пористість зразків DNA/Alg та LHA/Alg, оскільки не стабільні за формою. Матеріали з високою пористістю мають розвинену поверхню, що збільшує швидкість всмоктування, тобто збільшує кількість адсорбованого лікарського препарату за одиницю часу та підвищує швидкість зворотного процесу - десорбцію препарату. Слід зазначити, що час експозиції в PBS до точки насичення (отримання постійної ваги) для зразків був різним. Крім того, стійкість до збереження форми для зразків зменшувалася із збільшенням вмісту альгінату. Зразки групи DNA/Alg були менш стабільними у порівнянні з іншими групами через порівняно високий початковий ступінь вологості в результаті присутності слабо зв'язаної структурної води в макромолекулах альгінату та гідратної води в кристалах НА. Ступінь набухання був значно вищим для ліофілізованих зразків (LHA/Alg) у порівнянні з іншими групами зразків через їх підвищену здатність поглинати рідину за відсутності структурних молекул води. Ці зразки мають найвищу пористість. Найбільша стабільність форми (місяць і більше) мали контрольні безполімерні зразки (DNA, CHA) і всі відпалені при 1100 °C (CHA/Alg), тоді як DNA/Alg і LHA/Alg почали втрачати свою форму після експозиції PBS протягом 1 хв і 5 хв, відповідно.

Дослідження методом ВЕРХ. Композити з трьох груп були занурені в PBS та знаходились в шейкері протягом 120 годин при 37 ° C і 115 об. / хв. Залежність вивільнення хлоргексидину із складу композитів від терміну перебування в фізіологічному розчині приведена на рис. 2.10-2.12.

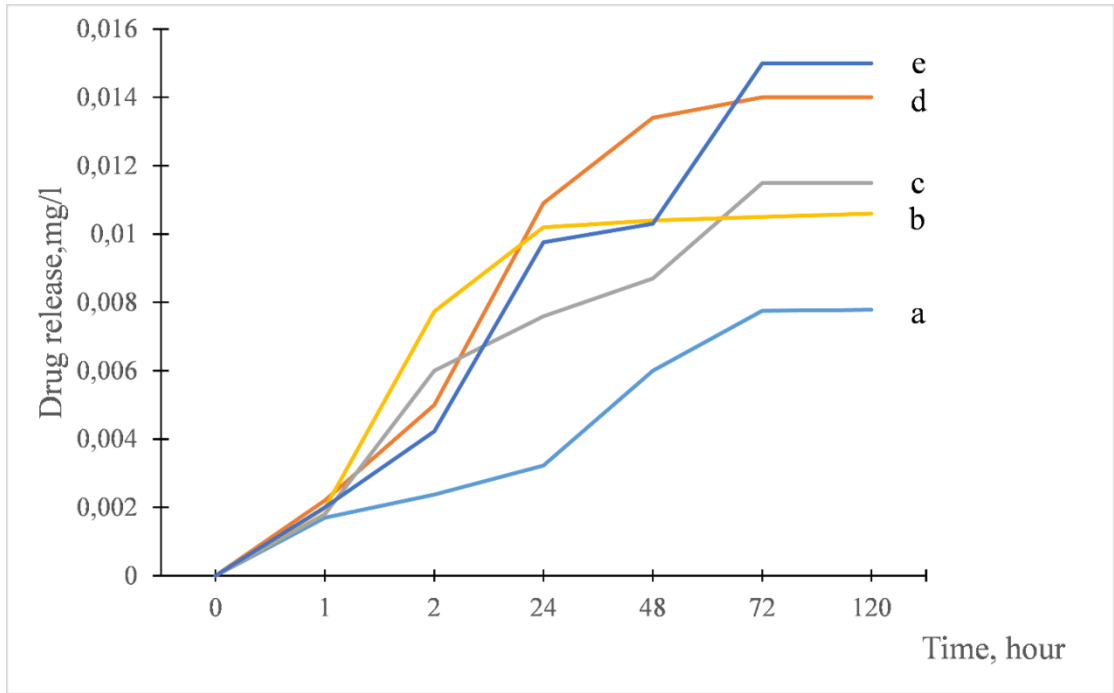


Рисунок 2.10 – Кінетика вивільнення СН з композитів DHA/Alg: (e) DHA/Alg40, (d) DHA/Alg30, (c) DHA/Alg20, (b) DHA/Alg10 and (a) DHA.

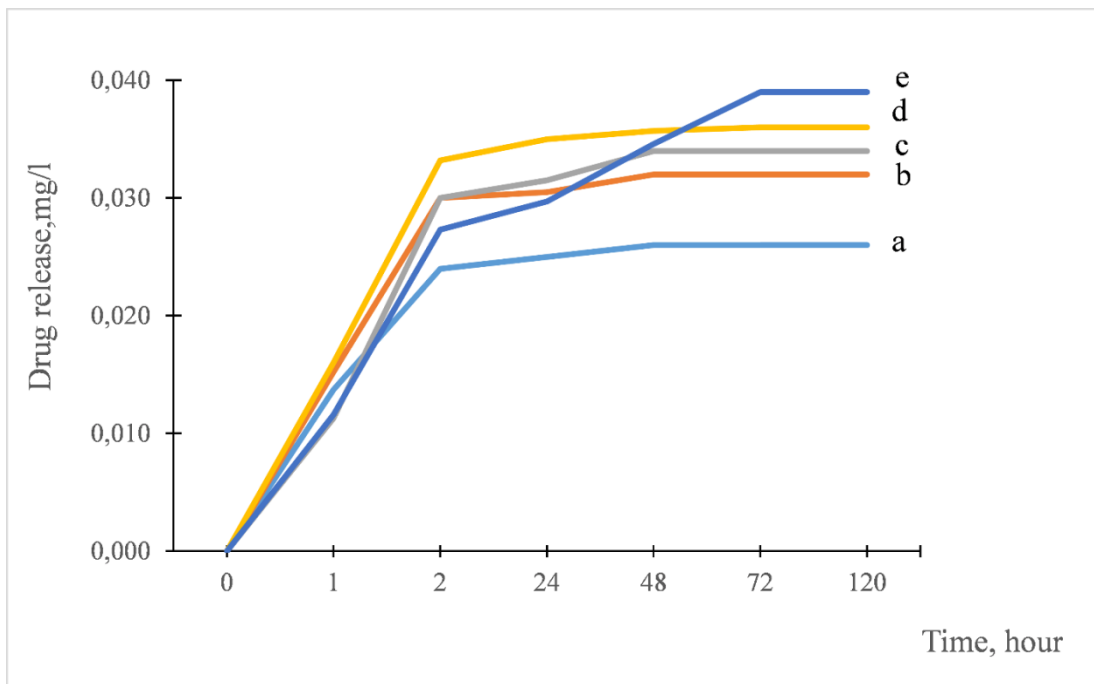


Рисунок 2.11 – Кінетика вивільнення СН з композитів LHA/Alg: (e) LHA/Alg40, (d) LHA/Alg30, (c) LHA/Alg20, (b) LHA/Alg10 and (a) LHA.

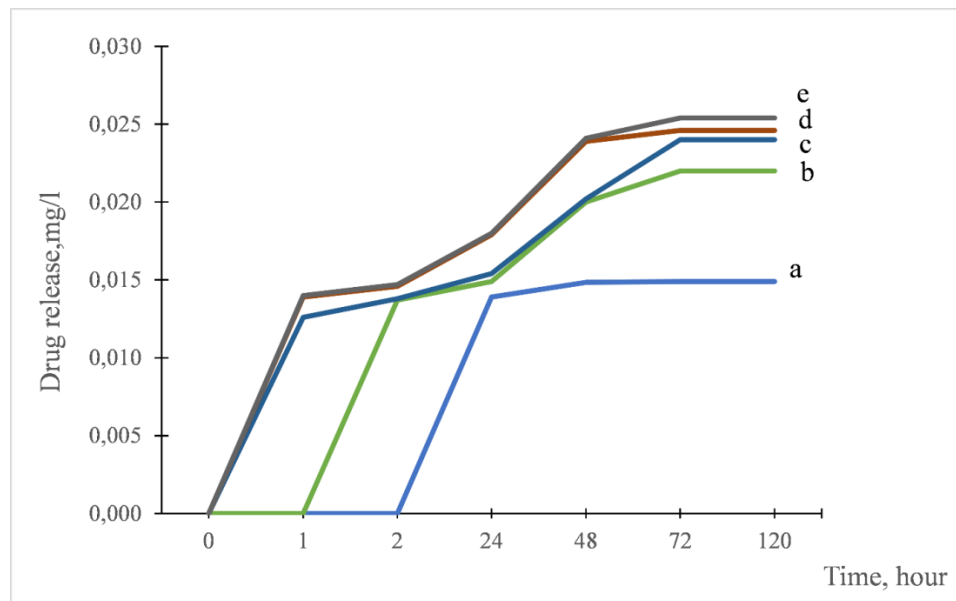


Рисунок 2.12 – Кінетика вивільнення СН з композитів CHA/Alg: (e) CHA/Alg40, (d) CHA/Alg30, (c) CHA/Alg20, (b) CHA/Alg10 and (a) CHA.

Як зазначалося вище, хлоргексидин вводили в експериментальні зразки, які мали форму спресованих таблеток шляхом їх насичення протягом 15 с. Отримані хроматограми показують, що кількість поглиненого лікарського препарату та швидкість вивільнення ліків для груп зразків різні. Для висушених при 37°C зразків (CHA/Alg група) вивільнення препарату відбувалося протягом 72 годин з найменшою середньою швидкістю 0,2 мкг/год серед зразків трьох груп і найменшою на кінець дослідження концентрацією в PBS - приблизно 0,015 мг/л. Адсорбція препарату у випадку висушених при 37°C зразків відбувається як за рахунок електростатичної взаємодії між позитивно зарядженими молекулами лікарського засобу та функціональними групами НА, так і через гідрофільність алгінатних макромолекул і здатність їх до набухання. Для ліофілізованих зразків виділення СН з композитів тривало 48 годин, за винятком LHA/Alg40 - 72 год. Для цієї групи зразків кількість виділеного препарату була найвищою. Кінцева концентрація в PBS становила приблизно 0,04 мг/л, а середня швидкість вивільнення - 0,83 мкг/год. Високорозвинена пористість поверхні ліофілізованих зразків та відсутність слабо зв'язаної води в структурі сприяли

високому ступеню всмоктування препарату. Це стало причиною найбільшого ступеню набухання ліофілізованих зразків. Вивільнення препарату зі зразків групи CHA/Alg тривало 72 години. Середня швидкість вивільнення становила 0,35 мкг/год, а кінцева концентрація СН в PBS була максимальною в експерименті і становила 0,025 мг/л. Для зразків без вмісту полімерів виділення СН відбувалося від 2 до 24 годин зі швидкістю 0,6 мкг/год, а максимальна кінцева концентрація СН у середовищі становила 0,015 мг/л.

