

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. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ

**ФІЗИЧНІ ОСНОВИ ФОРМУВАННЯ СКЛАДУ АПАТИТ-
БІОПОЛІМЕРНИХ ПОРИСТИХ МАТРИЦЬ ДЛЯ КОНТРОЛЬОВАНОЇ
ДОСТАВКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ В ЗОНУ ІМПЛАНТАЦІЇ**
(остаточний)

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

Л.Ф. Суходуб

2020

Рукопис закінчено 18 грудня 2020 р.

Результати даної роботи розглянуті науковою радою СумДУ протокол від 23 грудня 2020р. № 6

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР, чл.-кор. НАНУ, д-р. фіз.-мат. наук, професор, завідувач кафедри ББФБІ СумДУ	18.12.2020	Л.Ф.Суходуб (вступ, розділ 4, 6,8-11,висновки)
Відповідальний виконавець – канд. хім. наук., старш.наук.співроб. ННЦ «Нано- і біоматеріали» СумДУ	18.12.2020	Л.Б. Суходуб (розділ 1-12, висновки)
Виконавці:		
д-р. фіз.-мат. наук, професор кафедри біофізики та медичної інформатики ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ ім.Т.Шевченка	18.12.2020	Ю.І.Прилуцький (підрозділи 2.2, 3.2; p.5,7).
д-р.тех.н. професор кафедри ПМіТКМ	18.12.2020	К.О.Дядюра (розділ.4)
м.н.с. ННЦ «Нано-і біоматеріали» СумДУ	18.12.2020	М.О.Кумеда (підрозділ 3.2, розділи 5, 7- 10,11)
к.б.н., доцент кафедри ББФБІ СумДУ	18.12.2020	Н.М.Іншина (розділ 10)
к.х.н., доцент кафедри ББФБІ СумДУ	18.12.2020	С.А.Гончарова (розділ 12)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 189 с., 76 рис., 27 табл., 138 джерел.

АЛЬГІНАТ, ГІДРОКСИПАТИТ, ХІТОЗАН, ВУГЛЕЦЕВІ НАНОЧАСТИНКИ, НАНОКОМПОЗИТИ, СТРУКТУРА, ФІЗИКО- МЕХАНІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

Об'єкт дослідження: процеси формування гібридних біоматеріалів з інкорпорацією лікарських біоактивних речовин, *in vitro* кінетика вивільнення лікарських 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 перехідних 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: розроблено технологічні основи синтезу та створено лабораторні зразки альгінат (Alg)-гідроксилапатитних (ГА) композитів у формі тонких плівок (≤ 1 мм) з вмістом іонів Cu^{2+} , Zn^{2+} ; доведена протимікробна активність; створені лабораторні зразки біоактивних композитів на основі ГА з імобілізованими 0,05 та 0,5 мас.% багатостінними (MWCNTs) та одностінними (SWCNTs) вуглецевими нанотрубками у формі гранул ($d_r=2$ мм); синтезовано композитний матеріал на основі ГА, Alg і оксиду графену (GO) та встановлено структурно-фазові та механічні залежності від вмісту GO; отримані однофазні покриття з ГА (300мкм) та Брушиту (50мкм) на Ti6Al4V субстратах, оброблених плазмовим електролітичним окисненням з використанням методу термодепозиції; створений поліелектролітний композит на основі НА, Alg та хітозану (CS) з вмістом фулерену C_{60} .

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ	3
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	8
ПЕРЕДМОВА	9
ВСТУП	16
1 ОТРИМАННЯ БІОАКТИВНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ПРИРОДНИХ ПОЛІМЕРІВ ТА НА ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В СТОМАТОЛОГІЇ.....	20
1.1 Композитні матеріали на основі НА та альгінату з вмістом іонів металів у формі порошків	20
1.2 Композитні матеріали з вмістом іонів Ca^{2+} та пропіленгліколю	24
Даний розділ присвячений дослідженню впливу технологічних параметрів на форму утвореного продукту.....	24
1.3 Полімер-апатитні біоматеріали з вмістом іонів металів у формі тонких плівок та скафолдів	25
2 ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ, СТРУКТУРИ ТА ВЛАСТИВОСТЕЙ БІОАКТИВНИХ МАТЕРІАЛІВ ДЛЯ СТОМАТОЛОГІЇ ТА ЩЕЛЕПНО-ЛИЦЬОВОЇ ХІРУРГІЇ.....	33
2.1 Дослідження структури біоактивних композитних плівок НА-Alg-Me	33
2.2 Наноструктуровані апатит-полімерні композити: залежність кінетики вивільнення лікарського засобу від фінішної обробки матеріалу	36
3 РОЗРОБКА БІОПОЛІМЕР-АПАТИТНИХ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ З ІМОБІЛІЗОВАНИМИ В ЇХ СТРУКТУРУ НЕОРГАНІЧНИМИ НАНОЧАСТИНКАМИ ТА ІОНАМИ МЕТАЛІВ.....	51
3.1 Альгінат-апатитні матеріали з імобілізацією MWCNT та Fe	51

3.2	Дослідження впливу мікрохвильового випромінювання (MW) на синтез та властивості композитних матеріалів з вмістом хітозану.....	64
4	ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКТИВНОСТІ В МОДЕЛЬНИХ РЕАКЦІЯХ IN VITRO. ВПЛИВ ФОРМИ ТА СКЛАДУ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ НА З ВМІСТОМ ІОНІВ Ag^+ , МАГНЕТИТУ Fe_3O_4 , ЦИНКУ ОКСИДУ ZnO НА ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ І БІОСУМІСНІСТЬ	66
5	РОЗРОБКА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКТИВНИХ ПОЛІМЕР-АПАТИТНИХ МАТЕРІАЛІВ З ВМІСТОМ ЧАСТИНОК НЕОРГАНІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ	73
5.1	Композитний матеріал з покращеними механічними властивостями на основі гідроксиапатиту, альгінату та оксиду графену для лікування твердої кісткової тканини	73
5.2	Композитний матеріал на основі гідроксиапатиту, альгінату та мікрочастинок оксиду цинку з антибактеріальними властивостями	83
6	РОЗРОБКА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПОКРИТТІВ НА МОДЕЛЬНИХ ТИТАНОВИХ СУБСТРАТАХ МЕТОДОМ ТЕРМІЧНОЇ ДЕПОЗИЦІЇ.....	93
6.1	Біоактивні покриття з гідроксиапатиту та брушиту на модифікованих методом плазмо-електролітичного окислення $Ti6Al4V$ субстратах.....	93
6.2	Біоактивні ZnO та ZnO/Alg покриття з протимікробними властивостями.....	99
7	ОТРИМАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКТИВНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ПРИРОДНИХ ПОЛІМЕРІВ ТА НА З ВМІСТОМ НАНОЧАСТИНОК ФУЛЕРЕНУ	108
7.1	Розробка та дослідження поліелектролітної мембрани на основі природних полімерів та наноструктурованого НА з імобілізованими лікарськими засобами	108

7.2	Дослідження біоактивності композитів з вмістом наночастинок фулерену C ₆₀ в модельних реакціях <i>in vitro</i>	114
8	ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКТИВНОСТІ ОТРИМАНИХ АПАТИТ-БІОПОЛІМЕРНИХ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ <i>IN VITRO</i>	128
8.1	Синтез та дослідження протимікробної активності композитного матеріалу на основі гідроксиапатиту, альгінату та фулерену C ₆₀	128
9	ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ ВИВІЛЬНЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ЗІ СКЛАДУ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ ЗА МЕТОДОМ ВЕРХ.....	136
9.1	Дослідження впливу технологічних умов на процес утворення HA-CS-F покриттів, отриманих методом термодепозиції на титанових субстратах ...	137
9.2	Дослідження вивільнення диклофенаку натрію з HA-CS та HA-CS-F покриттів методом ВЕРХ	140
9.3	Дослідження вивільнення диклофенаку натрію з Alg- HA та xFull- Alg- HA гранульованих композитів методом ВЕРХ.....	142
10	МЕДИКО-БІОЛОГІЧНІ <i>IN VITRO</i> ТА <i>IN VIVO</i> ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНО ДІЇ ТА БІОСУМІСНОСТІ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ	146
10.1	Дослідження біологічних особливостей композитного матеріалу з вмістом одностінних вуглецевих нанотрубок HA-Alg-SWCNT	146
10.2	Порівняльна характеристика протимікробної активності C ₆₀ –вмісних гідрогелів та гранул, синтезованих на основі гідроксиапатиту	150
11	ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ХІТОЗАНУ В КОМПЛЕКСІ З ІОНАМИ ТА НАНОЧАСТИНКАМИ СРІБЛА НА ПРОТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОКРИТТІВ НА ОСНОВІ HA, НАНЕСЕНИХ НА МОДЕЛЬНІ ТИТАНОВІ ІМПЛАНТИ	156
12	МЕДИКО-БІОЛОГІЧНІ <i>IN VITRO</i> ТА <i>IN VIVO</i> ДОСЛІДЖЕННЯ.....	159

12.1	Дослідження цитотоксичності частинок магнетиту у складі композитів на основі НА	159
12.2	Дослідження протимікробної активності щодо мікроорганізмів E.coli, K. pneumonia, S. aureus біоактивних покриттів на основі НА та цинку сульфід (ZnS), нанесених на модельні титанові імплантати	165
12.3	In vivo дослідження композитного матеріалу у вигляді альгінат-хітозанового поліелектролітного пористого каркасу з різним вмістом ZnO та з сорбційними властивостями.....	168
	ВИСНОВКИ.....	174
	ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	177

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

Alg – альгінат

HA (ГА) – гідроксиапатит

ED – електронна дифракція

кдHA – 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

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

ДН – диклофенак натрію

ПЕРЕДМОВА

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

Рентгеноструктурний аналіз.

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

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

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

0,688 нм) по дифракційних лініях, що відповідають кристалографічним площинам (3 1 0) та (0 0 2), за наступними формулами:

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

де a_{hk0} – параметр елементарної комірки, обрахований в площині (h k 0);

d_{hk0} – міжплощинна відстань площини (h k 0);

h, k, l – індекси Міллера;

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

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

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

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

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

де K – безрозмірна константа, залежна від форми кристалітів (приймаємо K=1);

λ – довжина хвилі рентгенівського випромінення;

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

θ – кут дифракції.

Рівень мікродеформацій ϵ вимірюється як зміна міжплощинної відстані досліджуваного зразка у порівнянні з еталоном, в якому мікродеформації відсутні. Якщо фізичне розширення дифракційних ліній відбувається лише

через мікродеформації кристалічної решітки, то рівень мікродеформацій визначається за наступною формулою:

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

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

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

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

Рентгено-флуоресцентний аналіз

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

Електронна мікроскопія

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

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

Для розміщення об'єктів у предметній площині об'єктивної лінзи ПЕМ використовувались опорні сітки з міді (30×30 мкм) та нікелю (50×50 мкм). Оскільки об'єкти мали розміри менші за отвори сітки, вони розміщувались на тонких, прозорих для електронів, суцільних плівках вуглецю товщиною 20 нм. Дані зразки наносились на опорну сітку з плівкою вуглецю, попередньо закріплену в об'єктотримачі, завдяки диспергації суспензії ультразвуковим методом. Суспензія отримувалась методом розчинення гелю (порошку) дистильованою водою.

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

Використовуючи знімки ПЕМ було виміряно розміри наночастинок у довжину D, оскільки у всіх випадках вони мають голкоподібну структуру.

Скануюча електронна мікроскопія

Електронно-мікроскопічні дослідження морфології зразків проводилися методом електронної мікроскопії на растровому електронному мікроскопі FEI Inspect S 50. Субстрат досліджувався в електронному мікроскопі в режимі вторинних електронів при прискорюючій напрузі 10-20 кВ. Роздільна здатність мікроскопу складала 10 нм.

ІЧ спектроскопія

Спектри FTIR отримували за допомогою спектрометра PerkinElmer Spectrum BX. Зразки готували у вигляді дисків. Спектри реєструвалися в діапазоні 4000–400 см^{-1} при роздільній здатності 1 см^{-1} . Дослідження проводили на інфрачервоному спектрометрі на основі Фур'є перетворення, в якому застосовується сучасний метод ідентифікації молекулярних сполук і їх кількісного аналізу. Промені від ІЧ-джерела світла проходять через зразок і падають на детектор, який вимірює поглинання світла зразком. Величина поглинання дозволяє точно ідентифікувати молекулярну структуру зразка. Зразки готували у формі дисків з використанням КВг.

Вимірювання пористості та ступеню набрякання композитів

Для визначення пористості отриманих композитних матеріалів зразок масою m_0 поміщали в мірний циліндр з відомим об'ємом етанолу (V_1) і витримували протягом 30 хв. Об'єм етанолу з зануреним зразком відповідає V_2 . Потім зразок, в пори якого проник етанол, витягували з циліндра, зважували (m_1) і визначали об'єм спирту, що залишився (V_3). Пористість (Π) розраховували за формулою [2]:

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

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

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

Розрахунок рівноважного ступеня набрякання Q проводили за формулою:

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

де m_0 – маса сухого зразку, г;

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

In vitro дослідження біоактивності

Біоактивність досліджуваних зразків визначали за зміною значення рН фізіологічного розчину (SBF), який за складом та концентрацією компонентів наближений до сироватки крові людини: Na^+ -142 мМ, K^+ – 5 мМ, Mg^{2+} – 1,5 мМ, Ca^{2+} – 2,5 мМ, Cl^- – 148,8 мМ, HCO_3^- – 4,2 мМ, HPO_4^{2-} – 1,0 мМ, SO_4^{2-} – 0,5 мМ, рН=7,4 [3]. Зразки композитів однакової маси були занурені в розчин SBF об'ємом 5 мл та витримані в термошафі з постійною температурою 37°C протягом 7 днів. Вимірювання рН здійснювалося щоденно за допомогою рН-метра рН-150МІ.

Дослідження механічних властивостей

Втрата ваги при термічному впливі та теплову поведінку зразків досліджували за допомогою одночасного TGA/DTA аналізатора Shimadzu DTG-60Н. Зразки нагрівали в платиновому тиглі на повітрі зі швидкістю 10°C/хв від кімнатної температури до 600°C. В якості стандартного зразка

використовували $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$. Визначали максимальні відносні деформації ϵ до руйнування, силу σ при одноосному стискуванні.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)

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

ВСТУП

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 (CNPs) завдяки їх унікальним властивостям, пов'язаним в першу чергу з їх високорозвиненою активною поверхнею. Серед CNPs 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 виїняткових 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 CNPs, 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 CNPs, завдяки їх здатності розтинати клітинні мембрани [22]. Поверхневі властивості, гідрофільність, розміри та форма дозволяють використовувати CNPs 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 CaP 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 ОТРИМАННЯ БІОАКТИВНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ПРИРОДНИХ ПОЛІМЕРІВ ТА НА ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В СТОМАТОЛОГІЇ

Розвиток багатофункціональних наноструктурних матеріалів для медицини, таких як ортопедія та стоматологія, залишається актуальним предметом медичної науки. Сучасні можливості припускають широкий вибір матеріалів, які за певних умов можна комбінувати і створювати композитні матеріали, щоб досягти кращих властивостей [34,35]. Композитний скафолд, що складається з двох різних матеріалів, таких як синтетичний органічний полімер та неорганічні матеріали, поєднує переваги кожного окремого матеріалу та мінімізує їх недоліки.

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

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

Матеріали

Кальцій нітрат тетрагідрат 0,167 М ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), гідрофосфат амонію 0,1М ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), гідроксид амонію (NH_4OH) класифікації «ХЧ» (виробництво «Merck»); 1% водний розчин альгінату натрію молекулярною

масою 15 кДа, (E401), Китай). 0,5 М розчини металовмісних сполук: хлориду кальцію CaCl_2 , сульфату міді CuSO_4 , сульфату цинку ZnSO_4 , сульфату магнію MgSO_4 , хлориду алюмінію AlCl_3 .

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



Синтез відбувався при рН 10,5, що досягалось додаванням 25% розчину NH_4OH . Реакційну суміш нагрівали до $80\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 10 хвилин з наступним 24 годинним «зістарюванням» та ретельною промивкою осаду. Утворений гідрогель НА був відділений від дисперсійного середовища шляхом центрифугування. Вологість отриманого НА склала 90%. Частина продукту відпалювали при $900\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 1 години для подальших досліджень методом рентгенівської дифракції.

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

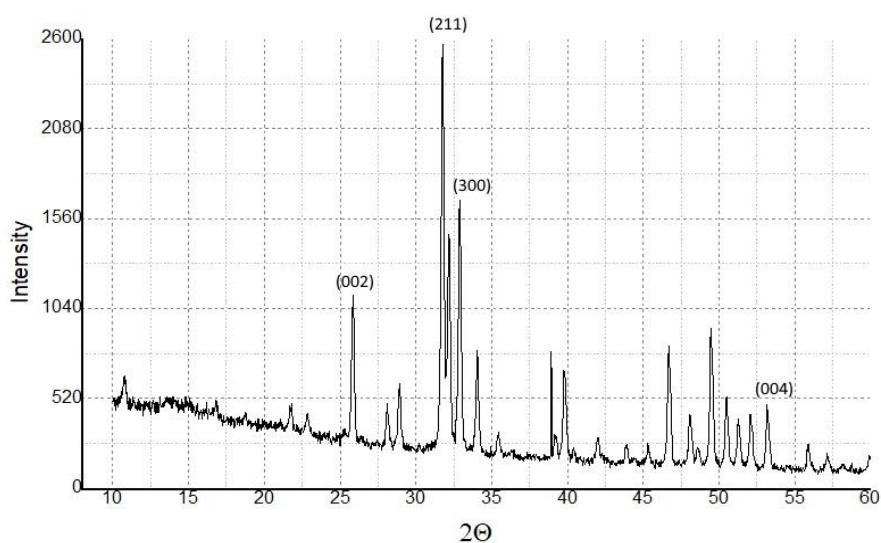


Рисунок 1.1 – Рентгенівська дифрактограма зразка НА, синтезованого при рН=10,5 та відпаленого при $900\text{ }^\circ\text{C}$.

Таблиця 1.1 – Структурні характеристики НА .

Умови		Параметри кристалічної решітки			Склад, %		Ca/P
pH	t, oC	a, нм	c, нм	L, нм	НА	b-ТСП	
10,5	80	0,942	0,688	50,16	100	0	1,66

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

Основні моменти технології виготовлення композитів приведені в таб.1.2.

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

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

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

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

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

Висновок:

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

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

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

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

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

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

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

Висновок:

Параметри технологічного процесу впливають на форму синтезованого продукту.

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

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

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

В основі процесу отримання композитного матеріалу у формі тонких плівок або скафолдів лежить здатність макромолекул природного полімеру альгінату до гелеутворення. Гідрогелі альгінату представляють собою «зшиту» в даному випадку іонами металів тривимірну сітку, здатну

іммобілізувати та утримувати в своїй структурі наночастинки гідроксиапатиту. На рис.1.2. схематично представлена структура композитного біоматеріалу.

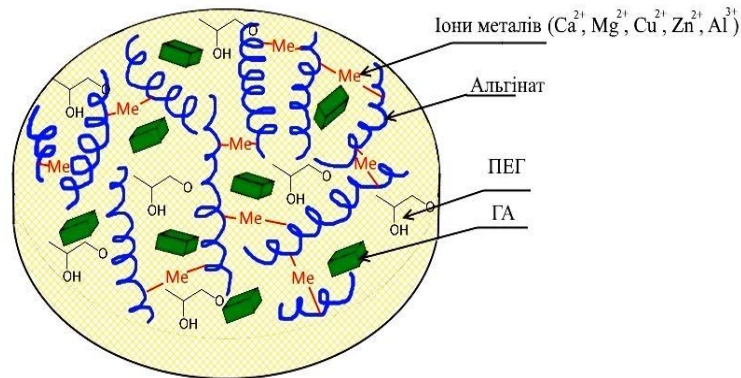


Рисунок 1.2 – Схематичне зображення структури альгінат-апатитних біокомпозитів.

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

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

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

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

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

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

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

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

Результати дослідження наведені в таблиці 1.4.



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

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

Вихідними матеріалами для даної групи зразків були: суспензія НА №6 від 12.02.2018 вологістю близько 80%; 1% водний розчин альгілату натрію; пропіленгліколь; 0,1М водні розчини металовмісних сполук (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}). До всіх зразків було застосовано УЗ перемішування.

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

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

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

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

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

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

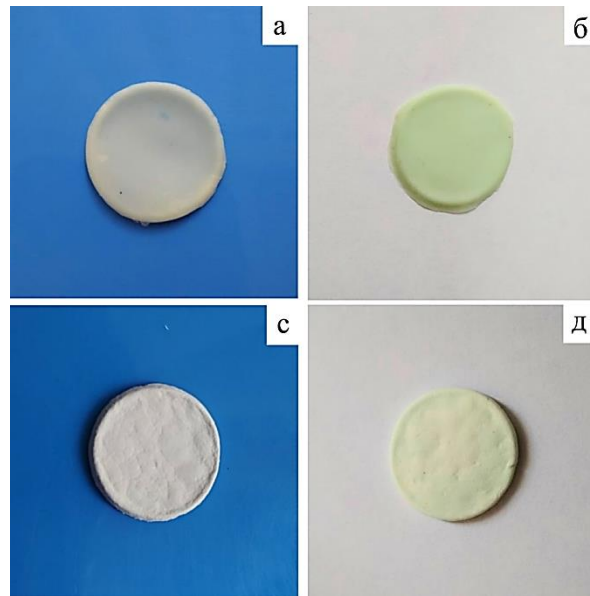


Рисунок 1.4 – Композитні матеріали на основі НА , альгінату та іонів металів: а), б) - з додаванням Al^{3+} та Cu^{2+} , висушені при кімнатній температурі; с), д) - з додаванням Al^{3+} та Cu^{2+} відповідно, ліофілізовані при $-53\text{ }^{\circ}C$.

Висновок:

Вид кінцевої обробки впливає на форму матеріалу.

