

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

УКПП

№ 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. Чорноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

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

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

Л.Ф. Суходуб

2019

Рукопис закінчено 18 грудня 2019 р.

Результати даної роботи розглянуті науковою радою СумДУ протокол від 26 грудня 2019р. № 6

СПИСОК АВТОРІВ

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

Л.Ф.Суходуб
(вступ, розділ 4,
висновки)

18.12.2019

Відповідальний виконавець –
канд. хім. наук.,
старш.наук.співроб. ННЦ «Нано-
і біоматеріали» СумДУ

Л.Б. Суходуб
(розділ 1-4,
висновки)

Виконавці:

18.12.2019

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).

18.12.2019

магістр за спеціальністю
«Біомедична інженерія»
СумДУ

М.О.Кумеда
(підрозділ 3.2)

18.12.2019

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 81 с., 31 рис., 5 табл., 94 джерела.

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

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-апатитних 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: синтезований композитний матеріал на основі гідроксиапатиту (НА), альгінату натрію (Alg) і оксиду графена (GO) з поліпшеними механічними характеристиками для застосування у біоінженерії кісткової тканини; синтезований під впливом мікрохвильового опромінення композит на основі НА, Alg та мікрочастинок ZnO з протимікробними властивостями; розроблена методика отримання біоактивних покриттів з НА, брушиту (DCPD), на титановому субстраті, обробленому плазмо-електролітичним окисленням (PEO); отримані ZnO та ZnO/Alg покриття демонструють зони інгібування росту бактерій; поліелектролітний композит на основі НА, Alg та хітозану (CS) з вмістом фулерену C₆₀, був синтезований у вигляді мембрани для стоматології та гранул, що забезпечують пролонговане вивільнення лікарських засобів.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
1 Розробка та дослідження біоактивних полімер-апатитних матеріалів з вмістом частинок неорганічного походження	10
1.1 Композитний матеріал з покращеними механічними властивостями на основі гідроксиапатиту, альгінату та оксиду графену для лікування твердої кісткової тканини.....	10
1.2 Композитний матеріал на основі гідроксиапатиту, альгінату та мікрочастинок оксиду цинку з антибактеріальними властивостями	20
2 Розробка та дослідження покриттів на модельних титанових субстратах методом термічної депозиції.....	30
2.1. Біоактивні покриття з гідроксиапатиту та брушиту на модифікованих методом плазмо-електролітичного окислення $Ti6Al4V$ субстратах	30
2.2. Біоактивні ZnO та ZnO/Alg покриття з протимікробними властивостями.....	36
3 Отримання та дослідження біоактивного матеріалу на основі природних полімерів та ГА, що містить наночастинки фулерену	45
3.1 Розробка та дослідження поліелектролітного скафолду на основі природних полімерів та наноструктурованого ГА з імобілізованими лікарськими засобами.....	45
3.2 Дослідження біоактивності композитів з вмістом наночастинок фулерену C_{60} в модельних реакціях <i>in vitro</i>	51
ВИСНОВКИ.....	65
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	69

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

Alg – альгінат

НА (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

CH – хлоргексидину біглюконат

MW – мікрохвильове випромінювання

GO – оксид графену

C60 Full – фуллерен

CHX – хлоргексидин біглюконат

ВСТУП

При створенні біоматеріалів медичного призначення в останні десятиліття використовується біоміметичний хімічний синтез, який відтворює біологічні принципи будови тканин. Модифікація неорганічними біоактивними іонами та наночастинками матеріалів для ортопедичних імплантатів з метою ініціації контрольованих реакцій в оточуючих тканинах набуває широкого застосування в медичному матеріалознавстві. Визначено, що включення невеликої кількості таких іонів до структури біоapatиту суттєво впливає на його властивості [1]. Наприклад, іони цинку сприяють збільшенню щільності КТ, запобігають втраті кісткової маси, покращують адгезію білків та підвищують антибактеріальну активність [2]. Zn володіє антибактеріальними властивостями і є металевим елементом, необхідним для проліферації клітин та реконструкції позаклітинного матриксу [3-5]. Zn^{2+} також здатний стимулювати утворення епітелію під час загоєння ран. ZnO підвищує життєздатність клітин та остеогенетичну здатність [6], тому ретельно досліджується як потенційний новий антибактеріальний засіб [7-9]. Крім того, у роботах [10,11] було повідомлено, що зменшення розміру частинок ZnO сприяє збільшенню розчинності біоматеріалу та підвищенню його антимікробної активності.

В якості добавок неорганічного походження до складу біоматеріалів включають карбонові наночастинки (CNP) завдяки їх унікальним властивостям, пов'язаним в першу чергу з їх високорозвиненою активною поверхнею. Серед CNP є окрема група на основі графену, яка називається матеріалами сімейства графену (GFMs). Структура всіх GFMs представлена як матеріал, що має товщину одного атома та складається з атомів вуглецю, та має структуру сотових ґрат. Це надає карбоновим наночастинкам виняткових функціональних та механічних властивостей [12]. Важливим фактором у створенні нанокомпозитів на основі графену є дисперсія в полімерній матриці, оскільки через високу питому площу поверхні графен

має тенденцію до утворення агломератів завдяки взаємодії ван дер Ваальса [13]. Порівняно з гідрофобним чистим графеном, оксид графену (GO) містить як гідрофобні, так і гідрофільні області, які надають йому амфіфільних властивостей [14]. Реактивні групи, розташовані на поверхні GO (наприклад, гідроксил, епоксид та карбоніл), можуть взаємодіяти з полімерами, біомолекулами, ДНК, білками, квантовими точками, надаючи їм багатофункціональних можливостей для різних біологічних та медичних застосувань [15]. Численні функціональні групи кисню в базальній площині та межі GO можуть генерувати міжфазну зв'язок з гідроксильними групами Alg, дозволяючи однорідний розподіл GO в матриці Alg [16]. Було показано, що GO проявляє антибактеріальну активність [17].

Серед CNP, фуллерен (C_{60}) є найбільш стійкою молекулою (М.М. 720 м.м., $\Delta H = -8,06$ ккал / моль). Він має унікальну структуру, що складається з sp^2 атомів вуглецю та утворює високо-симетричну решітку. C_{60} є акцептором електронів із дією сильного відновника, який може приймати до 6 електронів. Ця унікальна фізико-хімічна особливість C_{60} робить його перспективним матеріалом для біомедицини [18]. C_{60} є окислювачем і може утворювати активні форми кисню, зокрема, під дією УФ-опромінення [19]. C_{60} та його водні розчини можуть проявляти антиоксидантні властивості в організмі, головним чином, нейтралізуючи та / або приєднуючись до АТФ та вільних радикалів [20]. Водні суспензії C_{60} проявляють відносно сильну антибактеріальну активність, яка залежить від розміру частинок: менші агрегати мають більш високу антибактеріальну активність [21].

В останнє десятиліття велика увага приділялася доставці ліків та системам випуску лікарських засобів на основі наночастинок різного походження, включаючи CNP, завдяки їх здатності розтинати клітинні мембрани [22]. Поверхневі властивості, гідрофільність, розміри та форма дозволяють використовувати CNP в якості транспортного засобу для контролю випуску різних модельних лікарських засобів у клітини [23].

Ще одна широка область застосування композитних матеріалів на основі НА – утворення захисних покриттів на металевих імплантатах для стоматології та ортопедії. Металеві матеріали, переважно титан та його сплави, широко застосовуються в медицині як імплантати для заміни твердої кісткової тканини. Однак через відсутність або погану біоактивність та остеопровідність металевих матеріалів є велика ймовірність їх відторгнення, а також можуть відбуватися післяопераційні запальні процеси [24], а агресивні умови рідин організму сприяють біологічній корозії металевих імплантатів. Тривала біоактивна дія покриттів залежить від їх механічних властивостей та ступеню їх протидії факторам навколишнього середовища, в яких знаходиться імплантат.

Підвищення механічних властивостей покриттів на основі СаР відбувається за рахунок їх нанесення на поверхню пористого оксидного шару, збагаченого іонами кальцію та фосфору. Метод плазмо-електролітичного окислення (ПЕО) може бути використаний як ефективний метод попередньої обробки поверхні. ПЕО - це комбінація високовольтного розряду з електрохімічним окисленням або мікродуговим окисленням.

Покриття з ПЕО характеризуються високими механічними властивостями, корозійною стійкістю, міцними зв'язками з поверхнею та біоактивністю [25-27]. Залежно від застосування поверхня анодованого типового субстрату може бути збагачена керамічними частинками [28], специфічними білками [29], препаратами [30] або полі(молочно-когліколевою кислотою)-амоксициліном, як гібридний матеріал для стоматологічних застосувань. Серед різних технологій, що використовуються для нанесення покриттів для медичних імплантатів [31], метод термічної депозиції з водного розчину (TSD) був введений Куродою [32] та вдосконалений нашою групою [33].

Таким чином, робота в рамках даного проекту присвячена створенню біополімерних композитних матеріалів та покриттів на основі НА, визначенню фізичних основ формування їх складу, застосуванню в апатит-

біополімерних пористих матрицях для контрольованої доставки лікарських засобів в зону імплантації.

1 РОЗРОБКА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКТИВНИХ ПОЛІМЕР-АПАТИТНИХ МАТЕРІАЛІВ З ВМІСТОМ ЧАСТИНОК НЕОРГАНІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ

1.1 Композитний матеріал з покращеними механічними властивостями на основі гідроксиапатиту, альгінату та оксиду графену для лікування твердої кісткової тканини

Матеріали

Порошок GO (Sigma-Aldrich, США), нітрат кальцію тетрагідрат $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, хлорид кальцію CaCl_2 , діамоній дигідрофосфат $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$, гідроксид амонію NH_4OH , (Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd), альгінат натрію (низька в'язкість, E407, Китай), фармацевтична 0,05 мас.% хлоргексидину біглюконат (CH).

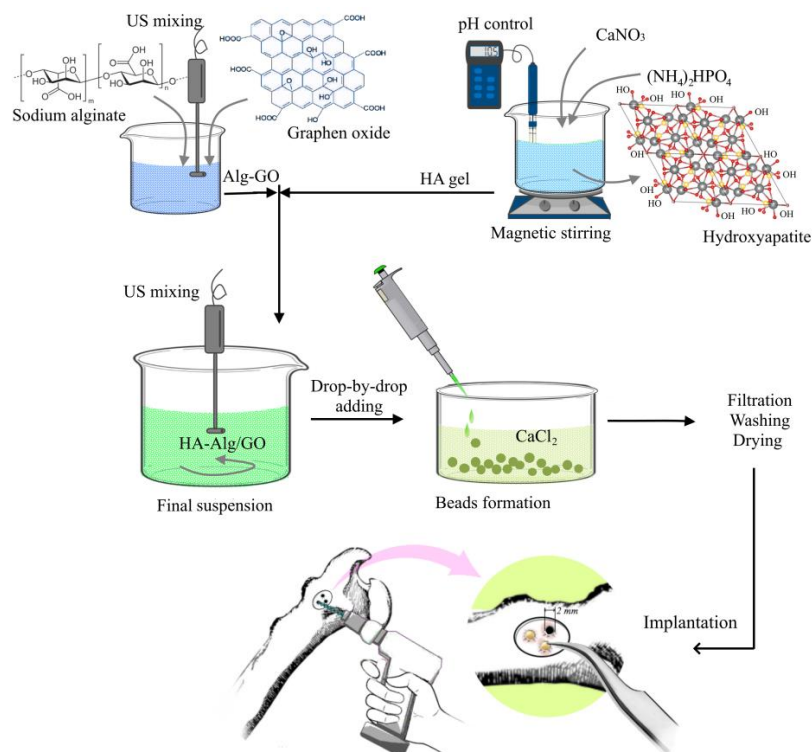


Рисунок 1.1 – Приготування композицій HA-Alg, з вмістом GO.

Технологічна схема отримання гранул показана на рис. 1.1 і включає наступні етапи:

Alg-GO: порошок GO диспергували у надчистій воді для приготування вихідного розчину з концентрацією 0,9 мг/мл. Потім цей водний розчин протягом 2 год (40 кГц) піддавали ультразвуковій обробці, згідно з технологією описаною у [34]. Вихідний розчин GO додавали до 2% розчину натрію Alg для забезпечення концентрації GO в Alg - 15 та 150 мкг/мл відповідно. Суміші обробляли ультразвуком протягом 10 хв. В результаті утворилися однорідні колоїдні суспензії Alg-GO.

Гідрогель НА: отримували згідно з описаним раніше способом [35] Коротко, для синтезу НА 0,38 М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ розчин додавали по краплях до 0,5 М розчину $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Після коригування значення рН до 10,5 додаванням розчину аміаку маточну суспензію переносили у споживчу мікрохвильову піч (МВт) для її опромінення протягом 3 хв. Потім продукт охолоджували, промивали і центрифугували для отримання гідрогелю НА з вмістом води близько 85 мас.%.

Гранули НА-Alg-GO були отримані раніше описаним методом. Коротко, гідрогель НА поступово додавали до колоїдних суспензій Alg-GO з масовим співвідношенням 1:1 і обробляли ультразвуком протягом 1 хв. Суміші капали у 0,25 М розчин хлориду кальцію протягом 24 годин з подальшим промиванням та сушкою утворених кульок. Вміст GO (у перерахунку на порошок) в отриманих гранулах НА-Alg-GO становив 0,0004% та 0,004% по відношенню до порошку НА. Зразки назвали НА-Alg-GO та НА-Alg-10GO відповідно. Зразок НА-Alg, що не містить GO, використовувався в якості контролю в подальших дослідженнях.

ТЕМ-дослідження. Зображення ТЕМ та електронно-дифракційна картина (ED) композитів (рис. 1.2 А-С) вказують на утворення голкоподібних кристалітів НА та їх агломератів розмірами 100 нм і більше. ED підтвердила наявність фази НА. Збільшення вмісту GO знижує ступінь кристалічності композиту, про що свідчить ослаблення дифракційного кільця [002] на

спектрах ED. Як було сказано вище, середній розмір частинок GO у водному розчині становить близько 1 мкм. Дисперсія GO в розчині Alg призводить до розподілу наночастинок GO розміром 20-30 нм. Очевидно, що Alg в комплексі з ультразвуковим змішуванням є вигідними умовами рівномірного розподілу частинок GO.

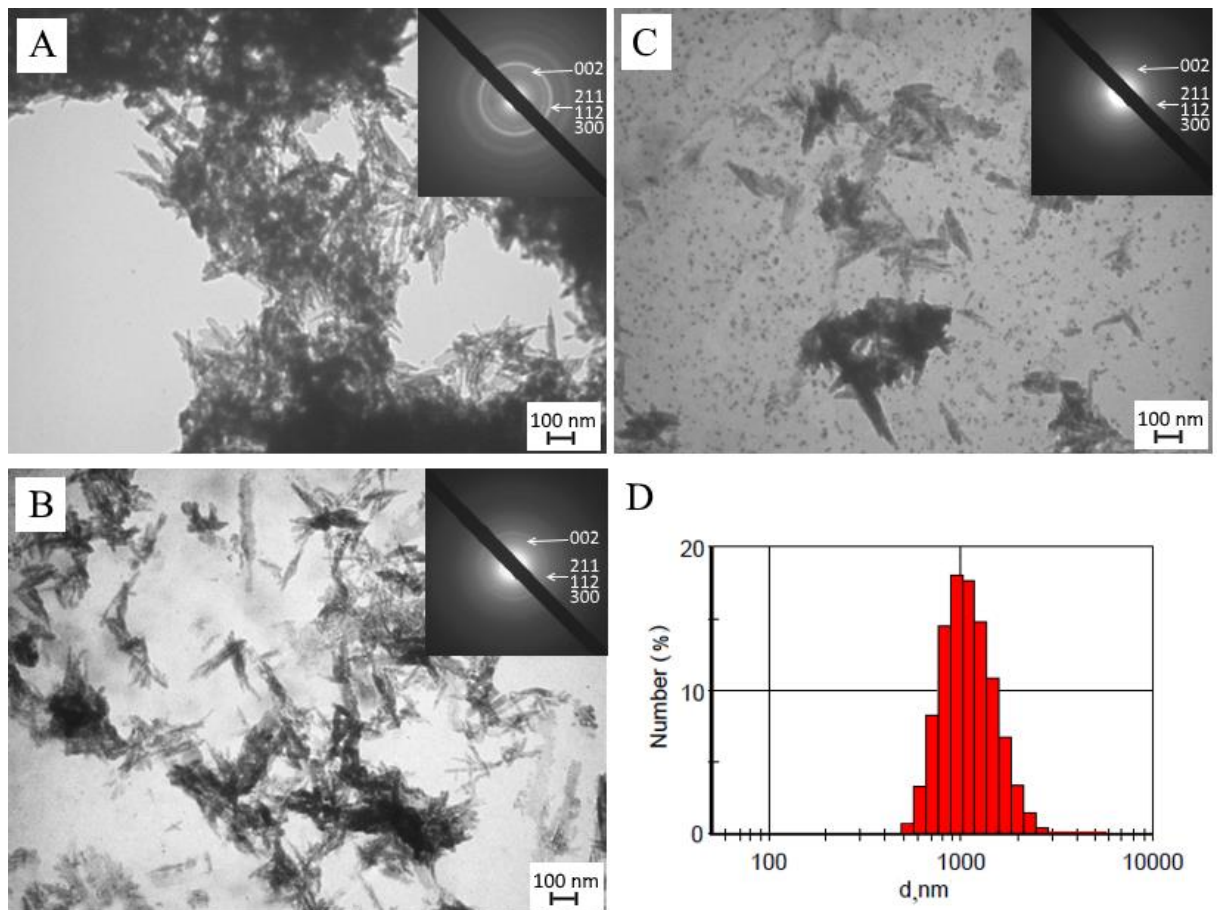


Рисунок 1.2 – ТЕМ-зображення та ЕД-спектри експериментальних зразків: А) HA-Alg; В) HA-Alg-GO; С) HA-Alg-GO10; D) результати розподілу GO у водному розчині (0,15 мг / мл)

XRD дослідження. На рис. 1.3 А показані дифрактограми від висушених при 37 °С композитів HA-Alg, HA-Alg-GO та HA-Alg-10GO. Дифрактограми досліджуваних зразків вказують на наявність лише однієї фази - HA (JCPDS 01-086-0740). Як було зазначено вище, HA був синтезований під впливом МВт. За даними RFA, атомне співвідношення Ca/P у композитах становить

1,65, тоді як для стехіометричного НА це відношення становить 1,67. Параметри кристалічної решітки, обчислені в площинах (002) та (211) для отриманого НА ($a = 0,9385$ нм; $c = 0,6882$ нм), також відрізняються від стехіометричних ($a = 0,9421$ нм; $c = 0,6881$ нм), що означає формування кальцій-дефіцитного НА з малим вмістом карбонату. Цей факт підтверджується спектроскопією FTIR, яка вказує на смугу поглинання карбонатів у 870 см^{-1} [36]. Продукти мають низьку кристалічність, що характерно для сирого (термічно необробленого) НА. Середній розмір кристаліту для піків дифракції (002) становить приблизно 30 нм.

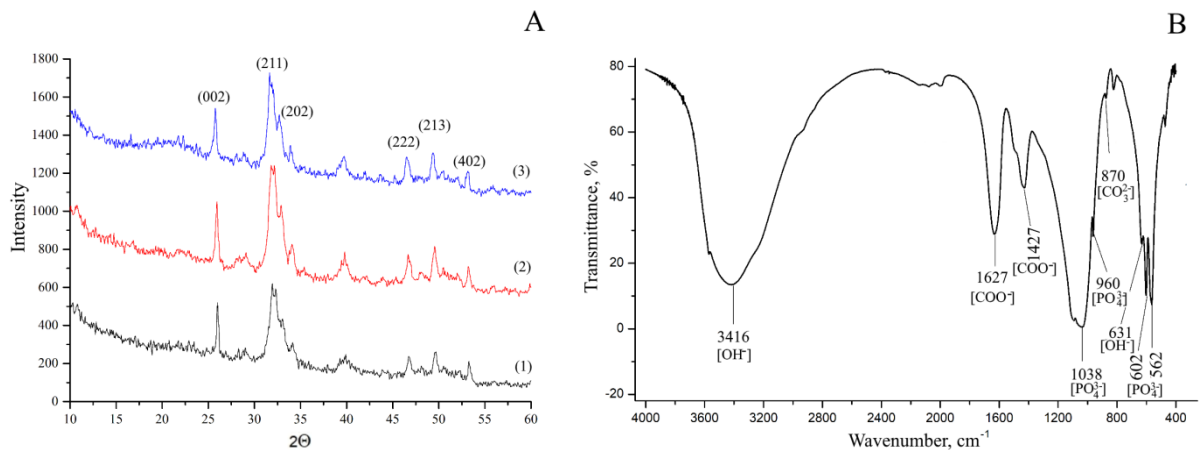


Рисунок 1.3 – А) Рентгенограми експериментальних зразків: НА-Alg (1), НА-Alg-GO (2) та НА-Alg-10GO (3); В) Спектр FTIR зразка НА-Alg

Дослідження FTIR. Характерні ІЧ-смуги для зразка НА-Alg показані на рис.1.3В. Дані FTIR для всіх експериментальних зразків показують основні вібраційні смуги, що належать до НА. Є смуги 3574 та 631 см^{-1} гідроксильної групи (ОН) [37]. Смуги з піками при 1038 , 960 , 602 та 562 см^{-1} відповідають вібраціям груп PO_4^{3-} у НА [38]. Alg представляє дві характерні смуги поглинання приблизно 1626 та 1422 см^{-1} , що відповідають асиметричним та симетричним коливанням розтягування COO - груп відповідно [39]. Для зразків, що містять GO, залишаються всі вібраційні смуги, характерні для зразка НА-Alg, вільного від GO (дані не показані). Це підтверджує

відсутність хімічної взаємодії між GO та іншими компонентами. Можна припустити наявність фізичної адсорбції між ними або інтеркаляції молекулярної структури HA-Alg між шарами GO.

Дослідження набрякання та in vitro біоактивності. Коефіцієнт набрякання визначали для оцінки здатності дослідних зразків зберігати їх стійкість форми у фізіологічних умовах та їх адсорбційну здатність. Розраховували також відносну вологість зразків як різницю ваги між висушеними зразками при 37 °C та ліофілізованими (рис. 1.4В). Доведено, що додавання GO знижує ступінь набухання композитів і, навпаки, покращує їх стійкість форми. Збільшення вмісту GO в HA-Alg-10GO в 10 разів призводить до збільшення швидкості набряку приблизно на 8% порівняно з HA-Alg-GO. Цей факт можна пояснити збільшенням щільності. Відносна вологість також збільшується після додавання GO. Це можна пояснити здатністю самого GO адсорбувати та утримувати воду через водневі зв'язки.