Як ми бачимо з отриманих даних, виділення СН сильно залежить від типу кінцевої обробки матеріалу. Ці результати можуть бути корисними для забезпечення антибактеріальної активності композитів. Справді, у випадку композитів D-типу (37 ° C) зв'язані молекули води залишаються присутніми в структурі HA/Alg, дещо запобігаючи вивільненню лікарського засобу через зв'язування з ним Н-зв'язками. В результаті ми маємо максимальний час вивільнення (72 год.) та найнижчу кінцеву концентрацію лікарського засобу (0,015 мг/л) в PBS. У випадку L-типу (-55 ° C) обробки, рівень гідратації в HA/Alg є нижчим (більш ефективно випаровування під час сушіння), що викликає більш швидке (48 годин) вивільнення препарату з матеріалу та більш довгий час вивільнення препарату (72 год.). Більш тривалий час вивільнення хлоргексидину для зразка з високим змістом альгінату (LHA/Alg40), ймовірно, пов'язаний із збільшенням середнього розміру кристалітів та максимального рівня (1,098 проти 0,365 для HA) мікродеформацій (таблиця 2.1).

Найтриваліше вивільнення хлоргексидину (72 години) у випадку С-типу (1100°C) повністю зневоднених зразків, очевидно, обумовлене пористою керамічною структурою, утвореною в процесі випаровування молекул води та вигорання макромолекул альгінату.

Дослідження механічних властивостей зразка HA/Alg при стисненні-розтягуванні. Зразок HA/Alg отримано холодним пресуванням гранул у прес-формі з параметрами, наведеними у Табл. 2.3. Тиск пресування складав понад 100 МПа.

Таблиця 2.3 – Значення фізичних параметрів для зразка HA/Alg.

Зразок	Маса, мг	Товщина зразка, мм	Діаметр, мм	Густина зразка, г/см ³	Модуль Юнга, МПа
HA/Alg	87	2	5	0,89	~740

Для дослідження механічних властивостей зразка HA/Alg використовували оригінальне обладнання для вимірювання пружно-пластичних параметрів зразків при стисненні та розтягуванні, що складається з «ИМАШ – 20-78», операційного підсилувача, аналогово-цифрового перетворювача (АЦП) та персонального комп'ютера (ПК).

Модуль Юнга зразка HA/Alg визначали за низьких навантажень при його стисненні-розтягуванні (Рис. 2.13,А). Як бачимо, досліджуваний зразок HA/Alg має досить значний модуль Юнга (Табл.2.4), порівняний зі сталевим зразком - гайкою такого ж розміру (Рис. 2.13, Б).

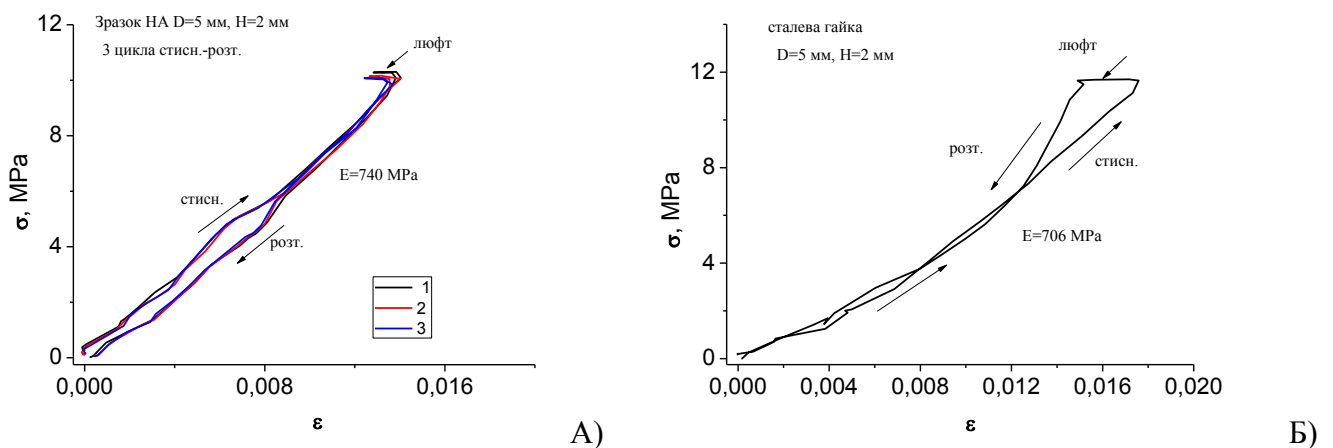


Рисунок 2.13 – Дослідження механічних характеристик зразків HA/Alg (А) і для порівняння - сталевій гайки (Б) за низьких навантажень при їх стисненні-розтягуванні.

Висновок:

У розробленому композитному матеріалі позитивно заряджений хлоргексидин сильно адсорбується на негативно заряджений функціоналізованій молекулами альгілату поверхні наночастинок НА, шляхом електростатичної взаємодії.

Три групи зразків (висушені при 37 ° С, ліофілізовані при температурі - 55 ° С та відпалені при 1100 ° С у формі керамічного НА скафолду) з різним вмістом альгілату показали відмінності в здатності адсорбувати та вивільняти СН.

Для всіх груп зразків зростання вмісту полімеру призводило до збільшення ступеню адсорбції СН та швидкості вивільнення лікарського засобу. Найвища концентрація вивільненого препарату в PBS протягом 72 год і максимальна швидкість вивільнення були у випадку ліофілізованих (0,04 мг/л і 0,83 мкг/год відповідно) зразків, а найнижчими (0,015 мг / л і 0,2 мкг / год) у випадку висушених при 37°С зразків.

Ступінь набрякання для контрольних безполімерних зразків залежить від методу їх виготовлення та становить від 10% для СНА до 494% для ЛНА. Для зразків з вмістом полімеру, найбільший ступінь набрякання 732% має ліофілізований ЛНА/Alg40.

Таким чином, отримані результати вказують на потенційне застосування наноструктурованих композитів НА/Alg/СН в біомедичних цілях, зокрема, для пролонгованого вивільнення лікарських засобів у стоматології.

3 Розробка біополімер-апатитних композитних матеріалів з іммобілізованими в їх структуру неорганічними наночастинками та іонами металів

3.1 Альгінат-апатитні матеріали з іммобілізацією MWCNT та Fe

В даному розділі описаний новий біологічно активний композитний матеріал на основі гідроксиапатиту та багатостінних вуглецевих нанотрубок, легуваних іонами заліза (MWCNT+Fe), який був синтезований методом "мокрої хімії" та детально досліджений сучасними інструментальними методами.

Матеріали. Наступні матеріали були використані: MWCNT+Fe наночастинки діаметром 20-80 нм, довжиною до 100 мкм, виготовлені за відомою технологією [51, 52] кальцій нітрат тетрагідрат $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, амоній дигідрофосфат $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, амоній гідроксид NH_4OH , кальцій хлорид CaCl_2 (Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd), натрій альгінат низької в'язкості (E407, China), фармацевтичний хлоргексидин (0,05%). Всі реагенти мали аналітичний ступінь чистоти та використовувались без спеціальної підготовки.

Отримання НА суспензії. На першій стадії суспензія НА була отримана методом «мокрої хімії» [10]. Коротко: для НА синтезу було використано 50 мл $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.167 М) та 50 мл $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.1 М). Значення $\text{pH}=10,5$ було досягнуто додаванням розчину аміаку. Реакція проходила при нагріванні суміші реагентів при 80 °С впродовж 10 хвилин з наступним зістарюванням протягом 24 годин. Після ретельного промивання деіонізованою водою, тверда фракція була відділена центрифугуванням. Вологість отриманої суспензії НА складала 90%.

Отримання Alginate/MWCNT+Fe суспензії. 0,7г альгінату натрію було розчинено в 50 мл деіонізованої води при 37° С протягом 5 годин для отримання 1,5% суспензії альгінату. MWCNT+Fe у формі дрібнодисперсного порошку було додано до суспензії альгінату для отримання концентрації 0.05

mg/ml. Суміш була оброблена ультразвуком низької потужності протягом 20 хвилин. В результаті була отримана гомогенна стабільна суспензія Alg/MWCNT+Fe.

НА-Alginate та НА-Alginate/MWCNT+Fe в формі гранул. Alg/MWCNT+Fe суспензія була додана до НА суспензії, після чого утворена суміш була гомогенізована ультразвуком протягом 10 хвилин. Таким чином, в отриманій суміші співвідношення сухого порошку MWCNT+Fe до сухого порошку НА склало 0.4 mg:1 g. Суміш була диспергована у водному розчині 0.25 М кальцію хлориду протягом 2 годин, після чого утворені гранули були відділені від розчину фільтрацією, ретельно промиті деіонізованою водою та висушені при кімнатній температурі. В подальшому зразки були названі НА-Alg/MWCNT+Fe.

Для порівняння фізичних та хімічних властивостей, зразки у формі гранул були отримані за обома вище описаними технологіями, але без вмісту MWCNT+Fe. Ці зразки були контрольними і названі НА-Alg(37). Відпалена при 700 ° С протягом 1 години частина цього зразку була названа НА-Alg (700) і використана для подальших досліджень.

Результати та обговорення. SEM-зображення поверхні зразків НА-Alg/MWCNT+Fe та НА-Alg демонструє рис 3.1. Отримані зображення показують, що зразки відрізняються за структурою поверхні. Більш щільну і однорідну поверхню мають НА-Alg/MWCNT+Fe зразки в порівнянні з НА-Alg.

Дослідження XRD були проведені для зразків НА-Alg та НА-Alg MWCNT + Fe. При утворенні композитного матеріалу до попередньо синтезованого ГА додають суспензію Alg/MWCNT+Fe, яка не впливає на утворення кристалітів та структуру НА. Тому рентгенівські дифрактограми приведені для зразка НА-Alg, висушеного при температурі 37°C, рис.3.2, (1) та відпаленого при 700°C (рис.3.2).