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

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

Ліофілізовані протягом 4,5 годин зразки мають невеликий ступінь еластичності. Час ліофілізації зразка об'ємом 2.5 мл з діаметром форми 2,5 см має не перевищувати 5 годин.

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

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

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

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

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

Було підготовано 2 групи зразків: №1- №6, до яких не застосовували УЗ обробки, та № 1а-6а , до яких був застосований УЗ вплив після додавання розчинів металовмісних сполук. Всі зразки були ліофілізовані протягом 6,5 годин. Результати досліджень наведені в таблиці 1.6, а зовнішній вигляд утворених структур приведено на рис. 1.5.

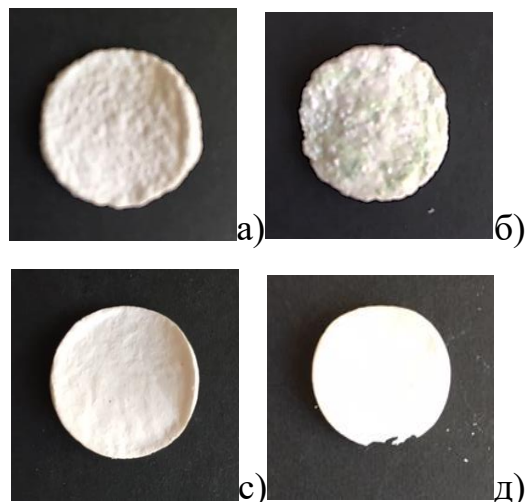


Рисунок 1.5 – Зображення зовнішнього вигляду зразків (таб.1.6): №2 (а) та №3 (б), синтезованих без застосування УЗ обробки; №2а (с) та №3а (д) – з застосуванням УЗ обробки.

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

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

Висновок:

Всі зразки є щільними, твердими. Після застосування УЗ структура матеріалу є більш гомогенною. Додавання металічних іонів призводить до збільшення твердості та зменшення еластичності в порівнянні з контрольним зразком №1. Зразки з Zn²⁺ та Cu²⁺ (рис.1.5, б,д) дають найбільшу усадку під час висушування, їх кінцевий діаметр становить 15 мм, в той час, як зразок з Mg²⁺ має діаметр 20 мм. При цьому діаметр заливочної форми становить 25 мм.

2 ДОСЛІДЖЕННЯ МОРФОЛОГІЇ, СТРУКТУРИ ТА ВЛАСТИВОСТЕЙ БІОАКТИВНИХ МАТЕРІАЛІВ ДЛЯ СТОМАТОЛОГІЇ ТА ЩЕЛЕПНО-ЛИЦЬОВОЇ ХІРУРГІЇ

2.1 Дослідження структури біоактивних композитних плівок HA-Alg-Me

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

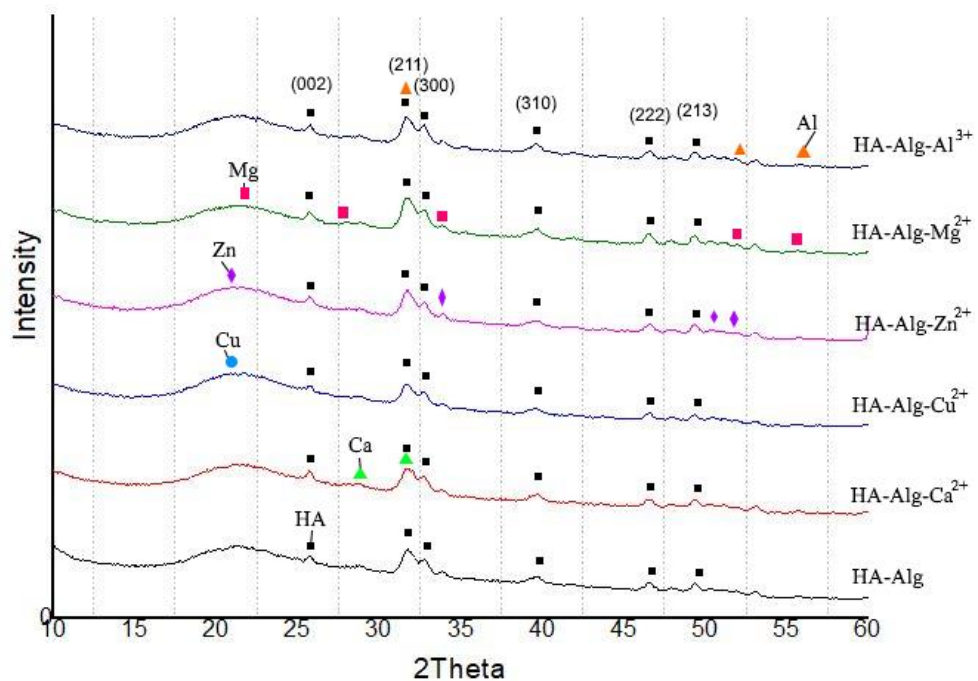


Рисунок 2.1 – XRD спектри альгінат-апатитних плівок з вмістом іонів металів, позначених на спектрах відповідними значками. Основні піки HA позначені ■.

ІЧ спектроскопія. Дослідження з допомогою ІЧ спектроскопії були проведені з метою дослідити взаємодію функціональних груп альгінату з

іонами металів. Рисунок 2.2 демонструє ІЧ спектр для чистого альгінату та альгінату після його взаємодії з іонами алюмінію. Даний спектр є типовим для Alg-Me сполук, тому ІЧ спектри з іншими досліджуваними іонами Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} не приводяться.

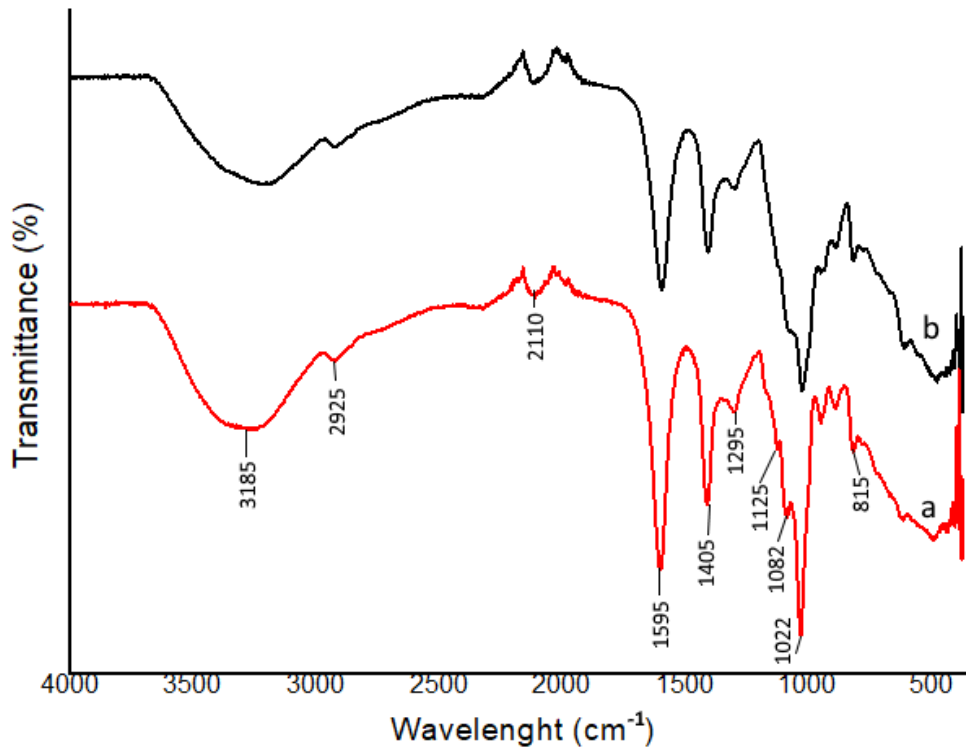


Рисунок 2.2 – FTIR спектри: а)- для альгінату натрію; б) – для Alg- Al^{3+} .

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

Визначення ступеню набрякання. Важливим фактором композитних матеріалів, в тому числі у формі плівок, є їх здатність зберігати форму,

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

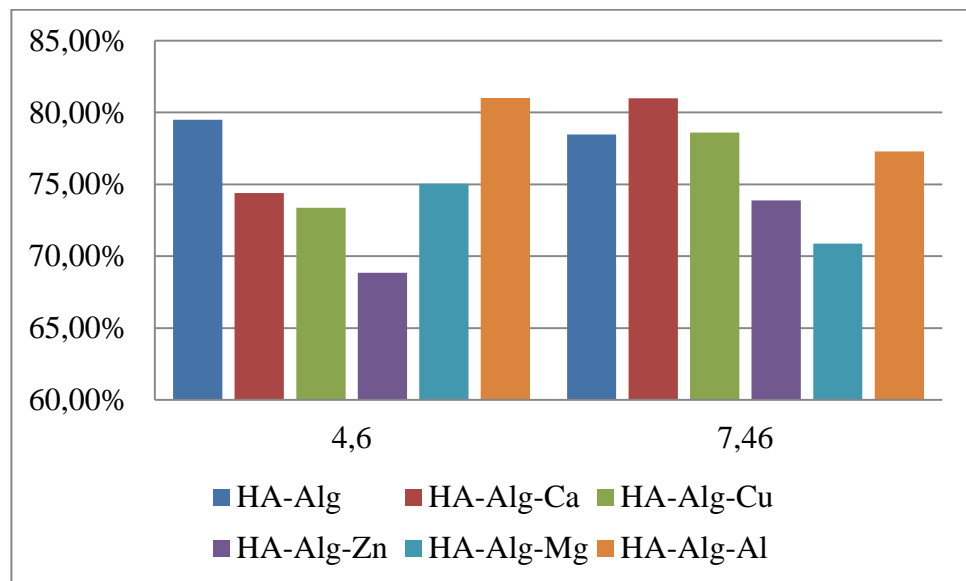


Рисунок 2.3 – Ступінь набрякання плівок у розчині PBS при рН=4,6 та 7,46.

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

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

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

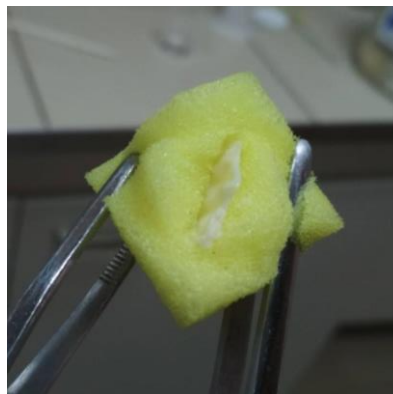


Рисунок 2.4 – Зовнішній вигляд зразку НА-Alg-Ca²⁺, через 1 добу експозиції.

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

В даному дослідженні ми синтезували новий наноструктурований композитний матеріал, який поєднує переваги Alg та ГА, а саме біоактивність, еластичність Alg та остеопровідність НА. Частина роботи присвячена дослідженню наноструктурних композитних матеріалів на основі

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

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

Для досліджень були підготовлені три групи зразків:

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

Методика отримання матеріалів у формі скафолдів.

Для отримання СНА/Alg зразків у формі керамічних скафолдів, 2% розчин Alg додатково додавали до НА/Alg зразків, синтезованих за вищеописаною технологією, у ваговому співвідношенні НА/Alg: Alg = 1: 0,5.

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

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

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

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

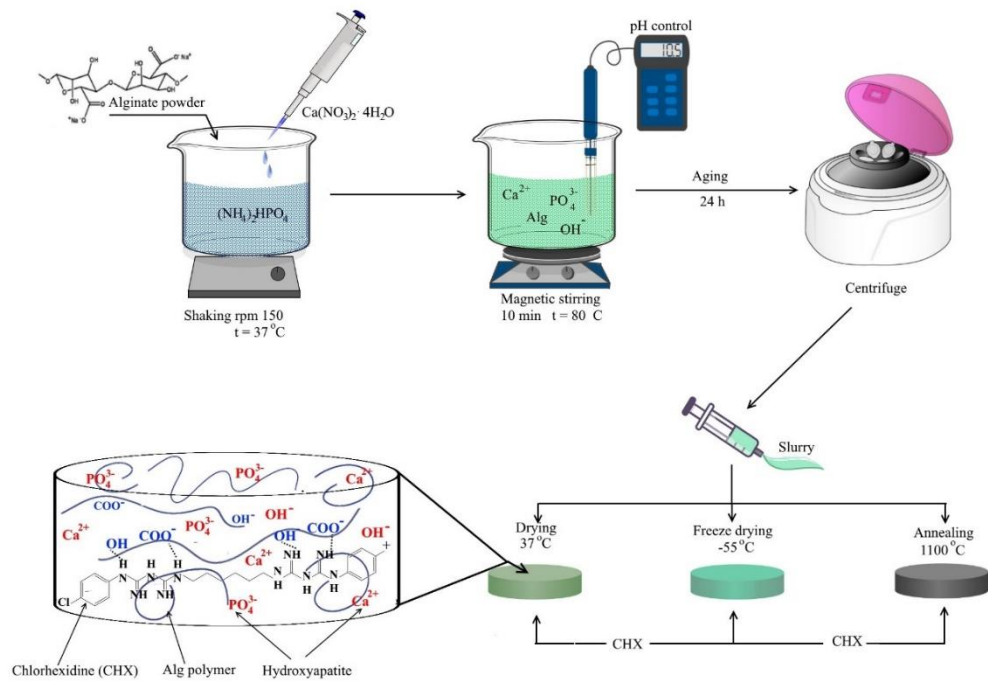


Рисунок 2.5 – Схема процесу отримання композитних матеріалів НА-Alg-CH.

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

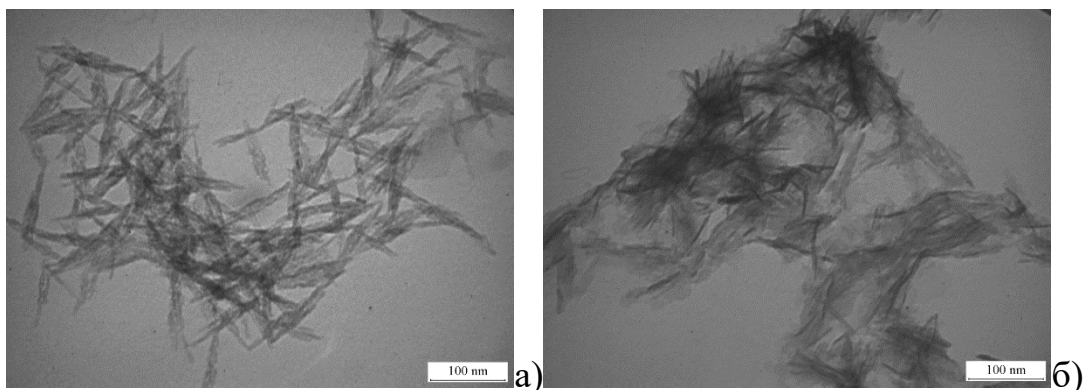


Рисунок 2.6 – ПЕМ зображення мікроструктури НА в складі композитних :а)- DHA/Alg10; б)- DHA/Alg40.

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

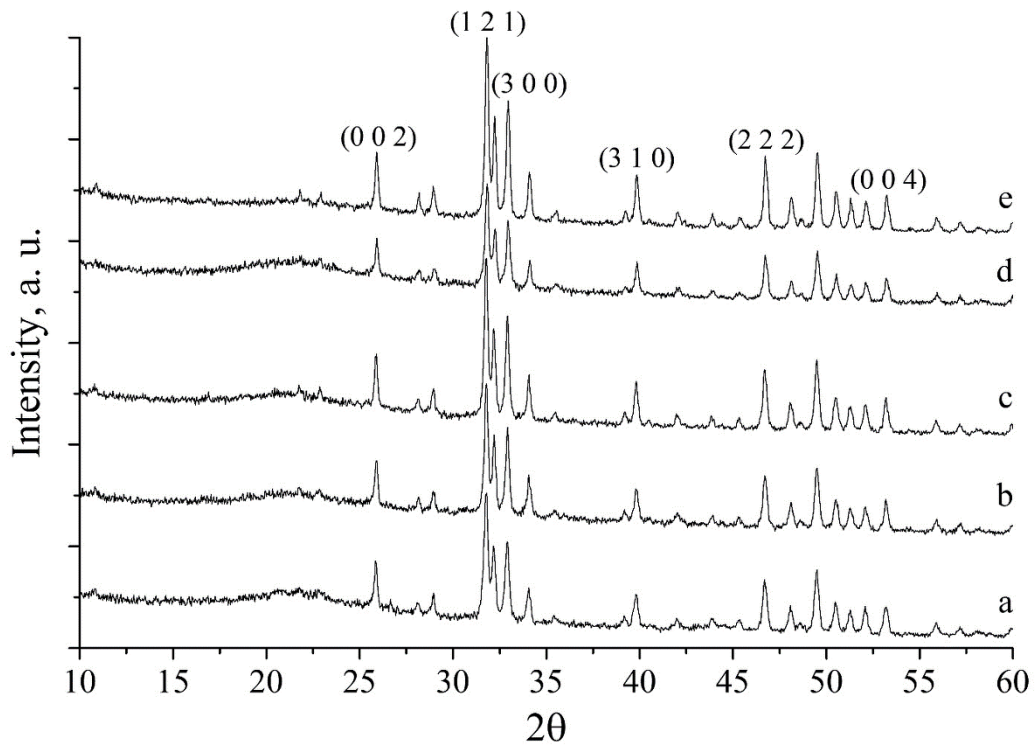


Рисунок 2.7 – XRD спектри від зразків CHA/Alg40 (a), CHA/Alg30 (b), HA/Alg20 (c), HA/Alg10 (d) та НА (e). Всі зразки відпалені протягом 1 години при 1100 °С.

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

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

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

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

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

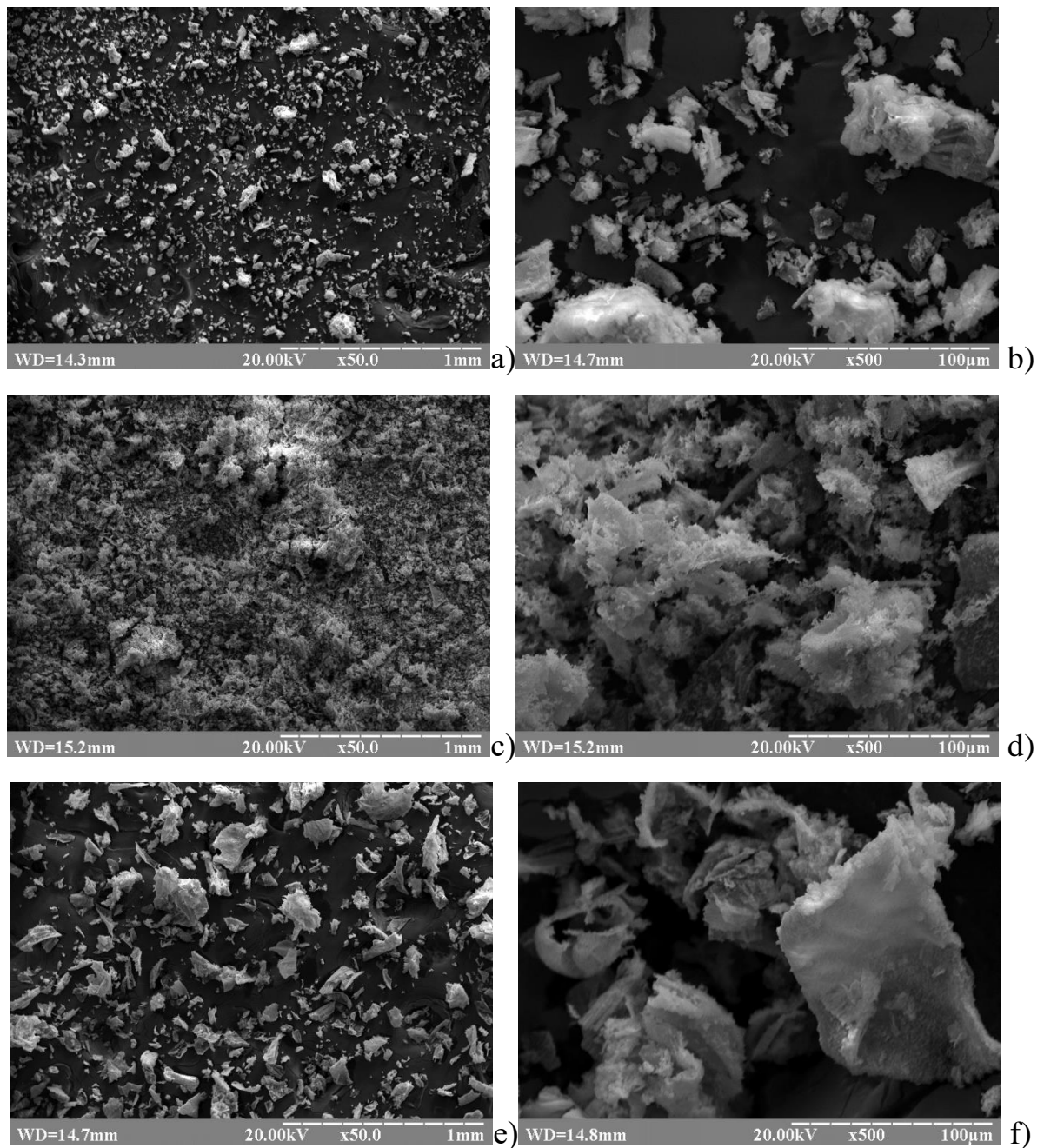


Рисунок 2.8 – РЕМ зображення поверхні зразків: висушених при 37 °С (а, б), керамічних скафолдів, відпалених при 1100 °С (с, d) та ліофілізованих при -55 °С (е, f) при різних збільшеннях (x50 та x500, відповідно).