Біоактивність композитів оцінювали через їх вплив на рН фізіологічного розчину. Випробування *in vitro* проводили шляхом замочування досліджуваних зразків у SBF при рН = 7,33. Скляні пробірки з 200 мг кожного зразка та 10 мл SBF постійно перемішували при 37 °C. Значення рН фіксувались через регулярні інтервали часу та їх зміни показано на рис. 1.4 А. Чистий SBF використовувався як контрольний.

Тест на біоактивність показав, що рН контрольного SBF (без проби) не змінюється протягом періоду спостереження. У той же час рН SBF у пробірках, що містить проби, змінюється під час експерименту, що вказує на взаємодію з SBF, що означає їх біоактивність. Спочатку HA розчиняється, вивільняючи іони Ca^{2+} та PO_4^{3-} у SBF. Зі збільшенням концентрації іонів розчин SBF стає перенасиченим цими іонами і знову відбувається осадження. Механізм утворення нової апатитової фази включає обмін між розчином Ca^{2+} і H^+ , що провокує підвищення значення рН. Поступове підвищення значень рН також може бути пов'язане з наявністю домішок карбонату з повітря, що

призводить до утворення карбонат-заміщеного апатиту. Підвищення рН сприяє утворенню ядер апатитів.

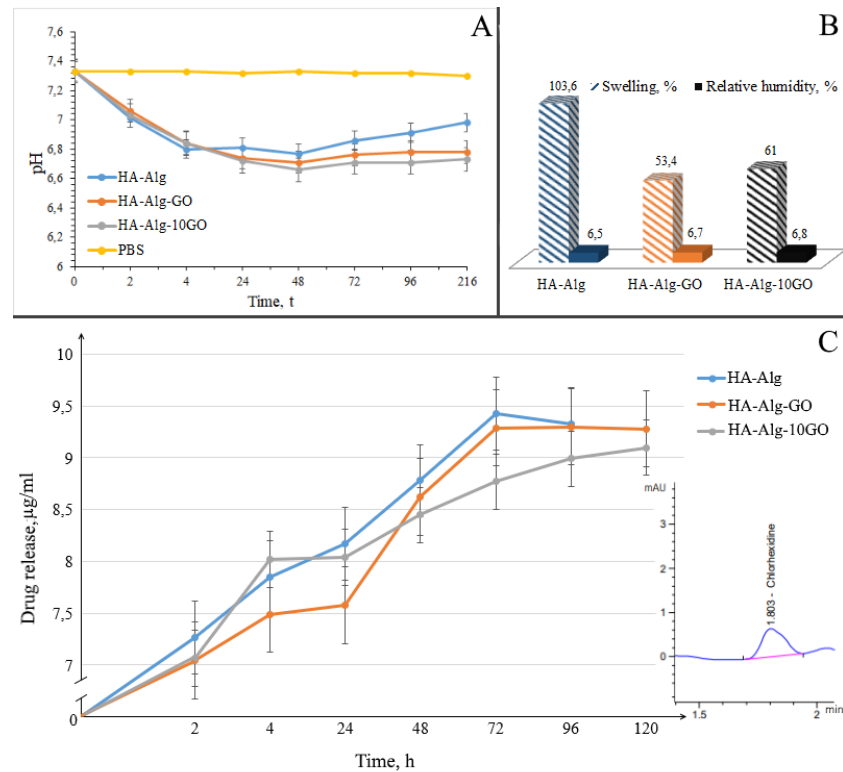


Рисунок 1.4 – А) Вплив композитів на значення рН SBF; Б) ступінь набрякання композитів і відносна вологість; С) Концентрація вивільненої протягом 120 год СН з експериментальних зразків (мкг/мл). Примітка: $p \leq 0,05$

Дослідження ВЕРХ. Кінетика вивільнення лікарських засобів з експериментальних зразків представлена на рис. 1.4 С. Графік залежності вивільненого СН будували в залежності від часу інкубації.

Вивільнення СН зі зразка HA-Alg відбувається майже рівномірно протягом усього періоду дослідження і триває протягом 72 год. Через 72 год концентрація СН у PBS починає знижуватися через розведення, що відбувається шляхом додавання аликвотів свіжого PBS після кожного відбору проб. На рис. 1.4 С можна виділити три основні стадії вивільнення лікарських засобів від зразків, що містять GO: до 4 год, від 4 до 24 год, від 24 до 120 год. На першому етапі відбувається вивільнення поверхнево

адсорбованого СН. Зразок НА-Alg-10GO демонструє підвищену швидкість вивільнення СН та найбільшу кількість вивільненого СН на цій стадії. Цей факт можна пояснити високорозвиненою поверхнею GO та його підвищеною здатністю адсорбувати рідину. Під час другої (4-24 год) стадії набухання композитів відбувається через гідратацію, що створює умови для подальшої дифузії лікарських засобів із зразків. Зразок, що не містить GO, має меншу стійкість форми та його набрякання відбувається швидше, а вивільнення лікарського препарату контролюється як дифузією, так і руйнуванням гранул.

НА-Alg-GO має більш високу швидкість вивільнення ліків на другій стадії порівняно з НА-Alg-10GO. Це можна пояснити тим, що НА-Alg-GO менш щільний через менший вміст GO у композиті, що сприяє дифузії лікарських засобів. На третьому етапі вихід лікарського засобу з зразка НА-Alg близький до НА-Alg-GO. НА-Alg-10GO на третьому етапі демонструє найбільш рівномірне і тривале вивільнення СН. Вивільнення СН з НА-Alg-GO та НА-Alg-10GO триває відповідно 96 та 120 год.

Дослідження міцності на стиск. Результати дослідження міцності на стиск для експериментальних композитів представлені в Таблиці 1.1 та на Рис. 1.5.

Як видно з рис.1.5 А, додавання GO в НА-Alg трохи збільшує міцність на стиск зразка. Максимальна відносна деформація перед руйнуванням лежить в межах (0,1– 0,14) для трьох типів зразків. Взагалі таке збільшення міцності для зразків, що містять GO, пов'язане з високим співвідношенням сторін та відмінними механічними властивостями графена (питома поверхня - 2630 м²/г, міцність на розрив - 130,5 ГПа, а модуль Юнга - близько 1,0 ТПа) [40]. Таким чином, підвищення міцності для зразків, що містять GO, можна пояснити також скріпленням частинок GO з матрицею НА-Alg, що призводить до ефективного перенесення напруги на GO.

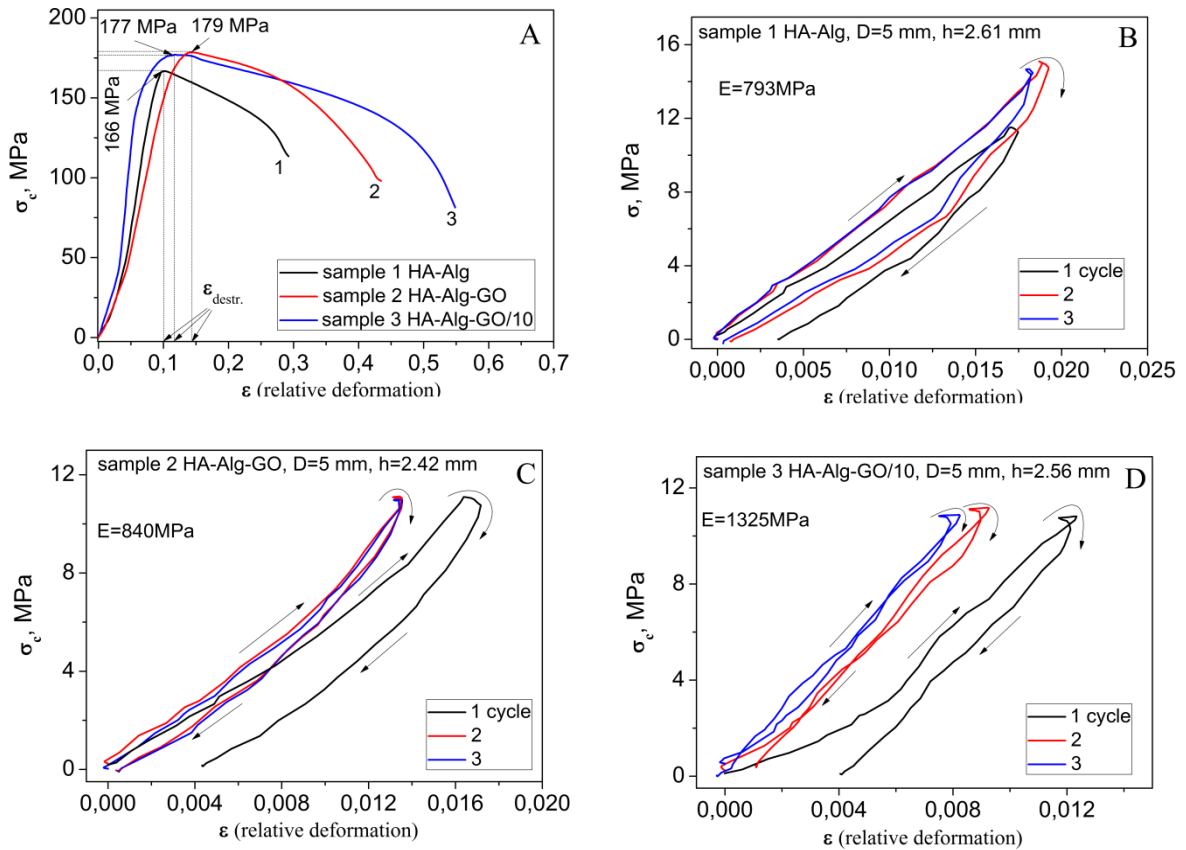


Рисунок 1.5 – А. Міцність на стиск експериментальних гранул, виміряна при одноосному стисненні. В, С, D Діаграми «навантажувально-розвантажувальних робіт» гранул HA-Alg, HA-Alg-GO та HA-Alg-10GO, виміряні при одноосному стисканні протягом трьох циклів навантаження відповідно

На рис. 1.5 В-D представлені діаграми «навантажувально-розвантажувальних робіт» досліджуваних зразків. Оцінка модуля Юнга (E) показала, що зразки, що містять GO, мають досить високий модуль Юнга порівняно з контрольним HA-Alg.

Поліпшення механічних властивостей композитів пояснюється, головним чином, сумісністю та специфічною взаємодією Alg гідроксильних груп з функціональними групами GO. Поліпшені властивості на розрив приписуються водневому зв'язку GO та Alg. Структура композиту Alg-GO призводить до більш рівномірного розподілу напружень і мінімізує наявність

центру концентрації напруги, тим самим значно підвищуючи механічні властивості нанокомпозиту. Крім того, хімічне зшивання між листами GO може бути підвищене додаванням двовалентних іонів Ca^{2+} під час утворення гранул, що призводить до посилення механічних властивостей композитів [41].

Дослідження in vivo. Зразок HA-Alg-GO імпантували у стегнову кістку щура для дослідження протягом 30 днів його остеointegraційної здатності.

Мікроскопічне дослідження виявило, що область дефекту була заповнена імпантованим HA-Alg-GO (рис. 1.6 А). Біоматеріал відрізнявся кольором і структурою, що свідчить про зміну його властивостей. Фрагменти біоматеріалу в зоні дефекту оточені новою кістковою тканиною різної зрілості. Між новосформованими кістковими трабекулами у міжтрабекулярних просторах були червоний та жовтий кістковий мозок. З крайових областей кісткові трабекули виростили всередину шаром біоматеріалу, оточеного фрагментами гнилого імпантованого матеріалу.

Прямо прилегли до області дефекту фрагменти кори кістки були тісно зрощені з новоствореною кістковою тканиною (рис. 1.6 В). На кісткових трабекулах спостерігали високу щільність остеоцитів.

Новостворена кісткова тканина оточувала фрагменти біоматеріалу. Утворення сполучних шарів не спостерігалось (рис. 1.6 С). Ніяких ознак запальної реакції в кістковому мозку або в місцях дефекту не спостерігалось. В області імпантації резорбція біоматеріалу синхронно протікала з формуванням нових кісткових тканин.

Таким чином, на 30-й день, імпантований в ретегральну кістку біоматеріалу HA-Alg-GO, частково розсмоктувався і замінювався на новоутворену кісткову тканину. Матеріал має високу остеопровідність та остеointегративність, про що свідчить відсутність руйнування та запалення.

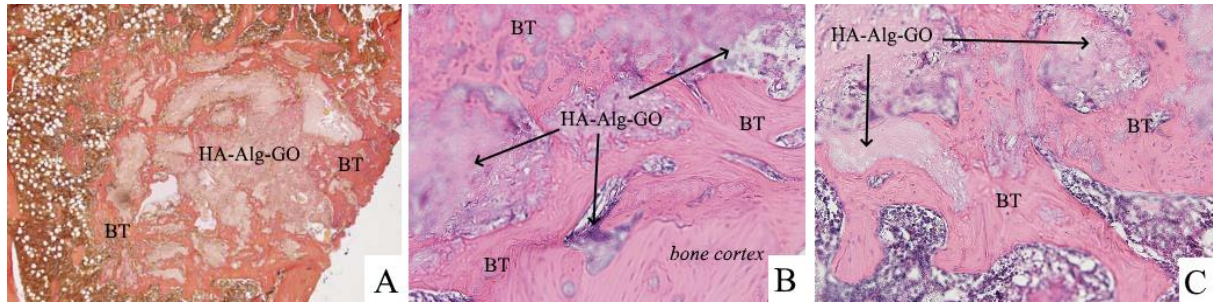


Рисунок 1.6 – А) Дефектна зона заповнена композиційним матеріалом HA-Alg-GO з розташованими кістковими трабекулами (BT); Б) композитні матеріали HA-Alg-GO оточені кістковою тканиною (BT); В) Новоутворена кісткова тканина (BT) навколо фрагментів складеного матеріалу. Аналіз проводили на 30-й день після імплантації. Збільшення $\times 200$

Висновки:

Були синтезовані гранули HA-Alg, з вмістом GO. Утворення при опроміненні MW кальцій-дефіцитного HA ($Ca/P = 1,65$) з малим вмістом карбонату підтверджується за допомогою рентгенологічного та рентгенофлуоресцентного аналізу. Alg діє як диспергатор і забезпечує рівномірний розподіл частинок GO в матриці Alg після обробки ультразвуком. Наночастинки GO у поєднанні з зшитими іонами Ca^{2+} Alg макромолекулами сприяють посиленню механічних властивостей отриманих кульок. HA-Alg-10GO мають набагато вищий модуль Юнга (1325 МПа) порівняно з HA-Alg (793 МПа). Додавання GO збільшує щільність матеріалу з 2,03 до 2,11 г/см³ і знижує ступінь набухання в PBS зі 103 до 61% для HA-Alg та HA-Alg-10GO відповідно.

ВЕРХ демонструє подовження вивільнення СН на 48 год з HA-Alg-10GO порівняно з пробою, що не містить GO. Дослідження *in vitro* (вимірювання рН) та *in vivo* (на моделі щурів) доводять гарну біоактивність, остеопровідність та остеointегративність, відсутність руйнування кісткової тканини та запалення.

1.2 Композитний матеріал на основі гідроксиапатиту, альгінату та мікрочастинок оксиду цинку з антибактеріальними властивостями

В ході виконання проекту під впливом мікрохвильового опромінення синтезували та комплексно вивчали наноструктурований композитний матеріал на основі НА, Alg та мікрочастинок ZnO. Біоматеріал був виготовлений у формі гранул та гідрогелю, що забезпечить заповнення дефектів складної геометрії з мінімальним зазором між кісткою та імплантатом.

Матеріали.

Кальцій нітрат тетрагідрат $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, діамоній гідрофосфат $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 25% розчин аміаку, цинку нітрат $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, натрію альгінат.

Методика отримання НА. 19,7г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ і 6,6 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ окремо розчиняли у 500 мл дистильованої води. Розчин гідрофосфату амонію додавали по краплях (1 мл/хв) до розчину кальцій нітрату тетрагідрату. При цьому кінцеві концентрації сполук кальцію та фосфору становили 0,167 М та 0,1 М, відповідно. Значення рН = 10,5 досягався додаванням 40 мл 25% розчину аміаку до суміші реагентів при перемішуванні.

Утворення НА відбувалося відповідно до наступної реакції:



Після змішування компонентів і корегування рН до заданого рівня, 400 мл реакційної суспензії переносили в мікрохвильову піч Samsung M1712NR, з метою мікрохвильового випромінювання (MW) в 2 етапи, а саме: потужністю 300 Вт протягом 3 хвилин, а потім 450 Вт протягом 5 хвилин з подальшим подальшим охолодженням. Важливо, що утворення нанокристалітів НА під впливом MW відбувається в одну стадію (без утворення проміжних CaP фаз) в результаті швидкого поглинання енергії випромінювання реакційною системою з миттєвою дегідратацією іонів Ca^{2+} , PO_4^{3-} та OH^- та створенням сприятливих умов для їх взаємодії (рис. 1.7).

Потім зразок кілька разів промивали дистильованою водою до досягнення нейтрального рН суміші.

Після промивання та відділення твердої фракції був отриманий гідрогель НА із вмістом води близько 85%.

Методика отримання ZnO та композиту НА-ZnO. 4 мл 3 мас.% розчину альгілату натрію додавали до 200 мл 0,2 М розчину цинку нітрату гексагідрату. Утворення ZnO починалося після додавання 15 мл 25 мас.% розчину аміаку та нагрівання реакційної суміші до температури 80 °С при магнітному перемішуванні. Охолоджену суміш багатократно промивали дистильованою водою до нейтрального значення рН. Отриману фракцію ZnO відокремлювали центрифугуванням. Продукт, висушений при 37 °С, подрібнювали до порошку з дисперсією ≤ 63 мкм. Для утворення НА-ZnO композиту 0,3 г порошку ZnO (≤ 63 мкм) додавали до 6,0 г гідрогелю НА (85% води), отриманого вищеописаним способом та перемішували під дією УЗ (в подальшому це зразок НА-ZnO)

Методика отримання гранул НА-Alg-ZnO. Для приготування гранул НА-Alg-ZnO до суспензії НА-ZnO додавали 2 мас.% водного розчину альгілату натрію у ваговому співвідношенні 1:1. Суміш перемішували в апараті УЗДН потужністю 75 Вт протягом 12 хвилин з подальшою дисперсією в 0,125 М розчині хлориду кальцію та витримкою протягом 25 хвилин та 18 годин. Після промивання та висушування при температурі 37°C утворені гранули були використані для досліджень як зразок НА-Alg-ZnO. Гранули НА-Alg (в подальшому контрольний зразок НА-Alg) були виготовлені за вище описаною технологією, але без додавання оксиду цинку.

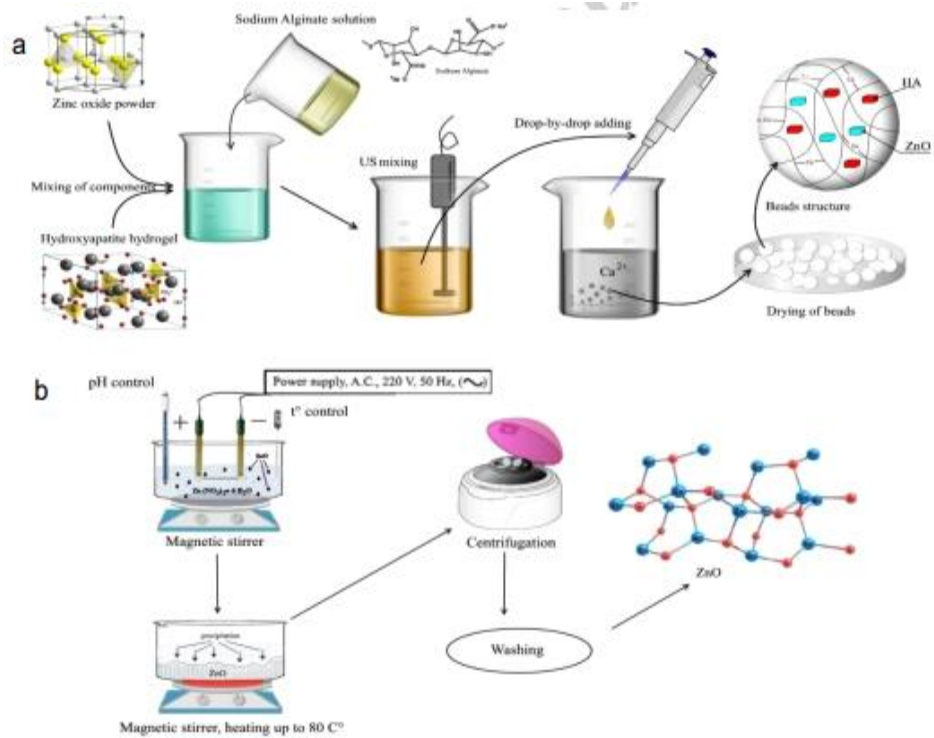


Рисунок 1.7 – Схема виготовлення композиційного полімерно-апатитового матеріалу у вигляді намистин, легованих наноструктурованими частинками ZnO (a) та частинками ZnO (b)

XRD дослідження. Рентгено-структурні дослідження зразків довели утворення фази HA (HA-JCPDS 01-084-1998) з середніми розмірами кристалітів - 39,6 нм. У той же час синтезовані частинки ZnO склалися з гексагональної фази ZnO ($a = 0,3242$ нм, $c = 0,517$ нм, JCPDS 00-001-1136), середній розмір кристалітів становив 25,5 нм. Рентгенівські спектри цих зразків, а також композитів HA-Alg та HA-Alg-ZnO приведені на рис. 1.8.