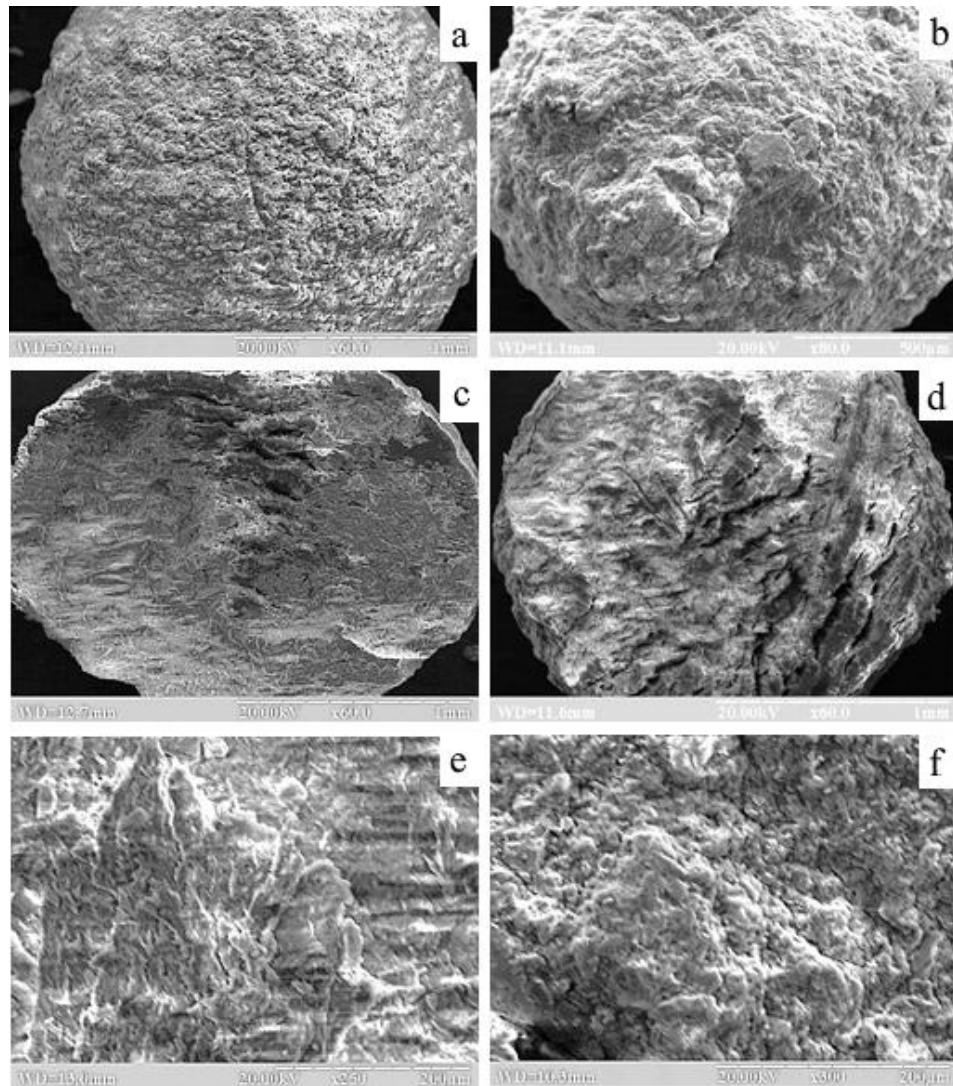


Рисунок 3.1 – СЕМ зображення: поверхня гранули HA-Alg/MWCNT+Fe - a); - HA-Alg - b); розріз гранули HA-Alg/MWCNT+Fe – c), HA-Alg – d); ділянка розрізу HA-Alg/MWCNT+Fe – e), HA-Alg – f).

За даними XRD, зразок HA-Alg містить нанорозмірні частинки, про що свідчать розширені рефлекси на дифрактограмі. Після спікання зразка при $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ було відзначено утворення монофазного кальцій фосфату апатитного типу, а саме кальцій дефіцитного HA (номер PDF: 000-86-1201) та підвищення ступеня його кристалічності. Розрахунок a та c параметрів кристалічної ґратки показав їх значно нижчі значення (табл.3.1) у порівнянні з відповідними даними для стехіометричного гідроксиapatиту ($a = 0,9421\text{ нм}$; $c = 0,6881\text{ нм}$).

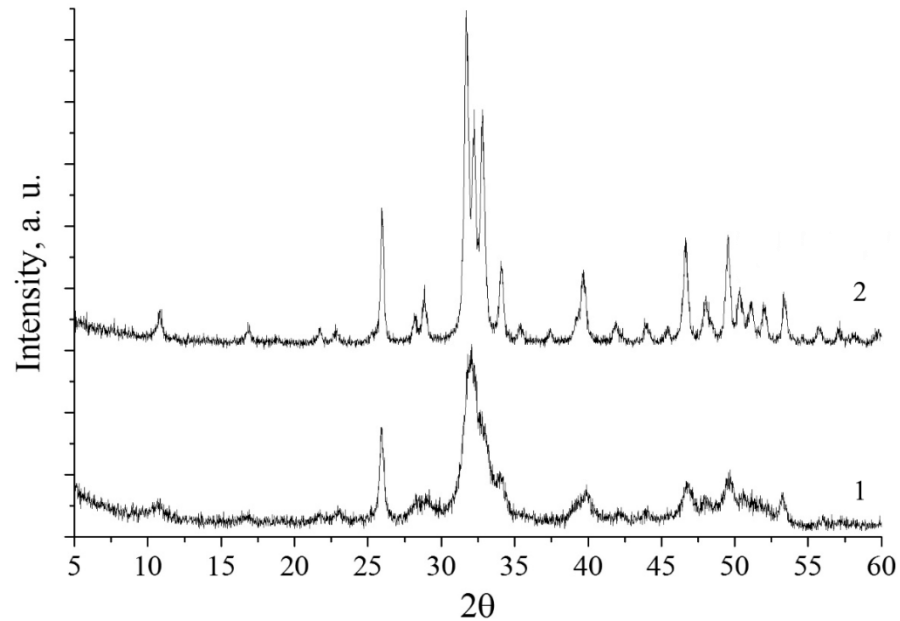


Рисунок 3.2 – Рентгенівські дифрактограми від зразків НА-Alg: висушеного при 37 °С (1) та відпаленого при 700 °С (2).

Таблиця 3.1 – Структурні параметри кристалітів у НА-Alg зразках, висушених при 37°С та відпалених 700 °С.

Sample	Розмір кристалітів за Шеррером, нм							L_{CSR} , нм	ϵ , 10^{-3}	a, нм	c, нм
	(002)	(211)	(112)	(300)	(202)	(401)	(213)				
37 °С	25.5	–	–	–	–	–	–	23.0	1.839	0.9354	0.6881
700 °С	37.4	28.7	25.9	26.3	37.4	29.7	35.2	33.8	0.497	0.9373	0.6865

Можна припустити, що карбонатні іони з реактивного розчину були адсорбовані поверхнею НА в процесі синтезу та ввійшли до його структури. Подальші дослідження методом RFA показали, що був отриманий кальцій дефіцитний гідроксиапатит ($Ca/P = 1,52$). FTIR-дослідження підтвердили отримання карбонатвмісного НА. З літературних джерел [53] відомо, що карбонатапатит типу В характеризується зменшенням параметра решітки a . Крім того, є прямі докази того, що кальцій дефіцитний НА містить іони PO_4^{2-} та дефіцит іонів OH. Попередній факт підтверджується спектрами FTIR зразків, де лібраційна смуга коливань OH-груп в НА при 630 cm^{-1} є низькоінтенсивною і перекривається іншими коливаннями. Значення

мікродеформацій (ϵ) вища в зразку, висушеному при 37°C внаслідок присутності органічного компонента.

ІЧ дослідження. Аналіз проводили для встановлення різних функціональних груп у фосфатах та карбонатних заміщеннях у створеному НА, а також взаємодії між функціональними групами НА, Alg та MWCNT+Fe у створених композитах.

ІЧ спектри реєстрували за допомогою спектрофотометра Perkin-Elmer ВХ-П з роздільною здатністю 1 cm^{-1} у діапазоні $(4000-400)\text{ cm}^{-1}$. Створений порошок відповідних зразків засипали в агатовий розчин і ретельно змішували з KBr (1 мг порошкоподібної досліджуваної проби змішували зі 100 мг порошку KBr).

Характеристичні смуги ІЧ коливань в експериментальних зразках наведені на рисунку 3.3. Для порівняння наведено додаткові дані про коливання функціональних груп в зразках чистого НА та чистого Альгінату (табл. 3.2).

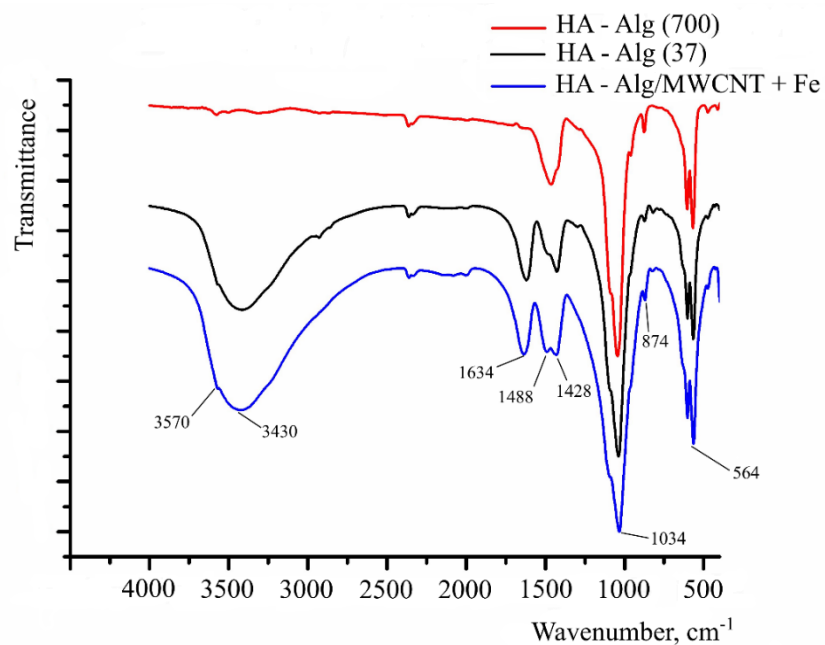


Рисунок 3.3 – FTIR спектри від зразків знизу -вверх: HA-Alg/MWCNT+Fe, HA-Alg37 and HA-Alg700.

Одержані дані для експериментальних зразків свідчать, що основні смуги коливань у всіх спектрах належать НА. Широка смуга з піком при 3570 см^{-1} відноситься до розтягувальної (ν_s) моди гідроксильної групи OH^- . Широка смуга в інтервалі $3430\text{-}3416\text{ см}^{-1}$ асоціюється з поглинанням молекул води. Смуги у всіх спектрах при 1038 та 1034 см^{-1} відносяться до коливань триплетно виродженого (ν_3) зв'язку P-O фосфатної групи PO_4^{3-} у НА. Смуги при $960\text{-}962\text{ см}^{-1}$ відносяться до невиродженої моди ν_1 (згин) P-O зв'язку. Піки при 602 та 564 см^{-1} відносяться до трикратно виродженої моди ν_4 (згин) O-P-O зв'язку.

Чистий Alg представляє дві характерні смуги поглинання - 1626 та 1422 см^{-1} , що відповідає асиметричному та симетричному розтягувальним коливанням COO^- груп, відповідно. Смуга при 1640 см^{-1} для чистого зразка НА відповідає деформаційним коливанням Н-О-Н молекул. Відокремлений пік при 1626 см^{-1} відноситься до асиметричного розтягувального коливання карбонілу -C=O у чистому Alg. Деякі коливання мають місце при 1614 см^{-1} у НА-Alg та при 1634 см^{-1} у НА-Alg/MWCNT+Fe. Смуга поглинання для чистого Alg при 1422 см^{-1} , що відповідає симетричному розтягувальному коливанню COO^- групи, зміщується до 1430 і 1428 см^{-1} у спектрах НА-Alg і НА-Alg/MWCNT+Fe, відповідно. Пік при 2924 см^{-1} для Alg, який пов'язаний з розтягувальними коливаннями зв'язків OH^- груп у вуглекислотах, зміщується до 2928 см^{-1} у НА-Alg і зникає у спектрі НА-Alg/MWCNT+Fe. Можна припустити, що карбоксильні групи молекул Alg іонізуються до COO^- іонів та формують водневий або інший зв'язок під час утворення НА-Alg композиту. Відсутність у відпаленому при $700\text{ }^\circ\text{C}$ зразку НА-Alg смуги близько 1600 см^{-1} , пов'язаної з коливанням у функціональних групах органічного компонента, узгоджується з даними термогравіметричного аналізу.

Таблиця 3.2 – Характеристичні інфрачервоні смуги коливань у зразках НА, Alg та MWCNT+Fe вмісних зразків.