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

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

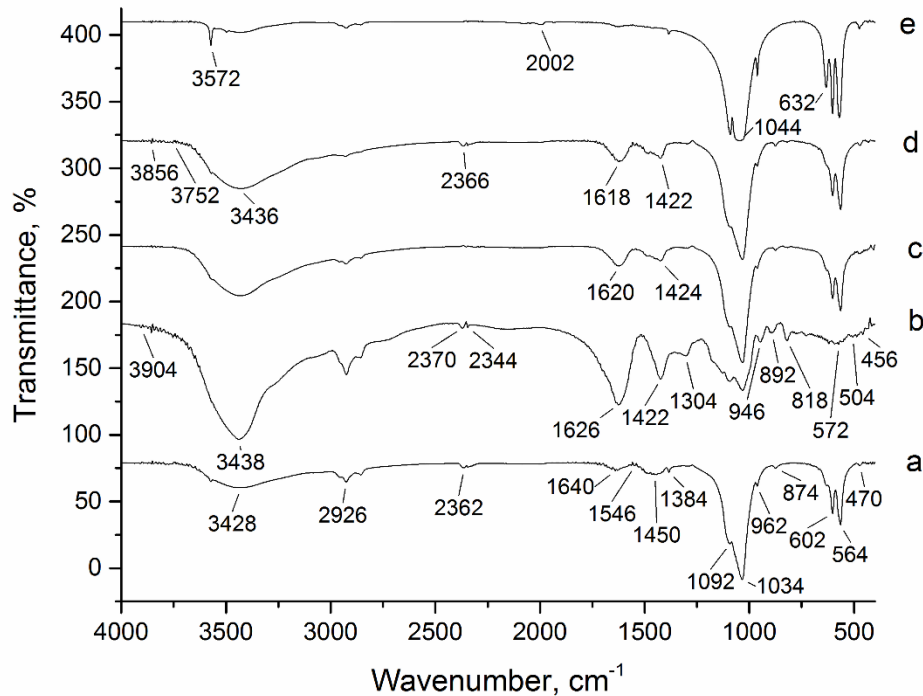


Рисунок 2.9 – FTIR спектри від зразків: НА (a), альгінат (b), композити DHA/Alg40/CHX (c), LHA/Alg40/CHX (d) and CHA/Alg40/CHX(e).

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

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

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

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

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

Таблиця 2.3 – Ступінь набрякання та пористість СНА зразків.

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

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

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

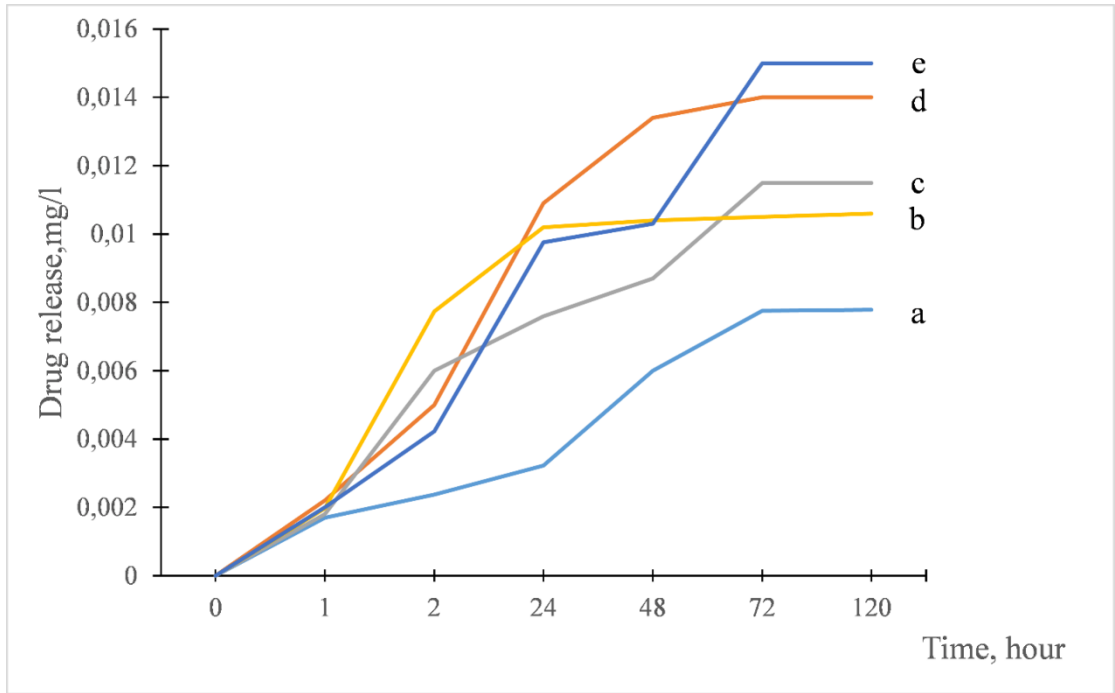


Рисунок 2.10 – Кінетика вивільнення СН з композитів DHA/Alg: (e) DHA/Alg40, (d) DHA/Alg30, (c) DHA/Alg20, (b) DHA/Alg10 and (a) DHA.

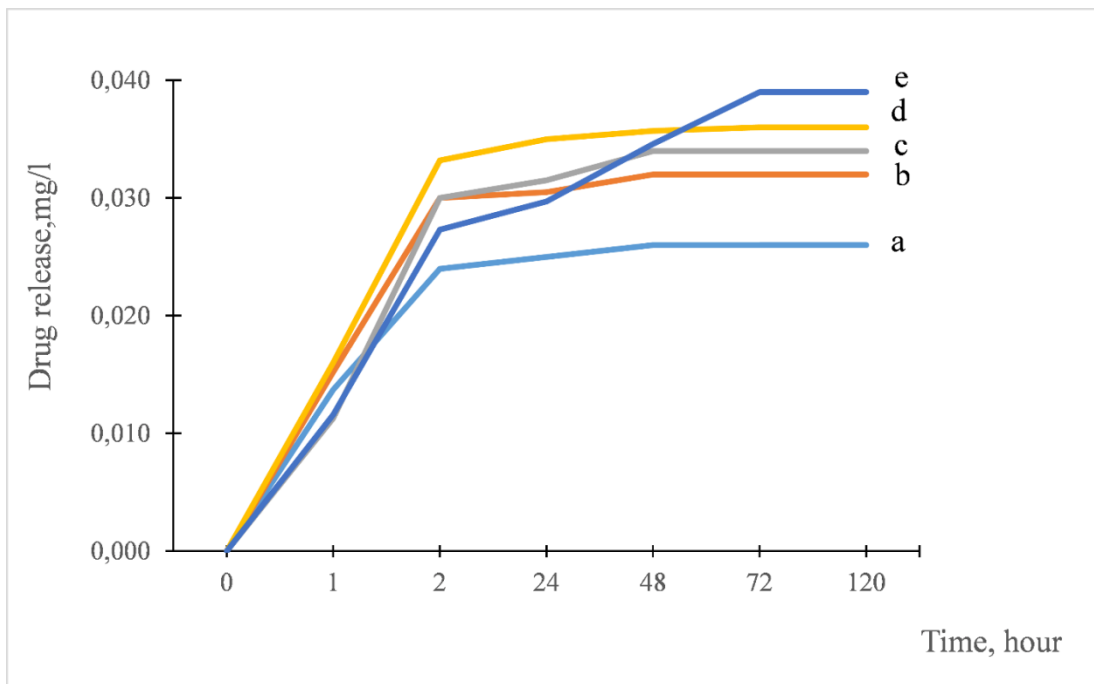


Рисунок 2.11 – Кінетика вивільнення СН з композитів LHA/Alg: (e) LHA/Alg40, (d) LHA/Alg30, (c) LHA/Alg20, (b) LHA/Alg10 and (a) LHA.

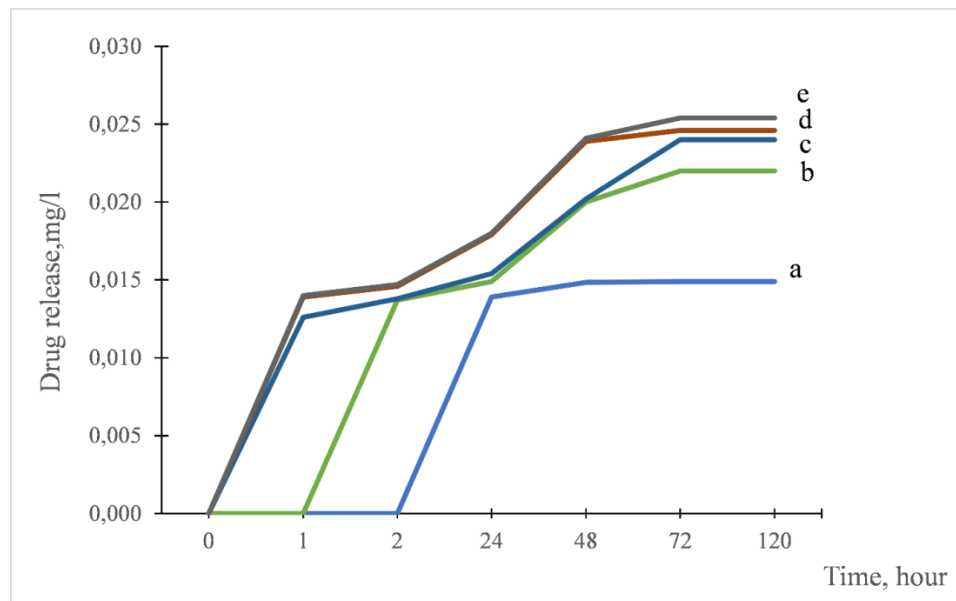


Рисунок 2.12 – Кінетика вивільнення СН з композитів CHA/Alg: (e) CHA/Alg40, (d) CHA/Alg30, (c) CHA/Alg20, (b) CHA/Alg10 and (a) CHA.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

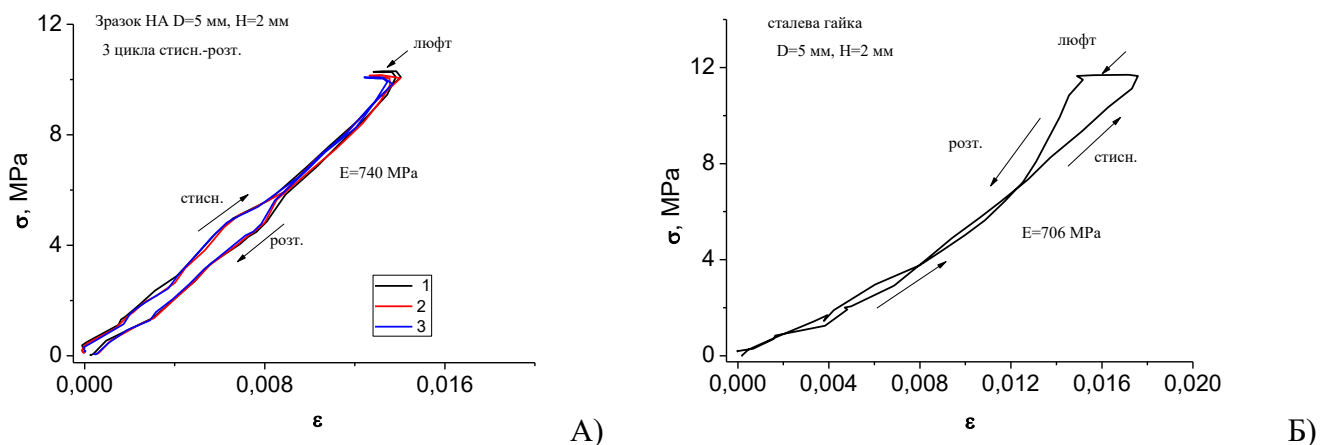


Рисунок 2.13 – Дослідження механічних характеристик зразків НА/Alg (А) і для порівняння - сталевій гайки (Б) за низьких навантажень при їх стисненні-розтягуванні.

Висновок:

У розробленому композитному матеріалі позитивно заряджений хлоргексидин сильно адсорбується на негативно заряджений функціоналізований молекулами альгілату поверхні наночастинок НА,

шляхом електростатичної взаємодії. Три групи зразків (висушені при 37 ° С, ліофілізовані при температурі -55 ° С та відпалені при 1100 °С у формі керамічного НА скафолду) з різним вмістом альгінату показали відмінності в здатності адсорбувати та вивільняти СН. Для всіх груп зразків зростання вмісту полімеру призводило до збільшення ступеню адсорбції СН та швидкості вивільнення лікарського засобу. Найвища концентрація вивільненого препарату в PBS протягом 72 год і максимальна швидкість вивільнення були у випадку ліофілізованих (0,04 мг/л і 0,83 мкг/год відповідно) зразків, а найнижчими (0,015 мг / л і 0,2 мкг / год) у випадку висушених при 37°С зразків. Ступінь набрякання для контрольних безполімерних зразків залежить від методу їх виготовлення та становить від 10% для СНА до 494% для ЛНА. Для зразків з вмістом полімеру, найбільший ступінь набрякання 732% має ліофілізований ЛНА/Alg40. Таким чином, отримані результати вказують на потенційне застосування наноструктурованих композитів НА/Alg/СН в біомедичних цілях, зокрема, для пролонгованого вивільнення лікарських засобів у стоматології.

3 РОЗРОБКА БІОПОЛІМЕР-АПАТИТНИХ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ З ІМОБІЛІЗОВАНИМИ В ЇХ СТРУКТУРУ НЕОРГАНІЧНИМИ НАНОЧАСТИНКАМИ ТА ІОНАМИ МЕТАЛІВ

3.1 Альгінат-апатитні матеріали з імобілізацією MWCNT та Fe

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

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

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

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

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

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

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

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

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

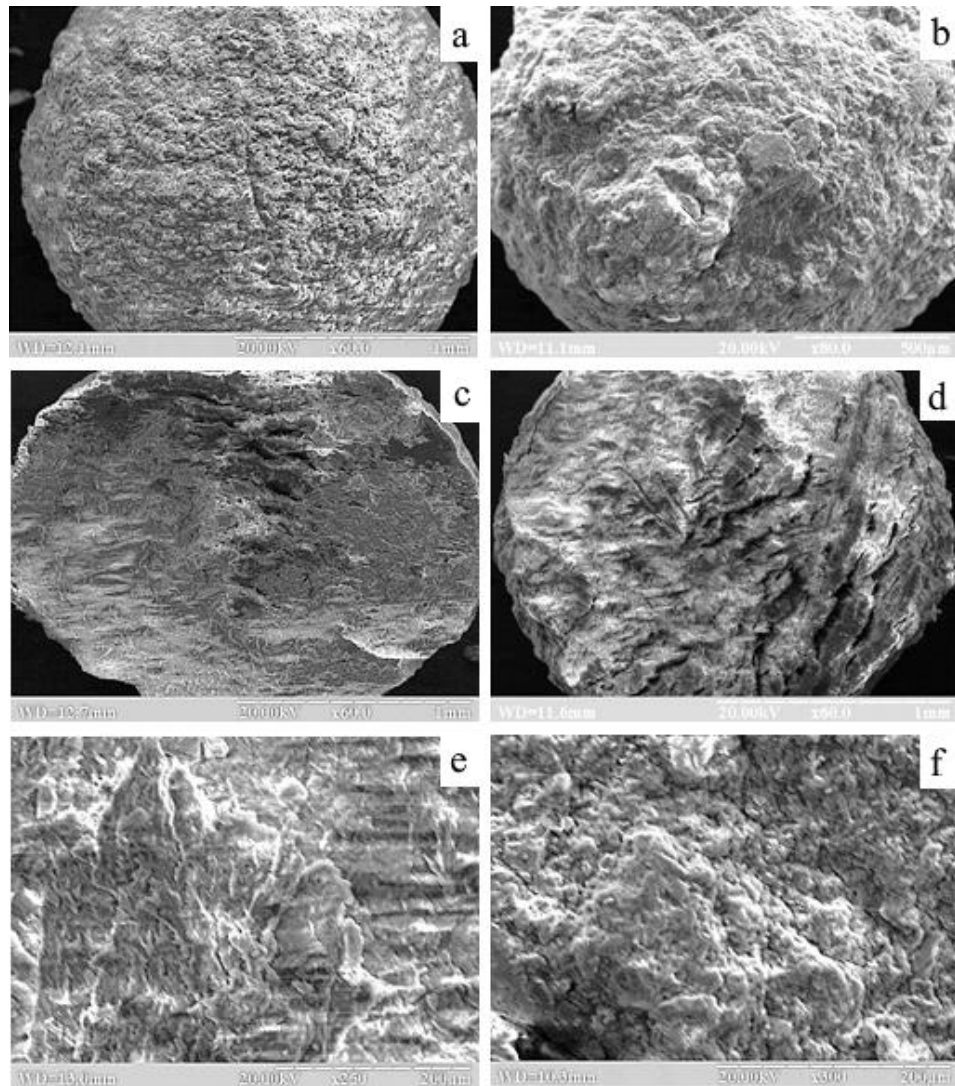


Рисунок 3.1 – СЕМ зображення: поверхня гранули HA-Alg/MWCNT+Fe - a); - HA-Alg - b); розріз гранули HA-Alg/MWCNT+Fe – c), HA-Alg – d); ділянка розрізу HA-Alg/MWCNT+Fe – e), HA-Alg – f).

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

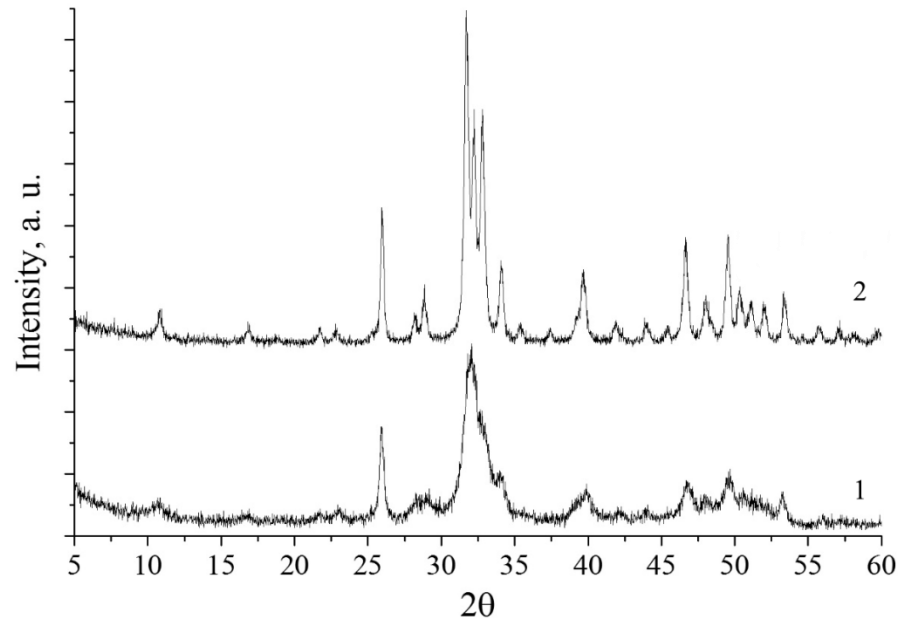


Рисунок 3.2 – Рентгенівські дифрактограми від зразків НА-Alg: висушеного при 37 °С (1) та відпаленого при 700 °С (2).

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

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

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

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

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

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

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

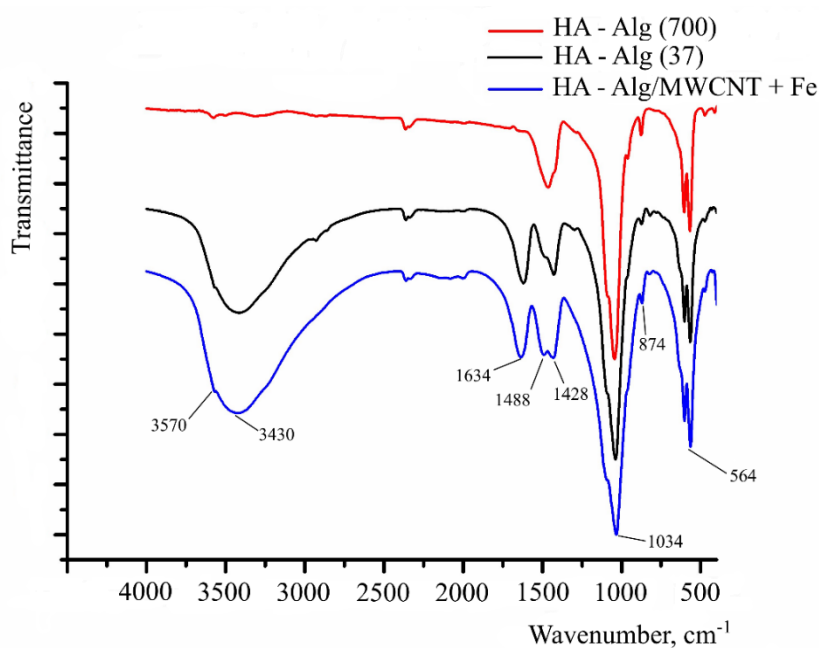


Рисунок 3.3 – FTIR спектри від зразків знизу -вверх: HA-Alg/MWCNT+Fe, HA-Alg37 and HA-Alg700.

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

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

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

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

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

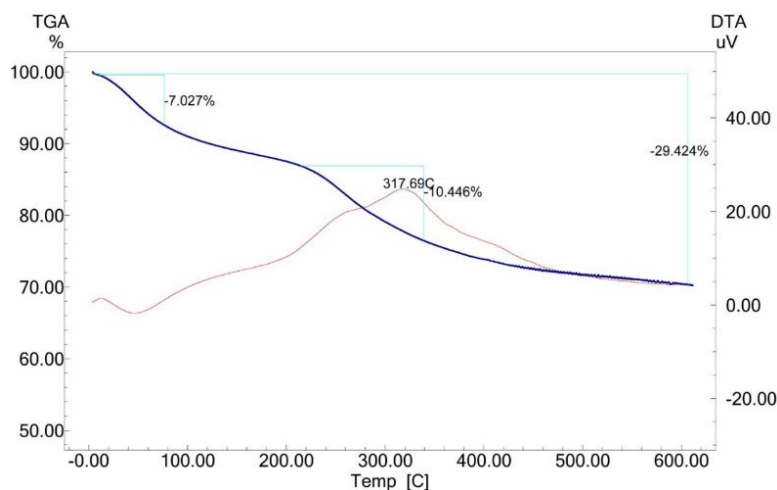


Рисунок 3.4 – Результат TGA/DTA аналізу зразків НА-Alg.