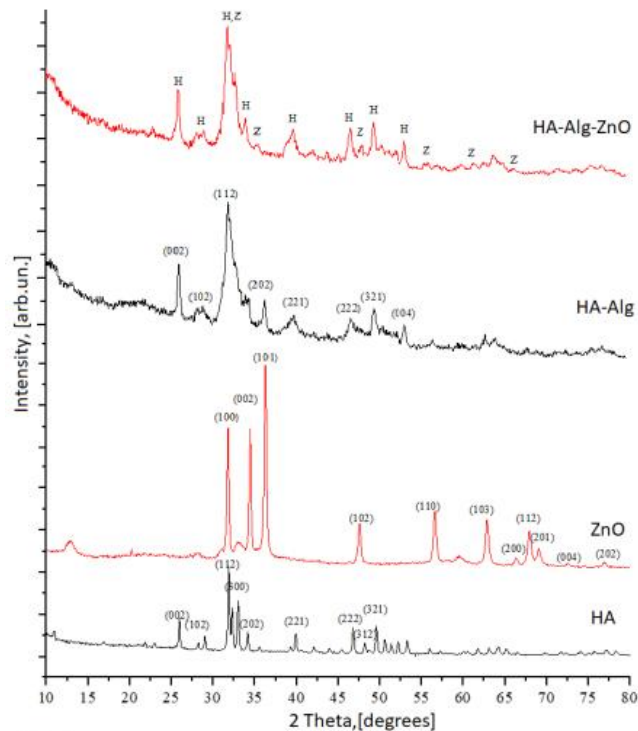


Рисунок 1.8 – Рентгенівські дифрактограми від зразків композиційних матеріалів та їх компонентів: ZnO та HA, виготовлених під впливом MW та відпалених при 900 °C; HA-Alg та HA-Alg-ZnO. Основні піки позначені індексами Міллера, а також літерами: H - гідроксиапатит, Z – ZnO

ТЕМ дослідження. Морфологію синтезованих зразків досліджували за допомогою ТЕМ, див. рис. 1.9.

Зразок HA представлений кристалітами голкоподібної форми (рис. 1.9с), яка є характерною для кісткового апатиту.

Аналіз частинок ZnO за допомогою ТЕМ показує, що нанокристаліти ZnO (до 50 нм) представлені включеннями кубічної структури (рис. 1.9а) з параметрами решітки $a = 0,427$ нм і переважно шестикутною структурою (рис. 1.9b) з параметрами решітки $a = 0,32427$ нм, $b = 0,32427$ нм і $c = 0,51499$ нм. Цей факт може бути пояснений особливостями виготовлення оксиду цинку. Як було сказано вище, зародження ZnO відбувалося з проходженням електричного струму, подальше зростання кристалітів та осадження продукту здійснювалося нагріванням реакційної суміші до 80 °C. Оскільки похибка методу рентгенівської дифракції становить приблизно 5-6% об'ємної

частки фаз, а концентрація кубічної фази ZnO не перевищує цей поріг, включення кубічної фази оксиду цинку не могли бути ідентифіковані в області дифракційного спектру під високим кутом (рис. 1.9).

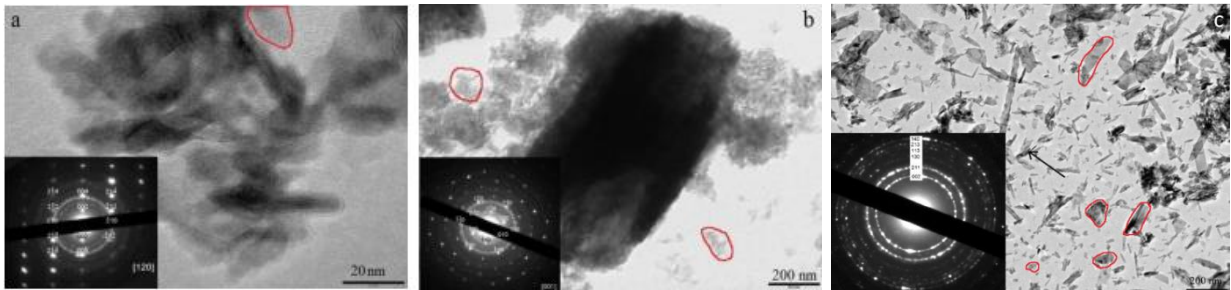


Рисунок 1.9 – ТЕМ-зображення кристалітів та електронно-дифракційних моделей ZnO з помітними наногранулами: з кубічною решіткою (шкала 20 нм) (а), з шестикутною решіткою (шкала 200 нм) (б); НА із помітними наногранулами та дифракційними кільцями (с)

FTIR-спектроскопія. FTIR-спектроскопія була використана для досліджень взаємодії функціональних груп компонентів у зразках НА-ZnO та НА-Alg-ZnO. (рис.1.10)

Спектр чистого НА представлений характерними коливаннями: вібраційні смуги в області 562 та 602 см^{-1} відповідають ν_4 коливанням груп О-Р-О. Пік при 962 см^{-1} відповідає симетричним (ν_1) коливанням фосфатних груп [42]. Діапазон з піком у 1026 см^{-1} відноситься до асиметричних ν_3 коливань Р-О [43]. Полоса на відстані 1420 см^{-1} належить до розтягуючих (ν_1) коливань групи CO_3 , що свідчить про утворення частки карбонатного апатиту під впливом мікрохвильового випромінювання під час синтезу [34]. Діапазон близько 1640 см^{-1} пов'язаний з коливаннями зв'язків Н-О-Н в адсорбованих молекулах води [44]. Смуги з піками при 3734 см^{-1} належать до поверхневих гідроксильних груп, а також до адсорбованих молекул води [45]. Після додавання мікрокристалічного ZnO до гідрогелю НА, всі характерні коливання НА зберігаються в спектрі, але смуга Р-О зміщується з $1026,6$ до $1030,9\text{ см}^{-1}$, що може свідчити про порушення симетрії молекули

НА. Значні зміни ІЧ-спектру відбулися після додавання альгінату натрію до системи (рис. 1.10в). З'явилися специфічні для альгінату коливання: піки 3435 cm^{-1} та $2987,5\text{--}2901,2\text{ cm}^{-1}$ відносять до коливань вільних та зв'язаних з воднем ОН-груп у карбонових кислотах відповідно [46]. Пік при 1615 cm^{-1} відповідає карбонілу $\text{C}=\text{O}$. Деформація $\text{O}-\text{H}$ (вторинна гідроксильна група) в $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ перекривається коливаннями $\text{P}-\text{O}$ і подається як інтенсивний пік при 1056 cm^{-1} . Деформація ОН-групи в COOH показана на піку 892 cm^{-1} . Відбувається зсув піку від 1030 cm^{-1} до 1056 cm^{-1} , значне розширення коливальної смуги після введення альгінату до складу композиту, а також зміни коливань ОН у карбоксильних групах альгінату ($1340, 1030, 1097, 947, 890\text{ cm}^{-1}$). Ці зміни можуть свідчити про утворення нових хімічних зв'язків у композитному матеріалі. Можна припустити, що карбоксильні групи альгінату іонізуються до COO^- і утворюють Н-зв'язок або інше з'єднання під час утворення композиту НА-Alg-ZnO.

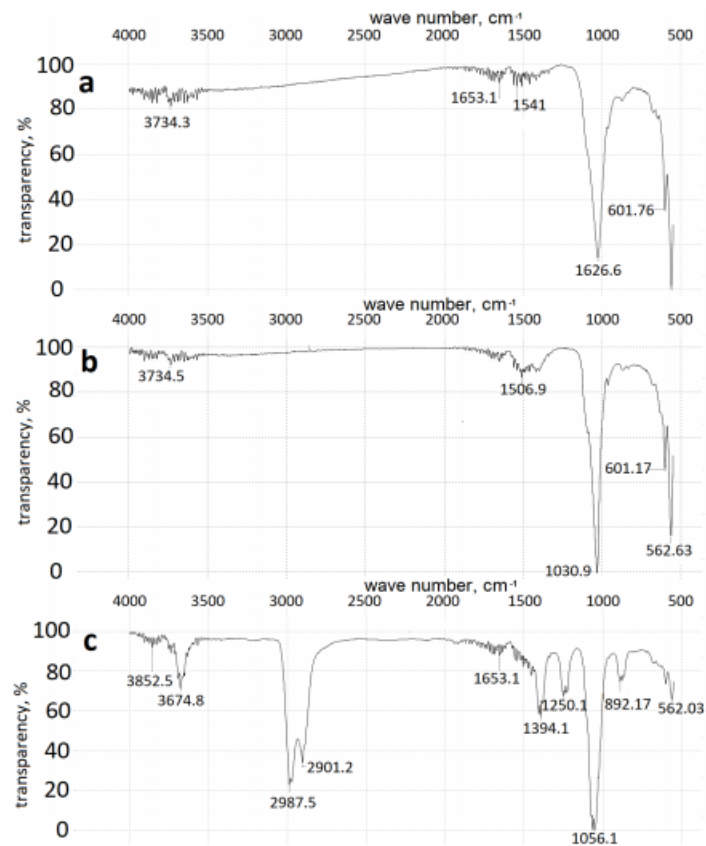


Рисунок 1.10 – FTIR спектри синтезованих зразків: НА (крива а), НА-ZnO (крива б) та НА-Alg-ZnO (крива с)

Дослідження ступеню набрякання. Вплив часу експозиції зразків в зшиваючому розчині CaCl_2 , при формуванні гранул на їх здатність адсорбувати рідину вивчали в розчині PBS при різних значеннях рН. Випробування на набряк проводили протягом 24 годин щодо HA-Alg та HA-Alg-ZnO гранул, час витримки яких у розчині CaCl_2 становив 25 хвилин (рис. 1.11а) та 18 годин (рис. 1.11б). Ступінь набрякання досліджували при значеннях рН 4,5 та 7,3 з урахуванням умов резорбції живого організму та утворення нової кісткової тканини, викликаної специфічними клітинами остеобластів та остеокластів у межах зазначених значень рН.

Результати показують, що ступінь набрякання зразків збільшується при введенні ZnO в композит. Збільшення часу витримки в розчині, що зшиває, призводить до зниження ступеня набрякання. Виявилось, що зразки з вмістом ZnO дещо менш чутливі до набрякання в нейтральному середовищі при рН = 7,3, ніж у кислому при рН = 4,5.

Залежно від часу витримки в зшиваючому розчині, пористість контрольного HA-Alg становить 5-15%, тоді як пористість HA-Alg-ZnO становить 35-50%. Збільшення пористості сприяє збільшенню кількості ділянок для адгезії та проліферації клітин, що утворюють нову кісткову тканину, і є однією з вирішальних вимог до біоматеріалів.

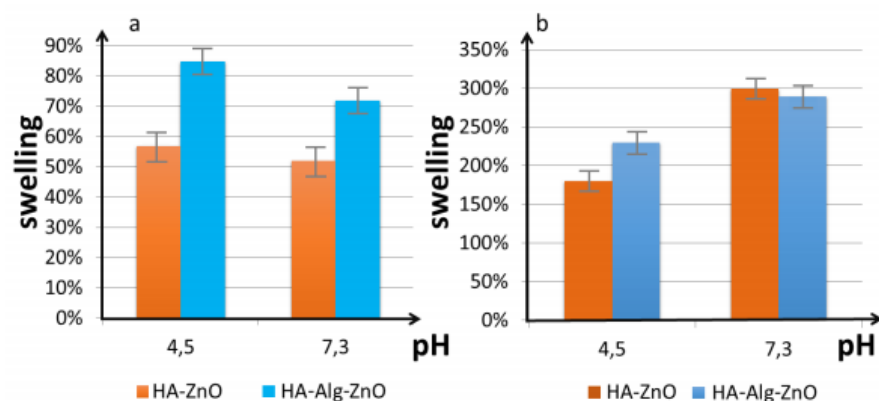


Рисунок 1.11 – Ступінь набрякання (в %) гранул HA-Alg та HA-Alg-ZnO з часом витримки в CaCl_2 : 25 хвилин (а) та 18 годин (б)

Антимікробна активність. Дослідження антимікробної активності матеріалу HA-Alg-ZnO щодо *E. coli* ATCC 25922 та *S. aureus* ATCC 25923 проводили методом дискової дифузії в агар. Для антибактеріальної проби використовували 0,1 мл суспензії HA-Alg-ZnO, в якій вміст активної речовини (ZnO) становив 0,7 мг та 0,1 мл HA-Alg (як контроль).

Зони інгібування для зразків, що містять ZnO, становили близько 10 мм, що вказує на незначну антимікробну активність композиту, причиною якої може бути слабка дифузія діючої речовини з композиту в агар. Зразки без вмісту ZnO не проявляють інгібування росту для обох бактеріальних культур. Наявність зони гальмування росту вказує на біоактивну дію частинок ZnO. Результати випробувань щодо *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922 показані на рис. 1.12.

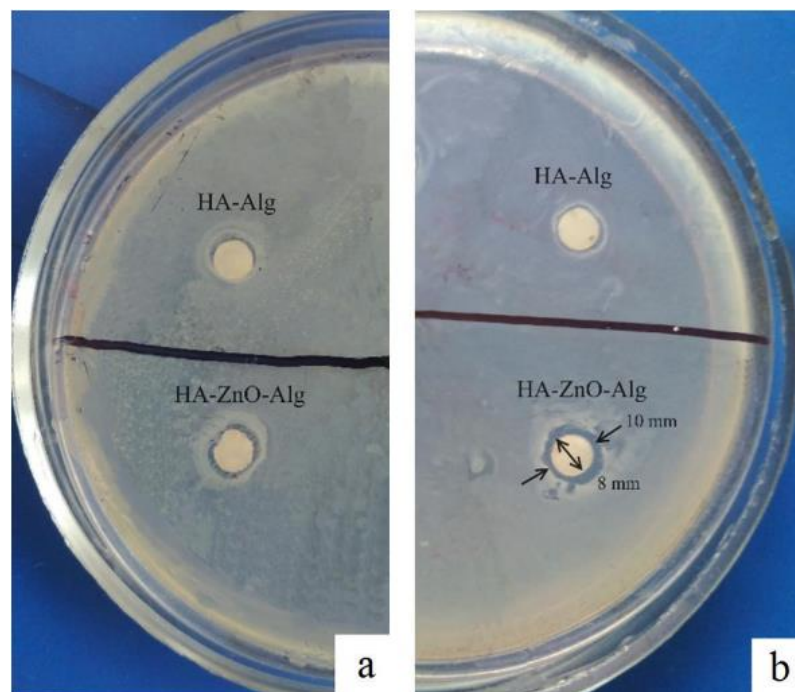


Рисунок 1.12 – Тест антибактеріальної активності HA-Alg (контроль) та HA-Alg-ZnO щодо *S.aureus* ATCC 25923 (a) та *E. coli* ATCC 25922 (b)

Запропонований антибактеріальний механізм композиційного матеріалу HA-Alg-ZnO полягає у виділенні в середовище іонів цинку.

Вивільнені іони Zn^{2+} мають істотний вплив на пригнічення активного транспорту, а також на метаболізм амінокислот та порушення функціонування ферментативної системи бактерій. Згідно з роботами [46, 47], цей механізм найбільш підходить для наноструктурованих кристалів ZnO, коли швидкість процесу виходу Zn^{2+} збільшується зі зменшенням розміру частинок ZnO, що також безпосередньо впливає на розмір зони інгібування. Детальна інформація представлена в таблиці 1.1.

Таблиця 1.1 – Залежність розміру зони затримки росту від концентрації ZnO

Концентрація ZnO	Зони затримки росту, мм	
	E.coli	S.aureus
10 мг/мл	29±2	19±1
15 мкг/мл	-	-
0,5 мг/мл	-	-
	-	12±1
7 мг/мл	10±1	10±

Наявність інгібуючої зони вказує на те, що механізм біоактивної дії частинок ZnO передбачає порушення бактеріальної мембрани після формування високореактивних кисневих молекул (ROS) на поверхні ZnO частинок з наступним утворенням молекул перекису водню, які призводять до загибелі бактеріальних клітин. Ми припускаємо, що наночастинки ZnO з кубічною структурою (параметр решітки $a = 0,427$ нм) вносять більший внесок у антибактеріальну активність, ніж наночастинки з гексагональною структурою (параметри решітки $a = 0,32427$ нм, $b = 0,32427$ нм та $c = 0,51499$).

Пояснення базується на тому, що лише наночастинки ZnO з шестигранною структурою можуть утворювати хімічний зв'язок з гідроксиапатитом. Фосфати цинку та кальцію відомі як нерозчинні у воді.

Наночастинки ZnO з кубічною структурою не утворюють хімічних зв'язків з фосфатами і, таким чином, з більшою ймовірністю утворюють частинки іонів ROS і Zn^{2+} , які можуть взаємодіяти з білком і надають потенційний вплив на патогенез ВПГ-1 [47].

Висновки:

Дослідження XRD та EDS показали утворення гідроксиапатиту з відношенням мас Ca/P = 2,15, що відповідає стехіометричному апатиту.

Введення ZnO у склад композиту збільшує його пористість і ступінь набрякання в фосфатному буферному розчині PBS.

Збільшення часу зшивання в розчині $CaCl_2$, призводить до зниження ступеню набрякання.

Зразки, що містять ZnO, менш чутливі до набрякання в нейтральному середовищі при рН = 7,3, ніж у кислому середовищі при рН = 4,5.

Зазначена концентрація ZnO в композитному матеріалі на основі НА забезпечує слабку антимікробну активність.

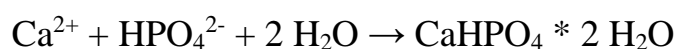
2 РОЗРОБКА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПОКРИТТІВ НА МОДЕЛЬНИХ ТИТАНОВИХ СУБСТРАТАХ МЕТОДОМ ТЕРМІЧНОЇ ДЕПОЗИЦІЇ

2.1 Біоактивні покриття з гідроксиапатиту та брушиту на модифікованих методом плазмо-електролітичного окислення Ti6Al4V субстратах

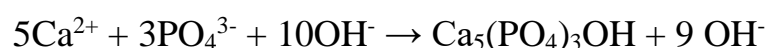
Технологія TSD заснована на залежності розчинності CaP від температури. Нагріваючи субстрат у насиченому водному розчині, можна отримати твердий осад безпосередньо на поверхні субстрату. Фазовий склад покриття змінюється залежно від pH, температури та іонної концентрації компонентів реакційної суміші [48]. Раніше TSD застосовували для осадження тільки CaP на Ti-сплавах без обробки ПЕО. В даному дослідженні метод був застосований для отримання також і біоактивних покриттів ZnO та ZnO/Alg на металевих (Ti6Al4V) субстратах.

Методика. Для отримання ПЕО-покриття підкладку Ti6Al4V механічно відшліфовували за допомогою абразивних паперів SiC (400–800) з подальшою анодизацією протягом 5 хв. в 0,1М Ca(H₂PO₄)₂ при напрузі 300 В і щільності струму 100mA/cm² (блок живлення: Kikusui PWR800H, Японія). Сплав Ti використовували як анод, а титанову сітку використовували як катод. Брушит (DCPD) наносили на попередньо оброблену ПЕО підкладку методом TSD з 200мл розчину, що містить 0,01М CaCl₂ та 0,006М H₃PO₄ при pH 6,52. Пропусканням змінного струму через підкладку протягом 30 хвилин субстрат нагрівали до 85 °С.

Для запобігання спонтанного утворення фосфату кальцію у всьому об'ємі використовували систему охолодження. Реакція утворення DCPD наступна:



Для нанесення покриттів з НА застосовували вище описаний метод, але температура субстрату складала 140 °С. Реакція утворення НА наступна:



Дослідження та обговорення. Структуру отриманих покриттів досліджували за допомогою рентгенівської дифракції (XRD; DRON 3 LTD "Буревестник"), рентгенівської флуоресценції (XRF; ElvaX Light SDD) та скануючої електронної мікроскопії (SEM; FEI Inspect S 50).

На рис. 2.1 показано SEM зображення механічно відполірованої поверхні титанової підкладки (А) та підкладки, обробленої методом ПЕО (В).

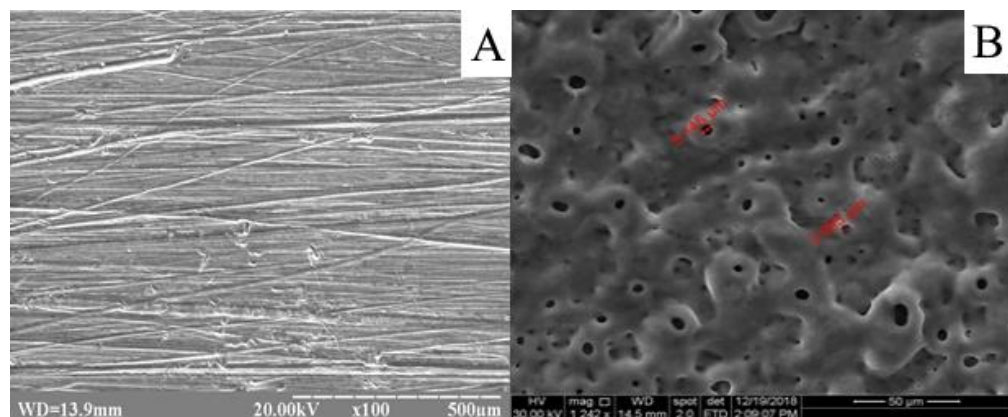


Рисунок 2.1 – Морфологія поверхні субстратів Ti6Al4V: (А) - до обробки ПЕО; (В) - після ПЕО

Поверхня Ti6Al4V субстрату перед обробкою ПЕО типова для вихідного матеріалу (рис. 2.1А). Пори на оброблюваній поверхні (рис. 2.1В) є типовими для ПЕО і утворювалися під час явищ мікророзряду внаслідок високої напруги та виділення кисню під час процесу ПЕО [49]. Інтенсивність пороутворення залежить від анодного потенціалу, щільності струму та тривалості обробки. Пори мають різні розміри і рівномірно розподіляються в оксидному шарі (від 0,5 до 6 мкм). На основі вимірювань XRF можна зробити висновок, що шар ПЕО складається з оксидів (переважно TiO₂) з включеними іонами кальцію та фосфору [50]. Утворення подібної пористої поверхні призводить до збільшення шорсткості поверхні, що підвищує адгезію створюваного шару фосфату кальцію.

Згідно теорії утворення фосфату кальцію, розчинність зменшується зі збільшенням температури. Кореляційний зв'язок між продуктом розчиненості НА K_{sp} (mol/dm^{-3}) і температурою T (К) виражається рівнянням:

$$\lg K_{sp} = - 8219.41/T - 1.6657 - 0.098215 T$$

При нагріванні водного розчину, в якому присутні іони Ca^{2+} та PO_4^{3-} , відбувається осадження різних фосфатів кальцію. Серед них особливий науковий інтерес представляють DCPD та НА через їх привабливу біологічну реакцію на середовища *in vivo*. Іонні продукти (K_{ip}) цих двох сполук такі:

$$K_{ip}(\text{DCPD}) = [\text{Ca}^{2+}] [\text{HPO}_4^{2-}]; K_{ip}(\text{HA}) = [\text{Ca}^{2+}]^5 [\text{PO}_4^{3-}]^3 [\text{OH}],$$

де $[X]$ - молярна концентрація.

Підвищення концентрації $K_{ip} = K_{sp}$ або рН розчину призводить до осадження СаР за умови $K_{ip} = K_{sp}$. Як показано, розрахунками згідно рівняння $\lg K_{sp85} = -59.8$ і $\lg K_{sp140} = -62.1$, або $K_{sp85} > K_{sp140}$.