НА-Alg (37 °C)	НА-Alg (700 °C)	НА- Alg/MWCNT +Fe	Alg	НА	
476	472	472			ν_2 O-P-O in PO_4
564	570	564	572	564	ν_4 PO_4
600	602	604		602	ν_4 PO_4
-	-	-		630(сл.)	ОН лібраційна мода
872	876	874			ν_2 CO_3^{2-}
960	958	-		962	ν_1 P-O у PO_4
1038	1042	1034		1044	ν_3 P-O у PO_4
1090	1092	1096		1092	ν_3 PO_4
1430	-	1428	1422	-	COO валентні сим.
-	-	1488		-	C=C вал.
1614	-	1634	1626		ν_2 H-O-H; -C=O
2340	2334	2336			ν_2 CO_2
3416	-	3430	2924		ОН вал.
3570	3576	3570	3438	3428	ОН вал.

Дослідження TGA/DTA. При вивченні теплової поведінки зразка при нагріванні до 600° С було відзначено дві зони втрати маси: в інтервалі температур до 100 ° С (видалення води, наявність якого підтверджено даними спектроскопії FTIR) і в інтервалі 200-400 ° С (близько 10%, видалення органічного компонента) (рис.3.4).

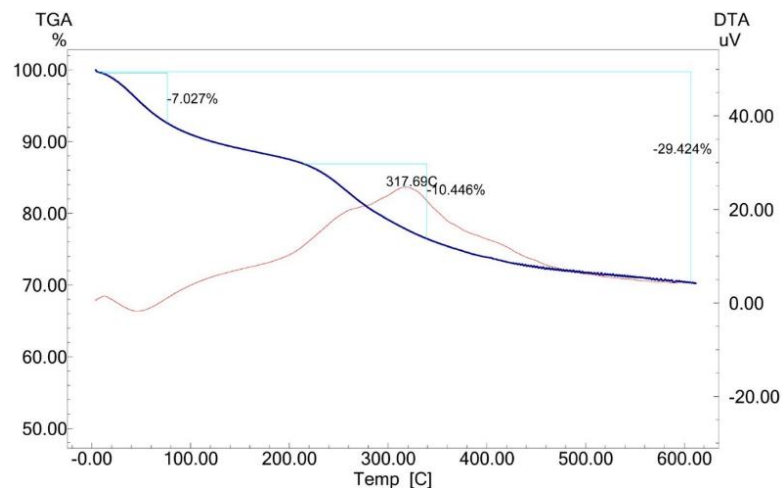


Рисунок 3.4 – Результат TGA/DTA аналізу зразків НА-Alg.

Це добре узгоджується з літературними даними [54, 55], які свідчать, що адсорбована вода втрачається після нагрівання при температурі від 25 до 120 °С; структурна вода - від 120 до 300 °С; втрата карбонатних та органічних компонентів починається при 550 °С.

Ступінь набрякання. Для того, щоб дослідити стабільність форми експериментальних зразків та їх здатність поглинати лікарський засіб, визначали ступінь набрякання експериментальних зразків у PBS. Дані представлені в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 – Ступінь набрякання експериментальних зразків.

Зразок	Набрякання, % та час експозиції	
	1 год	3 год
HA-Alg	54	68
HA-Alg/MWCNT+Fe	58	90

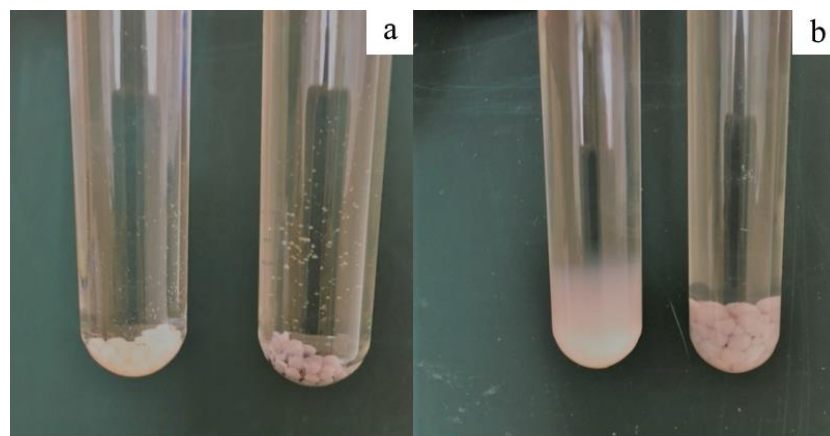


Рисунок 3.5 – Зовнішній вигляд зразків HA-Alg (ліві пробірки) та HA-Alg/MWCNT + Fe (праві пробірки): а) відразу після експозиції в PBS; б) через 7 днів коливання в шейкері в PBS при 37 ° С.

Незважаючи на те, що результати експерименту показали більш високий ступінь набухання зразків з вмістом вуглецевих трубок, ці зразки показали більшу стабільність форми під впливом механічних коливань у порівнянні з HA-Alg (рис.3.5). Гранули HA-Alg/MWCNT + Fe зберігали

стабільність форми навіть після 7 днів струшування. У той же час, гранули HA-Alg після двох днів перебування в зазначених технологічних умовах стали втрачати свою форму і через 7 днів вони набули форми колоїдного розчину (рис.3.5, б). Ці результати пояснюються тим, що, коли порошок MWCNT+Fe вводять у композитний матеріал під час синтезу, відбуваються поліелектролітні реакції між Alg, HA та MWCNT+Fe. У цьому випадку збільшення швидкості зшивання забезпечує більш стабільну форму гранул. Таким чином, здатність гранул HA-Alg підтримувати свою структурну цілісність підвищується при додаванні MWCNT+Fe.

Дослідження біоактивності. Тести на біоактивність проводили шляхом замочування зразків у PBS з рН = 7,47. Скляні пробірки з 0,2 г кожного зразка у формі гранул струшують у 10 мл PBS у шейкері із швидкістю 60 об/хв при 37°C. Значення рН вимірювали через певні проміжки часу. Результати дослідження представлені на рис.3.6. Чистий PBS використовували як контроль.

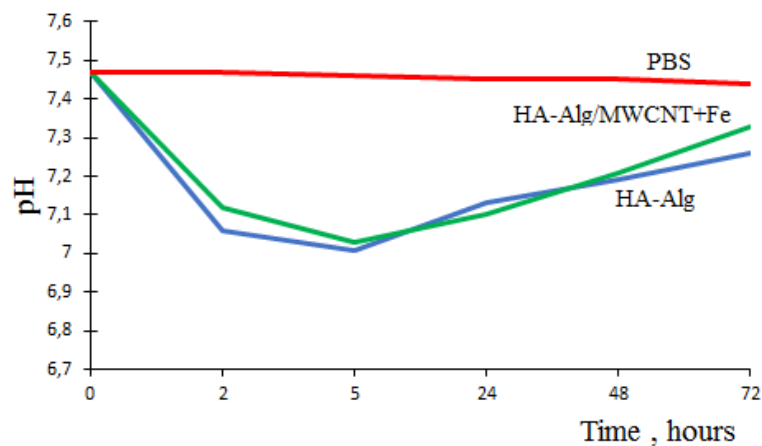


Рисунок 3.6 – Динаміка зміни значень рН внаслідок занурення зразків у PBS.

Тест на біоактивність показав, що рН контрольного PBS (без експериментальних зразків) залишався незмінним протягом експерименту (рис.3.6). У той же час значення рН PBS з зануреними зразками змінювалися

протягом всього експерименту, що вказує на їх біологічну активність, яка залежить від розмірів кристалітів, розмірів зерна, форми та дефектів кристалічної ґратки. Зниження значень рН для зразків НА-Alg і НА-Alg/MWCNT+Fe протягом перших 5 годин може бути пов'язане з наявністю аморфної фази фосфату кальцію (АФК) та її перетворенням у стабільну НА фазу, що викликає вивільнення кислого іону HPO_4^{2-} [56]. Збільшення значень рН через 5 годин обумовлено частковим розчиненням поверхні зразків та свідчить про високу реакційну здатність цих матеріалів. Ці факти узгоджуються з механізмами утворення нового апатитного шару на біологічно активній поверхні - обмін відбувається між Ca^{2+} і H^+ або H_3O^+ з розчину. Такі обміни провокують підвищення рН, що сприяє утворенню зародків апатиту [57]. Поступове збільшення значень рН може також бути пов'язане з наявністю карбонатних домішок [58]. У цьому контексті важливо зазначити, що наночастинки MWCNT+Fe при застосованій концентрації в нашому експерименті не виявили токсичного ефекту *in vitro* [59].

Дослідження динаміки вивільнення лікарського засобу. Для ВЕРХ дослідження були підготовлені зразки, що містять хлоргексидин (СН), як модельний лікарський засіб. СН проявляє протимікробну активність проти грамполозитивних і грамнегативних бактерій, факультативних анаеробів, аеробів і дріжджів [60]. СН був введений у композити методом насичення. Для цього 0,2г кожного зразка (НА-Alg і НА-Alg/MWCNT+Fe) занурювали в 4 мл розчину СН протягом 60 хвилин, після чого сушили при 37°C. Для того, щоб оцінити кінетику вивільнення СН, кожен препарат, що міститься у зразку, був поміщений у пробірку з 15 мл PBS. Пробірки зі зразками знаходились у шейкері (1150б/хв, температура 37°C) протягом 120 год. Кількість вивільненого СН визначали методом високоефективної рідинної хроматографії відносно часу інкубації (рис.3.7)

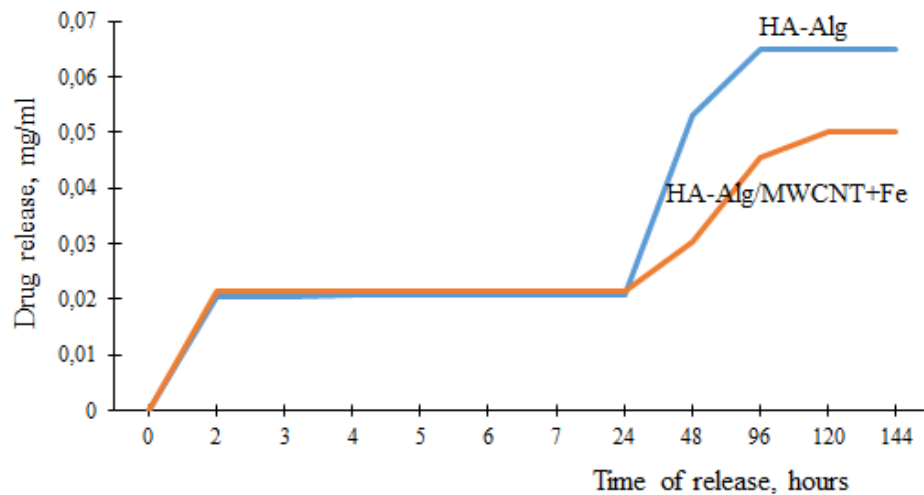


Рисунок 3.7 – Кінетика вивільнення СН гранул HA-Alg та HA-Alg/MWCNT+Fe.