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

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

Таблиця 3.3 – Ступінь набрякання експериментальних зразків.

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

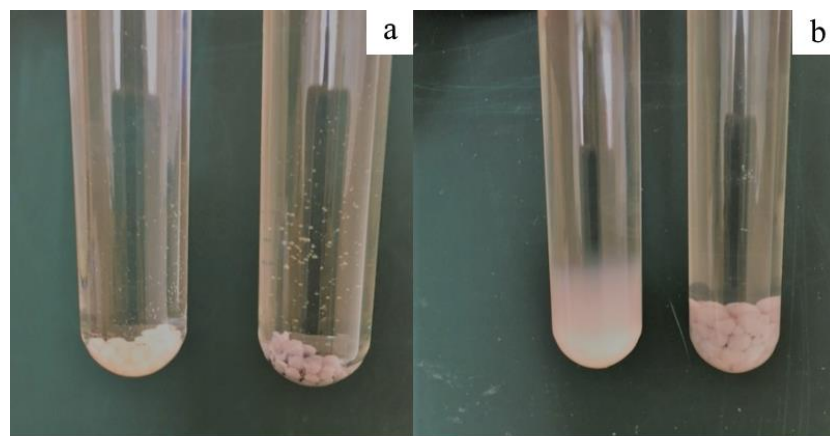


Рисунок 3.5 – Зовнішній вигляд зразків HA-Alg (ліві пробірки) та HA-Alg/MWCNT + Fe (праві пробірки): а) відразу після експозиції в PBS; б) через 7 днів коливання в шейкері в PBS при 37 °С.

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

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

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

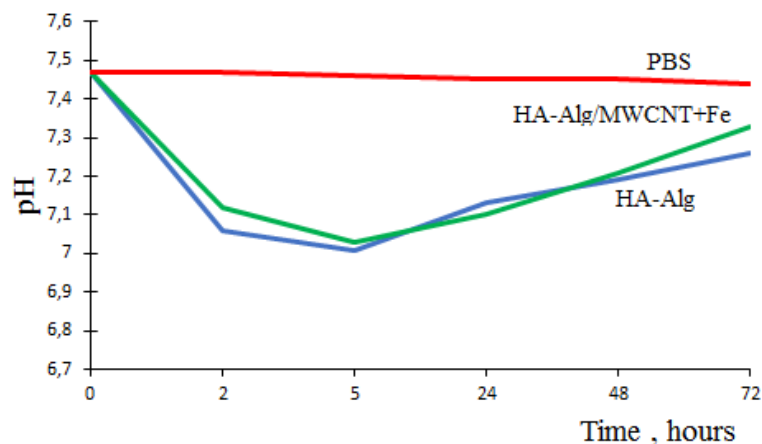


Рисунок 3.6 – Динаміка зміни значень рН внаслідок занурення зразків у PBS.

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

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

Дослідження динаміки вивільнення лікарського засобу. Для ВЕРХ дослідження були підготовлені зразки, що містять хлоргексидин (СН), як модельний лікарський засіб. СН проявляє протимікробну активність проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, факультативних анаеробів, аеробів і дріжджів [60]. СН був введений у композити методом насичення. Для цього 0,2г кожного зразка (НА-Alg і НА-Alg/MWCNT+Fe) занурювали в 4 мл розчину СН протягом 60 хвилин, після чого сушили при 37°C. Для того, щоб оцінити кінетику вивільнення СН, кожен препарат, що міститься у зразку, був поміщений у пробірку з 15 мл PBS. Пробірки зі зразками знаходились у шейкері (115 об/хв, температура 37°C) протягом 120 год. Кількість вивільненого СН визначали методом високоефективної рідинної хроматографії відносно часу інкубації (рис. 3.7)

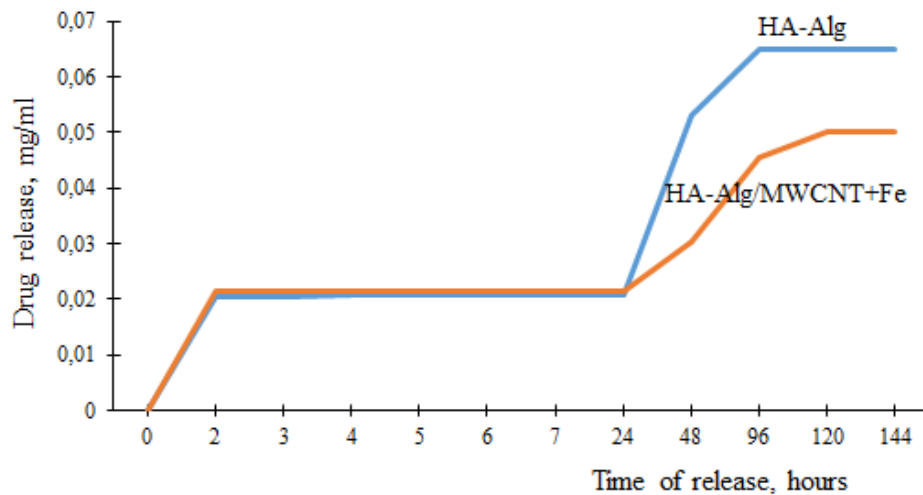


Рисунок 3.7 – Кінетика вивільнення СН гранул HA-Alg та HA-Alg/MWCNT+Fe.

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

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

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

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

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

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

Таблиця 3.4 – Механічні властивості композитів на основі НА.

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

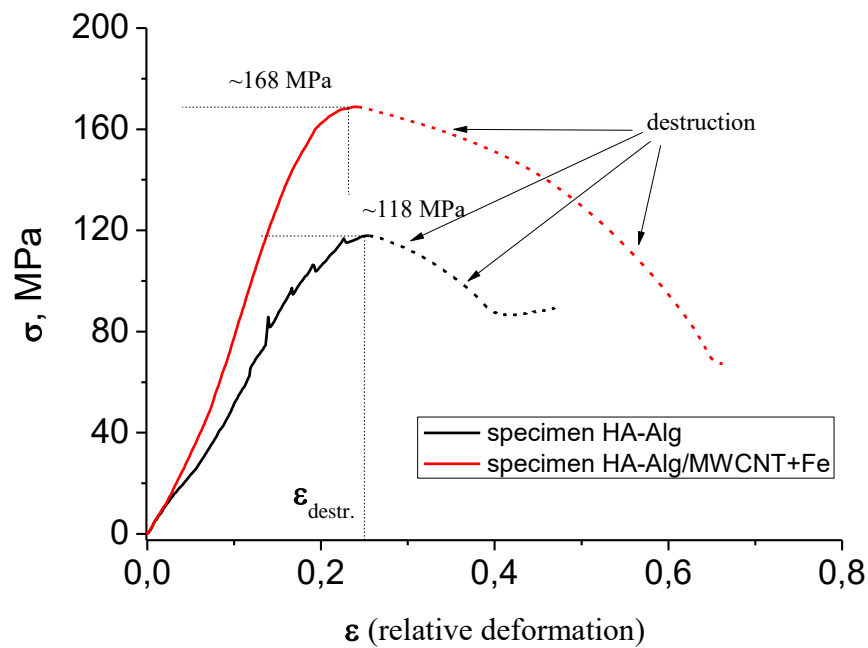


Рисунок 3.8 – Міцність σ_c для HA-Alg та HA-Alg/MWCNT+Fe зразків, виміряна за їх одноосного стискування.

Висновок:

Синтезований новий полімер-апатитний композиційний матеріал з вмістом багатостінних вуглецевих нанотрубок, легованих іонами заліза на основі поліелектролітної реакції між функціональними групами Alg, HA та MWCNT + Fe. Введення MWCNT + Fe до складу композиту сприяє тривалому збереженню структурної цілісності гранул в умовах постійного коливання в фізіологічному розчині в шейкері (rpm 80) при 37°C. MWCNT + Fe пролонгують на 24 години вивільнення хлоргексидину із структури композиту в порівнянні з HA-Alg, що пов'язано з особливостями механізму взаємодії поверхні MWCNT + Fe з хлоргексидином. Підвищення міцності композитів HA-Alg/MWCNT+Fe в порівнянні з HA-Alg пояснюється зв'язуванням наночастинок MWCNT + Fe з матрицею HA-Alg, що призводить до ефективного перенесення навантаження на MWCNT+Fe. Композитний матеріал відкриває можливість його використання в біоінженерії кісткової тканини для заповнення кісткових дефектів різної геометрії з функцією

тривалого вивільнення препарату. Потенційно матеріал може бути використаний при 3D моделюванні ділянок кісткової тканини, які несуть механічне навантаження.

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

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

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

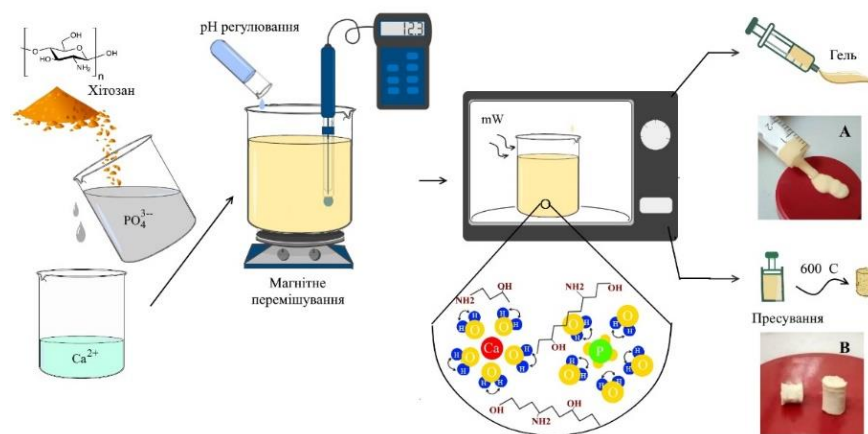


Рисунок 3.9 – Схема формування композитного матеріалу.

Висновок:

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

4 ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКТИВНОСТІ В МОДЕЛЬНИХ РЕАКЦІЯХ IN VITRO. ВПЛИВ ФОРМИ ТА СКЛАДУ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ НА З ВМІСТОМ ІОНІВ Ag^+ , МАГНЕТИТУ Fe_3O_4 , ЦИНКУ ОКСИДУ ZnO НА ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ І БІОСУМІСНІСТЬ

Модифікація композитних матеріалів неорганічними біоактивними іонами є одним з сучасних підходів в медичному матеріалознавстві. Мікроелементи в організмі людини, присутні в мізерних кількостях (“trace elements”) відіграють суттєву роль в регуляції клітинних функцій, активують чи пригнічують ферментативні процеси [66]. Крім метаболічних функцій, деякі, наприклад іони або наночастинки срібла, володіють ще й протимікробними властивостями [67,68]. Одним з елементів є Zn , який бере участь в біосинтезі білків, стимулює адгезію і проліферацію остеобластів, а також формування кісткової тканини [69]. В ряді досліджень встановлено, що Zn та його оксид ефективно пригнічують ріст і розвиток бактерій та грибів [70–72]. Наноструктурований магнетит Fe_3O_4 є перспективним матеріалом, завдяки можливості його застосування в медичній практиці для адресної доставки лікарських засобів, а також для діагностики та лікування внаслідок гіпертермічної дії на клітини пухлин [73,74].

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

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

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

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

Отримання гідрогелю НА з вмістом іонів срібла (зразок НА $_{Ag^+}$ Gel).

На першому етапі синтезу до 15,7г нітрату кальцію було додано 4,0 г нітрату срібла. В подальшому синтез був проведений згідно вище описаної технології. Отриманий продукт в подальшому буде розглянутий як зразок НА $_{Ag^+}$ Gel

Отримання гідрогелю НА з вмістом оксиду цинку (зразок НА $_{ZnO}$ Gel). До 10 г гідрогелю НА , було дисперговано 2,5 г порошку оксиду цинка, попередньо отриманого за відомою технологією [75]. Суміш була гомогенізована ультразвуком протягом 5 хвилин. Таким чином, вміст активної речовини (ZnO) в композиті склав 25 вагових %. В подальшому композит буде розглянутий, як зразок НА $_{ZnO}$ Gel.

Отримання гідрогелю НА з вмістом магнетиту (зразок НА $_{Fe_3O_4}$ Gel). До 10 г гідрогелю НА було дисперговано 2,5 г порошку магнетиту, попередньо синтезованого за відомою в літературі технологією [76]. Суміш була гомогенізована ультразвуком протягом 5 хвилин. Таким чином, вміст активної речовини (Fe_3O_4) в композиті склав 25 вагових %. В подальшому композит буде розглянутий як зразок НА $_{Fe_3O_4}$ Gel.

Отримання композитних матеріалів в формі гранул. До кожного з отриманих гідрогелей був доданий 2% альгінат натрію в ваговому співвідношенні 1:1, після чого суспензія була ретельно гомогенізована під дією ультразвука. Отримана суспензія була диспергована в 0,25 М розчині хлористого кальцію. Через 24 години утворені геометрично правильні кульки (гранули) були промиті дистильованою водою та висушені при температурі 37 °С. Розмір висушених гранул складає 2-2,5 мм. В подальшому зразки будуть названі наступним чином: гранули чистого гідроксиapatиту - НА $_{Gr}$; гранули гідроксиapatиту з вмістом іонів срібла - НА $_{Ag^+}$ Gr; гранули гідроксиapatиту з вмістом оксиду цинку - НА $_{ZnO}$ Gr; гранули гідроксиapatиту з вмістом магнетиту - НА $_{Fe_3O_4}$ Gr.

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

Цитотоксичність матеріалів оцінювали за ефективністю прикріплення до нього клітин.

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

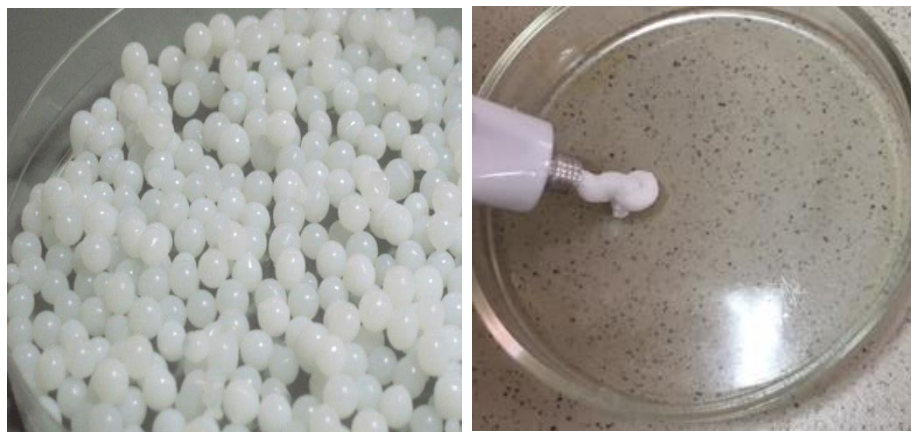


Рисунок 4.1 – Зліва- зразок НА _Gr в вологому стані; справа – зразок НА _Gel.

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

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

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

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

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

Структурна організація клітин свідчила про їх належність до молодих фібробластів. Відсоток загиблих клітин в контрольній культурі склав 3,5%, в дослідних культурах коливався в межах від 4,1% до 5,7% в разі гідрогелів і від 7,2 до 10,1% в разі гранульованих матеріалів. Встановлена кількість загиблих клітин в дослідних і контрольному зразках знаходиться в межах норми для первинних культур [68]. На 5-у добу культивування остеобластів і фібробластів зі зразками досліджуваних матеріалів відзначалося достовірне

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

За даними аналізу, кількість загиблих клітин в контрольній культурі склала 6,1%, а в дослідних культурах коливалася в межах від 5,1-5,9% (в разі гідрогелів), від 9,9% до 12,9% (в разі гранул), що не перевищує допустимих меж для первинних культур. Звертає на себе увагу той факт, що найбільша кількість загиблих клітин (12,9%) було зафіксовано для зразка з магнетитом НА Fe_3O_4 Gr. Приріст клітин за період від 3 до 5 діб для цього зразка також найменший і складає 57,3%, в той час, як інші зразки з групи гранульованих мають приріст клітин від 63,5% до 67,3%. У групі гідрогелей приріст клітин за 2 доби близький до контролю, за винятком зразка НА Ag^+ Gel, для якого цей показник становить 51,5%.

Експериментальні дані показують, що поведінка остеобластів і фібробластів залежить від структури зразка і змінюється при переході від гелів до гранул. Так, в разі гелів характерно менша кількість загиблих клітин, але і менший ступінь їх проліферації в період від 3 до 5 діб перебування в контакті із зразками. У разі зразків у формі гранул збільшується кількість загиблих клітин, але їх проліферація трохи вища в порівнянні з гелями. Даний факт можна пояснити наступним: гідрогелі мають більш розвинену поверхню НА, що передбачає більш високий рівень контакту частинок гідроксиапатиту і клітин. Отже, НА сприяє виживанню клітин. У разі гранульованих зразків, контакт клітин з НА відбувається тільки на поверхні гранул, що зменшує ступінь виживання. З іншого боку, на поверхні гранул розташовані макромолекули альгінату натрію, який, як відомо, є живильним середовищем для проліферації клітин. Тому спостерігається більш високий приріст клітин протягом 2 діб, що є підтвердженням цієї гіпотези. Очевидно, що іони Ag^+ і частинки неорганічного походження (ZnO , Fe_3O_4) також впливають на поведінку фібробластів. Однак, концентрації цих іонів і

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

Висновок:

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

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

5.1 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).

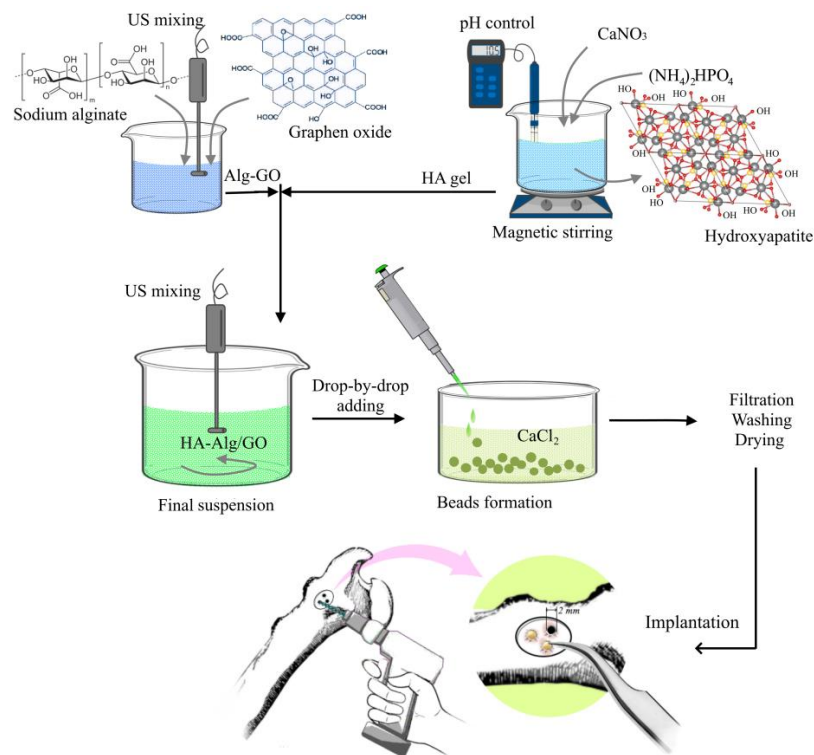


Рисунок 5.1 – Приготування композицій HA-Alg, з вмістом GO.

Технологічна схема отримання гранул показана на рис. 5.1 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 [77]. 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 [78] 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. 5.2 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.

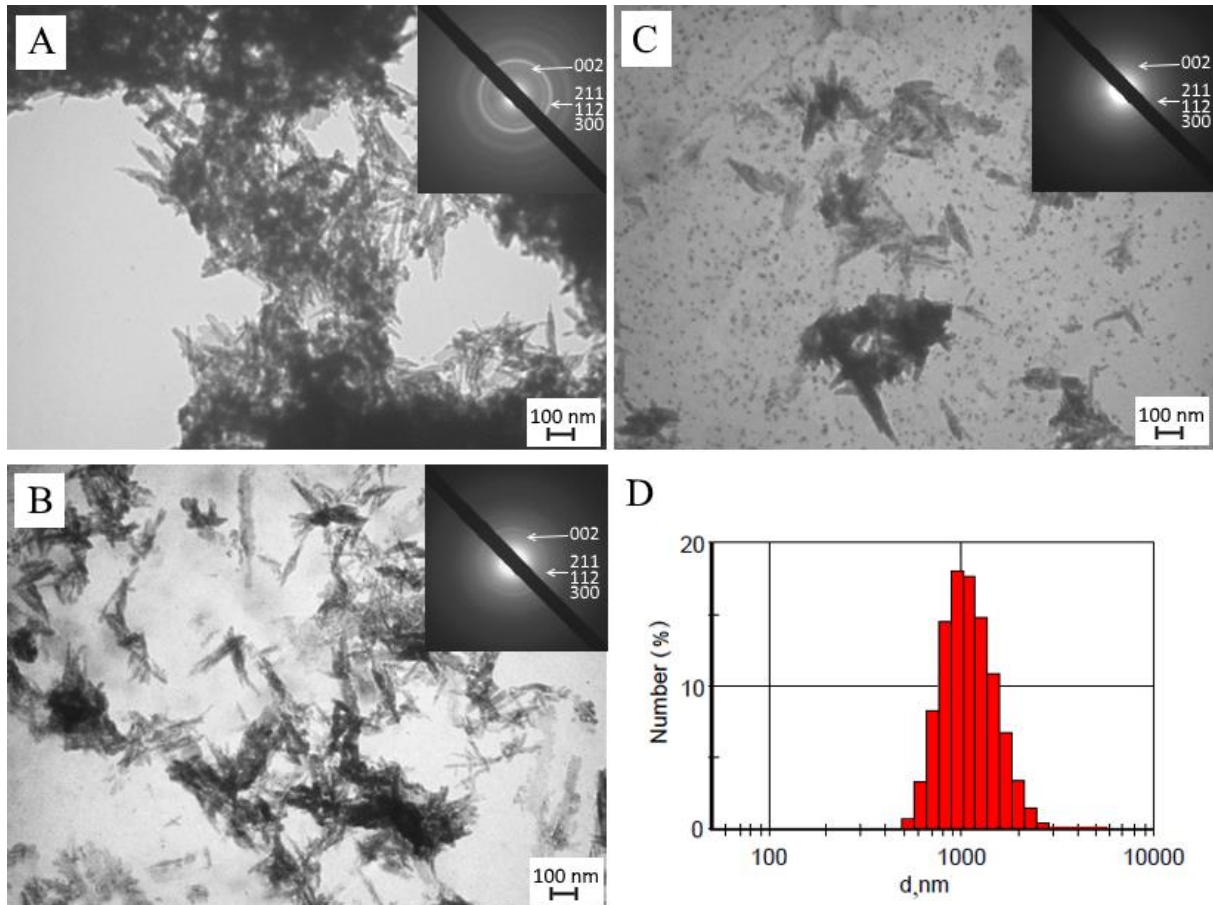


Рисунок 5.2 – ТЕМ-зображення та ЕД-спектри експериментальних зразків: А) HA-Alg; В) HA-Alg-GO; С) HA-Alg-GO10; D) результати розподілу GO у водному розчині (0,15 мг/мл)

XRD дослідження. На рис. 5.3 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 cm^{-1} [79]. Продукти мають низьку кристалічність, що характерно для сирого (термічно необробленого) НА. Середній розмір кристаліту для піків дифракції (002) становить приблизно 30 нм.