Отже, використання методу TSD дає можливість отримати на титановому субстраті два різних монофазних покриття СаР з бажаною кристалічною фазою. Описані закони є основою формування експериментального покриття.

На рис. 2.2 показані зображення покриттів НА (А, В) та DCPD (D, E). Покриття НА має товщину 300 мкм, щільне і складається як з голкоподібних, так і пластинчастих кристалітів. Покриття DCPD значно меншої товщини (50 мкм) з голкоподібними кристалітами.

Морфологія отриманих покриттів визначається як температурою їх осадження, так і структурою молекул, що утворюють покриття. Молекула НА (М.М. 502) має гексагональну решітку, тоді як DCPD (М.М. 172) має моноклінну решітку. Значна різниця між цими молекулами викликає переважаючий ріст кристалітів DCPD, порівняно з НА. Відповідно до гістограм розподілу розмірів (рис. 2.2 С, F), середні розміри агломератів найбільших фракцій НА та DCPD складають відповідно 4,4 мкм та 7 мкм. Пористість утворених покриттів контролюється вищевказаними чинниками. Згідно з даними SEM, середні розміри пор для покриттів НА та DCPD

відповідно становлять 5 та 8 мкм. Обидва покриття добре розподілені і рівномірні.

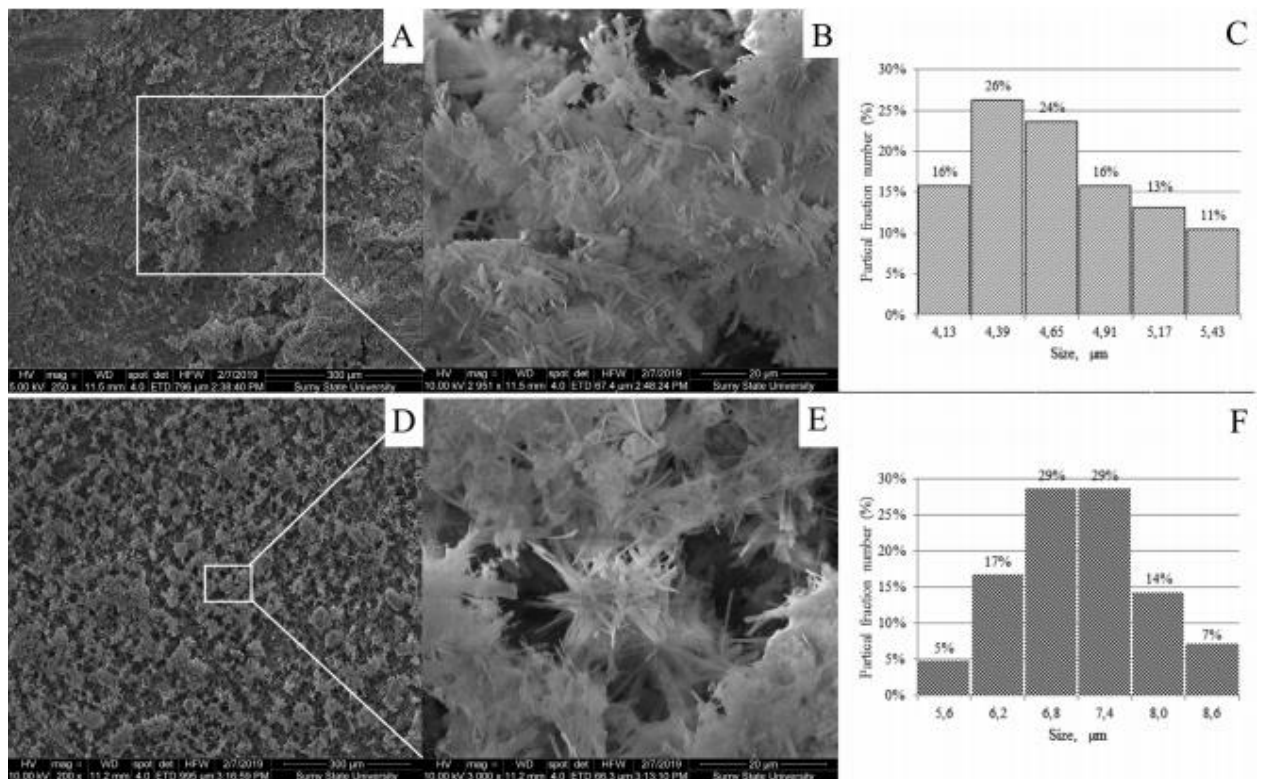


Рисунок 2.2 – SEM зображення (при різних збільшеннях) субстратів $Ti6Al4V$, оброблених за ПЕО методом, покритих HA (A, B) та DCPD (D, E).

Гістограми розподілу розмірів частинок HA (C) та DCPD (F)

Зображення XRD експериментальних зразків та їх фазовий склад щодо вибраних елементів наведені на рис. 2.3.

На обробленому ПЕО субстраті при 85 °C було отримано покриття з однофазним DCPD, в той час як підвищення температури підкладки до 140 °C призвело до утворення фази HA та збільшення товщини покриття. Цей результат був підтверджений XRD: на дифрактограмі HA є лише два піки титану (002, 310), тоді як серія піків TiO_2 присутня в дифрактограмі DCPD (рис. 2.3).

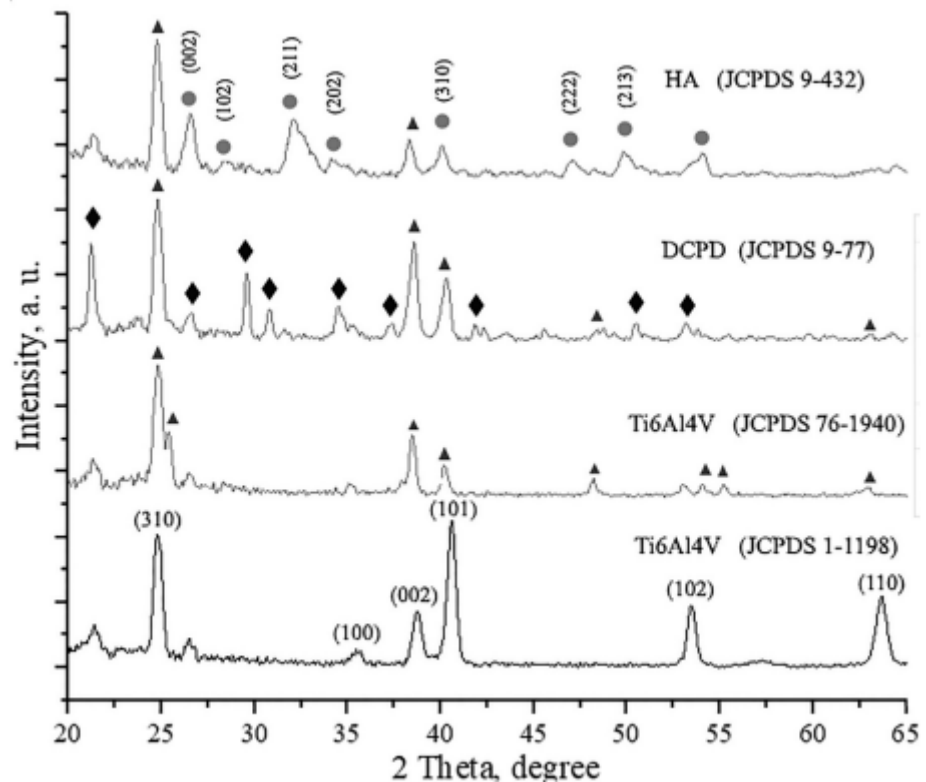


Рисунок 2.3 – Спектри XRD експериментальних зразків: чистий Ti6Al4V субстрат; оброблений PEO Ti6Al4V субстрат; покриття DCPD і HA на Ti6Al4V субстраті. Титанові піки позначені індексами Міллера; TiO₂ (рутил) - ▲; DCPD - ◆; HA - ●

Середні розміри кристалітів (L) в напрямку [002] для HA та в напрямку [040] для DCPD були оцінені за відповідним розширенням піку за рівнянням Шеррера [51]. Розрахунок параметрів структури кристалічної клітини HA показав незначні відхилення параметрів a і c (табл. 2.1) порівняно з відповідними значеннями для стехіометричного HA ($a = 0,942$ нм; $c = 0,688$ нм). Згідно з даними XRF, атомне співвідношення Ca/P у отриманому HA становило 1,64, тоді як для стехіометричного HA це відношення становить 1,67 (рис. 2.3). Отримані дані вказують на утворення кальцій дефіцитного HA з малим вмістом карбонатної фази.

Таблиця 2.1 – Параметри кристалічної структури покриттів DCPD та HA.

Зразок	Розмір кристалітів для піка (002)	Параметри кристалічної решітки, нм			
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	$\epsilon, 10^3$
HA	26,39	0,936	-	0,657	0,48
DCPD	29,2	0,574	1,44	0,643	0,63

Іони карбонату з реакційно здатного розчину адсорбувалися HA при синтезі. Відомо, що карбонатний апатит типу В характеризується зменшенням параметра решітки *a*. Параметри комірки моноклінної решітки DCPD оцінювали за допомогою системи лінійних рівнянь з чотирма невідомими членами: *a*, *b*, *c* і β [52]. Вклад малих розмірів когерентних областей розсіювання та існуючих мікродеформацій у розширення піків був визначений методом Вільямсона – Холла, використовуючи піки, які відповідають площинам різних порядків відбиття, паралельних напрямку [0*b*0] для DCPD та [00*c*] для HA. Мікродеформації (ϵ) для HA є суттєво меншими, ніж для DCPD.

Висновки:

Метод TSD був застосований для нанесення монофазних CaP покриттів, а саме HA та DCPD на Ti6Al4V субстрати, попередньо оброблені методом плазмо-електролітичного окислення.

На обробленому ПЕО субстраті при 85 °C було отримано покриття з однофазною DCPD, тоді як підвищення температури субстрату до 140 °C призвело до утворення фази кальцій дефіцитного HA (Ca/P = 1,64) і збільшення товщини покриття.

За 30 хвилин осадження було отримано покриття HA з товщиною 300 мкм, що складається з кристалів голкоподібної та пластинчастої форми з

середнім розміром 4 мкм та DCPD покриття товщиною 50 мкм з голкоподібними кристалами розміром 7 мкм.

2.2 Біоактивні ZnO та ZnO/Alg покриття з протимікробними властивостями

Модифікація поверхні металевих імплантатів є одним із перспективних методів поліпшення фізико-механічних та біологічних властивостей цих матеріалів. Відомо, що кістковий мінерал містить деякі заміщення, такі як іони натрію (Na), цинку (Zn), магнію (Mg), заліза (Fe) та карбонату (CO_3^{2-}), які впливають на швидкість розчинення HA, контролюють його кристалічність та структуру [53]. Враховуючи серйозну небезпеку бактерій для здоров'я, багато неорганічних матеріалів було розроблено як антибактеріальні засоби для знищення бактерій, такі як 2D наноматеріали MoS_2 [54], оксид графену [55,56], нітрид вуглецю [6], а також матеріали на основі Ag [57,58]. Серед них іони Zn та оксид цинку (ZnO) є перспективними кандидатами для вирішення проблеми, оскільки вони володіють більшою міцністю, стабільністю та селективністю, меншою токсичністю [59].

У літературі також описані способи нанесення покриття ZnO: осадження металоорганічних хімічних парів та термічне випаровування [60], мокрий хімічний метод [61], імпульсне лазерне осадження [62], розпилувальний піроліз [63], епітаксіальне електроосадження, радіочастотне магнетронне розпилення [64]. Вибір методу синтезу визначає фізико-хімічні характеристики наночастинок оксиду металу, такі як розмір, дисперсність, тип внутрішніх дефектів, морфологію та структуру кристалів [65].

У свою чергу, вищезазначені фактори впливають на антимикробну активність оксиду цинку. Таким чином, було встановлено, що кристалографічна орієнтація та тип поверхневої площини монокристалічного масиву 1D ZnO впливають на антибактеріальні властивості: мембрана з наноматрицями ZnO, орієнтована випадковим чином, демонструє значно

кращу антибактеріальну властивість [66]. Наноструктури ZnO у формі стрижнів і проводів можуть проникати в клітинні стінки бактерій легше, ніж сферичні [67]. Тоді як наночастинки ZnO у формі квітки виявляють більшу біоцидну активність проти *S.aureus* та *E.coli*, ніж сферичні та стрижнеподібні наноструктури [68].

У цій роботі для отримання біоактивних покриттів ZnO та ZnO/Alg на металевих (Ti6Al4V) субстратах був використаний модифікований TSD метод осадження з водних розчинів, який був застосований для утворення покриттів на основі кальцій фосфатів (розділ 2.1). Застосування цього способу для покриттів ZnO пояснюється подібністю фізико-хімічних процесів утворення цих типів покриттів. Як уже зазначалося, процес осадження передбачає проходження змінного струму через металеву підкладку, занурену у водний розчин. В результаті металевий субстрат нагрівається до температури 100 °C за рахунок резистивного нагрівання (нагрівання Джоуля), хоча гідропроект проходить під атмосферним тиском.

Одним із методів модифікації поверхні титанового імплантату є утворення на ньому оксидної TiO₂ плівки анодизацією, яка покращує антикорозійну стійкість імплантату. Оксидна плівка також характеризується високими адсорбційними властивостями. У представленому документі покриття ZnO та ZnO/Alg були нанесені на анодовану титанову поверхню.

Матеріали

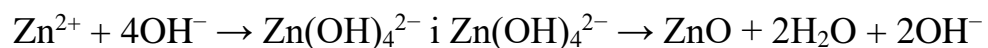
Для синтезу використовувались такі сполуки: нітрат цинку Zn(NO₃)₂ × 6H₂O, аміак водний NH₄OH, сірчана кислота H₂SO₄, фторид натрію NaF, альгінат натрію (E 401, низька в'язкість) виробництва Shanghai Chemical Company Ltd, Китай. Всі компоненти були аналітично чистими і використовувались без подальшого очищення.

Методика отримання оксидного шару на поверхні субстратів перед нанесенням покриттів на основі оксиду цинку

Пластина Ti6Al4V (20 × 1,8 × 0,9 мм) була використана в якості експериментального субстрату. Зразок перед осадженням шліфували папером SiC і промивали етанолом та деіонізованою водою в ультразвуковому очищувачі з наступним анодуванням протягом 1 години при кімнатній температурі в електроліті наступного складу: H₂SO₄ - 20% мас/мас; NaF - 0,5% мас/мас для утворення на поверхні шару TiO₂. Пластинки свинцю та титану використовували відповідно як катод та анод. Щільність постійного струму 1-1,5 А/дм² підтримувалася протягом перших 5 хвилин напругою до 12 В. Подальший процес анодизації проводився без коригування значення струму, його щільність становила близько 0,2 А/дм². Анодований титановий субстрат був відпалений при температурі 500 °С протягом 1 години в печі з подальшою обробкою етанолом та промиванням деіонізованою водою.

Нанесення ZnO, ZnO/Alg на Ti6Al4V субстрат

Нанесення покриття з ZnO на титанові субстрати проводилося методом TSD, який описаний вище. Середовище для покриття готували наступним чином: до 200 мл 0,2 М водного розчину Zn(NO₃)₂ × 6H₂O додавали по краплях при інтенсивному перемішуванні 30 мл 25% аміаку для отримання прозорого лужного розчину, що містить ZnO наночастинки. Утворення наночастинок ZnO в розчині відбувається відповідно до наступної хімічної реакції [69]:



Анодований субстрат Ti6Al4V був занурений у підготовлений розчин і протягом 20 хвилин через субстрат пропускався змінний електричний струм силою 2А, в результаті чого субстрат нагрівався до 80 °С. Це створило сприятливі умови реакції для осадження наночастинок ZnO на поверхні субстрату.

Для утворення ZnO/Alg покриття 3 г альгінату натрію розчиняли в 100 мл 0,01 М NaOH і 4 мл цього 3% лужного розчину по краплях додавали до суміші 200 мл 0,2 М Zn(NO₃)₂ × 6 H₂O та 30 мл 25% аміаку при інтенсивному

перемішуванні. Отриманий розчин поміщали в шейкер і перемішували протягом 0,5 год (200 об/хв) при кімнатній температурі.

Способи отримання покриттів ZnO схематично представлені на рис. 2.4:

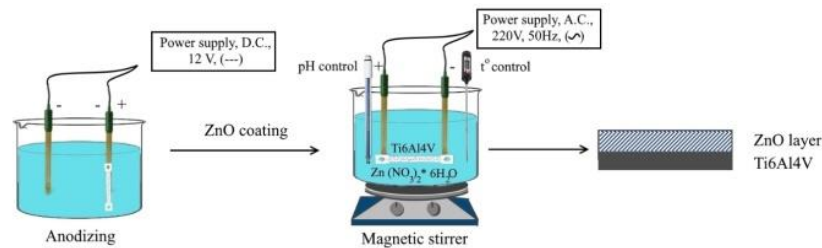


Рисунок 2.4 – Схема нанесення покриття ZnO на анодований Ti6Al4V субстрат за методом TSD

Дослідження та обговорення

Як було сказано вище, два види покриттів було отримано та досліджено: ZnO/Alg покриття нанесене з розчину, що містить полімер Alg і ZnO р розчину, що не містить полімеру. СЕМ дає інформацію про морфологію поверхні цих покриттів (рис. 2.5). Очевидно, що присутність у маточному розчині полімерного компонента альгінату натрію істотно впливає на утворення покриттів, тому вони відрізняються за морфологією. У присутності альгінату утворюються поодинокі кристали у формі тетраєдрів, тоді як з розчину, що не містить полімеру, утворюються кулеподібні частинки з квітковими вкрапленнями. Товщина покриття ZnO, нанесеного протягом 20 хвилин на титанову підкладку, становить 180 мкм, тоді як товщина покриття ZnO/Alg, нанесеного за той же час, становить 600 мкм. Середня швидкість осадження з розчину, що містить альгінат, становить 30 мкм/хв, а з розчину, що не містить альгінату - 9 мкм/хв.

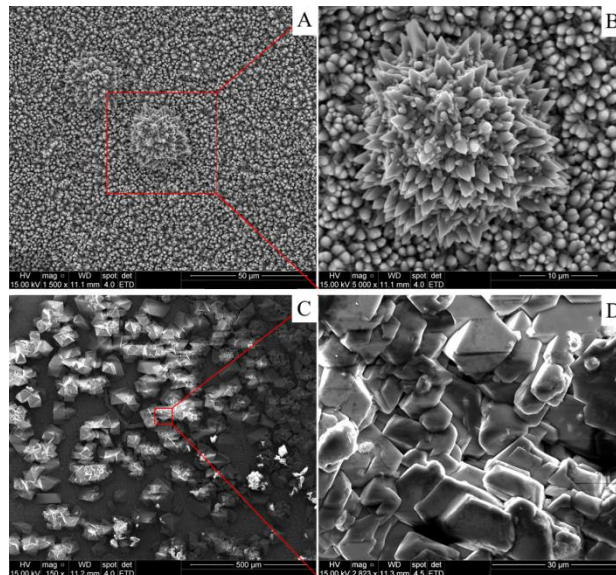


Рисунок 2.5 – Морфологія поверхні покриттів, отриманих TSD методом на титановому субстраті: (A), (B) - ZnO при різних збільшеннях; (C), (D) - ZnO/Alg при різних збільшеннях

Основні піки кристалічних фаз TiO_2 та ZnO на відповідних рентгенівських дифрактограмах від експериментальних зразків позначені індексами Міллера (рис. 2.6). На дифрактограмі анодованого Ti6Al4V субстрата (без покриття) показані піки, що належать TiO_2 (карта JCPDS № 76-0322 Рутил). Деякі піки рутилу також присутні на дифрактограмах зразків із покриттями ZnO та ZnO/Alg, але інтенсивність цих піків мінімальна порівняно з піками ZnO. XRD вказує на утворення додаткової другорядної фази оксиду титану Ti_3O_5 (картка JCPDS № 01-072-2101) після перебування титанового субстрату в лужних умовах при осадженні ZnO. Як для покриттів ZnO, так і для ZnO/Alg, аналіз XRD показує наявність однофазного ZnO (JCPDS 03-0891) без додаткових піків. Піки найвищої інтенсивності при (002) показують, що напрямок росту наночастинок ZnO - вздовж осі c для обох покриттів. Але інші піки, характерні для фази ZnO, такі як (100), (101), (102), є більш інтенсивними за XRD-схемою для ZnO/Alg порівняно з покриттям ZnO, що доводить утворення частинок різної форми під впливом молекул полімеру.

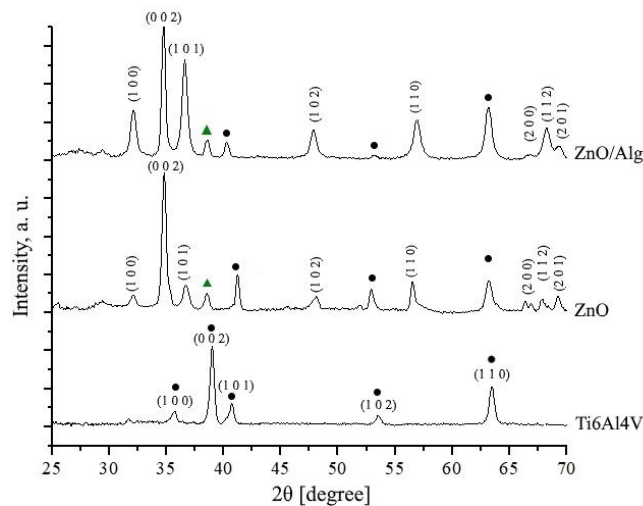


Рисунок 2.6 – Дифракційні структури зразків: анодований титановий субстрат, покриття ZnO та ZnO/Alg, нанесені на титановий субстрат. Піки підкладки TiO_2 позначені ●; піки оксиду титану Ti_3O_5 позначені ▲; піки, що належать ZnO, позначаються індексами Міллера

Для визначення параметрів структури покриттів використовувався метод Харріса (Harris, НТІ). Розміри кристалітів за Шеррером (L) оцінювали для всіх основних піків фази ZnO, а також розраховували параметри кристалічної ґратки (a і c , nm) з використанням піків (1 0 3) та (0 0 2) відповідно. Хороша роздільна здатність піків (0 0 2) та (0 0 4) дозволила відокремити внески від невеликих розмірів когерентних областей розсіювання (L_{WH}) та наявність мікронапружень (ϵ) у розширенні піків. Розмежування цих внесків було здійснено методом Вільямсона – Холла. Ці результати представлені в таблиці 2.2.