На рис.3.7 ми спостерігаємо 3 основні стадії релізу СН: протягом перших 2 годин, протягом 24 годин, через 24 години. Рушійною силою процесу є градієнт концентрації СН в системі "композит (максимальна концентрація) - PBS (нульова концентрація)". Дослідження показали, що протягом перших 2 годин вивільнення препарату з обох зразків відбувається практично з однаковою швидкістю. Очевидно, що перша стадія вивільнення препарату обумовлена поверхневими молекулами СН, які мають меншу енергію зв'язування до поверхні композиту. Другий етап вивільнення препарату є результатом повільного обміну молекул СН з молекулами води PBS внаслідок набрякання зразка. Третя стадія інтенсивного вивільнення через 24 години коливань в PBS обумовлена частковим руйнуванням форми та структури композиту внаслідок максимальної гідратації, що призвело до збільшення здатності до дифузії лікарських засобів. Повне вивільнення препарату, поглинутого зразком HA-Alg, відбувалося протягом 96 годин. Вивільнення СН з HA-Alg/MWCNT+Fe тривало 120 годин. Швидкість вивільнення зі зразка HA-Alg вища, ніж у HA-Alg/MWCNT+Fe. Наявність MWCNT значно пригнічує цей процес, і час випуску препарату з HA-Alg/MWCNT+Fe подовжується. Це, очевидно, пов'язане з особливостями

механізму взаємодії поверхні MWCNT+Fe з СН. Здатність НА-Alg зберігати її структурну цілісність та стабільність форми підвищується при додаванні MWCNT+Fe (рис.3.5).

Дослідження механічних властивостей зразків НА-Alg та НА-Alg/MWCNT+Fe при стискуванні-розтягуванні. Для дослідження механічних властивостей одержаних зразків використовували оригінальне обладнання для вимірювання пружно-пластичних параметрів зразків при стисненні та розтягуванні, що складається з «ИМАШ–20-78», операційного підсилювача, аналогово-цифрового перетворювача (АЦП) та персонального комп'ютера (ПК).

Зразки отримано холодним пресуванням у формі таблетки діаметром 5 мм і товщиною 2 мм. Тиск пресування складав близько 100 МПа.

Механічні властивості одержаних композитів на основі НА представлені у таблиці 3.4 та на рисунку 3.8.

Модуль Юнга зразків визначали за низьких навантажень при їх стискуванні-розтягуванні (для трьох циклів, рис.3.8). Як бачимо, досліджуваний зразок НА-Alg/MWCNT+Fe має досить великий модуль Юнга ($E \sim 740$ МПа; Табл. 3.4), що можна порівняти зі сталевим зразком такого ж розміру ($E \sim 706$ МПа).

Таблиця 3.4 – Механічні властивості композитів на основі НА.

Зразок	Густина, г/см ³	Максимальна відносна деформація, ε_{destr}	Міцність σ_c , МПа	Модуль Юнга E , МПа
НА-Alg	0.89	0.25	118	570
НА-Alg/MWCNT+Fe	0.91	0.23	168	740

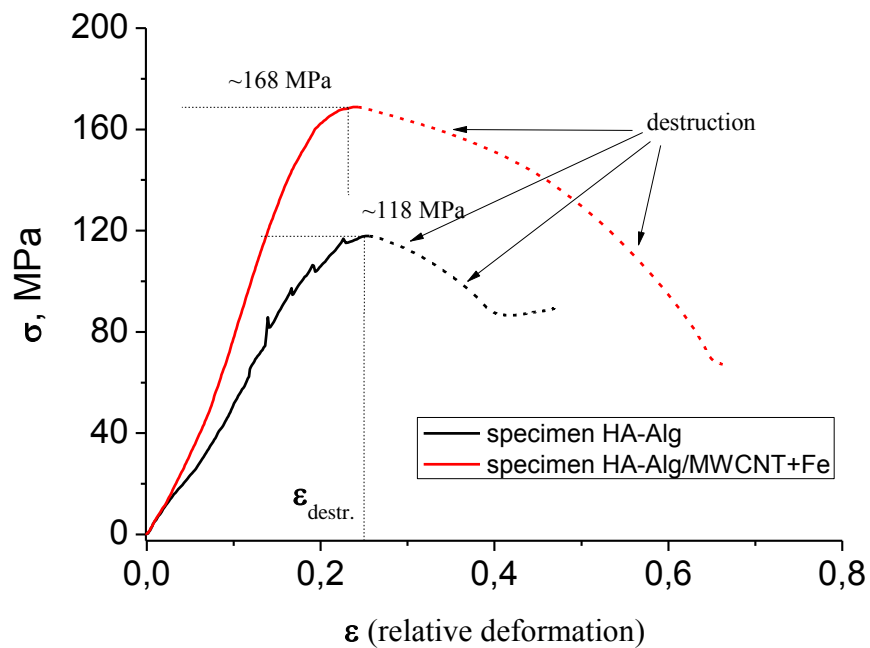


Рисунок 3.8 – Міцність σ_c для HA-Alg та HA-Alg/MWCNT+Fe зразків, виміряна за їх одноосного стискування.

Висновок:

Синтезований новий полімер-апатитний композиційний матеріал з вмістом багатостінних вуглецевих нанотрубок, легованих іонами заліза на основі поліелектролітної реакції між функціональними групами Alg, HA та MWCNT + Fe.

Введення MWCNT + Fe до складу композиту сприяє тривалому збереженню структурної цілісності гранул в умовах постійного коливання в фізіологічному розчині в шейкері (rpm 80) при 37°C.

MWCNT + Fe пролонгують на 24 години вивільнення хлоргексидину із структури композиту в порівнянні з HA-Alg, що пов'язано з особливостями механізму взаємодії поверхні MWCNT + Fe з хлоргексидином

Підвищення міцності композитів HA-Alg/MWCNT+Fe в порівнянні з HA-Alg пояснюється зв'язуванням наночастинок MWCNT + Fe з матрицею HA-Alg, що призводить до ефективного перенесення навантаження на MWCNT+Fe.

Композитний матеріал відкриває можливість його використання в біоінженерії кісткової тканини для заповнення кісткових дефектів різної геометрії з функцією тривалого вивільнення препарату. Потенційно матеріал може бути використаний при 3D моделюванні ділянок кісткової тканини, які несуть механічне навантаження

3.2 Дослідження впливу мікрохвильового випромінювання (MW) на синтез та властивості композитних матеріалів з вмістом хітозану

Ідеальний імплантат повинен бути біологічно сумісним і мати відповідні механічні та мікроструктурні властивості. Поєднання механічних властивостей гідроксиапатиту та пластичності хітозану забезпечує композитному матеріалу біосумісність з нативним оточенням, пластичність, остеопровідність. Хітозан, особливо з низькою молекулярною масою, часто застосовується в біомедицині [61, 62]. Технологія синтезу кристалічного ГА під впливом MW є ефективною та короткотривалою, порівняно до класичних методів, які включають конвекційне нагрівання [10, 63-65].

У цьому дослідженні ми зосередили увагу на процесах синтезу ГА під впливом MW у присутності полімеру CS. Проведено порівняння оцінку властивостей HA/CS композитів, отриманих при різних MW потужностях.. Схема утворення композитних матеріалів приведена на рис 3.9.

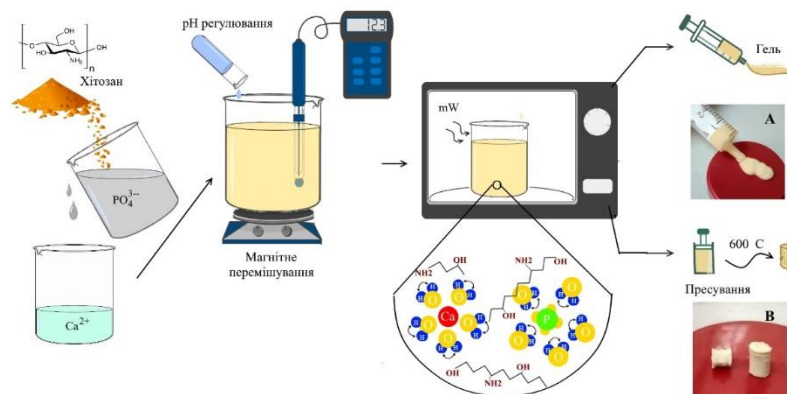


Рисунок 3.9 – Схема формування композитного матеріалу.

Висновок:

Вплив MW випромінювання значно скорочує формування композитів CS-НА. Вплив MW зменшує середній розмір кристалітів ГА, утворених у присутності хітозану. Зі збільшенням потужності MW середній розмір кристалітів ГА, утворених у присутності хітозану, зменшується від 31 нм (300 Вт) до 24 нм (800 Вт). Зі збільшенням потужності MW, ступінь набухання зразків збільшується від 40 до 55%, а пористість зменшується від 28 до 18%. Подібна залежність спостерігається при збільшенні вмісту альгінату в складі композиті. Плануються подальші дослідження композитних матеріалів НА/CS.

4 Дослідження біоактивності в модельних реакціях *in vitro*.

Вплив форми та складу композитних матеріалів на основі ГА з вмістом іонів Ag^+ , магнетиту Fe_3O_4 , цинку оксиду ZnO на цитотоксичність і біосумісність

Модифікація композитних матеріалів неорганічними біоактивними іонами є одним з сучасних підходів в медичному матеріалознавстві [36]. Мікроелементи в організмі людини, присутні в мізерних кількостях (“trace elements”) відіграють суттєву роль в регуляції клітинних функцій, активують чи пригнічують ферментативні процеси [66, 67, 29]. Крім метаболічних функцій, деякі, наприклад іони або наночастинки срібла, володіють ще й протимікробними властивостями [68, 69]. Одним з елементів є Zn , який бере участь в біосинтезі білків, стимулює адгезію і проліферацію остеобластів, а також формування кісткової тканини [70]. В ряді досліджень встановлено, що Zn та його оксид ефективно пригнічують ріст і розвиток бактерій та грибів [71-73]. Наноструктурований магнетит Fe_3O_4 є перспективним матеріалом, завдяки можливості його застосування в медичній практиці для адресної доставки лікарських засобів, а також для діагностики та лікування внаслідок гіпертермічної дії на клітини пухлин [74, 75].

В даній роботі синтезовані композитні матеріали на основі ГА, що включають іони срібла (Ag^+), частинки оксиду цинку (ZnO), магнетиту (Fe_3O_4), з метою дослідження їх цитотоксичності по відношенню до фібробластів NIH-3T3. Дослідження на культурі фібробластів доцільне тому, що при проведенні токсикологічних досліджень різних нових матеріалів їх в основному імплантують в підшкірно-жирову клітковину, тобто реакція організму опосередкована через систему сполучної тканини, основними структурними елементами якої є клітини фібробластичного диферону. Також в ході дослідження було вивчено вплив агрегатної форми біоматеріалу (гідрогель, гранули) на проліферацію клітинної культури.

Матеріали. Були використані наступні хімічні речовини виробництва фірми «Merck»: кальцій нітрат тетрагідрат ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), гідрофосфат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), натрій гідроксид (NaOH), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ класификации «ХЧ», кальцію хлорид CaCl_2 ; цинку нітрат ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, натрію альгінат (Alg) (E401) з молекулярною масою 15 кДа (виробник Китай).