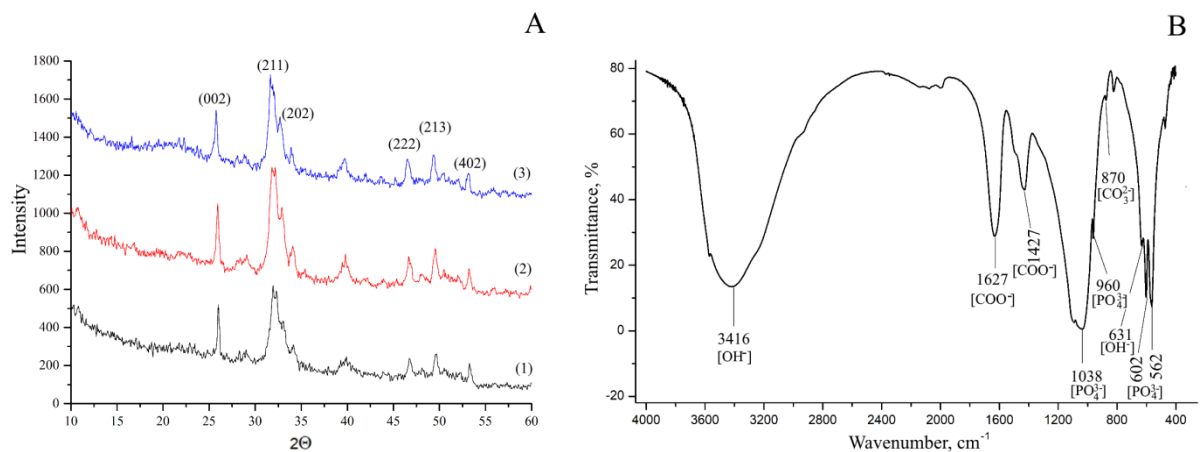


Рисунок 5.3 – А) Рентгенограми експериментальних зразків: НА-Alg (1), НА-Alg-GO (2) та НА-Alg-10GO (3); В) Спектр FTIR зразка НА-Alg

Дослідження FTIR. Характерні ІЧ-смуги для зразка НА-Alg показані на рис.5.3В. Дані FTIR для всіх експериментальних зразків показують основні вібраційні смуги, що належать до НА. Є смуги 3574 та 631 cm^{-1} гідроксильної групи (ОН) [80]. Смуги з піками при 1038 , 960 , 602 та 562 cm^{-1} відповідають вібраціям груп PO_4^{3-} у НА [50]. Alg представляє дві характерні смуги поглинання приблизно 1626 та 1422 cm^{-1} , що відповідають асиметричним та симетричним коливанням розтягування COO - груп відповідно [50]. 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. 5.4В). 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. 5.4 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.

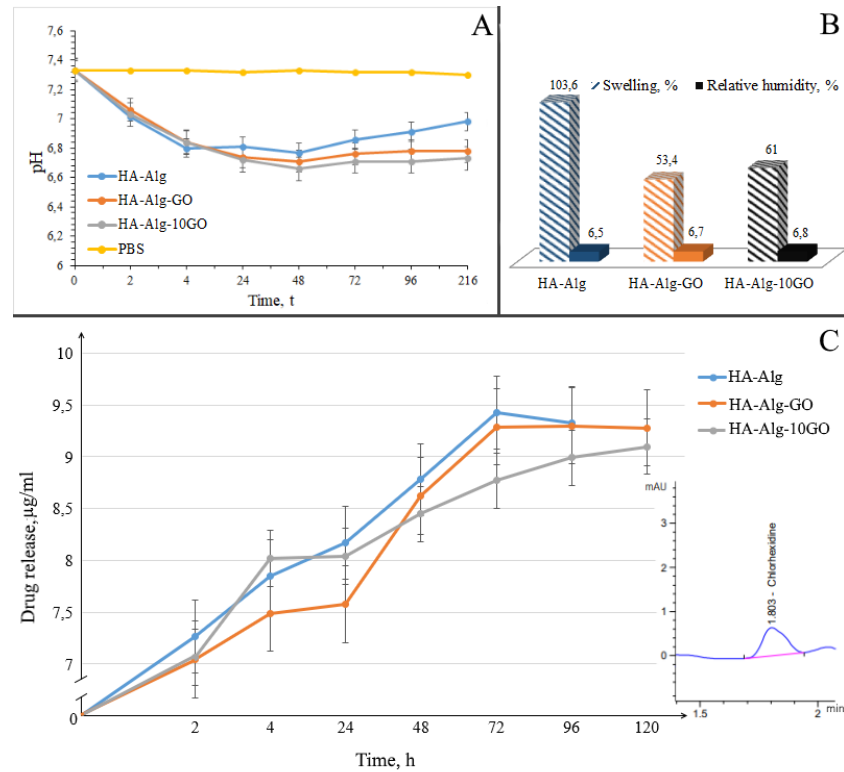


Рисунок 5.4 – А) Вплив композитів на значення рН SBF; Б) ступінь набрякання композитів і відносна вологість; С) Концентрація вивільненої протягом 120 год СН з експериментальних зразків (мкг/мл). Примітка: $p \leq 0,05$

Дослідження ВЕРХ. Кінетика вивільнення лікарських засобів з експериментальних зразків представлена на рис. 5.4 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. 5.4 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 HA-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.

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

Дослідження міцності на стиск. Результати дослідження міцності на стиск для експериментальних композитів представлені на Рис. 5.5.

Як видно з рис.5.5 А, додавання GO в HA-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) [81]. Таким чином, підвищення міцності для зразків, що містять GO, можна пояснити також скріпленням частинок GO з матрицею HA-Alg, що призводить до ефективного перенесення напруги на GO.

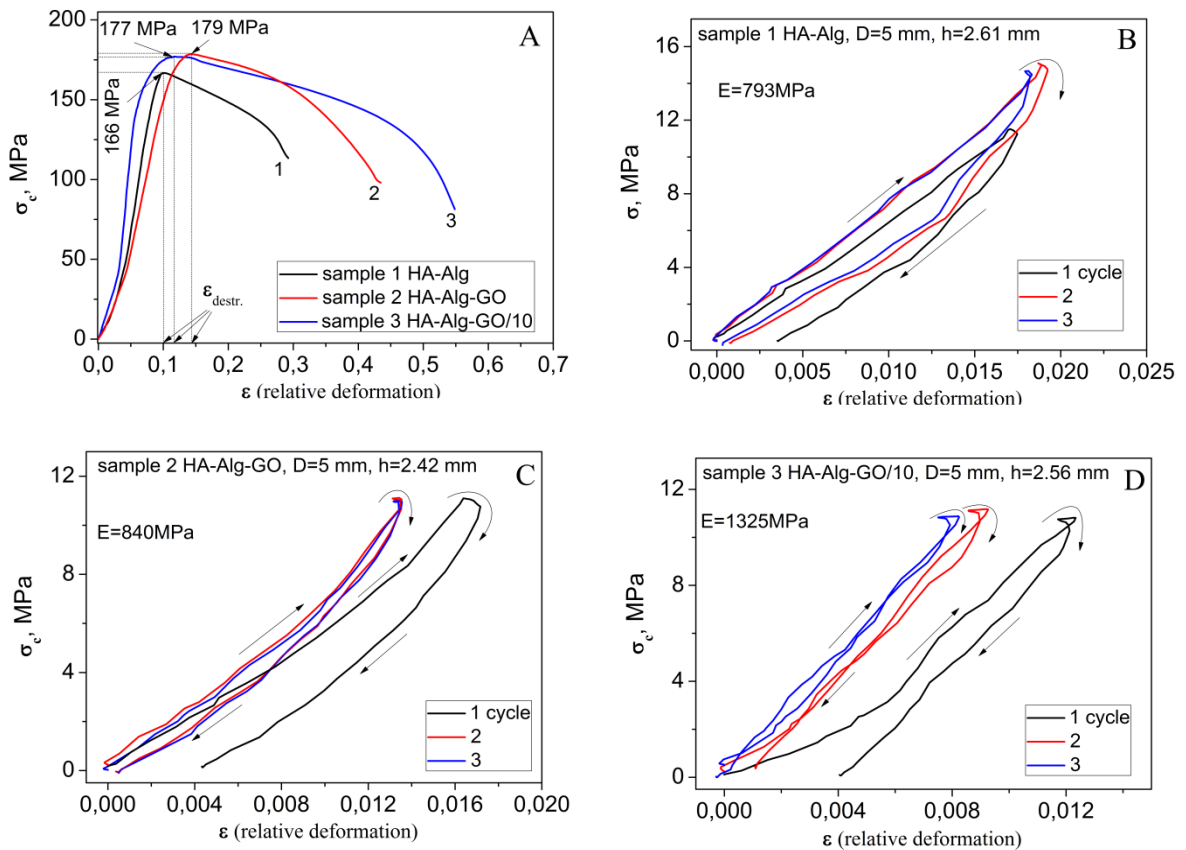


Рисунок 5.5 – А. Міцність на стиск експериментальних гранул, виміряна при одноосному стисненні. В, С, D Діаграми «навантажувально-розвантажувальних робіт» гранул HA-Alg, HA-Alg-GO та HA-Alg-10GO, виміряні при одноосному стисканні протягом трьох циклів навантаження відповідно

На рис. 5.5 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 [82].

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.5.6 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 виростали всередину шаром біоматеріалу, оточеного фрагментами гнилого імпантованого матеріалу.

Прямо прилеглі до області дефекту фрагменти кори кістки були тісно зрощені з новоствореною кістковою тканиною (рис. 5.6 В). На кісткових трабекулах спостерігали високу щільність остеоцитів.

Новостворена кісткова тканина оточувала фрагменти біоматеріалу. Утворення сполучних шарів не спостерігалося (рис. 5.6 С). Ніяких ознак запальної реакції в кістковому мозку або в місцях дефекту не спостерігалося. 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 остеointegratивність, про що свідчить відсутність руйнування та запалення.

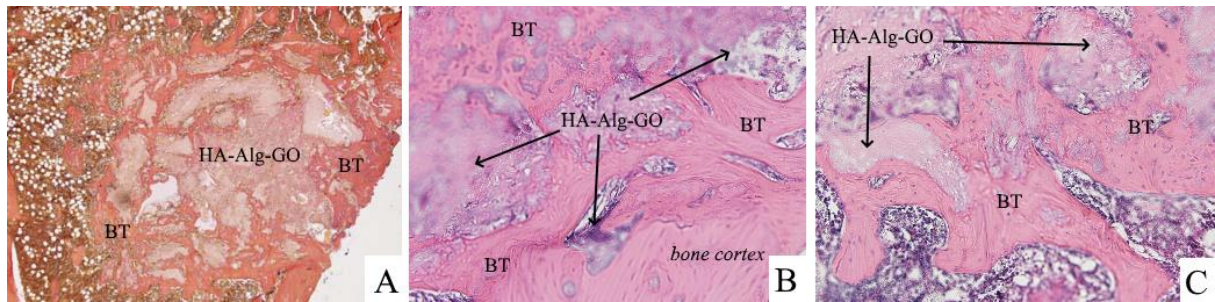


Рисунок 5.6 – А) Дефектна зона заповнена композиційним матеріалом HA-Alg-GO з розташованими кістковими трабекулами (BT); Б) композитні матеріали HA-Alg-GO оточені кістковою тканиною (BT); В) Новоутворена кісткова тканина (BT) навколо фрагментів складеного матеріалу. Аналіз проводили на 30-й день після імплантації. Збільшення $\times 200$

Висновок:

Були синтезовані гранули HA-Alg, з вмістом GO. Утворення при опроміненні MW кальцій-дефіцитного HA ($\text{Ca/P} = 1,65$) 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/см^3 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 остеоінтегративність, відсутність руйнування кісткової тканини та запалення.

5.2 Композитний матеріал на основі гідроксиapatиту, 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. 5.7).

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°С 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.

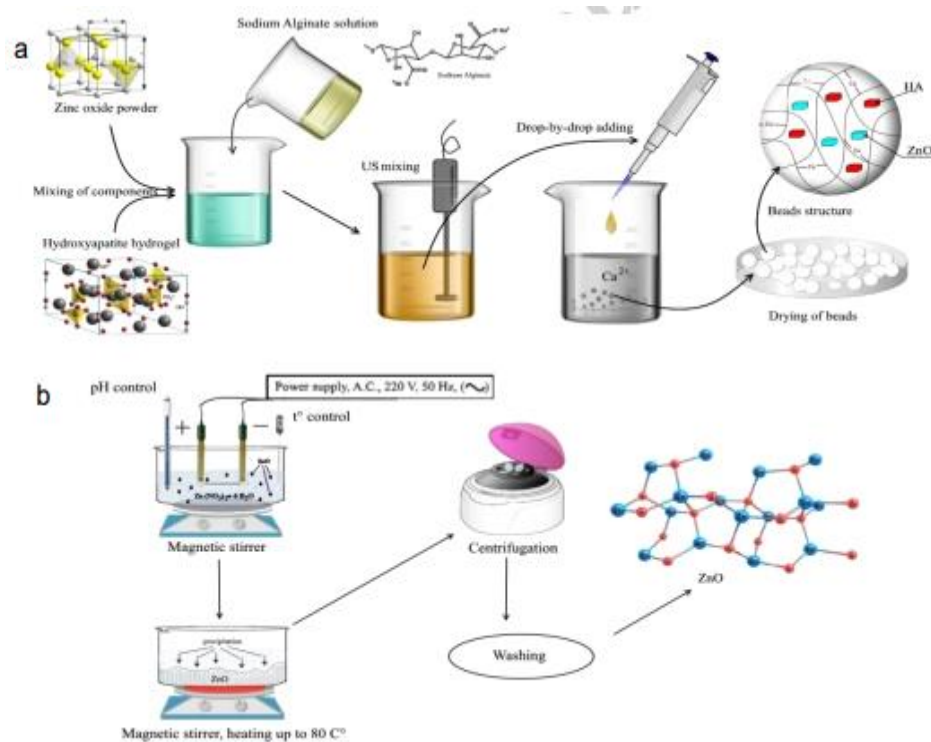


Рисунок 5.7 – Схема виготовлення композиційного полімерно-апатитового матеріалу у вигляді намистин, легованих наноструктурованими частинками ZnO (a) та частинками ZnO (b)

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. 5.8.

TEM дослідження. Морфологію синтезованих зразків досліджували за допомогою TEM, див. рис. 5.9.

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

Аналіз частинок ZnO за допомогою TEM показує, що нанокристаліти ZnO (до 50 нм) представлені включеннями кубічної структури (рис. 5.9а) з параметрами решітки $a = 0,427$ нм і переважно шестикутною структурою

(рис. 5.9b) з параметрами решітки $a = 0,32427$ нм, $b = 0,32427$ нм і $c = 0,51499$ нм.

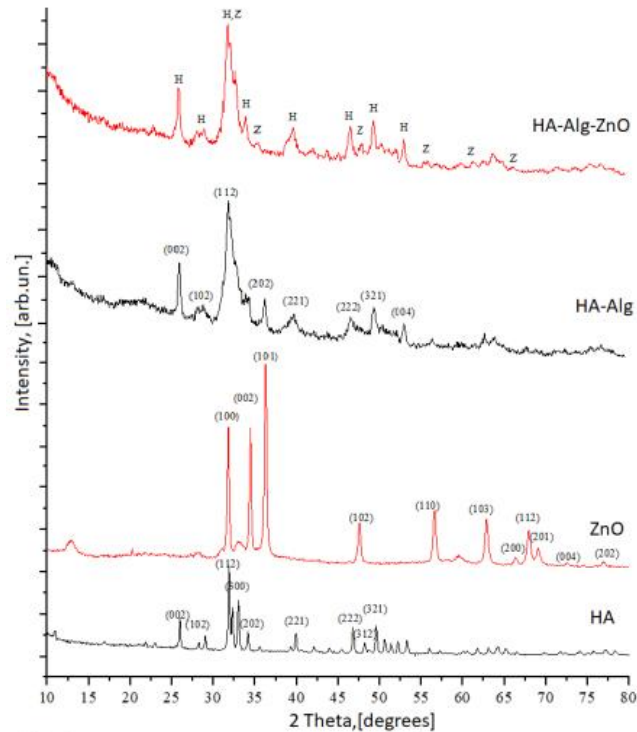


Рисунок 5.8 – Рентгенівські дифрактограми від зразків композиційних матеріалів та їх компонентів: ZnO та HA, виготовлених під впливом MW та відпалених при 900 °С; HA-Alg та HA-Alg-ZnO. Основні піки позначені індексами Міллера, а також літерами: H - гідроксиапатит, Z – ZnO

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 °С. 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. 5.9).

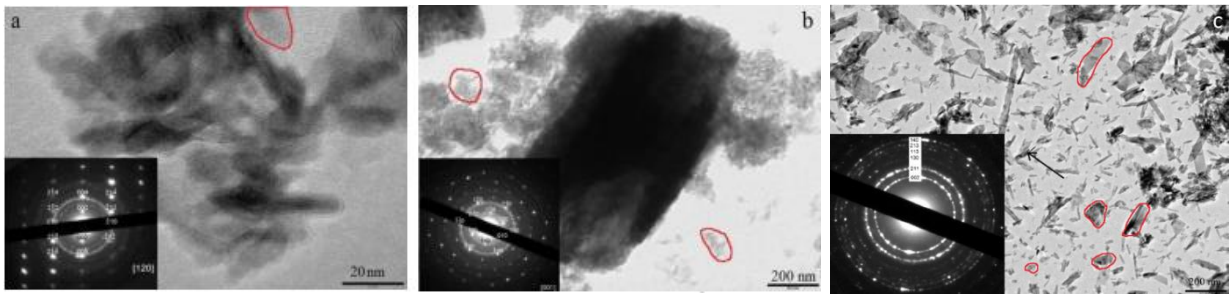


Рисунок 5.9 – TEM-зображення кристалітів та електронно-дифракційних моделей ZnO з помітними наногранулами: з кубічною решіткою (шкала 20 нм) (а), з шестикутною решіткою (шкала 200 нм) (б); НА із помітними наногранулами та дифракційними кільцями (с)

FTIR-спектроскопія. FTIR-спектроскопія була використана для досліджень взаємодії функціональних груп компонентів у зразках НА-ZnO та НА-Alg-ZnO (рис.5.10).

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 [83]. Діапазон з піком у 1026 см^{-1} відноситься до асиметричних ν_3 коливань Р-О [84]. 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 [85]. Діапазон близько 1640 см^{-1} пов'язаний з коливаннями зв'язків Н-О-Н в адсорбованих молекулах води [46]. Смуги з піками при 3734 см^{-1} належать до поверхневих гідроксильних груп, а також до адсорбованих молекул води [86]. 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. 5.10в). З'явилися специфічні для альгінату коливання: піки 3435 см^{-1} та $2987,5\text{--}2901,2\text{ см}^{-1}$ відносять до коливань вільних та зв'язаних з воднем ОН- груп у карбонових кислотах відповідно [48]. Пік при 1615 см^{-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 OH -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 OH 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 H -зв'язок або інше з'єднання під час утворення композиту HA-Alg-ZnO .

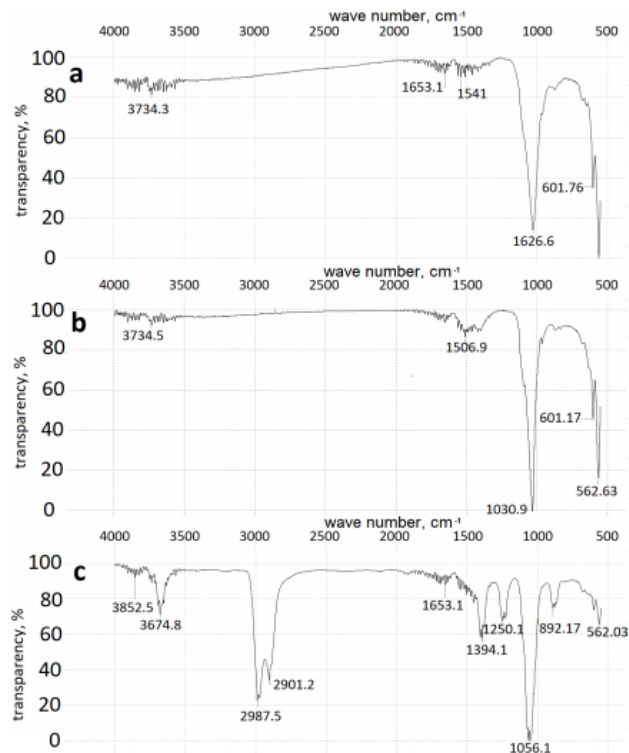


Рисунок 5.10 – FTIR спектри синтезованих зразків: HA (крива a), HA-ZnO (крива b) та HA-Alg-ZnO (крива c)

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 НА-Alg та НА-Alg-ZnO гранул, час витримки яких у розчині CaCl₂ становив 25 хвилин (рис. 5.11а) та 18 годин (рис. 5.11б). 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 НА-Alg становить 5-15%, тоді як пористість НА-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.