Кристалічність фази ZnO в отриманому без додавання полімеру покритті є вищою, ніж у ZnO/Alg, в той же час інтенсивність більшості піків для зразка ZnO/Alg є вищою, що свідчить про більшу товщину покриття в цьому випадку. У випадку зразка ZnO спостерігаються більші значення мікронапружень у напрямку (0 0 1). Обидва зразки мають значну текстуру. НТІ показує її зниження для ZnO/Alg порівняно з ZnO. Очевидно, що зміни в

структурі зумовлені впливом альгінату натрію. Альгінатні макромолекули в присутності двовалентного металу (Zn^{2+}), як правило, приймають впорядковане положення шляхом димеризації [70], тому вони створюють контрольовані умови для зростання наночастинок ZnO.

Таблиця 2.2 – Параметри кристалічної ґратки ZnO покриттів на Ti6Al4V субстратах, отриманих методом TSD.

Sample	Value	(100)	(002)	(101)	(110)	L_{wh}, nm $\epsilon, 10^{-3}$	a, nm c, nm
ZnO	L, nm	27,3	39,3	26,3	18,0	106,0	0,325
	HTI	0,177	3,389	0,096	0,078	2,862	0,521
ZnO/Alg	L, nm	12,0	50,8	15,7	10,3	69,6	0,322
	HTI	0,036	2,455	0,036	0,047	1,591	0,518

Антибактеріальну активність покриття ZnO/Alg досліджували проти грамнегативної *E.coli* та грампозитивної бактерії *S. Aureus* методом дифузії в агар та визначали зону пригнічення росту мікробних клітин. Ріст бактерій візуалізували після інкубації субстратів протягом ночі при 37 °C на твердому поживному середовищі. Результати антимікробної активності представлені в табл. 2.3 та рис. 2.7. Зона інгібування росту (у мм) навколо покритих субстратів відображає антимікробний вплив покриття. Чим більша зона гальмування, тим більшою є антимікробна активність.

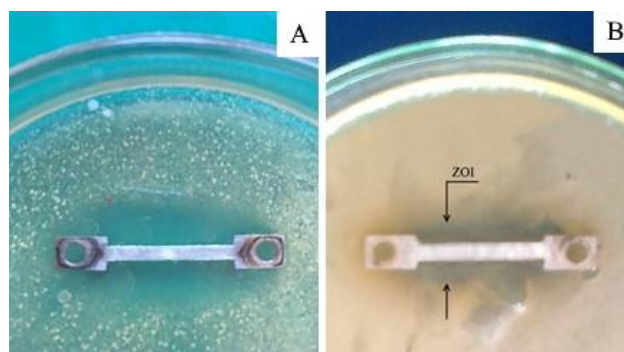


Рисунок 2.7 – Антимікробна активність покриття ZnO/Alg проти (А) *E. coli* ATCC 25922; (В) *S. aureus* ATCC 25923

Таблиця 2.3 Антимікробна активність покриття ZnO/Alg щодо досліджуваних штамів, $M \pm m$.

Культури мікроорганізмів	Зона затримки росту за диско- дифузійним методом
	ZnO/Alg
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16.0±1.33
<i>E. coli</i> ATCC 25922	20.0±0.66

Note: $p \leq 0.05$

Таким чином, наночастинки ZnO, осаджені в присутності альгінату на субстраті Ti6Al4V методом TSD, демонстрували виражену інгібуючу активність як проти бактерій *S.aureus*, так і проти *E.coli*. Хоча точний антибактеріальний механізм металічних наночастинок все ще не зовсім зрозумілий, запропоновано деякі відмітні моменти, які включають утворення реактивних видів кисню (ROS) на поверхні наночастинок оксиду металу, вивільнення іонів металів та вторгнення іонів у клітинну стінку бактерій, що провокує пряме механічне руйнування мембрани та спричиняє загибель бактеріальної клітини [71,72].

Висновки:

Покриття ZnO, ZnO/Alg були отримані на попередньо анодованих Ti6Al4V субстратах методом TSD.

Доведено, що природний біополімерний альгінат має значний вплив на формування покриттів, їх морфологію, текстуру, структуру наночастинок ZnO.

Середня швидкість осадження ZnO з розчину, що містить альгінат, становить 30 мкм/хв, а з розчину, що не містить альгінату, 6 мкм/хв. Товщина покриття ZnO, нанесеного протягом 20 хвилин, становить 180 мкм, тоді як товщина покриття ZnO/Alg, нанесеного за аналогічних умов, становить 600 мкм.

Для ZnO покриття характерно збільшення розміру кристалітів та мікронапружень у напрямку (0 0 1).

Покриття ZnO демонструють зони гальмування росту приблизно 16 мм для *S.aureus* і 20 мм для *E.coli*. Отримані покриття є перспективними для медичних імплантатів на основі титану та його сплавів, завдяки їх антибактеріальним властивостям.

3 ОТРИМАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКТИВИХ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ПРИРОДНИХ ПОЛІМЕРІВ ТА ГА З ВМІСТОМ НАНОЧАСТИНОК ФУЛЕРЕНУ

3.1 Розробка та дослідження поліелектролітної мембрани на основі природних полімерів та наноструктурованого ГА з імобілізованими лікарськими засобами

Розробка призначена для застосування в стоматології. Пародонтит - це захворювання ясен, що включає запальний процес та імунну відповідь. Він руйнує альвеолярну кістку, цемент, пародонт та ясна внаслідок мікробних скупчень [73]. Медикаментозне лікування пародонтиту в даний час є одним з найбільш поширених. Новий біоактивний композитний фуллерен-апатит/поліелектролітний матеріал у вигляді мембран для стоматологічних застосувань, був синтезований методом "мокрої хімії" та досліджений різними експериментальними методами. При створенні композитного матеріалу використовували здатність альгілату натрію до утворення гелю, а також антибактеріальні властивості, біосумісність та біодеградацію хітозану. Завдяки наявності аміногруп у полімерному ланцюзі хітозану, які у водно-кислотних середовищах із значенням рН <6,5 протонізуються до утворення NH³⁺ груп, молекули хітозану набувають позитивного заряду, що полегшує їх зв'язування з аніонними функціональними групами альгілату натрію, утворюючи поліелектролітний комплекс. Локалізуючись поблизу негативно заряджених поверхонь мікробних клітин, хітозан проявляє антимікробну дію, зв'язуючись із фосфоліпідами оболонки мембрани мікробної клітини, що призводить до порушення обмінних процесів та загибелі клітин [74]. У той же час структура отриманого апатит/полімерного гідрогелю включає наночастинки до 100 нм з характерною реакційною здатністю для таких частинок. Наночастинки іммобілізуються в альгінатній матриці, обмеження розміру пор якої дозволяє їм залишатися нанорозмірними в суспензії протягом тривалого часу до і після сублімації, що значно відрізняється від

порошків, в яких частинки НА та інших кальцій фосфатів є агломерованими. Оскільки всі наночастинки мають велику площу поверхні та велику вільну поверхневу енергію, вони легко агломериуються для зменшення поверхневої енергії. Тому попередня дисперсія частинок НА в полімері, здійснена в процесі синтезу, є важливим чинником при отриманні гомогенного полімер-НА композиту.

Матеріали. Були використані наступні матеріали та хімічні речовини: кальцій нітрат тетрагідрат $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, діамоній гідрофосфат $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, гідроксид амонію NH_4OH , альгінат натрію (низька в'язкість, E407, Китай), хітозан (ММ 300 кДа, Acros organics, США), фармацевтичний 0,05% хлоргексидин.

Отримання композитного матеріалу. Гідрогель НА був отриманий за методом «мокрої хімії», а саме: для синтезу НА використовували 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). Гідрофосфат амонію додавали по краплях до кальцій нітрат тетрагідрату. Шляхом додавання розчину аміаку отримували рН близько 10,5. 100 мл отриманої суспензії переносили в побутову мікрохвильову піч Samsung M1712NR для MW опромінення протягом 3 хвилин з наступним охолодженням при кімнатній температурі в закритому, але не герметичному посуді. Після промивання суспензії до нейтрального значення рН, тверду фракцію зразка відокремлювали центрифугуванням. Вміст вологи в отриманому гідрогелі НА становив близько 90%. Гідрогель диспергували у 0,05%-ний водний розчин гідроксиду натрію під дією ультразвуку з подальшим додаванням порошку альгінату натрію таким чином, щоб співвідношення НА:Alg дорівнювало 1: 1, в перерахунку на сухі речовини. Пропіленгліколь (10 об.%) та емульгатор TWEEN-80 додавали до суміші. Отриману суміш виливали шаром з товщиною в 5 мм з подальшим заморожуванням і ліофільним сушінням протягом 6 годин в спеціальному лабораторному пристрої ALPHA 1-2 LDplus. В результаті утворився високопористий проміжний НА-Alg скафолд.

Наступним етапом готували 30мл 1% хітозану в аскорбіновій кислоті і розділяли на 3 частини по 10 мл: 1) контрольний розчин, який містив тільки хітозан (без C_{60} фулерену); 2) розчин хітозану, що містив 100 мг/л фулерену і 3) розчин хітозану, що містив 200 мг/л фулерену. Після додавання необхідної кількості колоїдного фулерену до розчину хітозану застосовували ультразвукове перемішування з метою отримати гомогенну суспензію.

Попередньо отримані експериментальні HA-Alg скафолди насичували підготовленими розчинами хітозану протягом 12 годин з подальшим промиванням у дистильованій воді та сушінням при 37 °С. Отримані зразки в подальших дослідженнях названі, як HA-Pol, HA-Pol-100Full, HA-Pol-200Full.

Модельний лікарський засіб Хлоргексидин вводили в HA-Pol, HA-Pol-100Full та HA-Pol-200Full методом насичення з подальшим висушуванням.

Дослідження та обговорення

На рис. 3.1 представлено *SEM* зображення морфології поверхні, типове для фуллерен-вмісного зразку на основі гідроксиапатиту, альгінату та хітозану. Спостерігається багатошарова полімерна структура з вкрапленнями кубічних частинок HA.

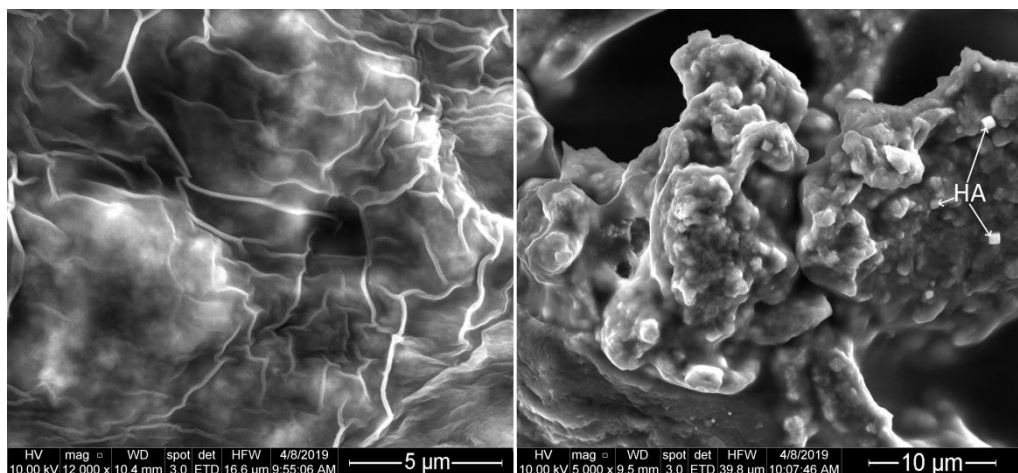


Рисунок 3.1 – Морфологія зразка HA-Pol-100Full при різному збільшенні

Як було зазначено вище, основою експериментальних зразків є НА, рентгенівський дифракційний спектр якого показаний на рис. 3.2. Результати XRD показують наявність лише однієї фази - НА (JCPDS 9-432) із середнім розміром кристалітів 20 нм у напрямку c . Невелике відхилення параметрів кристалічної решітки в одержаному НА ($a = 0,939$ нм; $c = 0,686$ нм) порівняно зі стехіометричним НА ($a = 0,9421$ нм; $c = 0,6881$ нм) вказує на утворення незначної фракції карбонат-заміщеного НА.

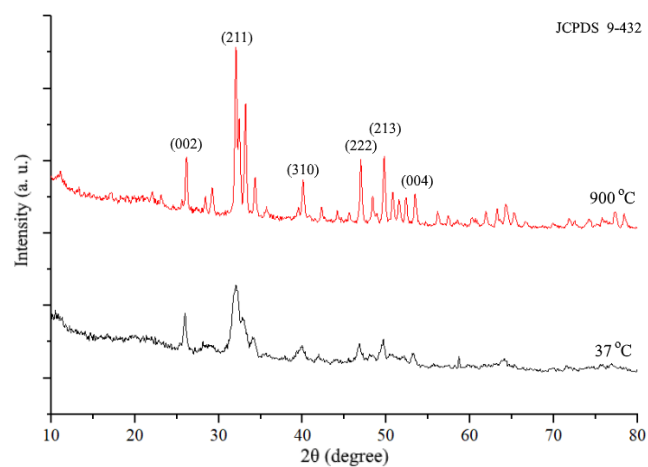


Рисунок 3.2 – Дифрактограми від зразка НА, висушеного при 37 °С і відпаленого при 900 °С

Тест на здатність до поглинання та утримання рідини. Біомедичне застосування пред'являє особливі вимоги до синтезованого матеріалу. Матеріал не повинен зазнавати значних об'ємних змін, щоб не викликати напругу у навколишніх тканинах. Отже, поглинання води (набрякання) та здатність до утримання води під час зберігання експериментальними композитними матеріалами є важливими факторами. Як було сказано вище, дослідження ступеню набрякання проводили в розчині SBF протягом 1 години при 37 °С. Як і очікувалося, ліофілізовані зразки мають підвищену здатність до поглинання рідини. Результати свідчать, що включення фулерену до складу композитів призводить до зниження ступеня поглинання (набрякання) та утримання залишкової рідини (рис. 3.3). Очевидно, що

частково це є результатом гідрофобності наночастинок фулерену. Крім того, зразки, що містять фуллерен, мають більш високу здатність зберігати форму гранул під час постійних коливань в шейкері (80 об/хв) при 37 °С протягом 7 днів.

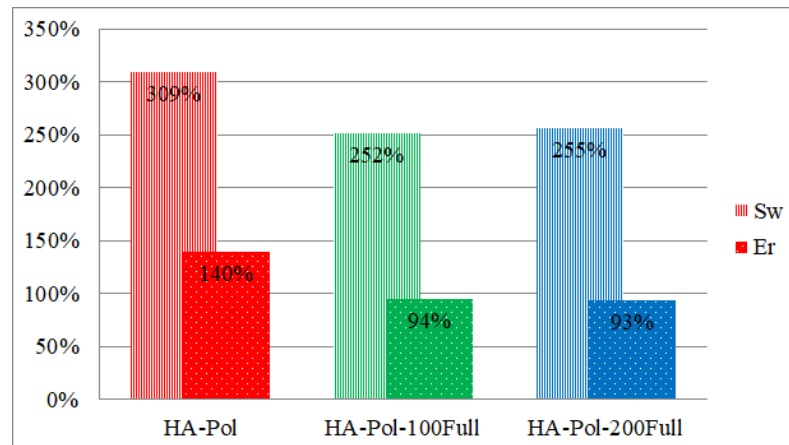


Рисунок 3.3 – Ступінь поглинання (набрякання) (S_w) та здатність утримувати рідину (E_r) композитами HA-Pol, HA-Pol-100Full та HA-Pol-200Full через 1 годину дослідження

Дослідження *ВЕРХ* проводили для перевірки впливу складу матеріалу на його здатність вивільняти модельний лікарський засіб у фізіологічному розчині. Фармацевтичний 0,05% хлоргексидин (СНХ) вводили в композити методом насичення. СНХ дуже поширений у стоматологічній медицині як антибактеріальний засіб проти грампозитивних та грамнегативних бактерій та грибів. Він має здатність зменшувати кількість шкідливих бактерій у роті, працює на лікування гінгівіту та сприяє загоєнню запалених ясен [75]. Результати (рис. 3.4) показали, що вивільнення СНХ з усіх експериментальних зразків триває протягом 48 годин, після чого концентрації починають знижуватися внаслідок розведення, що відбувається в результаті додавання аліквоти свіжого розчину PBS після кожного відбору проб. У випадку контрольного зразка ми спостерігаємо нерівномірність і зменшення кількості вивільненого препарату протягом перших 3 годин. Як

було відмічено [76], полімери утворюють дифузійний бар'єр для початкового вивільнення лікарського засобу. Додавання фулерену прискорює та вирівнює кінетику вивільнення СНХ протягом перших годин, очевидно, через гідрофобність фулерену та відштовхування гідрофільних молекул СНХ. З цієї ж причини ми спостерігаємо швидше і більш об'ємне вивільнення СНХ з проб, що містять фулерен.

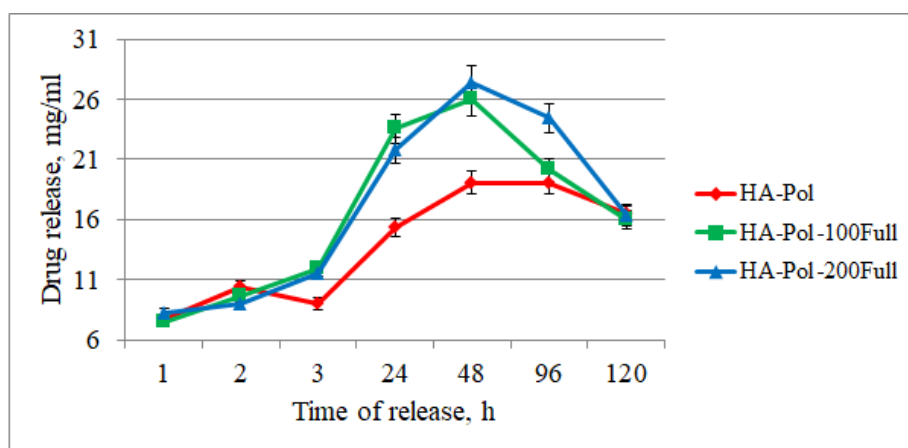


Рисунок 3.4 – Концентрація хлоргексидину в PBS (мкг/мл), що виділяється з експериментальних зразків

В результаті дослідження було доведено наступне:

Дані XRD вказують на утворення під впливом MW-опромінення лише однієї фази гідроксиапатиту (JCPDS 9-432) із середнім розміром кристалітів 20 нм та малим вмістом карбонату.

Включення фулерену C_{60} до зразків призводить до зниження ступеня набрякання приблизно на 60%, а ступеня утримування залишкової кількості рідини - приблизно на 50%.

Зразки, що містять фулерен, мають більш високу здатність зберігати форму під час коливань в шейкері (80 об/хв) при 37 °C протягом 7 днів.

Дослідження ВЕРХ показали здатність використовувати матеріал як систему тривалого (96 годин) вивільнення ліків. Додавання фулерену

прискорює вивільнення СНХ на 48 годин та вирівнює динаміку виходу лікарського засобу.

3.2 Дослідження біоактивності композитів з вмістом наночастинок фулерену C₆₀ в модельних реакціях *in vitro*

Біоактивний композитний матеріал на основі НА, CS та C₆₀ у формі гранул розміром 2 мм був синтезований та досліджений у ході даної роботи. Утворення гідрогелю НА-CS, що лежить в основі композитних матеріалів, відбувалося під впливом MW, що значно (до 3 хв) скорочує час синтезу порівняно з класичним методом, який включає конверсійну передачу тепла та старіння розчину протягом не менше 24 год. У разі MW випромінювання електричне поле поляризує одночасно всі молекули в розчині, що сприяє швидкому перетворенню електромагнітної енергії в тепло та призводить до надшвидкого нагрівання всього матеріалу [34, 77]. Отримані гранули являють собою матрицю, утворену шляхом зшивання макромолекул CS з ТПФ, яка містить іммобілізовані неорганічні частинки НА та C₆₀.

ТПФ з низькою молекулярною вагою належить до групи неорганічних поліфосфатів, відомих як терапевтичний засіб, що стимулює фактор росту фібробластів і підсилює остеогенну диференціацію стовбурових клітин [78].

Матеріали. Були використані наступні матеріали та хімічні речовини: фулерен C₆₀ (водний колоїдний розчин із середнім розміром частинок 50 нм), приготований відповідно до [79,80], хлорид кальцію CaCl₂, ортофосфорна кислота H₃PO₄, натрію гідроксид NaOH, натрію триполіфосфат Na₅P₃O₁₀ (виробництво в Китаї), хітозан (М.М. 300 кДа, Acros organics, США), фармацевтичний Анестезин.

Приготування гідрогелю НА-CS. До 100 мл 0,1М CaCl₂ додавали 10М NaOH для досягнення значення рН = 12. До вищевказаного розчину додавали 100мл 0,06М H₃PO₄, що містить 0,4г CS (М.М. 150 кДа). Отриману суміш піддавали мікрохвильовому опроміненню при потужності 600 Вт протягом 3

хв. Після охолодження осад відокремлювали центрифугуванням і промивали деіонізованою водою. Вміст води в отриманій речовині становив 85%. Зразок був названий гідрогелем НА-CS і використовувався для подальшої підготовки композитів, що містять C_{60} .

Приготування гранул НА-CS та НА-CS- C_{60} . Розчин C_{60} в ультрарозчинній воді (2,6 мг/мл) додавали до 3% розчину CS в 1% оцтовій кислоті. Суміш обробляли ультразвуком протягом 20 хвилин. Було приготовано дві однорідні колоїдні суспензії CS- C_{60} , в яких концентрація C_{60} становила 0,15 та 0,3 мг/мл. Кожну з цих двох суспензій (CS-0,15 C_{60} та CS-0,3 C_{60}) додавали до гідрогелю НА-CS у ваговому співвідношенні 1:1, а суміші обробляли ультразвуком протягом 5 хв з подальшим крапанням в 1% розчин натрію триполіфосфату (ТПФ) для формування гранул протягом 24 годин. Утворені гранули відокремлювали від рідкої фракції фільтруванням, ретельно промивали деіонізованою водою і сушили при кімнатній температурі. Зразки були названі НА-CS-0.15 C_{60} та НА-CS-0.3 C_{60} . Для порівняння фізичних та хімічних властивостей також були отримані гранули за вищеприписаною технологією, але без вмісту C_{60} . Цей зразок отримав назву НА-CS і використовувався як контрольний.