Дослідження біосумісності та цитотоксичності були проведені Науковим інститутом проблем біології і біотехнології (Казахстан) за участю Казахського національного університету імені Аль-Фарабі. Для досліджень була використана культура клітин мишачих остеобластів та фібробластів NIH-3T3, отриманих з лабораторії біомедичної інженерії из лаборатории биомедицинской инженерии (Аахенський університет прикладних наук, Німеччина)

Отримання гідрогелю ГА (зразок ГА_Гель). Синтез гідрогелю був проведений під впливом ультразвуку. Для проведення синтезу ГА брали стартові компоненти, а саме 19.7г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ та 6.6г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ і кожний розчиняли в 500 мл дистильованої води. Розчин гідрофосфату амонію покрпельно (1мл/хв) додавали до розчину кальцій нітрату тетрагідрату, при цьому кінцева концентрація кальцію та фосфору складала 0.167М та 0.1М відповідно. Величина рН =10,5 досягалась додаванням 40 мл 25% розчину аміаку до суміші реагентів при перемішуванні. Молярне співвідношення Са/Р в розчині дорівнювало 1.67, як у випадку стехіометричного НА. Після перемішування компонентів і доведення рН до заданого рівня, 400 мл реакційної суспензії було перенесено в мікрохвильову піч Samsung M1712NR та піддано впливу мікрохвильового випромінення потужністю 300 Вт протягом 3 хвилин, а потім потужністю 450 Вт протягом 5 хвилин. Після охолодження зразок був промитий дистильованою водою до нейтральні реакції. Тверду фракцію відділяли центрифугуванням. В результаті був отриманий гідрогель ГА вологістю біля 85% (в подальшому взразок ГА_Gel).

Отримання гідрогелю ГА з вмістом іонів срібла (зразок ГА_Ag⁺_Gel).

На першому етапі синтезу до 15,7г нітрату кальцію було додано 4,0 г нітрату срібла. В подальшому синтез був проведений згідно вище описаної технології. Отриманий продукт в подальшому буде розглянутий як зразок ГА_Ag⁺_Gel

Отримання гідрогелю ГА з вмістом оксиду цинку (зразок ГА_ZnO_Gel).

До 10 г гідрогелю ГА, було дисперговано 2,5 г порошку оксиду цинку, попередньо отриманого за відомою технологією [76]. Суміш була гомогенізована ультразвуком протягом 5 хвилин. Таким чином, вміст активної речовини (ZnO) в композиті склав 25 вагових %. В подальшому композит буде розглянутий, як зразок ГА_ZnO_Gel.

Отримання гідрогелю ГА з вмістом магнетиту (зразок ГА_Fe₃O₄_Gel).

До 10 г гідрогелю ГА було дисперговано 2,5 г порошку магнетиту, попередньо синтезованого за відомою в літературі технологією [77]. Суміш була гомогенізована ультразвуком протягом 5 хвилин. Таким чином, вміст активної речовини (Fe₃O₄) в композиті склав 25 вагових %. В подальшому композит буде розглянутий як зразок ГА_Fe₃O₄_Gel.

Отримання композитних матеріалів в формі гранул. До кожного з отриманих гідрогелей був доданий 2% альгінат натрію в ваговому співвідношенні 1:1, після чого суспензія була ретельно гомогенізована під дією ультразвука. Отримана суспензія була диспергована в 0,25 М розчині хлористого кальцію. Через 24 години утворені геометрично правильні кульки (гранули) були промиті дистильованою водою та висушені при температурі 37 °С. Розмір висушених гранул складає 2-2,5 мм. В подальшому зразки будуть названі наступним чином: гранули чистого гідроксиапатиту - ГА_Gr; гранули гідроксиапатиту з вмістом іонів срібла - ГА_Ag⁺_Gr; гранули гідроксиапатиту з вмістом оксиду цинку - ГА_ZnO_Gr; гранули гідроксиапатиту з вмістом магнетиту - ГА_Fe₃O₄_Gr.

Біосумісність композитних матеріалів in vitro оцінювали за наступними показниками: рівень життєздатності, адгезивні властивості, морфологія, проліферація і диференціювання клітин.

Цитотоксичність матеріалів оцінювали за ефективністю прикріплення до нього клітин.

На предмет цитотоксичності були досліджені експериментальні зразки на основі ГА з додаванням неорганічних іонів Ag^+ та частинок ZnO , Fe_3O_4 . Зразки представлені в 2-х агрегатних формах – гідрогелі та гранули (рис.4.1).

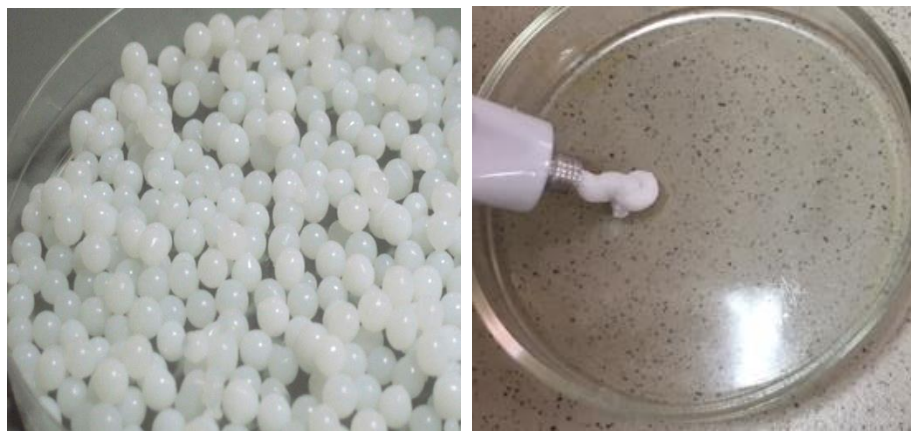


Рисунок 4.1 – Зліва- зразок ГА_Gr в вологому стані; справа – зразок ГА_Gel.

Дослідження відносно загиблих клітин та загальної кількості клітин в культурах проводилось на 3 та 5 добу після експозиції зразків в культуральне середовище. Кількісне визначення клітин було проведено методом виключення трипанового синього. В таблиці 4.1 приведені дані про результати дослідження.

Дослідження показали, що на 3-ю добу в культурах із зразками матеріалів і в контрольній культурі відмінностей не було виявлено. Клітини остеобалстного і фібробластичного дифферона нещільним шаром розташовувалися практично по всьому дну лунки планшета. До цього часу відзначалася значна кількість клітин з митозами. Фібробласти на склі мали

полігональну форму - довгасту, веретеновидную і зірчасту. Їх цитоплазма мала невеликі відростки. В ядрах більшості клітин визначалися 2-3 ядерця.

Таблиця 4.1 – Динаміка виживання і проліферації клітин в умовах контакту з дослідними зразками.

Зразок	3 доба		5 доба		Приріст загальної кількості клітин за 2 доби, %
	Загальна кількість клітин	Кількість загиблих клітин, в т.ч. в %	Загальна кількість клітин	Кількість загиблих клітин, в т.ч. в %	
Культура (контроль)	$1,98 \times 10^4$	$6,93 \times 10^2$ 3,5 %	$3,21 \times 10^4$	$1,96 \times 10^3$ 6,1 %	62,1
ГА_Gel	$1,56 \times 10^4$	$8,89 \times 10^2$ 5,7 %	$2,53 \times 10^4$	$1,72 \times 10^3$ 6,8 %	62,2
ГА_Ag ⁺ _Gel	$1,67 \times 10^4$	$6,85 \times 10^2$ 4,1 %	$2,53 \times 10^4$	$1,29 \times 10^3$ 5,1 %	51,5
ГА_ZnO_Gel	$1,46 \times 10^4$	$7,01 \times 10^2$ 4,8 %	$2,32 \times 10^4$	$1,37 \times 10^3$ 5,9 %	58,9
ГА_Fe ₃ O ₄ _Gel	$1,83 \times 10^4$	$7,69 \times 10^2$ 4,2 %	$2,95 \times 10^4$	$1,59 \times 10^3$ 5,4 %	61,2
ГА_Gr	$1,81 \times 10^4$	$1,41 \times 10^3$ 7,8 %	$2,96 \times 10^4$	$1,09 \times 10^3$ 10,9 %	63,5
ГА_Ag ⁺ _Gr	$1,79 \times 10^4$	$1,52 \times 10^3$ 8,5 %	$3,01 \times 10^4$	$3,37 \times 10^3$ 11,2 %	66,6
ГА_ZnO_Gr	$1,59 \times 10^4$	$1,14 \times 10^3$ 7,2 %	$2,66 \times 10^4$	$2,63 \times 10^3$ 9,9 %	67,3
ГА_Fe ₃ O ₄ _Gr	$1,92 \times 10^4$	$1,94 \times 10^3$ 10,1 %	$3,02 \times 10^4$	$3,90 \times 10^3$ 12,9 %	57,3

Структурна організація клітин свідчила про їх належність до молодих фібробластів. Відсоток загиблих клітин в контрольній культурі склав 3,5%, в дослідних культурах коливався в межах від 4,1% до 5,7% в разі гідрогелів і від 7,2 до 10,1% в разі гранульованих матеріалів. Встановлена кількість загиблих клітин в дослідних і контрольному зразках знаходиться в межах норми для первинних культур [69]. На 5-у добу культивування остеобластів і фібробластів зі зразками досліджуваних матеріалів відзначалося достовірне

підвищення щільності клітин в лунках як в контрольній культурі остеобластів і фібробластів, так і в дослідних, культивованих із зразками досліджуваних матеріалів.

За даними аналізу, кількість загиблих клітин в контрольній культурі склала 6,1%, а в дослідних культурах коливалася в межах від 5,1-5,9% (в разі гідрогелів), від 9,9% до 12,9% (в разі гранул), що не перевищує допустимих меж для первинних культур. Звертає на себе увагу той факт, що найбільша кількість загиблих клітин (12,9%) було зафіксовано для зразка з магнетитом GA_Fe3O4_Gr. Приріст клітин за період від 3 до 5 діб для цього зразка також найменший і складає 57,3%, в той час, як інші зразки з групи гранульованих мають приріст клітин від 63,5% до 67,3%. У групі гідрогелей приріст клітин за 2 доби близький до контролю, за винятком зразка GA_Ag⁺_Gel, для якого цей показник становить 51,5%.

Експериментальні дані показують, що поведінка остеобластів і фібробластів залежить від структури зразка і змінюється при переході від гелів до гранул. Так, в разі гелів характерно менша кількість загиблих клітин, але і менший ступінь їх проліферації в період від 3 до 5 діб перебування в контакті із зразками. У разі зразків у формі гранул збільшується кількість загиблих клітин, але їх проліферація трохи вища в порівнянні з гелями. Даний факт можна пояснити наступним: гідрогелі мають більш розвинену поверхню ГА, що передбачає більш високий рівень контакту частинок гідроксиapatиту і клітин. Отже, ГА сприяє виживанню клітин. У разі гранульованих зразків, контакт клітин з ГА відбувається тільки на поверхні гранул, що зменшує ступінь виживання. З іншого боку, на поверхні гранул розташовані макромолекули альгінату натрію, який, як відомо, є живильним середовищем для проліферації клітин. Тому спостерігається більш високий приріст клітин протягом 2 діб, що є підтвердженням цієї гіпотези. Очевидно, що іони Ag⁺ і частинки неорганічного походження (ZnO, Fe₃O₄) також впливають на поведінку фібробластів. Однак, концентрації цих іонів і

речовин, що застосовуються в досліджуваних зразках, не виявляють негативного впливу на клітини.

Висновок:

Цитологічні характеристики остеобластів і фібробластів в культурах, збереження фенотипу клітин відповідно до термінів спостереження, приріст клітин в культурах, характер їх розташування, загальна кількість клітин в культурах і число деструктивно змінених і загиблих клітин свідчать про те, що культури фібробластів на 5-ту добу як в контрольних, так і в дослідних зразках знаходилися в стадії стабільного зростання, а наявність в живильному середовищі зразків досліджуваних матеріалів не здійснювало на клітини цитотоксичної дії. Дані факти є підтвердженням того, що досліджувані зразки матеріалів є біосумісними.