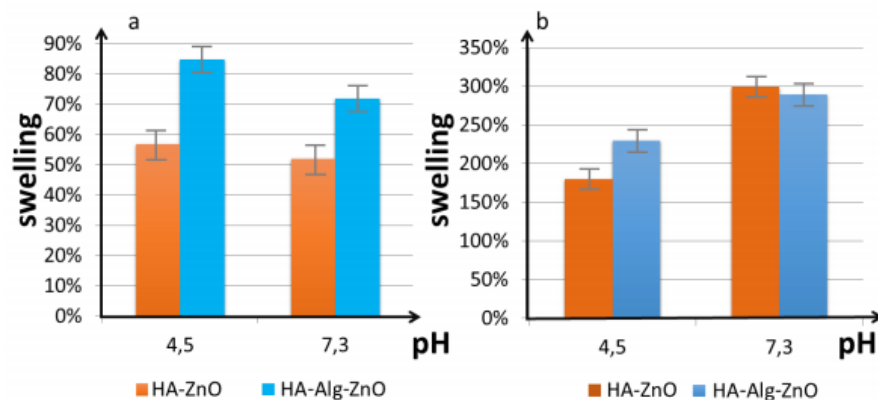


Рисунок 5.11 – Ступінь набрякання (в %) гранул НА-Alg та НА-Alg-ZnO з часом витримки в CaCl₂: 25 хвилин (а) та 18 годин (б)

Антимікробна активність. Дослідження антимікробної активності матеріалу НА-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. 5.12.

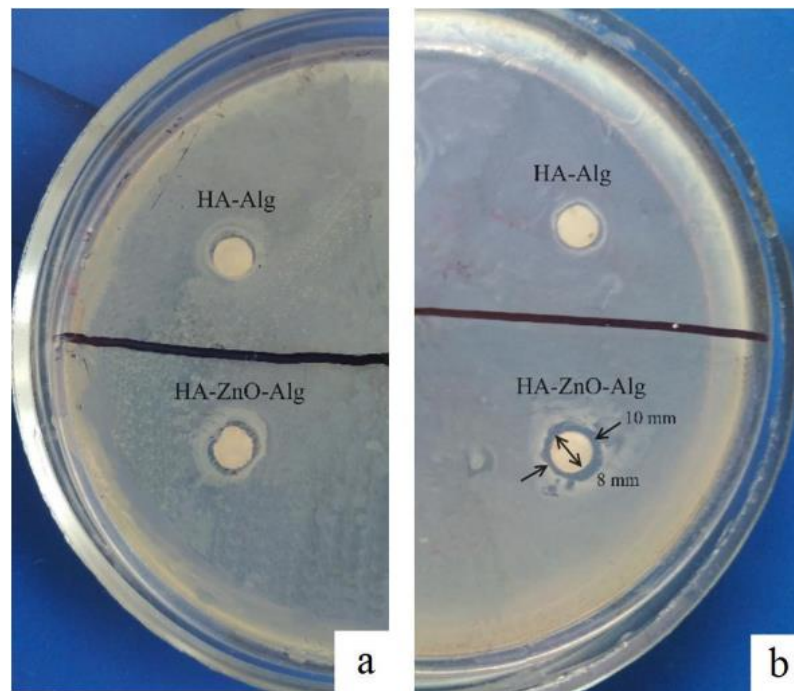


Рисунок 5.12 – Тест антибактеріальної активності HA-Alg (контроль) та HA-Alg-ZnO щодо *S.aureus* ATCC 25923 (a) та *E. coli* ATCC 25922 (b)

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 [48,87], 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 5.1.

Таблиця 5.1 – 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±1

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 [87].

Висновки:

Дослідження XRD та EDS показали утворення гідроксиапатиту з відношенням мас $\text{Ca/P} = 2,15$, 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 $\text{pH} = 7,3$, ніж у кислому середовищі при $\text{pH} = 4,5$. Зазначена концентрація ZnO в композитному матеріалі на основі НА забезпечує слабку антимікробну активність.

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

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

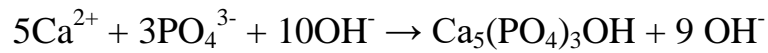
Технологія TSD заснована на залежності розчинності CaP від температури. Нагріваючи субстрат у насиченому водному розчині, можна отримати твердий осад безпосередньо на поверхні субстрату. Фазовий склад покриття змінюється залежно від рН, температури та іонної концентрації компонентів реакційної суміші [88]. 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/Al₃O₃ 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 рН 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. 6.1 показано SEM зображення механічно відполірованої поверхні титанової підкладки (А) та підкладки, обробленої методом ПЕО (В).

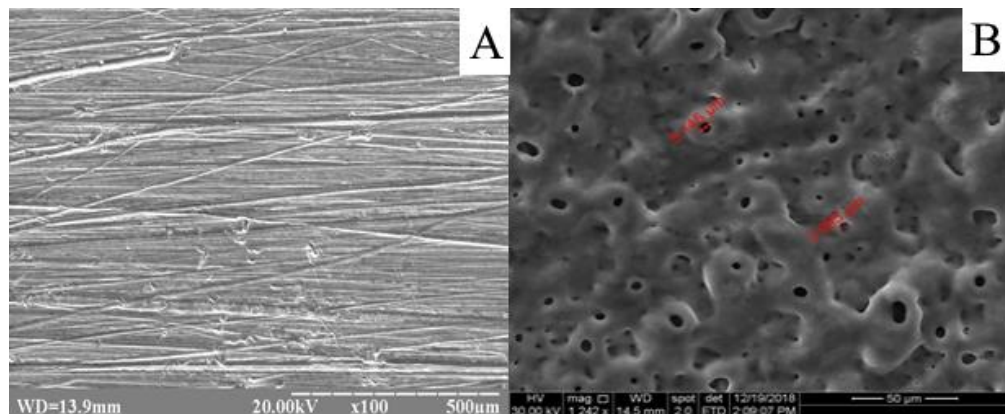


Рисунок 6.1 – Морфологія поверхні субстратів Ti6Al4V: (А) - до обробки ПЕО; (В) - після ПЕО

Поверхня Ti6Al4V субстрату перед обробкою ПЕО типова для вихідного матеріалу (рис. 6.1А). Пори на оброблюваній поверхні (рис. 6.1В) є типовими для ПЕО і утворювалися під час явищ мікророзряду внаслідок високої напруги та виділення кисню під час процесу ПЕО [89]. 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 [90]. 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 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 HA через їх привабливу біологічну реакцію на середовища *in vivo*. Іонні продукти (K_{ip}) цих двох сполук такі:

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

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. 6.2 показані зображення покриттів HA (A, B) та DCPD (D, E). Покриття HA 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. 6.2 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.

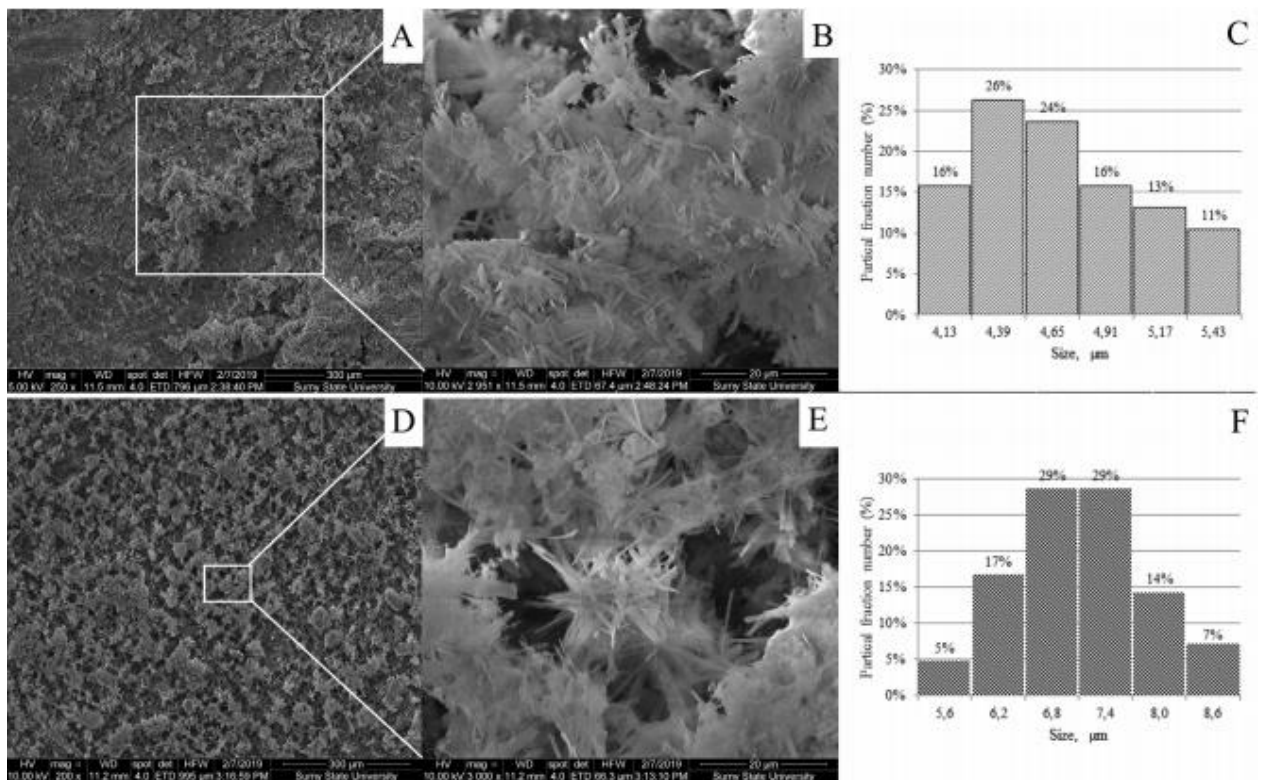


Рисунок 6.2 – SEM зображення (при різних збільшеннях) субстратів Тi6Al4V, оброблених за ПЕО методом, покритих НА (А, В) та DCPD (D, E).

Гістограми розподілу розмірів частинок НА (С) та DCPD (F)

Зображення XRD експериментальних зразків та їх фазовий склад щодо вибраних елементів наведені на рис. 6.3.

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

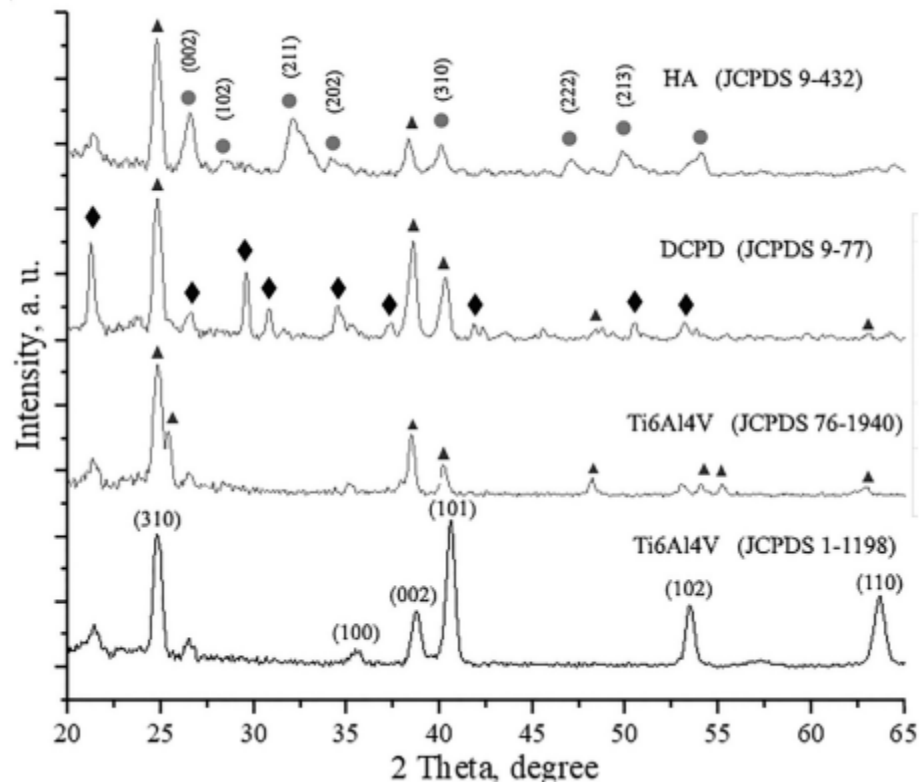


Рисунок 6.3 – Спектри XRD експериментальних зразків: чистий Ti6Al4V субстрат; оброблений ПЕО Ti6Al4V субстрат; покриття DCPD і НА на Ti6Al4V субстраті. Титанові піки позначені індексами Міллера; TiO_2 (рутил) - ▲; DCPD - ◆; НА - ●

Середні розміри кристалітів (L) в напрямку [002] для НА та в напрямку [040] для DCPD були оцінені за відповідним розширенням піку за рівнянням Шеррера [37]. Розрахунок параметрів структури кристалічної клітини НА показав незначні відхилення параметрів a і c (табл. 6.1) порівняно з відповідними значеннями для стехіометричного НА ($a = 0,942$ нм; $c = 0,688$ нм). Згідно з даними XRF, атомне співвідношення Ca/P у отриманому НА

становило 1,64, тоді як для стехіометричного НА це відношення становить 1,67 (рис. 6.3). Отримані дані вказують на утворення кальцій дефіцитного НА з малим вмістом карбонатної фази.

Таблиця 6.1 – Параметри кристалічної структури покриттів DCPD та НА.

Зразок	Розмір кристалітів для піка (002)	Параметри кристалічної решітки, нм			
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	$\epsilon, 10^3$
НА	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 адсорбувались НА 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 [91]. 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 НА. Мікродеформації (ϵ) для НА є суттєво меншими, ніж для DCPD.

Висновки:

Метод TSD був застосований для нанесення монофазних CaP покриттів, а саме НА 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 НА (Ca/P = 1,64) і збільшення 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.

6.2 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 НА, контролюють його кристалічність та структуру [92]. Враховуючи серйозну небезпеку бактерій для здоров'я, багато неорганічних матеріалів було розроблено як антибактеріальні засоби для знищення бактерій, такі як 2D наноматеріали MoS_2 [93], оксид графену [94,95], нітрид вуглецю, а також матеріали на основі Ag [96,97]. Серед них іони Zn та оксид цинку (ZnO) є перспективними кандидатами для вирішення проблеми, оскільки вони володіють більшою міцністю, стабільністю та селективністю, меншою токсичністю [98].

У літературі також описані способи нанесення покриття ZnO: осадження металоорганічних хімічних парів та термічне випаровування [98], мокрий хімічний метод [99], імпульсне лазерне осадження [100], розпилювальний піроліз [101], епітаксіальне електроосадження, радіочастотне магнетронне розпилення [102]. Вибір методу синтезу визначає фізико-хімічні характеристики наночастинок оксиду металу, такі як розмір, дисперсність, тип внутрішніх дефектів, морфологію та структуру кристалів [103].

У свою чергу, вищезазначені фактори впливають на антимікробну 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 [104]. Наноструктури ZnO у формі стрижнів і проводів можуть проникати в клітинні стінки бактерій легше, ніж сферичні [105]. Тоді як наночастинки ZnO у формі квітки виявляють більшу біоцидну активність проти *S.aureus* та *E.coli*, ніж сферичні та стрижнеподібні наноструктури [106].

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 6.1). 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

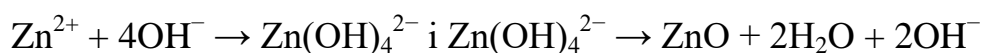
Company Ltd, Китай. Всі компоненти були аналітично чистими і використовувались без подальшого очищення.

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 [107]:



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 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$ 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. 6.4:

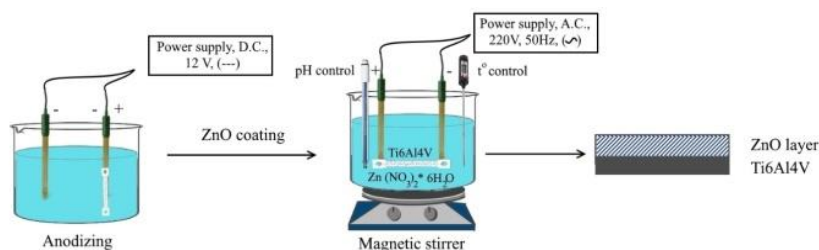


Рисунок 6.4 – Схема нанесення покриття ZnO на анодований Ti6Al4V субстрат за методом TSD

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. 6.5). 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.

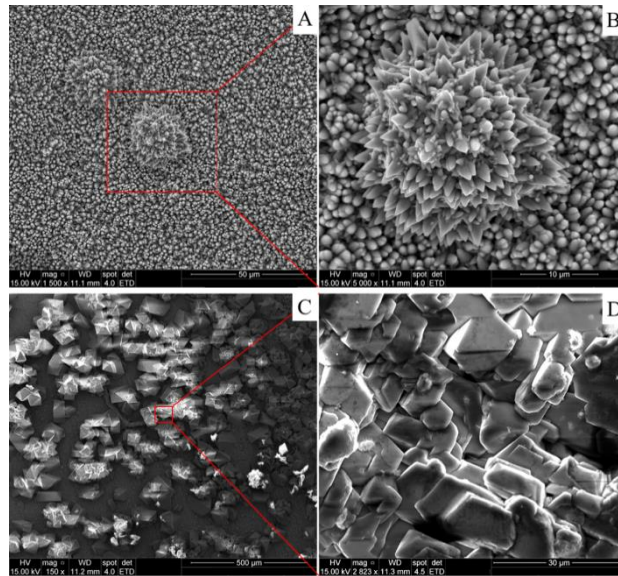


Рисунок 6.5 – Морфологія поверхні покриттів, отриманих TSD методом на титановому субстраті: (A), (B) - ZnO при різних збільшеннях; (C), (D) - ZnO/Alg при різних збільшеннях

Основні піки кристалічних фаз TiO_2 та ZnO на відповідних рентгенівських дифрактограмах від експериментальних зразків позначені індексами Міллера (рис. 6.6). 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.

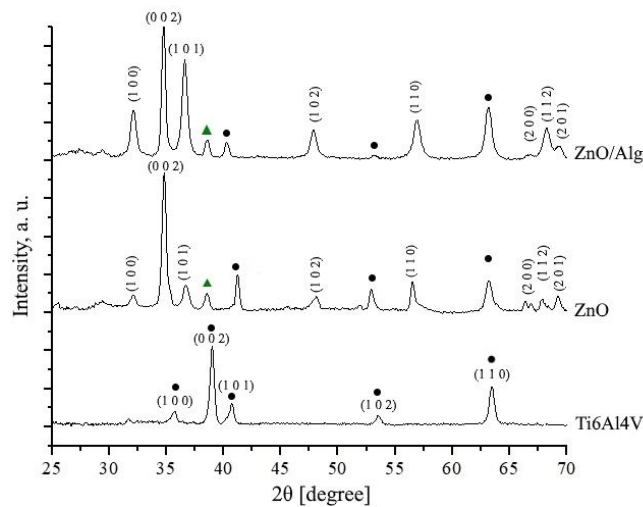


Рисунок 6.6 – Дифракційні структури зразків: анодований титановий субстрат, покриття ZnO та ZnO/Alg, нанесені на титановий субстрат. Піки підкладки TiO_2 позначені ●; піки оксиду титану Ti_3O_5 позначені ▲; піки, що належать ZnO, позначаються індексами Міллера

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 6.2.

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 [108], тому вони створюють контрольовані умови для зростання наночастинок ZnO.

Таблиця 6.2 – Параметри кристалічної ґратки ZnO покриттів на Ti6Al4V субстратах, отриманих методом TSD.

Sample	Value	(100)	(002)	(101)	(110)	L_{WH} , nm ε, 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. 6.3 та рис. 6.7. Зона інгібування росту (у мм) навколо покритих субстратів відображає антимікробний вплив покриття. Чим більша зона гальмування, тим більшою є антимікробна активність.

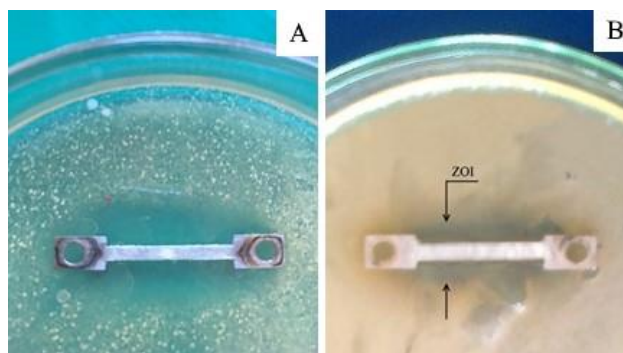


Рисунок 6.7 – Антимікробна активність покриття ZnO/Alg проти (А) *E. coli* ATCC 25922; (В) *S. aureus* ATCC 25923

Таблиця 6.3 – 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 [75,109].

Висновок:

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.

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

7.1 Розробка та дослідження поліелектролітної мембрани на основі природних полімерів та наноструктурованого НА з іммобілізованими 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 [110]. 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 "микрої 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 NH^{3+} 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 [111]. У той же час структура отриманого апатит/полімерного гідрогелю включає наночастинки до 100 нм з характерною реакційною здатністю для таких частинок. Наночастинки іммобілізуються в альгілатній матриці, обмеження розміру пор якої дозволяє їм залишатися нанорозмірними в суспензії протягом тривалого часу до і після сублимації, 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 (MM 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 НА-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 НА-Pol, НА-Pol-100Full, НА-Pol-200Full.