Внесення анестезину до складу гранул НА-CS та НА-CS- C_{60} . В якості модельного лікарського засобу використовували фармацевтичний розчин анестезину з концентрацією 11,76 мг/мл. Анастезин ($C_9H_{11}NO_2$) - гідрофобна молекула (М.м. 165,189 г/моль), погано розчинна у воді, що визначає її мінімальне поглинання. Він використовується як ключовий компонент у численних фармацевтичних препаратах для хірургічної або процедурної місцевої анестезії. Експериментальні зразки насичували розчином анестезину протягом 24 годин з наступним сушінням при 37 °С.

Дослідження XRD та FTIR. Проведені рентгенологічні дослідження для зразків НА-CS, НА-CS-0.15 C_{60} і НА-CS-0.3 C_{60} після сушіння при 37 °С і після спікання при 700 °С. Результати показують наявність однієї фази НА (JCPDS 9-432) в обох випадках. Незначне відхилення параметрів

кристалічної решітки НА в отриманих композитах ($a = 0,9415$ нм; $c = 0,6882$ нм) порівняно зі стехіометричним НА ($a = 0,9421$ нм; $c = 0,6881$ нм) є результатом адсорбції під час синтезу іонів карбонату, джерелом яких є атмосферний вуглекислий газ. Це призвело до утворення кальцій-дефіцитного карбонат заміщеного НА, в якому співвідношення Ca/P становить 1,63 за даними RFA. Цей факт підтверджується подальшими дослідженнями FTIR, які демонструють наявність смуг поглинання карбонатів у 874 та 1420 cm^{-1} [81] і свідчать про утворення карбонатного типу апатиту А типу внаслідок часткової заміни групи PO_4^{3-} на карбонатні іони [82].

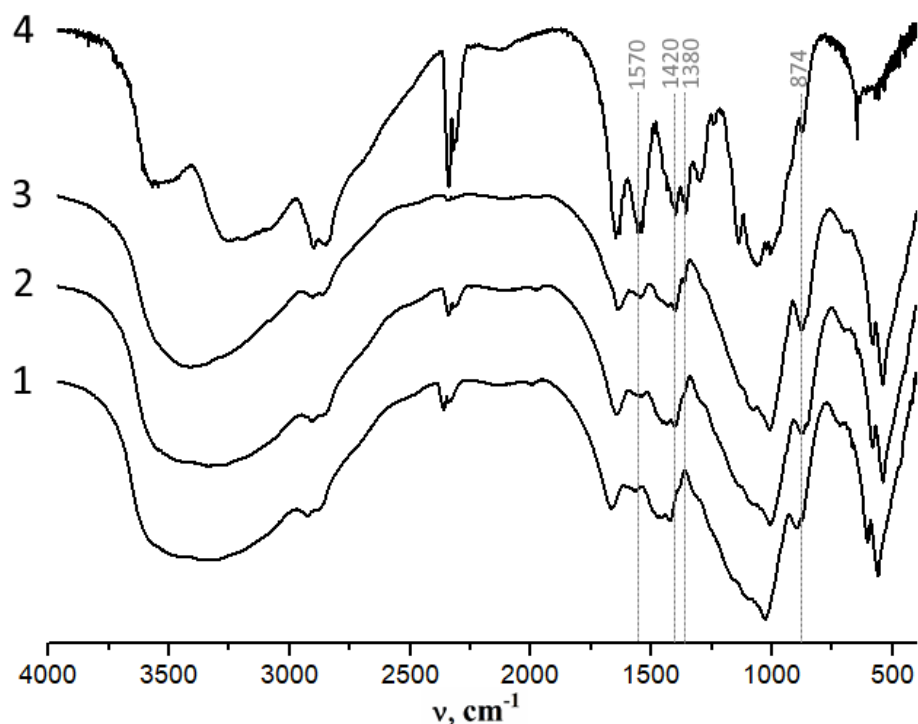


Рисунок 3.5 – Спектри FTIR підготовлених зразків: НА-CS (1); НА-CS-0.15C₆₀ (2); НА-CS-0.3C₆₀ (3) і порошок CS (4)

На рис. 3.5 показані спектри FTIR синтезованих композитів, а саме: НА-CS (крива 1), НА-CS-0.15C₆₀ (крива 2), НА-CS-0.3C₆₀ (крива 3) та порошок CS (крива 4). Спектр FTIR чистого CS порівнювали зі спектром

для композитів НА-CS-C₆₀. Експериментальні зразки демонструють характерні смуги поглинання PO₄³⁻ групами у НА при 1190-970 см⁻¹ (ν₃) та 670-520 см⁻¹ (ν₄). Широка смуга при 3200-3500 см⁻¹ належить валентним коливанням Н-О-Н адсорбованої води. Слід зазначити, що спектри FTIR для всіх композитів, незалежно від кількості C₆₀ у їх складі, схожі і демонструють смуги поглинання CS при 2850 та 2990 см⁻¹ (аліфатична -CH₂), 1660 см⁻¹ (амід I C = O), 1570 см⁻¹ (валентні коливання аміно групи -NH₂) і 1380 см⁻¹ (амід III). Після утворення гідрогелю НА-CS під впливом MW випромінювання всі основні смуги CS зберігаються, що вказує на відсутність негативного впливу MW на макромолекулу CS. У той же час, у спектрах гранул, що містять C₆₀, після зшивання макромолекул CS з ТПФ натрію, відбувається значне зниження інтенсивності смуг на 1380 см⁻¹ (валентні коливання C-N у поєднанні з NH у площинній деформації), 1660 см⁻¹ (валентні коливання C-O) та коливання 1570 см⁻¹, віднесені до груп NH³⁺.

ТЕМ зображення та схеми дифракції електронів (ЕД) композиту НА-CS (рис. 3.6) вказують на утворення голкоподібних кристалів НА при синтезі в присутності CS та під впливом мікрохвильового випромінювання. Агломерати кристалітів мають середній розмір 80 нм. Очевидно, що поверхнева енергія нанокристалітів, синтезованих під впливом MW, є найвищою. Цей фактор сприяє збільшенню швидкості їх агломерації. ЕР підтвердило, що неорганічний компонент досліджуваного матеріалу представлений фазою НА.

На рис. 3.7 показано СЕМ зображення морфології поверхні НА-CS-0.15C₆₀. Зразки, що містять C₆₀, характеризуються досить щільною, і в той же час багаторівневою поверхнею з кулькоподібними кристалічними агломератами НА. Контрольний зразок НА-CS має меншу щільність і більшу пористість порівняно з іншими.

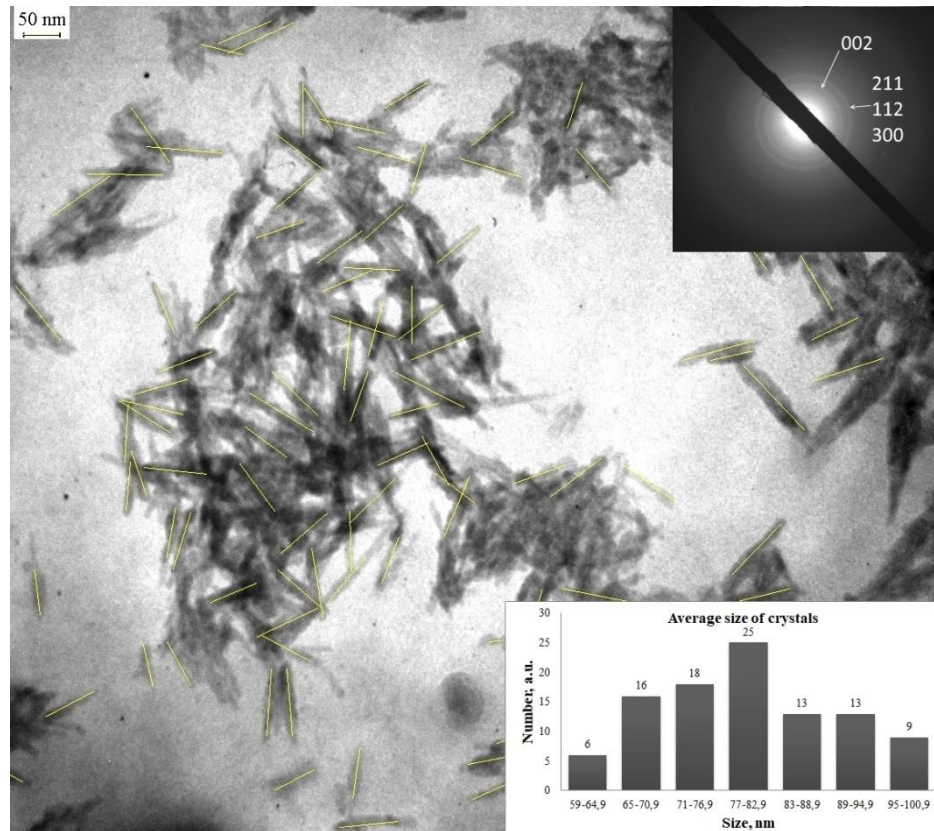


Рисунок 3.6 – Спектри зображень TEM та ЕД експериментальних КОМПОЗИТІВ

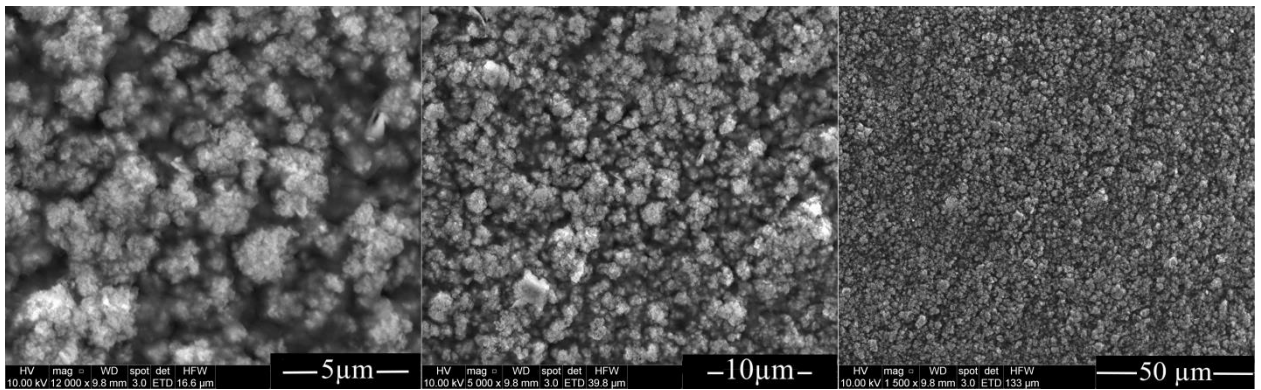


Рисунок 3.7 – Морфологія зразка HA-CS-0.15C₆₀ при різному збільшенні

Дослідження ступеню набрякання та поглинання рідини. Для дослідження ступеня набрякання гранули HA-CS, HA-CS-0.15C₆₀ та HA-CS-0.3C₆₀ поміщали у пробірки з розчином PBS (pH = 7,4) на 14 днів при

постійному перемішуванні в шейкері (80об/хв) при температурі 37 °С. PBS – це сольовий розчин на водній основі, що містить динатрій гідрофосфат Na_2HPO_4 (10 ммоль/л), хлорид натрію NaCl (137 ммоль/л), хлорид калію KCl (2,7 ммоль/л) та калій дигідрофосфат KH_2PO_4 (1,8 ммоль/л) [83]. Потягом експерименту всі зразки зберегли свою форму, а ступінь їх набрякання становив від 38% для контрольного HA-CS до 48% для HA-CS-0,3C₆₀. Отримані дані є значно нижчими порівняно з композитами HA-Alg (альгінати) з багатостінними вуглецевими нанотрубками (MWCNT), які, за нашими попередньо опублікованими даними, мали ступінь набрякання через 3 дні приблизно на 90%. Відносно низький ступінь набрякання зразків, що містять CS, можна пояснити тим, що вже на першій стадії утворення гідрогелю HA-CS іони Ca^{2+} взаємодіють з гідроксильними групами молекул CS, створюючи щільно пов'язаний комплекс між CS та HA [84], залишаючи меншу кількість гідрофільних груп для взаємодії з водою. Більш того, на другій стадії синтезу під час формування гранул утворюється матриця CS завдяки взаємодії протонуваних у оцтовокислому середовищі аміногруп макромолекул CS та негативно заряджених іонів солі ТПФ ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), які при кислотних значеннях (рН = 3) у розчині присутні у вигляді аніонів фосфонію $\text{P}_3\text{O}_{10-5}$ [85]. У той же час введення C₆₀ в композитну структуру викликало збільшення кількості адсорбованої рідини (рис. 3.8).

Цікаво, що маючи більш високий рівень набрякання, зразки з вмістом C₆₀ демонструють підвищену здатність до збереження своєї форми. Це можна пояснити тим, що C₆₀ впливає на просторове розташування макромолекул CS та індукує формування іншої структури порівняно з контрольним зразком, що не містить C₆₀. Додавання C₆₀, очевидно, збільшує в складі ступінь згуртованості, основою якого може бути сила міжмолекулярної взаємодії.

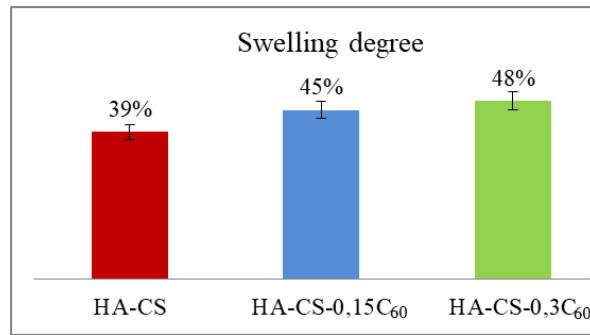


Рисунок 3.8 – Ступінь набрякання композитів HA-CS, HA-CS-0.15C₆₀ і HA-CS-0.3C₆₀ після 14-денного перебування у розчині PBS. Примітка: $p \leq 0,05$

Подальші дослідження ВЕРХ (рис. 3.9 б) підтверджують, що ступінь руйнування зразків, виражений у кількості продуктів розпаду, для контрольного зразка, що не містить C₆₀, був значно вищим порівняно зі зразками, що містять C₆₀.

Дослідження ВЕРХ. Дослідження гранул HA-CS-C₆₀, насичених анестезином, як систем для тривалого вивільнення ліків, проведено на рис. 3.9. Поверхня зразків була зоною найбільшої концентрації анестезину. Це спричинило прискорене вивільнення препарату протягом першої доби.

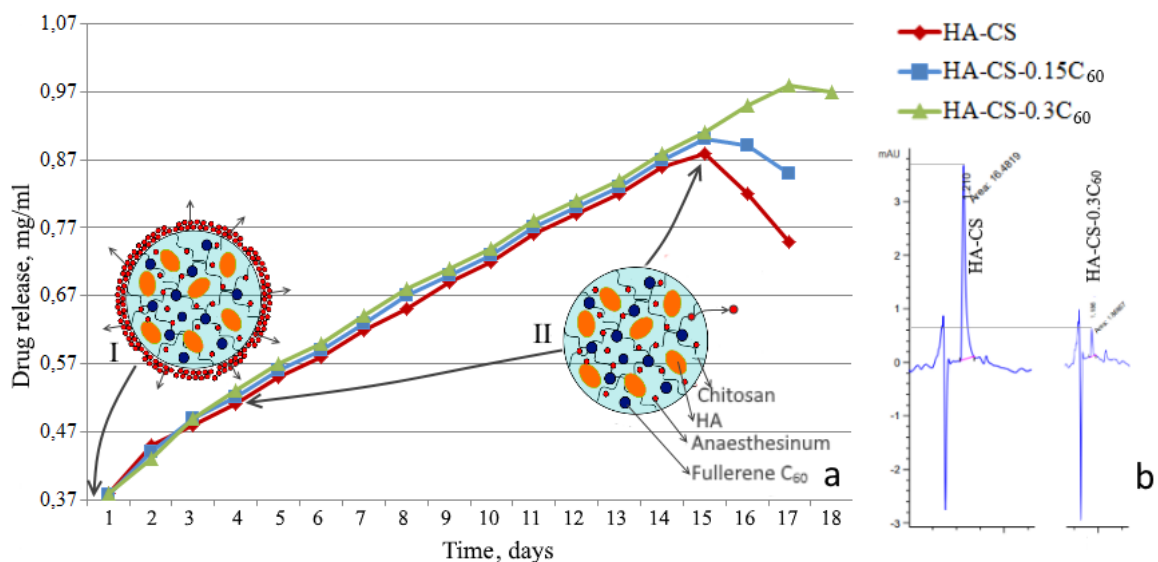


Рисунок 3.9. Концентрація анестезину в PBS (мг/мл), який виділяється з дослідних зразків протягом 18 днів (а); порівняння кількості продуктів деструкції, вивільнених з HA-CS та HA-CS-0.3C₆₀ протягом 18 днів (б)

На рис. 3.9а можна виділити дві основні стадії вивільнення лікарського засобу: протягом першої доби та після першої доби до кінця вивільнення. Перша стадія характеризується відносно високою швидкістю вивільнення поверхнево-адсорбованого анестезину. Після першого дня вивільнення ліків з усіх експериментальних зразків відбувається майже рівномірно протягом усього періоду дослідження, а саме протягом 15, 16 та 18 днів для НА-CS, НА-CS-0,15C₆₀ та НА-CS-0,3C₆₀, відповідно. Кінетика вивільнення фулереновмісних зразків схожа на контрольні зразки, але зразки, що містять C₆₀, мають більш стійку форму.

Вивільнення лікарського засобу із зразків, що містять C₆₀, контролюється виключно дифузійними силами, тоді як вивільнення лікарського засобу з контрольного зразка визначається як дифузійною препарату, так і деградацією гранул. Збільшення вмісту C₆₀ з 0,15 до 0,3 мг/мл подовжує вивільнення анаестезину на 2 дні. Можна припустити, що уповільнення вивільнення ліків із зразків, що містять C₆₀, відбувається внаслідок гідрофобних взаємодій C₆₀ та Анаестезину. Таким чином, зміна вмісту C₆₀ дозволяє регулювати час виходу препарату.

Вивчення кінетики вивільнення анестезину дозволило перевірити здатність C₆₀ контролювати профіль вивільнення лікарського засобу. Слід зазначити, що системи вивільнення лікарських засобів можна розділити на два різних класи [86]: тривале вивільнення та контрольоване вивільнення. Системи стійкого вивільнення - це суміш агентів, які впливають на чисту швидкість розчинення лікарського засобу. Системи з контрольованим вивільненням складаються в основному з молекули лікарського засобу та біоінертного або біосумісного полімеру. Такі системи, здатні контролювати швидкість вивільнення лікарського засобу, забезпечувати постійну абсорбцію ліків та підтримувати стабільні концентрації в плазмі протягом тривалого періоду часу та запобігати розвитку небажаних ефектів від концентрації.

Багато лікарських засобів, які знаходяться в базовому стані, демонструють профіль вивільнення першого порядку, який часто називають «вибуховим вивільненням», що супроводжується постійним зниженням концентрації ліків у фізіологічному середовищі [87]. Фармакокінетика цього підходу виявляє багатократні екстремальні мінімуми та максимуми, які характеризують нерівномірне вивільнення лікарського засобу, і це найбільш неідеально з точки зору обмеження потенційно токсичних над дозуванням молекул лікарських засобів. Ідеальний фармакокінетичний процес може бути представлений профілем кінетики вивільнення нульового порядку, який описує системи, в яких швидкість вивільнення ліків є постійною протягом певного періоду часу [88]. Для того, щоб визначити кращу модель опису профілю вивільнення анаестезину, для декількох математичних моделей випуску ліків було розраховано найменші квадратичні відхилення R^2 , що представляють суму квадратичних відхилень теоретично обчислених точок від практично отриманого значення за моделлю нульового порядку та моделлю Корсмейера-Пеппаса. У результаті розрахунків (рис. 3.10) була обрана модель Корсмейера-Пеппаса, яка представлена наступним рівнянням

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n, \quad (2)$$

де k - кінетична константа полімерної системи;

M_t - кількість лікарського засобу, що виділяється за час t ;

M_∞ - загальна кількість вивільненого препарату;

n - показник, який характеризує механізм вивільнення з лікарської/полімерної системи ($n = 0,5$ - Fickian дифузія; $n = 1$ - кінетичний профіль вивільнення нульового порядку; $0,5 < n < 1,0$ - non-Fickian дифузія).

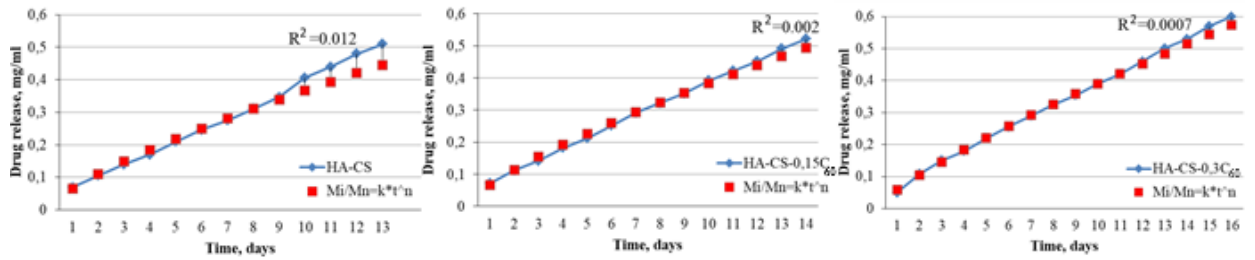


Рисунок 3.10 – Графічне зображення профілю кінетичного вивільнення Anaesthesinum з експериментальних зразків. R^2 - коефіцієнт відхилення

Розрахунок проводився для рівномірного вивільнення лікарського засобу (II стадія, рис. 3.10) через 1 добу дослідження, оскільки на першій стадії відбувалося активне вивільнення анаестезину з поверхневих шарів. Було встановлено, що показник вивільнення n набуває значень від $n = 0,75$ до $n = 0,82$ (табл. 1), демонструючи кінетику non-Fickian дифузії [89].

Таблиця 3.1 – Параметри профілю вивільнення лікарського засобу для експериментальних зразків.

Зразок	k	n	r^*
HA-CS	0.065	0.748	0.9985
HA-CS-0.15C60	0.067	0.757	0.9996
HA-CS-0.3C60	0.059	0.818	0.9991

* Тут r - коефіцієнт кореляції ($-1 \leq r \leq 1$).

Значення обчисленого коефіцієнта кореляції для досліджуваних зразків $r = 0,99$ означає, що вивільнення анаестезину протягом 18 днів близьке до кінетичного профілю вивільнення нульового порядку, що не суперечить літературним даним [90].