ВИСНОВКИ

1. Використання матеріалів з остеоінтегруючими та бактерицидними властивостями є важливою стратегією стоматології. В даному проекті розроблені методики синтезу наноструктурованих матеріалів у формі плівок на основі синтетичного кдГА у комбінації з природними біодеградуючим полісахаридом (альгінат натрію) з метою їх подальшого використання в стоматології.

✓ Синтезовані матеріали представляють собою тривимірну альгінатну гідрогелеву сітку, «зшиту» іонами Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , PO_4^{3-} , здатну імобілізувати та утримувати в своїй структурі наночастинки гідроксиапатиту

✓ Іони металів обрані для «зшивання» альгінатної матриці, оскільки вони сприяють зміцненню кісткової тканини, а Cu^{2+} , Zn^{2+} також відомі своїми антимікробними властивостями.

✓ Параметри технологічного процесу та вид кінцевої обробки впливають на фізико-хімічні властивості синтезованого продукту.

✓ Ліофільне висушування сприяє утворенню високопористого матеріалу у формі скафолда, в той час як висушування при кімнатній температурі призводить до утворення тонкої плівки;

✓ Час ліофілізації зразка об'ємом 2.5 мл не має перевищувати 5 годин.

✓ Змінюючи концентрацію доданих іонів металів можна регулювати форму отриманого матеріалу від плівки до скафолда.

✓ Застосування УЗ обробки гомогенізує структуру утвореного композиту.

✓ Матеріал з вмістом фосфатних та металічних іонів після висушування при температурі 25-37 °C набуває достатньої еластичності та властивостей, які надають перспективи використання у формі «чипів» для заповнення ясневих кишень при пародонтозі або аплікацій на ясна. Зразки

зберігають свою форму протягом 7 діб в імітованих ясневих кишнях при вологості 95% та є потенційним депо частинок ГА та лікарських засобів.

2. Розроблено композитний біоматеріал на основі гідроксиапатиту, альгінату натрію та хлоргексидину (СН), в якому позитивно заряджений хлоргексидин адсорбований на негативно зарядженій функціоналізованій молекулами альгінату поверхні наночастинок НА. Доведено, що:

- ✓ кінетика вивільнення СН залежність від вмісту Alg та методу фінішної обробки зразків;

- ✓ існують відмінності в здатності адсорбувати та вивільняти СН серед трьох груп зразків з різним вмістом альгінату: висушених при 37 ° С, ліофілізованих при температурі -55 ° С та відпалених при 1100 ° С у формі керамічного НА скафолду;

- ✓ зростання вмісту полімеру для всіх груп зразків збільшує ступінь адсорбції СН та швидкості вивільнення лікарського засобу. Найвища концентрація вивільненого препарату в PBS протягом 72 год і максимальна швидкість вивільнення спостерігались у випадку ліофілізованих (0,04 мг / л і 0,83 мкг / год відповідно) зразків, а найнижчі (0,015 мг/л і 0,2 мкг/год) у випадку висушених при 37°С зразків;

- ✓ Отримані результати вказують на потенційне застосування наноструктурованих НА/Alg/СН композитів в біомедичних цілях з різним терміном вивільнення лікарських засобів.

3. Синтезований новий полімер-апатитний композитний матеріал з вмістом багатостінних вуглецевих нанотрубок, легованих іонами заліза, на основі поліелектролітної реакції між функціональними групами Alg, НА та MWCNT + Fe. Доведено, що:

- ✓ введення MWCNT + Fe до складу композиту сприяє тривалому збереженню структурної цілісності гранул в умовах постійного коливання (шейкер, rpm 80) в фізіологічному розчині при 37°С.

✓ MWCNT + Fe пролонгують на 24 години вивільнення хлоргексидину із структури композиту в порівнянні з HA-Alg, що пов'язано з особливостями механізму взаємодії поверхні MWCNT + Fe з хлоргексидином

✓ підвищення міцності композитів HA-Alg/MWCNT+Fe в порівнянні з HA-Alg пояснюється зв'язуванням наночастинок MWCNT + Fe з матрицею HA-Alg, що призводить до ефективного перенесення навантаження на MWCNT+Fe.

✓ композитний матеріал відкриває можливість його використання в біоінженерії кісткової тканини для заповнення кісткових дефектів різної геометрії з функцією тривалого вивільнення препарату. Потенційно матеріал може бути використаний при 3D моделюванні ділянок кісткової тканини, які несуть механічне навантаження.

4. Розроблена методика синтезу композитних матеріалів на основі ГА та хітозану під впливом MW випромінювання. Доведено, що:

✓ MW випромінювання значно скорочує формування композитів CS-HA та зменшує середній розмір кристалітів ГА;

✓ середній розмір кристалітів ГА, утворених у присутності хітозану, зменшується від 31 нм (300 Вт) до 24 нм (800 Вт);

✓ Плануються подальші дослідження композитних матеріалів HA/CS.

5. Біологічні дослідження композитних матеріалів з вмістом іонів срібла, частинок оксиду цинку та магнетиту в модельних реакціях *in vitro* довели, що:

✓ склад композитних матеріалів на основі ГА та їх агрегатна форма слабо впливають на біосумісність;

✓ домішки неорганічного походження, а саме іонів Ag⁺, магнетиту Fe₃O₄ та цинку оксиду ZnO в застосованих в умовах експерименту концентраціях не впливають на цитотоксичність матеріалів.

✓ цитологічні характеристики остеобластів і фібробластів в культурах, приріст клітин в культурах, характер їх розташування, загальна кількість клітин в культурах і число деструктивно змінених і загиблих клітин свідчать про те, що досліджувані зразки матеріалів є біосумісними.

✓ культури фібробластів на 5-ту добу дослідження знаходилися в стадії стабільного зростання, а наявність в живильному середовищі зразків досліджуваних матеріалів не здійснювало на клітини цитотоксичної дії.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

- [1] Danilchenko SN, Kukharenko OG, Moseke C, et al. Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strain from diffraction line broadening. *Cryst. Res. Technol.* 2002. V. 37(11). P. 1234–1240.
- [2] Pramanik N, Mohapatra S, Bhargava P, et al. Chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite-poly(ethylene co vinyl alcohol) (EVA) nanocomposite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications. *Mater. Sci. Eng. C.* 2009. V. 29. P. 228–236.
- [3] Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J. Biomed. Mater. Res.* 1990. V. 24 P. 721-734.
- [4] Zhixia Li, Masakazu Kawashita. Current progress in inorganic artificial biomaterials. *J Artif Organs.* 2011. V.14. P.163–170.
- [5] S. Chernousova and M. Epple. Bioactive bone substitution materials. *Advanced Biomaterials and devices in Medicine.* 2014. V. 1. P. 74-87.
- [6] Q.Zhanga, J. Chena, J. Fenga, Y. Caoa, C. Denga, X. Zhanga. Dissolution and mineralization behaviors of HA coatings. *Biomaterials.* 2003. V. 24. P. 4741–4748.
- [7] Rodriguez-Lorenzo L.M., Vallet-Regi M. Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. *Chem. Mater.* 2000. V. 12. P. 2460-2465.
- [8] W. Suchanek, M. Yashimura. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. Mater. Res.* 1998. V. 13(1). P. 94-117.
- [9] Uswatta, S. P., Okeke, I. U., & Jayasuriya, A. C. (2016). Injectable porous nano-hydroxyapatite/chitosan/tripolyphosphate scaffolds with improved compressive strength for bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, V. 69, P. 505–512.
- [10] A.S. Stanislavov, L.F. Sukhodub, L.B. Sukhodub, V.N. Kuznetsov, K.L. Bychkov, M.I. Kravchenko. Structural features of hydroxyapatite and

carbonated apatite formed under the influence of ultrasound and microwave radiation and their effect on the bioactivity of the nanomaterials. *Ultrason. Sonochem.* 2018. V.42. P. 84–96.

[11] Sukhodub, L. B., Sukhodub, L. F., Prylutsky, Y. I., Strutynska, N. Y., Vovchenko, L. L., Soroca, V. M., ... Ritter, U. Composite material based on hydroxyapatite and multi-walled carbon nanotubes filled by iron: Preparation, properties and drug release ability. *Materials Science and Engineering: C.* 2018. V. 93. P. 606–614.

[12] Sukhodub, L. F., Sukhodub, L. B., Litsis, O., & Prylutsky, Y. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-alginate nanostructured composites for the controlled drug release. *Materials Chemistry and Physics.* 2018. V. 217. P. 228–234.

[13] W. Bojar, M. Kucharska, T. Ciach, Ł. Koperski, Z. Jastrzębski, M. Szalwiński. Bone regeneration potential of the new chitosan-based alloplastic biomaterial. *J. Biomater. Appl.* 2014. V. 28. P. 1060-1068.

[14] E. Khor, L.Y. Lim. Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials.* 2003. V. 24. P. 2339–2349.

[15] H.H.K. Xu, C.G. Simon. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials.* 2005. V. 26. P. 1337–1348.

[16] N.S. Pawar, K.J. Edgar. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials.* 2012. V. 33. P. 3279-3305.

[17] I. Liakos, L. Rizzello, I.S. Bayer, P.P. Pompa, R. Cingolani, A. Athanassiou. Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads. *Carbohydrate Polymers.* 2013. V. 92. P. 176–183.

[18] P. Turon, L.J. del Valle, C. Alemán, J. Puiggali. Biodegradable and biocompatible systems based on hydroxyapatite nanoparticles. *Appl. Sci.* 7. 2017. V. 60.

[19] S. Nahorny, H. Zanin, V.A. Christino, F.R. Marciano, A.O. Lobo, L.E. Silva Soares. Multi-walled carbon nanotubes/graphene oxide hybrid and

nanohydroxyapatite composite: A novel coating to prevent dentin erosion. *Mater. Sci. Eng. C*. 2017. V. 79. P. 199-208.

[20] Iijima S. Helical microtubules of graphite carbon. *Nature*. 1991. V. 354. P. 56-58.

[21] A.A. White, S. M. Best, I. A. Kinloch. Hydroxyapatite–Carbon Nanotube Composites for Biomedical Applications: A Review. *Int. J. Appl. Ceram. Technol*. 2007. V. 4[1]. P. 1–13.

[22] H. He, L.A. Pham-Huy, P. Dramou, D. Xiao, P. Zuo, C. Pham-Huy. Carbon nanotubes: Applications in pharmacy and medicine. *Biomed. Res. Int*. 2013. P. 578290.

[23] S. Kumar, R. Rani, N. Dilbaghi, K. Tankeshwar, Ki-H. Kim. Carbon nanotubes: a novel material for multifaceted applications in human healthcare. *Chem. Soc. Rev*. 2017. V. 46. P. 158-196.

[24] S. Prylutska, R. Bilyy, T. Shkandina, D. Rotko, A. Bychko, V. Cherepanov, R. Stoika, V. Rybalchenko, Yu. Prylutskyy, N. Tsierkezos, U. Ritter. Comparative study of membranotropic action of single- and multi-walled carbon nanotubes. *J. Biosci. Bioeng*. 2013. V. 115. P. 674-679.