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

Дослідження та обговорення

На рис. 7.1 представлено *SEM* зображення морфології поверхні, типове для фуллерен-вмісного зразку на основі гідроксиапатиту, альгінату та хітозану. Спостерігається багатошарова полімерна структура з вкрапленнями кубічних частинок НА.

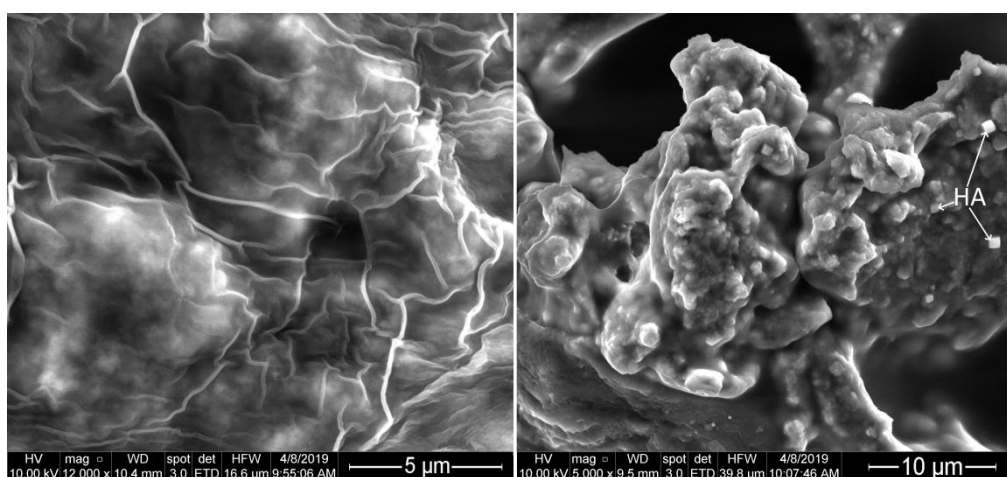


Рисунок 7.1 – Морфологія зразка НА-Pol-100Full при різному збільшенні

Як було зазначено вище, основою експериментальних зразків є НА, рентгенівський дифракційний спектр якого показаний на рис. 7.2. 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.

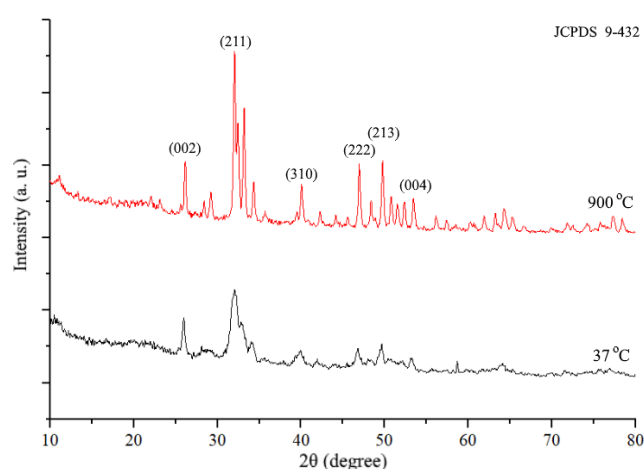


Рисунок 7.2 – Дифрактограми від зразка НА, висушеного при 37 °С і відпаленого при 900 °С

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. 7.3). 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.

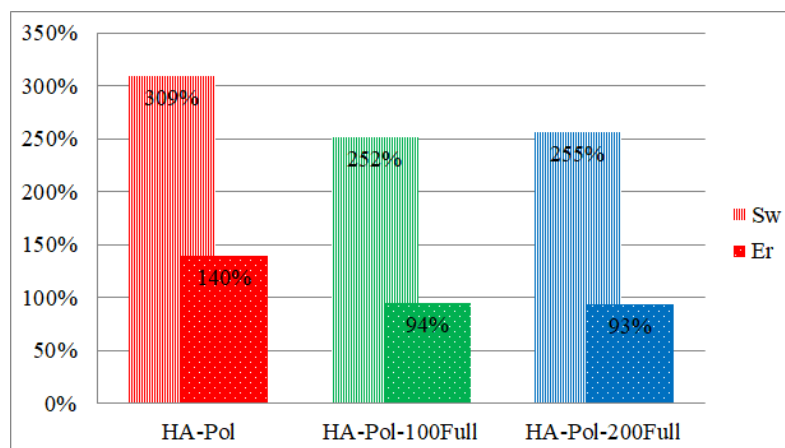


Рисунок 7.3 – Ступінь поглинання (набрякання) (S_w) та здатність утримувати рідину (E_r) композитами HA-Pol, HA-Pol-100Full та HA-Pol-200Full через 1 годину дослідження

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 [112]. Результати (рис. 7.4) 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 [113], 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.

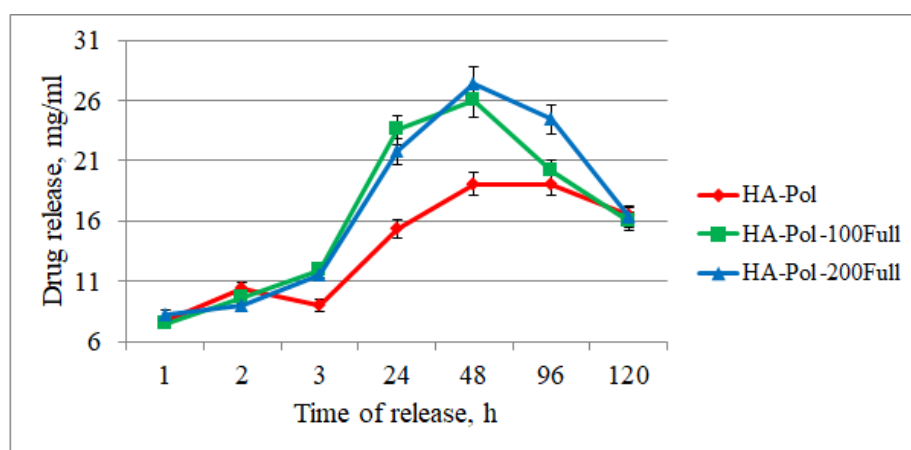


Рисунок 7.4 – Концентрація хлоргексидину в PBS (мкг/мл), що виділяється з експериментальних зразків

Висновок:

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.

7.2 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 [114]. 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 [115].

Матеріали. Були використані наступні матеріали та хімічні речовини: фулерен C₆₀ (водний колоїдний розчин із середнім розміром частинок 50 нм), приготований відповідно до [116,117], 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 вологи 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 ультрачистій 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 вищеписаною 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} [118] і свідчать про утворення карбонатного типу апатиту А типу внаслідок часткової заміни групи PO_4^{3-} на карбонатні іони [54].

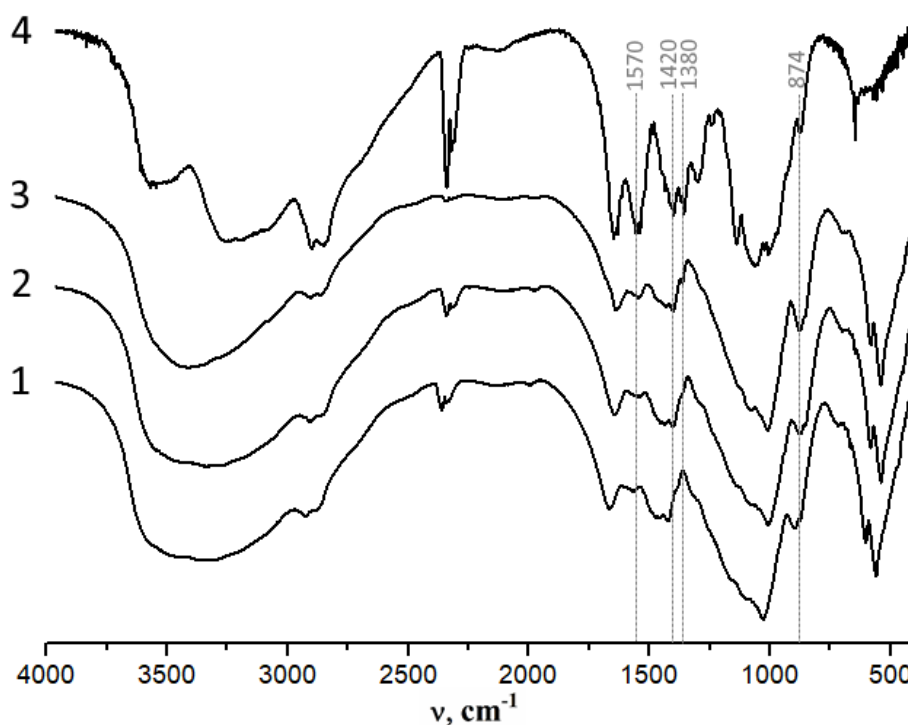


Рисунок 7.5 – Спектри FTIR підготовлених зразків: НА-CS (1); НА-CS-0.15C₆₀ (2); НА-CS-0.3C₆₀ (3) і порошок CS (4)

На рис. 7.5 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 PO_4^{3-} групами у НА при 1190-970 cm^{-1} (ν_3) та

670-520 cm^{-1} (ν_4). Широка смуга при 3200-3500 cm^{-1} належить валентним коливанням Н-О-Н адсорбованої води. Слід зазначити, що спектри FTIR для всіх композитів, незалежно від кількості C_{60} у їх складі, схожі і демонструють смуги поглинання CS при 2850 та 2990 cm^{-1} (аліфатична - CH_2), 1660 cm^{-1} (амід I $\text{C} = \text{O}$), 1570 cm^{-1} (валентні коливання аміно групи - NH_2) і 1380 cm^{-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 C_{60} , після зшивання макромолекул CS з ТПФ натрію, відбувається значне зниження інтенсивності смуг на 1380 cm^{-1} (валентні коливання C-N у поєднанні з NH у площинній деформації), 1660 cm^{-1} (валентні коливання C-O) та коливання 1570 cm^{-1} , віднесені до груп NH^{3+} .

ТЕМ зображення та схеми дифракції електронів (ЕД) композиту НА-CS (рис. 7.6) 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. EP підтвердило, що неорганічний компонент досліджуваного матеріалу представлений фазою НА.

На рис. 7.7 показано СЕМ зображення морфології поверхні НА-CS-0.15 C_{60} . Зразки, що містять C_{60} , 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.

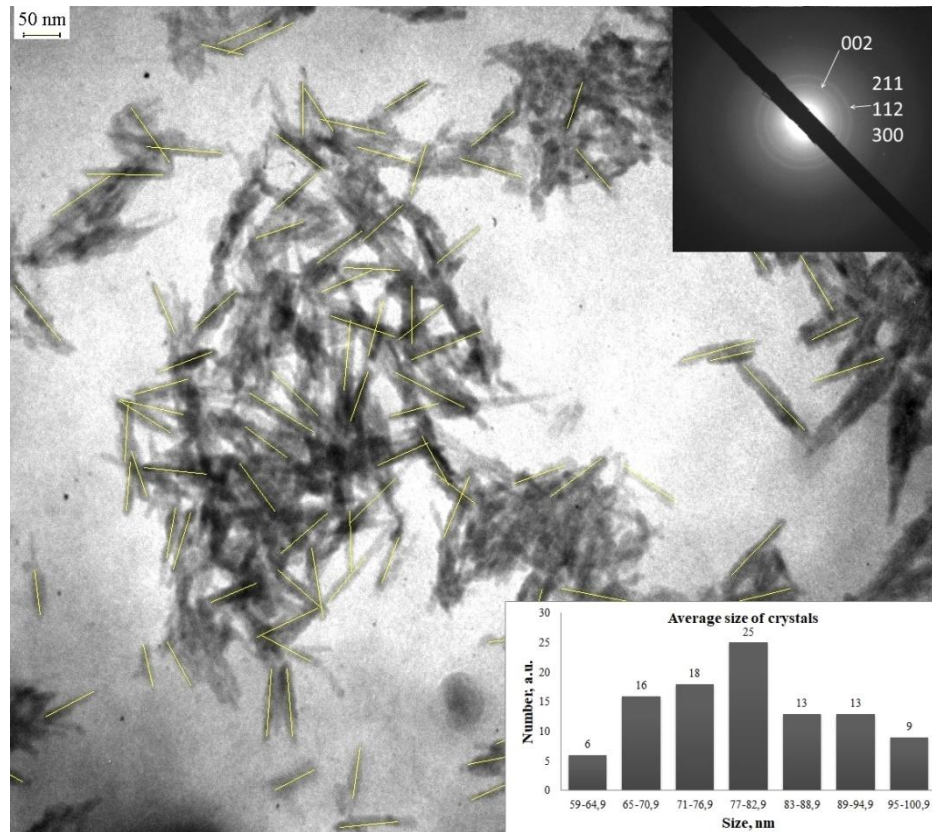


Рисунок 7.6 – Спектри зображень TEM та ЕД експериментальних КОМПОЗИТІВ

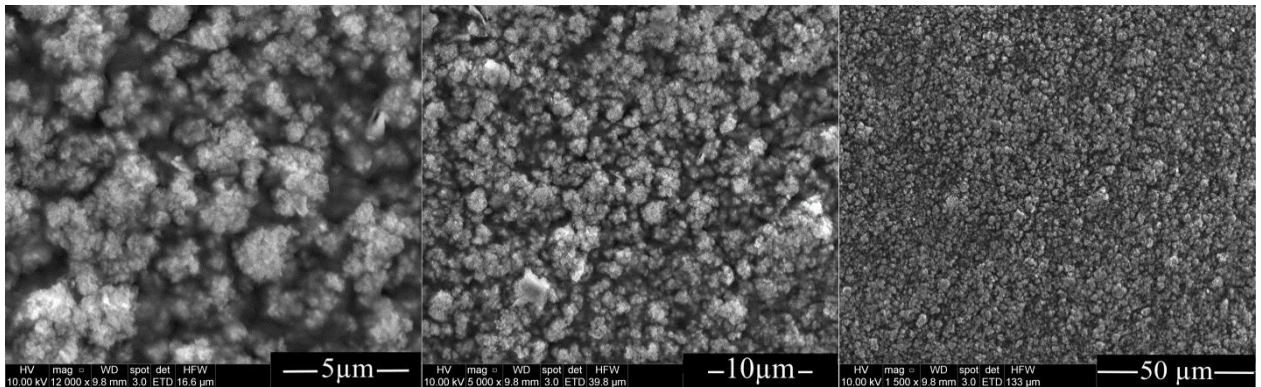


Рисунок 7.7 – Морфологія зразка HA-CS-0.15C₆₀ при різному збільшенні

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 перемішуванню 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) [119]. 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 [120], 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 (pH = 3) у розчині присутні у вигляді аніонів фосфонію $\text{P}_3\text{O}_{10-5}$ [121]. У той же час введення C₆₀ в композитну структуру викликало збільшення кількості адсорбованої рідини (рис. 7.8).

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.

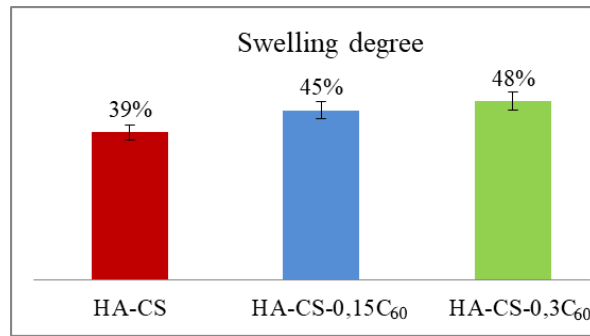


Рисунок 7.8 – Ступінь набрякання композитів HA-CS, HA-CS-0.15C₆₀ і HA-CS-0.3C₆₀ після 14-денного перебування у розчині PBS. Примітка: $p \leq 0,05$

Подальші дослідження ВЕРХ (рис. 7.9 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.

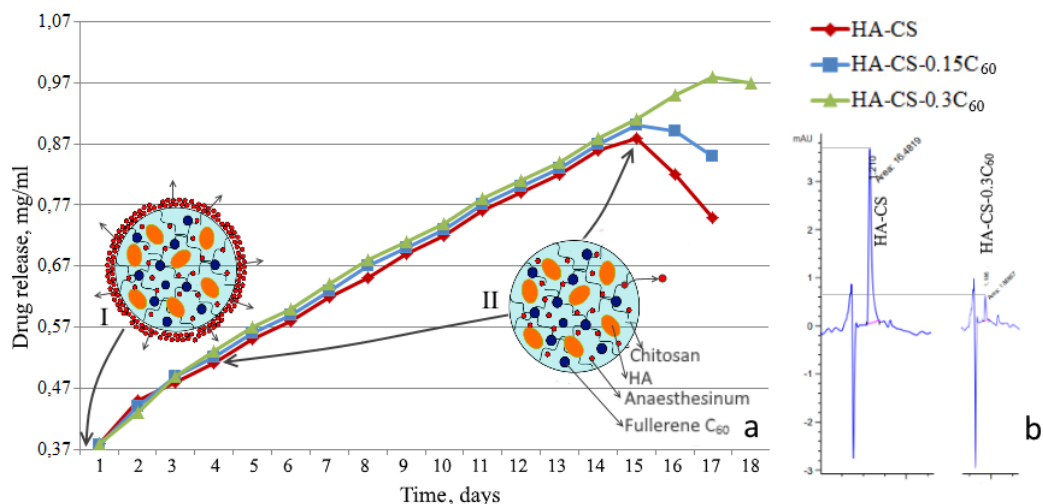


Рисунок 7.9. Концентрація анестезину в PBS (мг/мл), який виділяється з дослідних зразків протягом 18 днів (а); порівняння кількості продуктів деструкції, вивільнених з HA-CS та HA-CS-0.3C₆₀ протягом 18 днів (б)

На рис. 7.9а 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 анестезину 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 [122]: 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 [123]. 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 [124]. 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 Корсмейєра-Пеппаса. У результаті розрахунків (рис. 7.10) була обрана модель Корсмейєра-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).

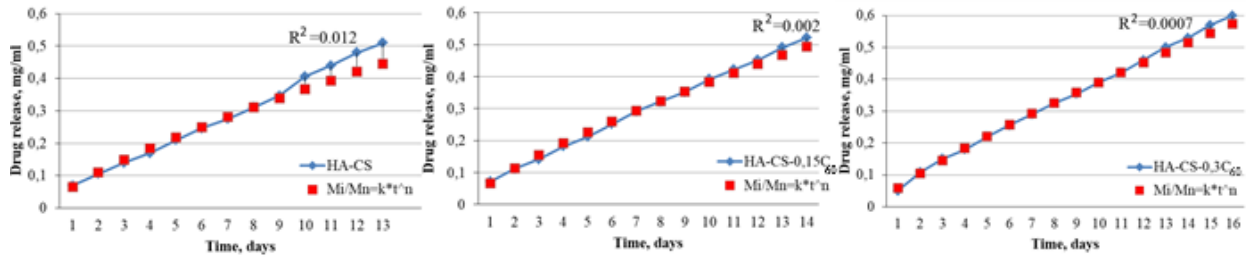


Рисунок 7.10 – Графічне зображення профілю кінетичного вивільнення Anaesthesinum з експериментальних зразків. R^2 - коефіцієнт відхилення

Розрахунок проводився для рівномірного вивільнення лікарського засобу (II стадія, рис. 7.10) 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 [125].

Таблиця 7.1 – 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 [126].

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.

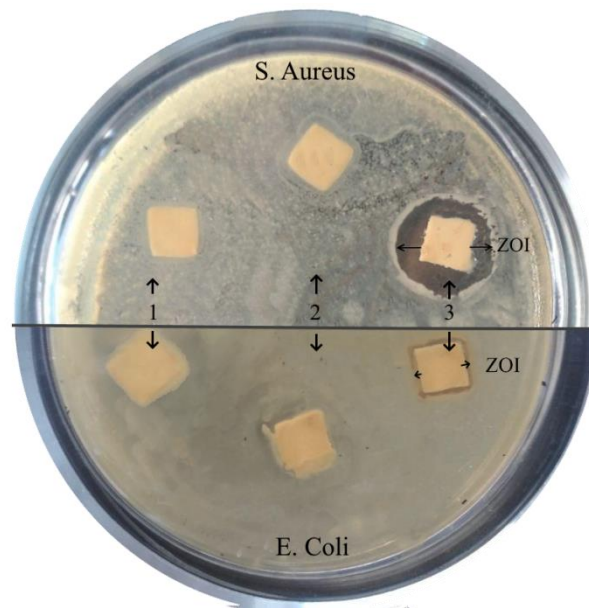


Рисунок 7.11 – Протимікробна активність зразків HA-CS (1), HA-CS-0,0004 C_{60} (2) та HA-CS-0,004 C_{60} (3) проти *S. aureus* ATCC 25923 (зверху) та *E. coli* ATCC 25922 (знизу). Примітка: $p \leq 0,05$

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. 7.11). 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 ліпіді ділянках, таких як клітинні мембрани, і вони можуть брати участь в окислювально-відновлювальних реакціях [127]. Вважається, що реактивні види кисню (ROS) беруть участь у руйнуванні бактеріальної мембрани клітин та перекисному окисленні ліпідів [128]. 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. 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 [129]. В іншому запропонованому механізмі CS утворює хелатні комплекси з мікроелементами, викликаючи пригнічення активності ферментів [130].

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. 7.12D). 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. 7.12C). У лунках із зразками HA-CS та HA-CS-0.15 C_{60} наявні деякі продукти деструкції (рис. 7.12 A та B), що, ймовірно, може впливати на життєздатність клітин.