Антибактеріальну активність експериментальних зразків досліджували проти грамнегативної *E. coli* ATCC 25922 та грампозитивної бактерії *S. aureus* ATCC 25923 методом визначення зони інгібування. Слід

зазначити, що досліджувані зразки характеризуються низьким ступенем розчинності, що спричиняє затримку дифузії наночастинок C_{60} зі складу композитів. Тому, антимікробний тест проводили з використанням гідрогелів, ідентичних за складом до досліджуваних гранул. Зона затримки росту (у мм) відображає антимікробну сприйнятливість зразків - чим більша зона гальмування, тим більша антимікробна активність.

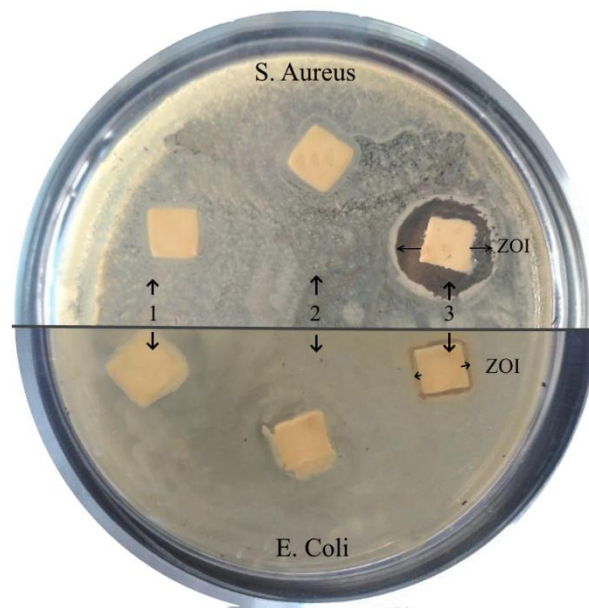


Рисунок 3.11 – Протимікробна активність зразків HA-CS (1), HA-CS-0,0004 C_{60} (2) та HA-CS-0,004 C_{60} (3) проти *S. aureus* ATCC 25923 (зверху) та *E. coli* ATCC 25922 (знизу). Примітка: $p \leq 0,05$

Експерименти показали, що зразки HA-CS, HA-CS-0.15 C_{60} та HA-CS-0.3 C_{60} не виявляли антимікробної активності. Додаткові дослідження на зразках з різним вмістом C_{60} (а саме 0,08, 0,04, 0,004, 0,0004) показали, що зниження концентрації до 0,004 мг/мл забезпечує антимікробний ефект композиту HA-CS-0,004 C_{60} проти *S.aureus* ATCC 25923, який підтверджується утворенням зони гальмування росту 16 ± 1 мм (рис. 3.11). У той же час практично відсутня антибактеріальна активність (ZOI приблизно 10 ± 2 мм) зазначеної концентрації C_{60} проти *E.coli* ATCC 25922.

Механізм антимікробної дії C_{60} не зовсім зрозумілий. Відомо, що молекули C_{60} здатні локалізуватися в багатих на ліпіди ділянках, таких як клітинні мембрани, і вони можуть брати участь в окислювально-відновлювальних реакціях [91]. Вважається, що реактивні види кисню (ROS) беруть участь у руйнуванні бактеріальної мембрани клітин та перекисному окисненні ліпідів [92]. Також показано, що чим менший ступінь агрегації C_{60} , тим вище антибактеріальна активність. Це явище пояснюється тим, що в суспензії менші агрегати C_{60} мають більшу загальну площу поверхні, що забезпечує більш високу антибактеріальну активність [21]. Оскільки CS є складовим компонентом композитного матеріалу, ми припускаємо, що антимікробний ефект може бути результатом синергетичного ефекту CS та C_{60} . Механізм дії CS включає позитивно заряджені частинки CS, які взаємодіють з негативно зарядженими клітинними мембранами, викликаючи збільшення мембранної проникності і, зрештою, розрив та витік внутрішньоклітинних компонентів [93]. В іншому запропонованому механізмі CS утворює хелатні комплекси з мікроелементами, викликаючи пригнічення активності ферментів [94].

Дослідження життєздатності клітин. Аналіз відновлення резазурину показав достатню проліферацію клітин остеобластів на 3-й день при порівнянні з позитивним контролем ПКТ (пластична культура тканини) (рис. 3.12D). Не було суттєвої різниці між зразками HA-CS та HA-CS-0.15 C_{60} , проте HA-CS-0.3 C_{60} (вміст C_{60} становить 0,3 мг/мл) значно підвищує життєздатність клітин ($p=0,034$) порівняно з іншими експериментальними групами. Клітини остеобластів мають нормальну структуру при мікроскопічному дослідженні, але лунка із зразком HA-CS-0.3 C_{60} показала краще злиття клітин (рис. 3.12C). У лунках із зразками HA-CS та HA-CS-0.15 C_{60} наявні деякі продукти деструкції (рис. 3.12 A та B), що, ймовірно, може впливати на життєздатність клітин.

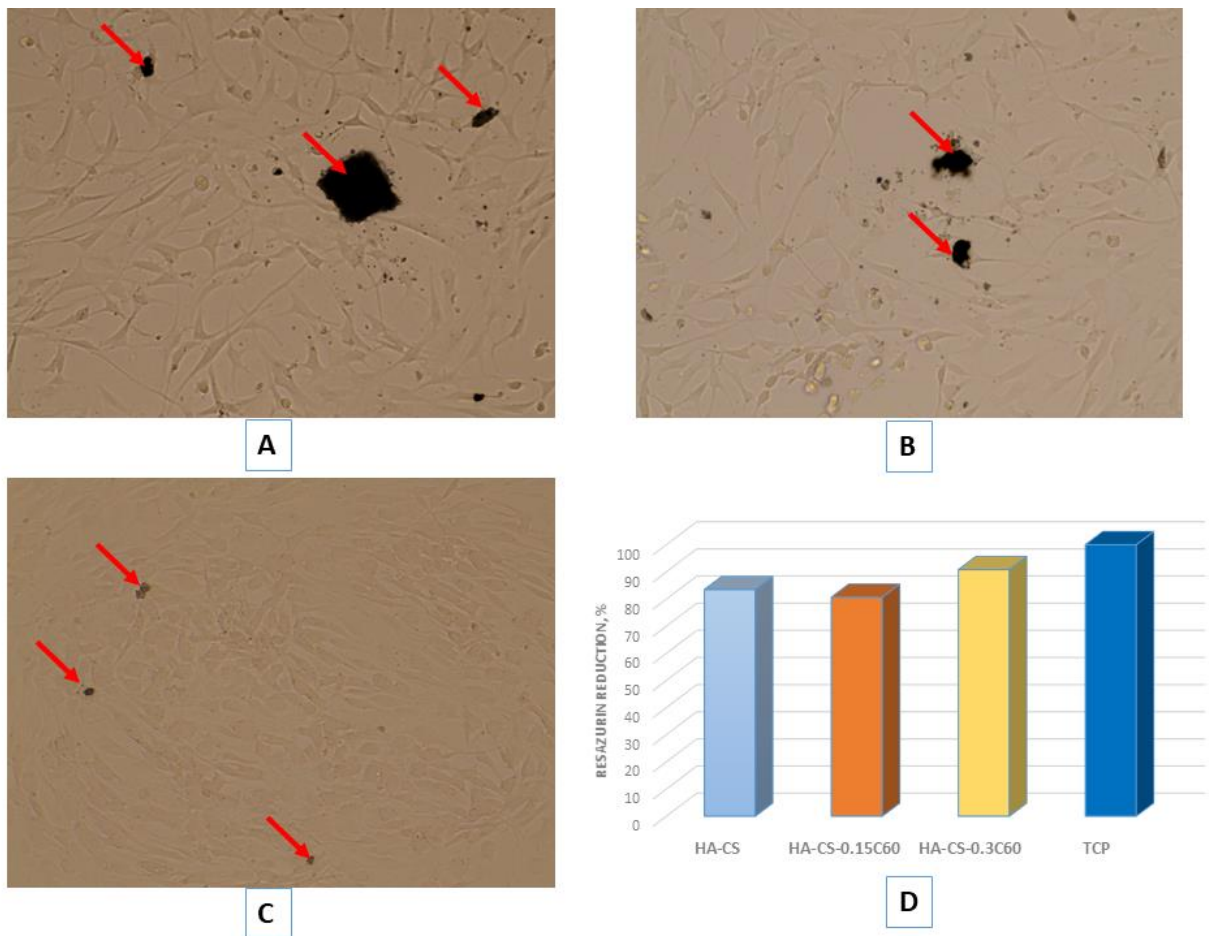


Рисунок 3.12 – Оптичне зображення первинних клітин остеобластів людини на 3-й день після культивування з експериментальними зразками HA-CS (A), HA-CS-0.15C₆₀ (B) та HA-CS-0.3C₆₀ (C) та виживання клітин, визначене з застосуванням резазурину (D). Червоні стрілки показують продукти деструкції

Тест на життєздатність клітин вказує на відсутність токсичної дії композитів, що містять, 0,3 та 0,15 мг/мл C₆₀, що добре узгоджується з нашими останніми результатами щодо чистого C₆₀: при концентрації до 0,144 мг/мл він не виявляє токсичності щодо ембріональної нирки людини (HEK293) клітини зі значенням IC₅₀ 0,383 мг/мл.

Висновок:

Синтез з MW опроміненням потужністю 600 Вт значно (до 3 хв) скорочує час утворення гідрогелю HA-CS і не впливає на структуру макромолекул CS та сприяє збільшенню агломерації кристалітів.

Дані XRD та FTIR підтвердили утворення кальцій-дефіцитного карбонат-заміщеного HA (Ca/P = 1,63).

Збільшення вмісту C₆₀ дозволяє підвищити стійкість гранул до руйнування і, таким чином, регулювати час вивільнення препарату. Дослідження ВЕРХ показує, що CS та C₆₀ забезпечують пролонговане вивільнення анастезину до 18 днів за рахунок міжмолекулярної гідрофобної взаємодії.

Утворення зони інгібування росту мікроорганізмів (ZOI) показує антимікробну дію композитів, що містять 0,004 мг/мл C₆₀, проти *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922 (ZOI 16 ± 1 мм та 10 ± 2, відповідно).

Тест на життєздатність клітин вказує на відсутність токсичності композитів, що містять 0,3 і 0,15 мг/мл фулерену C₆₀.

ВИСНОВКИ

1. Розроблений та досліджений композитний матеріал у формі гранул з покращеними механічними властивостями на основі гідроксиапатиту, альгінату та оксиду графену для лікування твердої кісткової тканини. Доведено, що:

– Обробка ультразвуком на стадії синтезу забезпечує рівномірний розподіл частинок GO в Alg матриці, а альгінат діє як диспергатор.

– Наночастинки GO у поєднанні з зшитими іонами кальцію (Ca^{2+}) макромолекулами альгінату, сприяють посиленню механічних властивостей отриманих гранул.

– Додавання GO підвищує модуль Юнга зразка HA-Alg-10GO до 1325 МПа порівняно з HA-Alg (793 МПа), збільшує щільність матеріалу з 2,03 до 2,11 г/см³ і знижує ступінь набухання в PBS зі 103 до 61% для HA-Alg та HA-Alg-10GO відповідно.

– Зразки з вмістом GO демонструють пролонговане на 48 годин вивільнення хлоргексидину порівняно з пробою, що не містить GO.

– *In vivo* дослідження на лабораторних щурах доводить біоактивність та остеопровідність матеріалу, відсутність запалення кісткової тканини.

2. Наноструктурований композитний матеріал з протимікробними властивостями у вигляді гідрогелю та гранул на основі HA, Alg та мікрочастинок ZnO був виготовлений під вплив мікрохвильового опромінення. Дослідженнями доведено:

– Утворення гідроксиапатиту зі співвідношенням Ca/P = 2.15, що відповідає стехіометричному апатиту.

– Середній розмір кристалітів HA становить 40 нм, кристалітів ZnO 25 нм - 11 мкм. Неорганічна HA-ZnO фаза розподіляється в полісахаридній матриці альгінату, що відповідає структурам природних кісткових нанокомпозитів.

- Додавання ZnO до складу композиту збільшує пористість в 5 разів.
- Збільшення часу зшивання в розчині CaCl₂, призводить до зниження ступеню набрякання в фосфатно - буферному сольовому розчині до 2 разів
- Зразки, що містять ZnO, менш чутливі до набрякання в нейтральному середовищі при рН = 7.3, ніж у кислому середовищі при рН = 4.5.
- Зазначена концентрація ZnO в композитному матеріалі на основі НА забезпечує слабку антимікробну активність.
- Запропоновано механізм протимікробної активності ZnO.
- In vitro дослідження біосумісності та цитотоксичності встановили незначний вплив застосованого вмісту цинку оксиду

3. Метод термічної депозиції (TSD) був застосований для нанесення монофазних CaP покриттів, а саме НА та брушиту (DCPD) на Ti6Al4V субстрати, попередньо оброблені методом плазмо-електролітичного окислення (PEO). Структура покриттів досліджена методами рентгенівської дифракції та СЕМ. Доведено, що:

- На обробленому PEO субстраті при 85 °C було отримано покриття, яке складається з фази DCPD, тоді як підвищення температури субстрату до 140 °C призвело до утворення фази кальцій дефіцитного НА (Ca/P = 1,64)
- Підвищення температури субстрата сприяє збільшенню товщини покриття.
- За 30 хвилин осадження було отримано покриття НА з товщиною 300 мкм, що складається з кристалів голкоподібної та пластинчастої форми з середнім розміром 4 мкм та DCPD покриття товщиною 50 мкм з голкоподібними кристалами розміром 7 мкм.

4. Біоактивні покриття ZnO, ZnO/Alg з протимікробними властивостями були отримані на попередньо анодованих Ti6Al4V субстратах методом TSD. Доведено, що:

- Природний біополімер альгінат має значний вплив на формування ZnO покриттів, їх морфологію, текстуру, структуру наночастинок.

- Присутність полімеру в розчині прискорює осадження покриття.
- Середня швидкість осадження ZnO з розчину, що містить альгінат, становить 30 мкм/хв, в той час, як з безальгінатного розчину - 6 мкм/хв.
- Товщина покриття ZnO, нанесеного протягом 20 хвилин, становить 180 мкм, тоді як товщина покриття ZnO/Alg, нанесеного за аналогічних умов, становить 600 мкм.
- Для ZnO покриття характерно збільшення розміру кристалітів та мікронапружень у напрямку (0 0 1).
- Покриття ZnO та ZnO/Alg демонструють зони затримки росту мікроорганізмів близько 16 мм для *S.aureus* і 20 мм для *E.coli*.
- Отримані покриття є перспективними для медичних імплантатів на основі титану та його сплавів, завдяки їх антибактеріальним властивостям.

5. Поліелектролітний композит на основі гідроксиапатиту (НА), альгінату натрію (Alg) та хітозану (CS) у формі мембран з вмістом неорганічних наночастинок фуллерену C60, був синтезований у вигляді мембрани та досліджений різними експериментальними методами. Доведено, що:

- Включення фуллерену C60 до зразків призводить до зниження ступеня набрякання приблизно на 60%, а ступеня утримування залишкової кількості рідини - приблизно на 50%.
- Зразки, що містять фуллерен, мають більш високу здатність зберігати форму під час коливань в шейкері (80 об/хв) при 37 °C протягом 7 днів.
- Матеріал може бути застосований для тривалого (96 годин) вивільнення ліків. Додавання фуллерену подовжує вивільнення хлоргексидину на 48 годин та вирівнює динаміку виходу лікарського засобу.
- Матеріал має протимікробні властивості .
- Біосумісний з нативним оточенням, матеріал може бути використаний в хірургічній та консервативній стоматології для лікування

захворювань пародонту, стимулювати відновлення кісткової тканини як додаткове джерело іонів кальцію та фосфору.

6. Біоактивний композитний матеріал на основі НА, CS та C₆₀ у формі гранул розміром 2 мм був синтезований та досліджений у ході даної роботи. Отримані гранули являють собою матрицю, утворену шляхом зшивання макромолекул CS з ТПФ, яка містить іммобілізовані неорганічні частинки НА та C₆₀. Доведено, що:

– Застосоване при синтезі MW опромінення потужністю 600 Вт значно (до 3 хв) скорочує час утворення гідрогелю НА-CS і не впливає на структуру макромолекул CS.

– Збільшення вмісту C₆₀ дозволяє підвищити стійкість гранул до руйнування і, таким чином, регулювати час вивільнення препарату зі складу композиту.

– CS та C₆₀ забезпечують пролонговане вивільнення анаестезину до 18 днів за рахунок міжмолекулярної гідрофобної взаємодії.

– Підтверджена протимікробна дія синтезованих композитів, що містять 0,004 мг/мл C₆₀, проти *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922 (ZOI 16 ± 1 мм та 10 ± 2 , відповідно).

– Тест на життєздатність клітин вказує на відсутність токсичності композитів, що містять 0,3 і 0,15 мг/мл фулерену C₆₀.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Laurenti, Marco & Valentina, Cauda. (2017). ZnO Nanostructures for Tissue Engineering Applications. *Nanomaterials*. 7. 374. 10.3390/nano7110374.
2. Tripathi, Anjali & Sekaran, Saravanan & Pattnaik, Soumitri & Ambigapathi, Moorthi & Partridge, Nicola & Selvamurugan, Nagarajan. (2011). Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*. 50. 294-9. 10.1016/j.ijbiomac.2011.11.013.
3. Ronen, Avner & Semiat, Raphael & Dosoretz, C.G.. (2012). Antibacterial Efficiency of a Composite Spacer Containing Zinc Oxide Nanoparticles. *Procedia Engineering*. 44. 10.1016/j.proeng.2012.08.491.
4. Hie, Mamiko & Iitsuka, Natsumi & Otsuka, Tomoyo & Nakanishi, Atsuko & Tsukamoto, Ikuyo. (2011). Zinc deficiency decreases osteoblasts and osteoclasts associated with the reduced expression of Runx2 and RANK. *Bone*. 49. 1152-9. 10.1016/j.bone.2011.08.019.
5. Nagata, Masashi & Lonnerdal, Bo. (2010). Role of zinc in cellular trafficking and mineralization in a murine osteoblast-line cell line. *The Journal of nutritional biochemistry*. 22. 172-8. 10.1016/j.jnutbio.2010.01.003.
6. Zhang, Yanzhe & Liu, Xiangmei & Li, Zhaoyang & Zhu, Shengli & Yuan, Xu-bo & Cui, Zhenduo & Yang, Xianjin & Chu, Paul & Wu, Shuilin. (2017). Nano Ag/ZnO Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 10. 10.1021/acsami.7b17351.
7. Li, Qilin & Mahendra, Shaily & Lyon, Delina & Brunet, Lena & Liga, Michael & Li, Dong & Alvarez, Pedro. (2008). Antimicrobial Nanomaterials for Water Disinfection and Microbial Control: Potential Applications and Implications. *Water research*. 42. 4591-602. 10.1016/j.watres.2008.08.015.
8. Moldovan, Marioara & Prodan, Doina & Popescu, Violeta & Prejmerean, Cristina & Saroși, Codruta & Saplontăi, Monica & Țălu, Ștefan & Vasile, Eugeniu.

(2015). Structural and morphological properties of HA-ZnO powders prepared for biomaterials. *Open Chemistry*. 13. 10.1515/chem-2015-0083.

9. Taccola, Liuba & Raffa, Vittoria & Riggio, Cristina & Vittorio, Orazio & Iorio, Maria & Vanacore, Renato & Pietrabissa, Andrea & Cuschieri, Alfred. (2011). Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells. *International journal of nanomedicine*. 6. 1129-40. 10.2147/IJN.S16581.

10. Raghupathi, Krishna & Koodali, Ranjit & Manna, Adhar. (2011). Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 27. 4020-8. 10.1021/la104825u.

11. Gunalan, Sangeetha & Sivaraj, Rajeshwari & Rajendran, Venckatesh. (2012). Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress in Natural Science: Materials International*. 22. 693–700. 10.1016/j.pnsc.2012.11.015.

12. MA, Jun & Meng, Qingshi & Zaman, Izzuddin & Zhu, Shenmin & Michelmore, Andrew & Kawashima, Nobuyuki & Wang, Chun-Hui & Kuan, Hsu-Chiang. (2014). Development of polymer composites using modified, high-structural integrity graphene platelets. *Composites Science and Technology*. 91. 82-90. 10.1016/j.compscitech.2013.11.017.

13. Zhang, Qinghua & Chen, Dajun. (2010). Enhanced Mechanical Properties of Graphene-Based Poly(vinyl alcohol) Composites. *Macromolecules*. 43. 10.1021/ma902862u.

14. Qu & He, Yu & Lian, Liang & M, Zhang & Lv, Wu (2018). Advances on graphene-based nanomaterials for biomedical applications. *Mat Sci Eng C*. 90. 764–780.

15. Jaworski, Sławomir & Sawosz, Ewa & Grodzik, Marta & Winnicka, Anna & Prasek Kutwin, Marta & Wierzbicki, Mateusz & Chwalibog, André. (2013). In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. *International journal of nanomedicine*. 8. 413-20. 10.2147/IJN.S39456.

16. Kang, Yiyuan & Jia, Liu & Wu, Junrong & Yin, Qian & Liang, Huimin & Chen, Aijie & Shao, Longquan. (2017). Graphene oxide and reduced graphene oxide induced neural pheochromocytoma-derived PC12 cell lines apoptosis and cell cycle alterations via the ERK signaling pathways. *International Journal of Nanomedicine*. Volume 12. 5501-5510. 10.2147/IJN.S141032.
17. Li, Ming & Xiong, Pan & Yan, Feng & Li, Sijie & Ren, Changhong & Yin, Zhichen & Li, Ang & Li, Huafang & Ji, Xunming & Zheng, Yufeng & Cheng, Yan. (2018). An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications. *Bioactive Materials*. 3. 10.1016/j.bioactmat.2018.01.001.
18. Marković, Zoran & Trajkovic, Vladimir. (2008). Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60). *Biomaterials*. 29. 3561-73. 10.1016/j.biomaterials.2008.05.005.
19. Grebinyk, Anna & Grebinyk, Sergii & Prylutska, Svitlana & Ritter, Uwe & Matyshevska, Olga & Dandekar, Thomas & Frohme, Marcus. (2018). C60 Fullerene Accumulation in Human Leukemic Cells and Perspectives of LED-mediated Photodynamic Therapy. *Free radical biology & medicine*. 124. 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.022.
20. Yudoh, Kazuo & Bbb, Aaa & Masuko, Kayo & Kato, Tomohiro. (2009). Water-soluble fullerene (C60) inhibits the osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis. *International journal of nanomedicine*. 4. 233-9. 10.2147/IJN.S7505.
21. Lyon, Delina & Adams, Laura & Falkner, Joshua & Alvarez, Pedro. (2006). Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size. *Environmental science & technology*. 40. 4360-6. 10.1021/es0603655.
22. Franskevych, D. & Palyvoda, K. & Petukhov, Dmytro & Prylutska, S. & Grynyuk, Iryna & Schuetze, Christina & Drobot, Liudmyla & Matyshevska, O. & Ritter, Uwe. (2017). Fullerene C60 Penetration into Leukemic Cells and Its Photoinduced Cytotoxic Effects. *Nanoscale Research Letters*. 12. 10.1186/s11671-016-1819-5.