[25] O.P. Matyshevskaya, A.Yu. Karlash, Ya.V. Shtogun, A. Benilov, Yu. Kirgizov, K.O. Gorchinsky, E.V. Buzaneva, Yu.I. Prylutskyy, P. Scharff. Self-organizing DNA/carbon nanotube molecular films. *Mater. Sci. Eng. C*. 2001. V. 15. P. 249-252.

[26] S. Marchesan, M. Melchionna, M. Prato. Carbon nanostructures for nanomedicine: Opportunities and challenges. *Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct*. 2014. V. 22. P. 190-195.

[27] R. L. Price, M. C. Waid, K. M. Haberstroh, and T. J. Webster. Selective Bone Cell Adhesion on Formulations Containing Carbon Nanofibers. *Biomaterials*. 2003. V. 24 [11]. P. 1877–1887.

[28] Moseke C, Gelinsky M, Groll J, et al. Chemical characterization of hydroxyapatite obtained by wet chemistry in the presence of V, Co, and Cu ions. *Materials Science and Engineering C*. 2013. P. 1654-1661.

[29] Sukhodub LB. Metal Ions Doped Chitosan Nanoparticles. Journal of Nano- and Electronic Physics. 2014. V.6. №4. P. 04034.

[30] Imran M, Nazir S, Latif S, et al. Synthesis, Characterization and Biological Studies of 2-(4-Nitrophenylaminocarbonyl)benzoic acid and its Complexes with Cr(III),Co(II), Ni(II), and Zn(II). J.Chem.Soc.Pak. 2010. V. 4. P. 492-495.

[31] Mestres G., Le Van C., Ginebra MP. Silicon-Stabilized α -tricalcium phosphate and its use in a calcium phosphate cement: Characterization and cell response. Acta Biomaterialia. 2012. V. 8. P. 1169–1179.

[32] Ito M, Otsuka M. Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation. Curr Appl phys. 2005. V.5. P. 402-406.

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

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

[35] Mieshkov AV, Grebenik LI, Ivahnuk TV, Sukhodub LF. Antibacterial properties of the nanoparticles with the zinc sulfide quantum dots. IFMBE Proceedings. 2016. V. 55. P. 267-270.

[36] Sukhodub L.B. Antimicrobial activity of Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺,Mg²⁺ ions doped chitosan nanoparticles. Annals of Mechnikov Institute. 2015. V.1. P. 39-43.

[37] Kuznetsov VM, Sukhodub LB, Sukhodub LF. Structural and Substructural Features of Apatite-biopolymer Composites: the Comparison of Data Obtained Using X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy with Electron Diffraction. J Nano- and Electronic Physics. 2014. V. 4. P. 04039-04045.

[38] Dubnika A, Loca D, Berzina-Cimdina L. Functionalized hydroxyapatite scaffolds coated with sodium alginate and chitosan for controlled

drug delivery. Proceedings of the Estonian Academy of Sciences 2012. V. 3. P. 193-199.

[39] Anita Lett J, Sundaresmari M, Ravichandran K. Porous hydroxyapatite scaffolds for orthopedic and dental applications-the role of binders. *Material Today: Proceedings* 3. 2016. P. 1672-1677.

[40] Anna Kovtun, et al. Chlorhexidine-loaded calcium phosphate nanoparticles for dental maintenance treatment: combination of mineralising and antibacterial effects, *RSC Adv.* 2012. V. 2. P. 870–875.

[41] Soskolne W.A, et al. Sustained local delivery of Chlorhexidine in the treatment of Periodontitis: A multi center study, *J Perio.* 1997. V. 68. P. 32-38.

[42] Soskolne W.A, et al. An in vivo study of the Chlorhexidine release profile of the PerioChip in the gingival crevicular fluid, plasma and urine, *J ClinPerio.* 1998. V. 25. P. 1017-1021.

[43] J. Arends, J. Christoffersen, M.R. Christoffersen, H. Eckert, B.O. Fowler, J.C. Heughebaert, G.H. Nancollas, J.P. Yesinowski, S.J. Zawacki. A calcium hydroxyapatite precipitated from an aqueous solution; an international multimethod analysis. *J. Cryst. Growth.* 1987. V. 3. P. 512-532.

[44] C.C. Kee, H. Ismail, A.F.M. Noor. Effect of synthesis technique and carbonate content on the crystallinity and morphology of carbonated hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Technol.* 2013. V. 8. P. 761-764.

[45] W.F. Neuman, T.Y. Toribara, B.J. Mulryan. The surface chemistry of bone. IX. Carbonate: Phosphate exchange. *J. Am. Chem. Soc.* 1956. V. 17. P. 4263–4266.

[46] A. Slosarczyk, Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiewicz. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J. Mol. Struct.* 2005. V. 744. P. 657-661.

[47] B.O. Fowler. Infrared studies of apatites. Vibrational assignments for calcium, strontium and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. *Inorg. Chem.* 1974. V. 13. P. 194-207.

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

[49] R. Pereira, A. Carvalho, D.C. Vaz, M.H. Gil, A. Mendes, P. Bártolo. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2013. V.52. P. 221–230.

[50] V.K. Malesu, D. Sahoo, P.L. Nayak. Chitosan–sodium alginate nanocomposites blended with cloisite 30b as a novel drug delivery system for anticancer drug curcumin. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 2011. V. 3. P. 402-411.

[51] G.E. Grechnev, V.A. Desnenko, A.V. Fedorchenko, A.S. Panfilov, L.Yu. Matzui, Yu.I. Prylutsky, M.I. Grybova, U. Ritter, P. Scharff, Yu.A. Kolesnichenko. Structure and magnetic properties of multi-walled carbon nanotubes modified with iron. *Low Temp. Phys.* 2010. V. 36. P. 1086-1090.

[52] S. Prylutska, R. Bilyy, T. Schkandina, A. Bychko, V. Cherepanov, K. Andreichenko, R. Stoika, V. Rybalchenko, Yu. Prylutsky, P. Scharff, U. Ritter. Effect of iron-doped multi-walled carbon nanotubes on lipid model and cellular plasma membranes. *Mater. Sci. Eng. C.* 2012. V. 32. P. 1486-1489.

[53] J.C. Elliot. Structure and chemistry of the apatites and other Calcium orthophosphates. Amsterdam-London-NewYork-Tokyo. 1994. P. 389.

[54] J.C. Elliot. Calcium Phosphate Biominerals. *Rev. Mineral. Geochem.* 2002. V. 48. P. 426-423.

[55] N. Strutynska, I. Zatovsky, N. Slobodyanik, A. Malyshenko, Y. Prylutsky, O. Prymak, I. Vorona, S. Ishchenko, N. Baran, A. Byeda, A. Mischanchuk. Preparation, characterization, and thermal transformation of poorly crystalline sodium- and carbonate-substituted calcium phosphate. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2015. P. 622-629.

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

- [57] A.O. Lobo, H. Zanin, I.A. Siqueira, N.C. Leite, F.R. Marciano, E.J. Corat, Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites, *Mater. Sci. Eng. C*. 2013. V. 33. P. 4305-4312.
- [58] T.S.S. Kumar, I. Manjubala, J. Gunasekaran. Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave irradiation. *Biomaterials*. 2000. V. 21. P. 1623-1629.
- [59] M. Tolkachov, V. Sokolova, V. Korolovych, Yu. Prylutsky, M. Epple, U. Ritter, P. Scharff. Study of biocompatibility effect of nanocarbon particles on various cell types in vitro. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*. 2016. V. 47. P. 216-221.
- [60] J.B. Leikin, F.P. Paloucek. Chlorhexidine Gluconate, Poisoning and Toxicology Handbook. 4th ed : Informa. 2008. P. 183-184.
- [61] W. Yue. Prevention of browning of depolymerized chitosan obtained by gamma irradiation. *Carbohydr. Polym*. 2014. V. 101. P. 857–863.
- [62] I. Bano, M.A. Ghauri, T. Yasin, Q. Huang, A.D.S. Palaparthi. Characterization and potential applications of gamma irradiated chitosan and its blends with polyvinyl alcohol. *Int. J. Biol.Macromol*. 2014. V. 65. P. 81–88.
- [63] M.N. Hassan, M.M. Mahmoud, A.A. El-Fattah, S. Kandil. Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes. *Ceram. Int*. 2015. V. 42. P. 3725–3744.
- [64] C.Qi,Y.J.Zhu, B.Q.Lu, X.Y.Zhao, J.Zhao, F.Chen,et al. Hydroxyapatite hierarchically Nano-structured porous hollow micro-spheres: rapid, sustainable microwave-hydrothermal synthesis by using creatine phosphate as anorganic phosphorus source and application in drug delivery and protein adsorption. *Chem.-A Eur.J*. 2013. V. 19. P. 5332–5341.
- [65] I. G. Beşkardeş, T. T. Demirtaş, M. D. Durukan, M. Gümüşdereliolu. Microwave-assisted fabrication of chitosan–hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds. *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 2015. V. 9. P. 1233–1246.

[66] Макро- та и микроэлементы (обмен, патология и методы определения / М.В. Погорелов, В.И. Бумейстер, и др. Сумы : Сумской государственный университет. 2010.

[67] Claus Moseke. Chemical characterization of hydroxyapatite obtained by wet chemistry in the presence of V, Co, and Cu ions. *Mater. Sci. Eng. C*. 2013. V. 33. P. 1654.

[68] Wan YZ, Raman S, He F, Huang Y. Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper. *Vacuum*. 2007, V.81. P. 1114–1118.

[69] Oh KS, Kim KJ, Jeong YK, Park EK, Kim SY, Kwon JH, Ryoo HM, Shin HI. Cytotoxicity and antimicrobial effect of Ag doped hydroxyapatite. *Key Eng Mater* 2004. V. 264–268. P. 2107–2110.

[70] Miao S, Weng W, Cheng K, Du P, Shen G, Han G, Zhang S. Sol–gel preparation of Zn-doped fluoridated hydroxyapatite films. *Surf Coat Technol* 2005. V. 198. P. 223–226.

[71] Zhang L., Ding Y., Povey M., York D. ZnO nanofluids—A potential antibacterial agent. *Prog. Nat. Sci.* 2008. V. 18,. P. 939–944.

[72] Padmavathy, N.; Vijayaraghavan, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles - an antimicrobial study. *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2008. V. 9. P. 1–7.

[73] Phaechamuda T., Mahadlek J., Aroonrerk N., Choopun S., Charoenteeraboon J. Antimicrobial activity of ZnO-doxycycline hyclate thermosensitive gel. *Science Asia*. 2012. V. 38. P. 64–74.

[74] M. Awwad, N.M. Salem A green and Facile Approach for Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Nanoscience and Nanotechnology*. 2012. V. 2(6). P. 208-213.

[75] Bretcanu O., Verne E., Coisson M., Tiberto P., Allia P. Magnetic properties of the ferromagnetic glass-ceramics for hyperthermia. *Journal of Magnetism and magnetic materials*. 2006. V. 305. P. 529-533.

[76] Amna Sirelkhatim et.al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* 2015. V. 7. P. 219-242.

[77] D. Gopia, M. Thameem Ansari, E. Shinyjoy, L. Kavitha. Synthesis and spectroscopic characterization of magnetic hydroxyapatite nanocomposite using ultrasonic irradiation. *Spectrochimica Acta Part A.* 2012. V. 87. P. 245– 250.