23. Prylutska, Svitlana & Skivka, Larysa & Didenko, Gennadiy & Prylutsky, Yuriy & Evstigneev, Maxim & Potebnya, Grygoriy & Panchuk, Rostyslav & Stoika, Rostyslav & Ritter, Uwe & Scharff, Peter. (2015). Complex of C60 Fullerene with Doxorubicin as a Promising Agent in Antitumor Therapy. *Nanoscale research letters*. 10. 499. 10.1186/s11671-015-1206-7.
24. Epple, Mathias. (2007). *Biomaterials and biomineralization*. Tomsk: Wind. 165.
25. Zhao, G. & Xia, L. & Zhong, Bo & Gongjian, Wen & Song, L. & Wang, X.. (2014). Effect of milling conditions on the properties of HA/Ti feedstock powders and plasma-sprayed coatings. *Surface and Coatings Technology*. 251. 38–47. 10.1016/j.surfcoat.2014.02.028.
26. Fakhr Nabavi, Houman & Aliofkhazraei, Mahmood & Sabour Rouh Aghdam, Alireza. (2017). Morphology and corrosion resistance of hybrid plasma electrolytic oxidation on CP-Ti. *Surface and Coatings Technology*. 322. 10.1016/j.surfcoat.2017.05.035.
27. Kazek-Kęsik, Alicja & Nosol, Agnieszka & Płonka, Joanna & Śmiga - Matuszowicz, Monika & Golda-Cepa, Monika & Krok, Malgorzata & Brzywczy-Włoch, Monika & Pamula, Elzbieta & Simka, Wojciech. (2018). PLGA-amoxicillin-loaded layer formed on anodized Ti alloy as a hybrid material for dental implant applications. *Materials Science and Engineering: C*. 94. 10.1016/j.msec.2018.10.049.
28. Choi, Jung & Kim, Gye & Shin, K.R. & Yoo, Bongyoung & Shin, Dong. (2017). Synthesis of Zirconium–Titanium oxide mixed layers on Ti substrates by plasma electrolytic oxidation and plasma-enhanced electrophoresis. *Journal of Alloys and Compounds*. 726. 10.1016/j.jallcom.2017.08.004.
29. Truc, Nguyen & Minh, Ho & Ly, Khanh & Vo, Thuy & Vo, Toi & Tran, Van & Huynh, Nam & Quyen, Tran & Nguyen, Thi Hiep. (2018). Modification of type I collagen on TiO₂ surface using electrochemical deposition. *Surface and Coatings Technology*. 344. 10.1016/j.surfcoat.2018.03.038.

30. Jarosz, Magdalena & Pawlik, Anna & Szuwarzyński, Michał & Jaskula, Marian & Sulka, Grzegorz. (2016). Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 143. 447–454. 10.1016/j.colsurfb.2016.03.073.

31. Dorozhkin, Sergey. (2015). Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 55. 10.1016/j.msec.2015.05.033.

32. Kuroda, Kensuke & Okido, Masazumi. (2012). Hydroxyapatite Coating of Titanium Implants Using Hydroprocessing and Evaluation of Their Osteoconductivity. *Bioinorganic chemistry and applications*. 2012. 730693. 10.1155/2012/730693.

33. Анна, Яновская & Kuznetsov, V. & Stanislavov, A. & Danilchenko, Sergei & Sukhodub, Leonid. (2012). A study of brushite crystallization from calcium-phosphate solution in the presence of magnesium under the action of a low magnetic field. *Materials Science and Engineering: C*. 32. 1883–1887. 10.1016/j.msec.2012.05.007..

34. Stanislavov, A.S. & Sukhodub, Leonid & Sukhodub, L.B. & Kuznetsov, V.N. & Bychkov, Konstantin & Kravchenko, M.I.. (2017). 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. *Ultrasonics Sonochemistry*. 42. 10.1016/j.ultsonch.2017.11.011.

35. Sukhodub, L.B. & Sukhodub, Leonid & Prylutsky, Yuriy & Strutynska, Nataliya & Vovchenko, Ludmila & Soroca, V.M. & Slobodyanik, N.S. & Tsierkezos, Nikos & Ritter, Uwe. (2018). Composite material based on hydroxyapatite and multi-walled carbon nanotubes filled by iron: Preparation, properties and drug release ability. *Materials Science and Engineering: C*. 93. 10.1016/j.msec.2018.08.019.

36. Dicu, Maria & Abrudeanu, M. & Moga, S. & Negrea, Denis & Andrei, Victor & Ducu, Catalin. (2012). Preparation of ceramic coatings on titanium

formed by micro-arc oxidation method for biomedical application. *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*. 14. 125-130.

37. Jadalannagari, Sushma & Deshmukh, Ketaki & Kowshik, Meenal & Ramanan, Sutapa & Verma, Anita & Vohra, Richa. (2014). Lanthanum-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles as Biocompatible Fluorescent Probes for Cellular Internalization and Biolabeling. *Science of Advanced Materials*. 6. 312-319. 10.1166/sam.2014.1717.

38. Malesu, Vijay & Sahoo, D. & Nayak, P.L.. (2011). Chitosan-Sodium Alginate Nanocomposites Blended with Cloisite 30B As a Novel Drug Delivery System for Anticancer Drug Curcumin. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*. 2. 402-411.

39. Malesu, Vijay & Sahoo, D. & Nayak, P.L.. (2011). Chitosan-Sodium Alginate Nanocomposites Blended with Cloisite 30B As a Novel Drug Delivery System for Anticancer Drug Curcumin. *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.*. 2. 402-411.

40. Tuček, Jiří & Błoński, Piotr & Ugolotti, Juri & Swain, Akshaya & Enoki, Toshiaki & Zboril, Radek. (2018). Emerging chemical strategies for imprinting magnetism in graphene and related 2D materials for spintronic and biomedical applications. *Chemical Society Reviews*. 47. 10.1039/C7CS00288B.

41. Radha, G. & Venkatesan, Balaji & Vellaichamy, Elangovan & Balakumar, S.. (2018). Structural, Mechanical and Biological Insights on Reduced Graphene Nanosheets Reinforced Sonochemically Processed Nano-Hydroxyapatite Ceramics. *Ceramics International*. 44. 10.1016/j.ceramint.2018.02.021.

42. M. Rajkumar, N. Meenakshisundaram, V. Rajendran, (2011) Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: Synthesis and characterisation, *Mater. Charact.* 62. 469–479. 10.1016/j.matchar.2011.02.008.

43. Haque, Saba & Rehman, Ihtesham & Darr, Jawwad. (2007). Synthesis and Characterization of Grafted Nanohydroxyapatites Using Functionalized Surface Agents. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 23. 6671-6. 10.1021/la063517i.

44. Ślósarczyk, Anna & Paszkiewicz, Zofia & Paluszkiewicz, Czesława. (2005). FTIR and XRD Evaluation of Carbonated Hydroxyapatite Powders Synthesized by Wet Methods. *Journal of Molecular Structure*. 744. 657-661. 10.1016/j.molstruc.2004.11.078.
45. Lak, Aidin & Mazloumi, Mahyar & Mohajerani, Matin Sadat & Kajbafvala, A. & Zanganeh, Saeid & Arami, Hamed & Sadrnezhaad, S.K.. (2008). Self - Assembly of Dandelion - Like Hydroxyapatite Nanostructures Via Hydrothermal Method. *Journal of the American Ceramic Society*. 91. 3292 - 3297. 10.1111/j.1551-2916.2008.02600.x.
46. Chidambara Kuttalam, Kailasanathan & Selvakumar, N. & Naidu, Vasant. (2011). Structure and properties of titania reinforced nano-hydroxyapatite/gelatin bio-composites for bone graft materials. *Ceramics International - CERAM INT*. 38.
47. Dwivedi, Sourabh & Wahab, Rizwan & Khan, Farheen & Mishra, Yogendra & Musarrat, Javed & Al-Khedhairi, Abdulaziz. (2014). Reactive Oxygen Species Mediated Bacterial Biofilm Inhibition via Zinc Oxide Nanoparticles and Their Statistical Determination. *PLoS ONE*. 9. e111289. 10.1371/journal.pone.0111289.
48. Okido, Masazumi & Kuroda, Kensuke & Ishikawa, M. & Ichino, R. & Takai, O.. (2002). Hydroxyapatite Coating on Titanium by Means of Thermal Substrate Method in Aqueous Solutions. *Solid State Ionics*. 151. 42. 10.1016/S0167-2738(02)00603-3.
49. Durdu, Salih & Deniz, Ömer & Kutbay, Isil & Usta, Metin. (2013). Characterization and formation of hydroxyapatite on Ti6Al4V coated by plasma electrolytic oxidation. *Journal of Alloys and Compounds*. 551. 422-429. 10.1016/j.jallcom.2012.11.024.
50. Krzakała, Agnieszka & Służalska, Katarzyna & Dercz, Grzegorz & Maciej, Artur & Kazek-Kęsik, Alicja & Szade, J. & Winiarski, Antoni & Dudek, M. & Michalska, Joanna & Tylko, Grzegorz & Osyczka, Anna & Simka, Wojciech.

(2013). Characterisation of bioactive films on Ti–6Al–4V alloy. *Electrochimica Acta*. 104. 425–438. 10.1016/j.electacta.2012.12.081.

51. Kuznetsov, V.M. & Sukhodub, L.B. & Sukhodub, Leonid. (2014). Structural and Substructural Features of Apatite-biopolymer Composites: the Comparison of Data Obtained Using X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy with Electron Diffraction. *Journal of Nano- and Electronic Physics*. 6.

52. Kuznetsov, V.N. & Yanovska, Anna & Stanislavov, A.S. & Danilchenko, Sergei & Kalinkevich, A. & Sukhodub, Leonid. (2015). Controllability of brushite structural parameters using an applied magnetic field. *Materials Science and Engineering: C*. 60. 10.1016/j.msec.2015.11.066.

53. Bhattacharjee, Promita & Begam, Howa & Chanda, Abhijit & Nandi, Samit. (2014). Animal trial on zinc doped hydroxyapatite: A case study. *Journal of Asian Ceramic Societies*. 2. 10.1016/j.jascer.2014.01.005.

54. Feng, Zizhou & Liu, Xiangmei & Tan, Lei & Cui, Zhenduo & Yang, Xianjin & Li, Zhaoyang & Zheng, Yufeng & Yeung, Kelvin & Wu, Shuilin. (2017). Electrophoretic Deposited Stable Chitosan@MoS₂ Coating with Rapid In Situ Bacteria - Killing Ability under Dual - Light Irradiation. *Small*. 14. 10.1002/sml.201704347.

55. Xie, Xianzhou & Mao, Congyang & Liu, Xiangmei & Tan, Lei & Cui, Zhenduo & Yang, Xianjin & Zhu, Shengli & Li, Zhaoyang & Yuan, Xubo & Zheng, Yufeng & Yeung, Kelvin & Chu, Paul & Wu, Shuilin. (2018). Tuning the Bandgap of Photo-Sensitive Polydopamine/Ag₃PO₄/Graphene Oxide Coating for Rapid, Noninvasive Disinfection of Implants. *ACS Central Science*. 4. 10.1021/acscentsci.8b00177.

56. Xie, Xianzhou & Mao, Congyang & Liu, Xiangmei & Zhang, Yanzhe & Cui, Zhenduo & Yang, Xianjin & Yeung, Kelvin & Pan, Haobo & Chu, Paul & Wu, Shuilin. (2017). Synergistic Bacteria-Killing through Photodynamic and Physical Actions of Graphene Oxide/Ag/Collagen Coating. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 9. 10.1021/acsami.7b06702.

57. Jin, Chen & Liu, Xiangmei & Tan, Lei & Cui, Zhenduo & Yang, Xianjin & Zheng, Yufeng & Yeung, Kelvin & Chu, Paul & Wu, Shuilin. (2018). Ag/AgBr Loaded Mesoporous Silica for Rapid Sterilization and Promotion of Wound Healing. *Biomaterials Science*. 6. 10.1039/C8BM00353J.
58. Mao, Congyang & Xiang, Yiming & Liu, Xiangmei & Cui, Zhenduo & Yang, Xianjin & Yeung, Kelvin & Pan, Haobo & Wang, Xianbao & Chu, Paul & Wu, Shuilin. (2017). Photo-Inspired Antibacterial Activity and Wound Healing Acceleration by Hydrogel Embedded with Ag/Ag@AgCl/ZnO Nanostructures. *ACS nano*. 11. 10.1021/acsnano.7b03513.
59. Reddy, K.M. & Feris, Kevin & Bell, Jason & Wingett, Denise & Hanley, Cory & Punnoose, Alex. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied physics letters*. 90. 2139021-2139023. 10.1063/1.2742324.
60. Reddy, K.M. & Feris, Kevin & Bell, Jason & Wingett, Denise & Hanley, Cory & Punnoose, Alex. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied physics letters*. 90. 2139021-2139023. 10.1063/1.2742324.
61. Rasmi & Vanitha, Chrisolite & George, R.P. & Mudali, Kamachi. (2018). Active Nano Metal Oxide Coating for Bio-fouling Resistance. *Transactions of the Indian Institute of Metals*. 71. 10.1007/s12666-017-1264-x.
62. Choi, Jae & Tabata, Hitoshi & Kawai, Tomoji. (2001). Initial Preferred Growth in Zinc Oxide Thin Films on Si and Amorphous Substrates by a Pulsed Laser Deposition. *Journal of Crystal Growth*. 226. 493-500. 10.1016/S0022-0248(01)01388-4.
63. Ambia, M. & Islam, M. & Hakim, M.. (1994). The effects of deposition variables on the spray pyrolysis of ZnO thin film. *Journal of Materials Science*. 29. 6575-6580. 10.1007/BF00354023.
64. Lee, J. & Choi, Yun & Kim, J. & Park, M. & im, Sanghyun. (2002). Optimizing n-ZnO/p-Si Heterojunctions for Photodiode Applications. *Thin Solid Films*. 403. 553-557. 10.1016/S0040-6090(01)01550-4.

65. Ann, Ling & Mahmud, Shahrom & Khadijah, Siti & mohd bakhori, Siti & Sirelkhatim, Amna & Mohamad, Dasmawati & Hasan, Habsah & Seeni, Azman & Rahman, Rosliza & Jamal, Rahman. (2013). Antibacterial responses of zinc oxide structures against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes*. *Ceramics International*. 40. 2993-3001. 10.1016/j.ceramint.2013.10.008.
66. Wang, Xiaolei & Yang, Wen & Yang, Xiurong. (2007). A study on the antibacterial activity of one-dimensional ZnO nanowire arrays: Effects of the orientation and plane surface. *Chemical communications (Cambridge, England)*. 42. 4419-21. 10.1039/b708662h.
67. Yang, Hui & Liu, Chao & Yang, Danfeng & Zhang, Huashan & Xi, Zhuge. (2009). Comparative Study of Cytotoxicity, Oxidative Stress and Genotoxicity Induced by Four Typical Nanomaterials: The Role of Particle Size, Shape and Composition. *Journal of applied toxicology : JAT*. 29. 69-78. 10.1002/jat.1385.
68. Talebian, Nasrin & Amininezhad, Seyedeh & Doudi, Monir. (2013). Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*. 120C. 66-73. 10.1016/j.jphotobiol.2013.01.004.
69. Zhang, Yunyan & Mu, Jin. (2007). Controllable Synthesis of Flower and rod-Like ZnO Nanostructures by Simply Tuning the Ratio of Sodium Hydroxide to Zinc Acetate. *Nanotechnology*. 18. 075606. 10.1088/0957-4484/18/7/075606.
70. Brayner, Roberta & Vaulay, Marie-Josèphe & Fiévet, Fernand & Coradin, Thibaud. (2007). Alginate-Mediated Growth of Co, Ni, and CoNi Nanoparticles: Influence of the Biopolymer Structure. *Chemistry of Materials - CHEM MATER*. 19. 10.1021/cm062580q.
71. Sirelkhatim, Amna & Mahmud, Shahrom & Seeni, Azman & Mohd Kaus, Noor Haida & Ann, Ling & mohd bakhori, Siti & Hasan, Habsah & Mohamad, Dasmawati. (2015). Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*. 7. 10.1007/s40820-015-0040-x.

72. Sharma, N. (2016) Synthesis, characterization and antimicrobial activity of manganese-and iron-doped zinc oxide nanoparticles. *J Exp Nanosci.* 11. 54–71.

73. Rao, Subramaniam & Ugale, Gauri & Warad, Shivaraj. (2013). Bone Morphogenetic Proteins: Periodontal Regeneration. *North American journal of medical sciences.* 5. 161-8. 10.4103/1947-2714.109175.

74. Hafdani, F. & Sadeghinia, N.. (2011). A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 74. 257-261.

75. Sukhodub, Leonid & Sukhodub, Liudmyla & Litsis, Olena & Prylutsky, Yuriy. (2018). Synthesis and characterization of hydroxyapatite-alginate nanostructured composites for the controlled drug release. *Materials Chemistry and Physics.* 217. 10.1016/j.matchemphys.2018.06.071.

76. Costantini, Lisa & Bouropoulos, Nikolaos & Fatouros, Dimitris & Kontopoulou, Ioanna & Roldo, Marta. (2016). Synthesis of carbon nanotubes loaded hydroxyapatite: Potential for controlled drug release from bone implants. *Journal of Advanced Ceramics.* 5. 10.1007/s40145-016-0195-z.

77. Pogrebnyak, Alexander & Sukhodub, Ludmila & Sukhodub, Leonid & Bondar, Oleksandr & Kumeda, Mariya & Shaimardanova, Botagoz & Shaimardanov, Zhasulan & Turlybekuly, Amanzhol. (2019). Composite material with nanoscale architecture based on bioapatite, sodium alginate and ZnO microparticles. *Ceramics International.* 45. 10.1016/j.ceramint.2019.01.043.

78. Doi, Kazuya & Kubo, Takayasu & Takeshita, Ryou & Kajihara, Shiho & Kato, Shinichi & Kawazoe, Yumi & Shiba, Toshikazu & Akagawa, Yasumasa. (2014). Inorganic polyphosphate adsorbed onto hydroxyapatite for guided bone regeneration: An animal study. *Dental materials journal.* 33. 10.4012/dmj.2013-275.

79. Scharff, P. & Carta-Abelmann, L. & Siegmund, C. & Matyshevska, O.P. & Prylutska, Svitlana & Koval, T.V. & Golub, A. & Yashchuk, Valeriy & Kushnir, K.M. & Prylutsky, Yuriy. (2004). Effect of X-Ray and UV irradiation of the C60

fullerene aqueous solution on biological samples. *Carbon*. 42. 1199-1201. 10.1016/j.carbon.2003.12.055.

80. Ritter, Uwe & Prylutsky, Yuriy & Evstigneev, Maxim & Davidenko, NA & Cherepanov, Vsevolod & Senenko, Anton & Marchenko, OA & Naumovets, A.G.. (2014). Structural Features of Highly Stable Reproducible C 60 Fullerene Aqueous Colloid Solution Probed by Various Techniques. *Fullerenes Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 23. 530-534. 10.1080/1536383X.2013.870900.

81. Chen, Chun-Wei & Oakes, Charles & Byrappa, Kullaiiah & Riman, Richard & TenHuisen, Kevor & Janas, Victor. (2004). Synthesis, characterization, and dispersion properties of hydroxyapatite prepared by mechanochemical/hydrothermal methods. *Journal of Materials Chemistry - J MATER CHEM*. 14. 10.1039/b315095j.

82. Elliott, J.. (2002). Calcium Phosphate Biominerals. 10.2138/rmg.2002.48.11.

83. Palasz, Andre & Breña, P & de la Fuente, Jose & Gutiérrez-Adán, Alfonso. (2008). The effect of different zwitterionic buffers and PBS used for out-of-incubator procedures during standard in vitro embryo production on development, morphology and gene expression of bovine embryos. *Theriogenology*. 70. 1461-70. 10.1016/j.theriogenology.2008.06.092.

84. Tanase, C. & Popa, Ionel Marcel & Verestiuc, Liliana. (2011). Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates. *Materials Letters*. 65. 1681. 10.1016/j.matlet.2011.02.077.

85. Sukhodub, Leonid. (2014). Metal Ions Doped Chitosan Nanoparticles. *Journal of Nano- and Electronic Physics*. 6.

86. Cascone, Sara. (2017). Modeling and comparison of release profiles: Effect of the dissolution method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 106. 10.1016/j.ejps.2017.06.021.

87. Huang, Xiao & Brazel, Christopher. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of*

controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 73. 121-36. 10.1016/S0168-3659(01)00248-6.

88. Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 67(3). 217–223

89. Korsmeyer, Richard & Gurny, Robert & Doelker, Eric & Buri, Pierre & Peppas, Nikolaos. (1983). Mechanisms of Solute Release from Porous Hydrophilic Polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 15. 25-35. 10.1016/0378-5173(83)90064-9.

90. Vora, Lalit & G, Sita & Vavia, Pradeep. (2017). Zero order controlled release delivery of cholecalciferol from injectable biodegradable microsphere: In - vitro characterization and in - vivo pharmacokinetic studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 107. 10.1016/j.ejps.2017.06.027.

91. Oberdörster, Eva. (2004). Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass. *Environmental health perspectives*. 112. 1058-62. 10.1289/ehp.7021.

92. Goodarzi, Saba & Ros, Tatiana & Conde, João & Sefat, Farshid & Mozafari, Masoud. (2017). Fullerene: Biomedical Engineers Get to Revisit an Old Friend. *Materials Today*. 10.1016/j.mattod.2017.03.017.

93. Qi, Hongying & Rath, Uttama & Wang, Dong & Xu, Ying-Zhi & Ding, Yun & Zhang, Weiguo & Blacketer, Melissa & Paddy, Michael & Girton, Jack & Johansen, Jørgen & Johansen, Kristen. (2004). Megator, an Essential Coiled-Coil Protein that Localizes to the Putative Spindle Matrix during Mitosis in *Drosophila*. *Molecular biology of the cell*. 15. 4854-65. 10.1091/mbc.E04-07-0579.

94. Rabea, Entsar & Badawy, Mohamed & Stevens, Christian & Smagghe, Guy & Steurbaut, Walter. (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. 4. 1457-65. 10.1021/bm034130m.