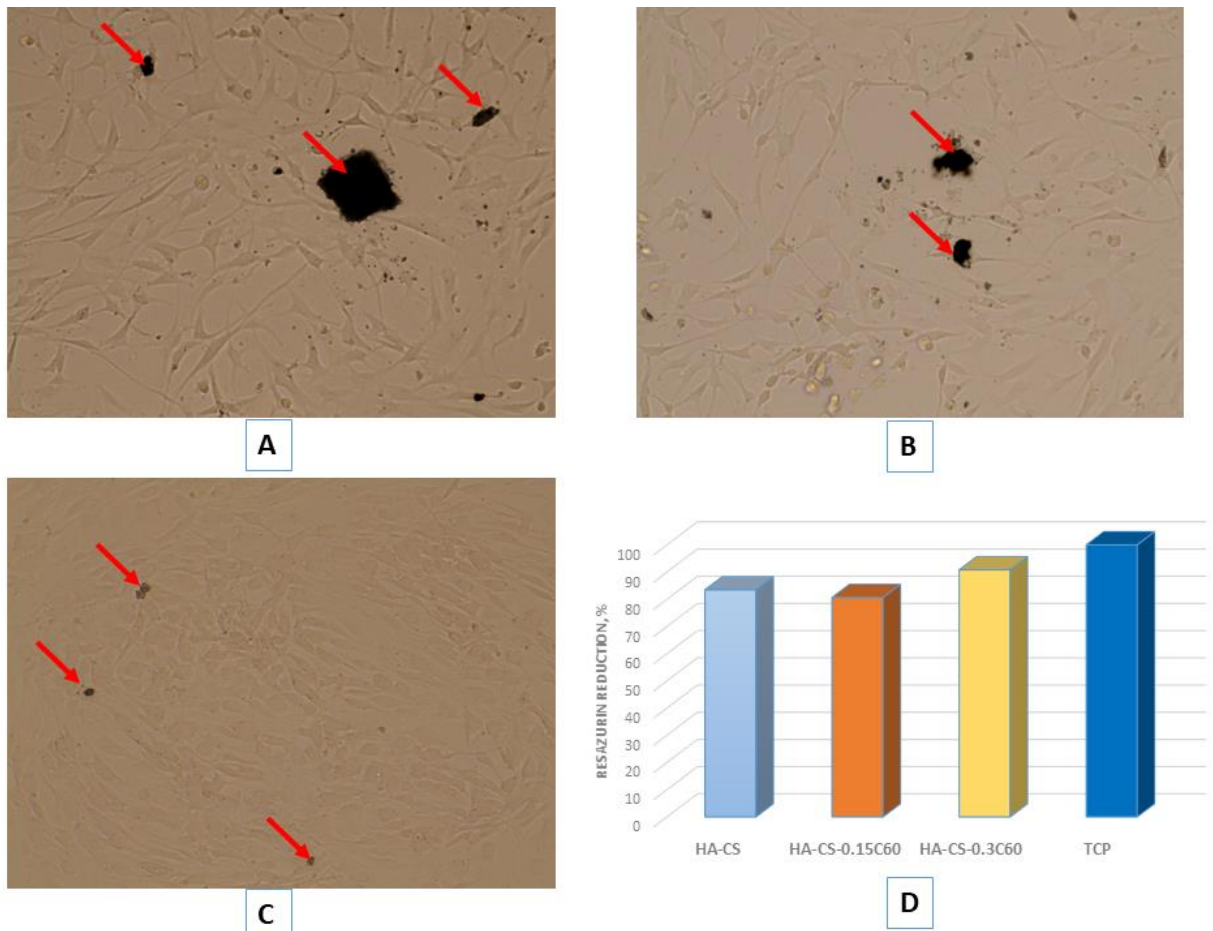


Рисунок 7.12 – Оптичне зображення первинних клітин остеобластів людини на 3-й день після культивування з експериментальними зразками HA-CS (A), HA-CS-0.15C₆₀ (B) та HA-CS-0.3C₆₀ (C) та виживання клітин, визначене з застосуванням резазурину (D). Червоні стрілки показують продукти деструкції

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 НА-CS і не впливає на структуру макромолекул CS та сприяє збільшенню агломерації кристалітів. Дані XRD та FTIR підтвердили утворення кальцій-дефіцитного карбонат-заміщеного НА (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.

8 ДОСЛІДЖЕННЯ БІОАКТИВНОСТІ ОТРИМАНИХ АПАТИТ-БІОПОЛІМЕРНИХ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ IN VITRO

8.1 Синтез та дослідження протимікробної активності композитного матеріалу на основі гідроксиапатиту, альгінату та фулерену C₆₀

Розвиток багатофункціональних наноструктурованих матеріалів для медицини залишається актуальним предметом медичного матеріалознавства. Композити, що складаються з природних органічних полімерів (хітозан CS, альгінат (Alg), желатина) та неорганічних матеріалів (гідроксиапатит (НА) та інші кальцій фосфати), поєднують переваги кожної окремої складової та мінімізують їх недоліки. Формування резистентності мікроорганізмів до широкого спектру антибіотиків створило новий виклик, одним із підходів до розв'язання якого у всьому світі є активний пошук неорганічних та органічних речовин та їх модифікація неорганічними біологічно активними іонами для ініціювання контрольованої реакції в тканинах та забезпечення антимікробної активності. Використання матеріалів з остеоінтегруючими та бактерицидними властивостями є важливою стратегією стоматології. Наночастинки неорганічного походження, а саме карбонові нанотрубки, графен, фулерен C₆₀ широко досліджуються на предмет протимікробної дії. Серед вуглецевих наночастинок фулерен є найбільш симетричною і стабільною молекулою (М.М. 760 а.о.м., $\Delta H = -8,06$ Ккал/атом) з неймовірними властивостями. Найпоширеніший серед них - фулерен C₆₀, який має 60 атомів вуглецю. У ряді досліджень показано, що C₆₀ може здійснювати антиоксидантні функції в організмі, приєднуючи АТФ і вільні радикали [131], водні суспензії фулеренів виявляють відносно сильну антибактеріальну активність [21]. Так, наше попереднє дослідження [132] демонструє протимікробну активність фулерену (0.004 mg/ml) у складі композитного матеріалу на основі гідроксиапатиту (НА) та хітозану (CS).

В даній роботі були отримані фулерен-вмісні композитні матеріали на основі гідроксиапатиту (НА та природного полімеру – альгінату під дією мікрохвильового випромінення (MW) з кінцевою обробкою ультрафіолетом (UV).

Матеріали та методи

Стоковий розчин фулерену C60, 3мг/мл (Технічний університет Льменау, Німеччина), 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).

Методика отримання композитного матеріалу.

Гідрогель НА отримували згідно з описаним раніше способом [78]. Коротко, для синтезу НА 0,1 М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ розчин додавали по краплях до 0,167 М розчину $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Після корегування 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-F. Готували стоковий розчини 2% альгінату, до якого додавали розчин фулерену C60 у розрахованій кількості, з метою отримати колоїдні суспензії фулерену в альгінаті (таб. 8.1). Вказані суспензії Alg- F поступово додавали до гідрогелю НА з масовим співвідношенням НА: Alg- F = 1:1. Суміш обробляли ультразвуком протягом 1 хв., після чого диспергували у 0,25 М розчині хлориду кальцію. Після витримання протягом 24 годин, утворені гранули відділяли від розчину, ретельно промивали та висушували. Дані про компонентний склад зразків приведені в таблиці 8.1, характеристика морфології та структури кристалітів НА на рис.8.1.

Таблиця 8.1 – Характеристика зразків щодо вмісту фулерену

Зразок	Концентрація фулерену в Alg, мг/мл	Концентрація фулерену в НА-Alg гідрогелі, мг/мл	Вміст фулерену по відношенню до НА, %
НА:Alg контроль (зразки 1, 4 в таб.8.2)	-	-	-
НА:Alg- 0.05F (зразки 2, 5 в таб.8.2)	0.1	0.05	0.1
НА: Alg- 0.5F (зразки 3, 6 в таб.8.2)	1.0	0.5	1.0

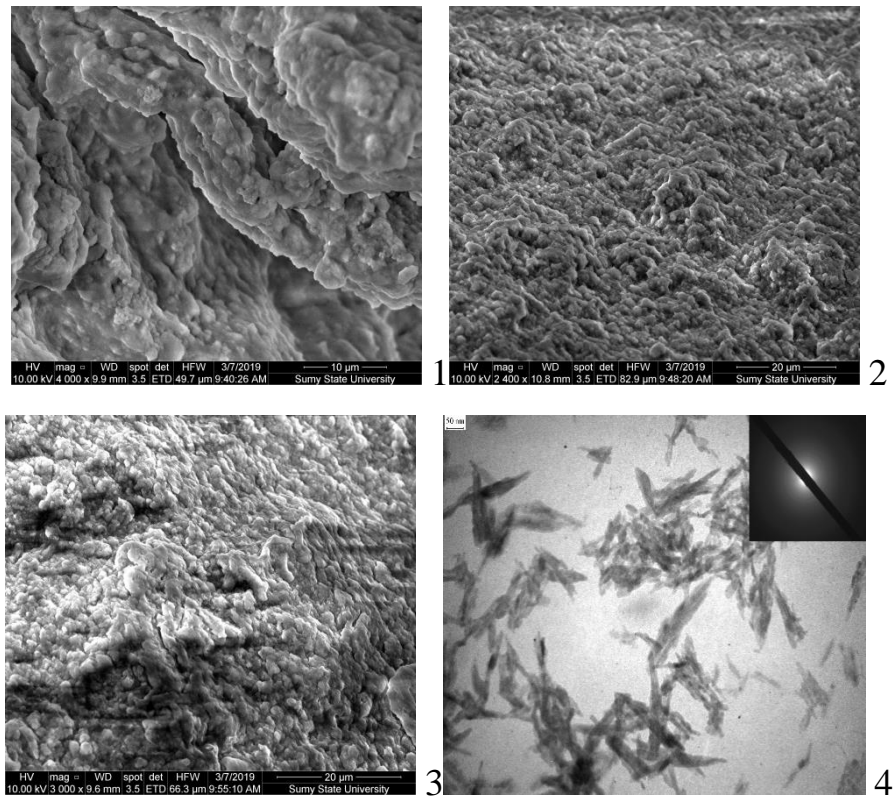


Рисунок 8.1 – Морфологія поверхні експериментальних зразків (SEM): 1 - НА-Alg (контроль); 2 - НА-Alg-F0,05; 3 - НА-Alg-F0,5; 4 - структура кристалітів НА (РЕМ)

Для дослідження антимікробних властивостей біокомпозитних матеріалів у формі гідрогелів використовували диско-дифузійний метод. Протимікробну дію гранул визначали викладанням матеріалу безпосередньо на щільне поживне середовище в чашки Петрі.

Основні етапи проведення тестування включали:

1. Приготування щільного поживного середовища – м'ясо-пептоного агару за стандартною методикою.
2. Приготування паперових дисків. У якості носія гідрогелю використовували диски з фільтрувального паперу, які попередньо стерилізували при 1 атм протягом 20 хв. Стерильні диски просочували гідрогелем (у кількості 0,2 мл на 1 диск) та висушували.
3. Посів на щільне поживне середовище у чашках Петри 10 тест-мікроорганізмів - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ОНУ 774, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ОНУ 443, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, дріжджоподібних грибів *Candida albicans* ATCC 18804.
4. Накладання на газон гранул, та паперових дисків просочених гідрогелем. Експерименти здійснювали в трьох повторах.
5. Інкубування посівів протягом 24-48 год при температурі 37 °С.
6. Облік результатів.

Результати та обговорення

Протимікробна активність зразків у формі гранул та гідрогелів з різним вмістом фулерену була досліджена щодо щодо тест-штамів роду *Bacillus*. Гідрогелеві біокомпозитні матеріали проявляли виражену антимікробну активність щодо вказаних мікрорганізмів. Так, діаметр затримки росту бактерій *Bacillus subtilis* ATCC 6633 за дії гідрогелів НА-Alg (контрольні, не піддавалися дії ультрафіолету) на паперових дисках діаметром 5 мм варіював від $8,1 \pm 0,5$ мм, а вміст фулерену 0.05 мг/мл та вплив ультрафіолету збільшували зони затримки росту до $10,3 \pm 3,6$ мм. Діаметр затримки росту бактерій *Bacillus subtilis* ATCC 6633 за дії гідрогелю з вмістом 0.5 мг/мл НА-Alg-0,5F дорівнював $9,2 \pm 1,5$ мм. В той же час біокомпозитний матеріал у формі гранул не викликав затримку росту бактерій при накладанні на газон *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Бактерії *Bacillus cereus* ОНУ 774 виявилися менш чутливими щодо дії контрольного гідрогелю НА-Alg на паперових дисках. Діаметр затримки росту бактерій під впливом дослідних НА-Alg-0,05F і НА-Alg-0,5F зразків збільшувався, але не перевищував $6,2 \pm 2,1$ мм.

Гранули біокомпозитних матеріалів НА-Alg-0,05F, НА-Alg-0,5F при накладанні на газон *Bacillus cereus* ОНУ 774, на відміну від *Bacillus subtilis* АТСС 6633, викликали затримку росту бактерій на рівні $2,1 \pm 1,5$ - $3,5 \pm 1,3$ мм.

Для оцінки антимікробної дії біокомпозитних матеріалів на бактерії *Staphylococcus aureus* використовували два штами – *S. aureus* АТСС 25923 і *S. aureus* ОНУ 443. З представлених у таблиці 1 та рис. 1 даних видно, що антимікробну дію на *Staphylococcus aureus* АТСС 25923 проявляли лише гранули дослідних біокомпозитних матеріалів – зразки № 5 - НА-Alg-0,05F та № 6- НА-Alg-0,5F. Діаметр затримки росту цього штаму за дії зразків № 5 та № 6 варіював незначно - від $4,2 \pm 2,5$ мм до $4,5 \pm 2,1$ мм. Бактеріостатичну дію гранул контрольного зразка №4 НА-Alg щодо штаму *Staphylococcus aureus* АТСС 25923 не виявлено.

Зображення мікробіологічного дослідження диско-дифузійним методом приведені на рис. 8.2, а в таблиці 8.2 – зведені результати протимікробної активності досліджуваних зразків щодо ряду бактеріальних штамів.

Штам *Staphylococcus aureus* ОНУ 443 виявився більш чутливим до дії гранул біокомпозитних матеріалів - діаметр затримки росту цього штаму за дії зразків №4 - НА-Alg-контроль, №5 - НА-Alg-0,05F, та № 6 - НА-Alg-0,5F сягала, відповідно, $5,0 \pm 2,5$ мм, $6,1 \pm 2,1$ мм, $7,5 \pm 2,6$ мм.

Слабко виражена антимікробна дія зразка №6 - НА-Alg-0,5F встановлена відносно штаму *Proteus vulgaris* АТСС 6896 - діаметр затримки росту бактерій не перевищував $3,2 \pm 1,5$ мм. Зразки гідрогелів на паперових дисках (№1-3) та гранул біокомпозитних гранульованих матеріалів (№ 4-6) антимікробну активність щодо тест-штамів *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853, *Micrococcus luteus* АТСС 4698, *Enterococcus faecalis* АТСС 29212,

Escherichia coli ATCC 25922, дріжджоподібних грибів *Candida albicans* ATCC 18804 не виявляли.

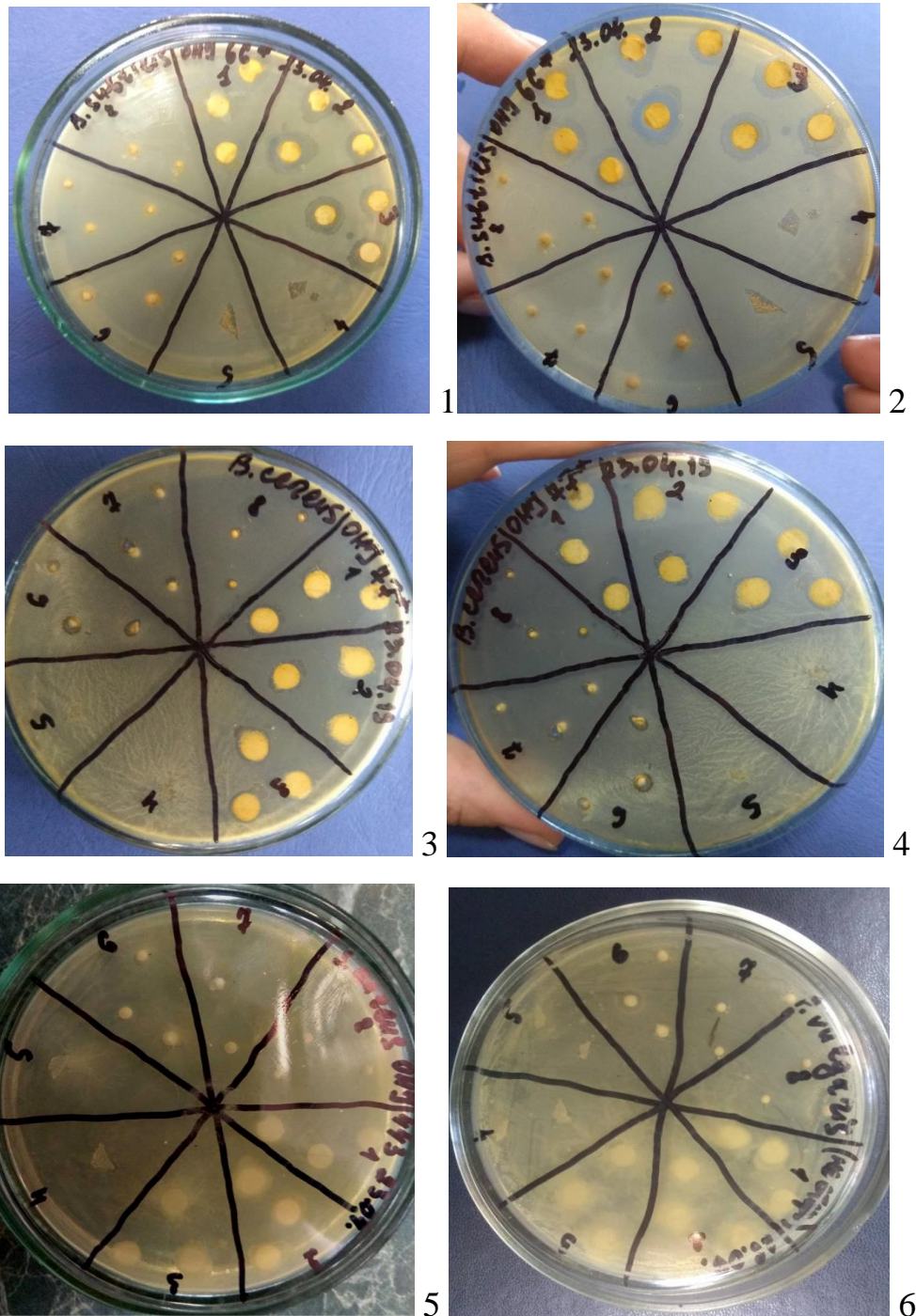


Рисунок 8.2 – Антимікробна дія біокомпозитних матеріалів на тест-штами *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (1, 2), *Bacillus cereus* ОНУ 774 (3, 4), *Staphylococcus aureus* ОНУ 443 (5), *Proteus vulgaris* ATCC 6896 (6)

Таблиця 8.2 – Антимікробні властивості біокомпозитних матеріалів

№	Тест-штам	Зразки біокомпозитних матеріалів					
		1*	2*	3*	4**	5**	6**
		Діаметр зони затримки росту, мм					
1	Bacillus subtilis ATCC 6633	8,1±0,5	10,3±3,6	9,2±1,5	0	0	0
2	Bacillus cereus ОНУ 774	6,2±2,1	6,0±2,5	6,1±2,5	2,0±1,3	2,2±1,5	2,1±1,5
3	Staphylococcus aureus ATCC 25923	0	0	0	0	4,2±2,5	4,5±2,1
4	Staphylococcus aureus ОНУ 443	0	0	0	5,0±2,5	6,1±2,1	7,5±2,6
5	Micrococcus luteus ATCC 4698	0	0	0	0	0	0
6	Proteus vulgaris ATCC 6896	0	0	0		0	3,2±1,50
7	Enterococcus faecalis ATCC 29212	0	0	0	0	0	0
8	Escherichia coli ATCC 25922	0	0	0	0	0	0
9	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	0	0	0	0	0	0
10	Candida albicans ATCC 18804.	0	0	0	0	0	0

Позначення:
Гідрогелі на паперових дисках:
1 - НА-Alg-контроль,
2 - НА-Alg-0,05F,
3 - НА-Alg-0,5F
*діаметр диску 5,0 ±0,1 мм

Гранули:
4 - НА-Alg-контроль,
5 - НА-Alg-0,05F,
6 - НА-Alg-0,5F
**діаметр 1 гранули 1,8 ±0,2 мм

Висновок:

Доведено, що протимікробна активність композитного матеріалу на основі НА та альгінату з вмістом фулерену С60 залежить від агрегатної форми (гранули, гідрогелі), вмісту фулерену С60, типу мікроорганізму, а обробка ультрафіолетовим випромінюванням (US) підвищує протимікробну активність матеріалу. Доведена виражена антимікробна активність гідрогелевих біокомпозитів у відношенні до тест-штамів роду *Bacillus*, водночас

гранульований матеріал демонстрував незначну протимікробну дію. Виявлено, що *Bacillus subtilis* ATCC 6633 є менш стійким до дії фулерену, ніж *Bacillus cereus* ОНУ 774. В той же час штами *S.aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ОНУ 443, *P. vulgaris* ATCC 6896 були більш чутливими до гранульованого матеріалу.

9 ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ ВИВІЛЬНЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ЗІ СКЛАДУ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ ЗА МЕТОДОМ ВЕРХ

Значення роботи: Композитні матеріали на основі гідроксиапатиту у формі гранул є потенціальним матеріалом для кісткової пластики. Функціональні покриття, нанесені на медичні імплантати, спрямовані на покращення процесу біоінтеграції при хірургічному оперуванні ушкоджених кісток.

Мета роботи: отримати фулерен C_{60} -вмісні (F) біокомпозитні матеріали та покриття на основі гідроксиапатиту (НА) та хітозану (CS) з заданими додатковими протимікробними властивостями та здатністю до пролонгованого вивільнення лікарських засобів. Дослідити методом ВЕРХ вплив наночастинок фулерену на кінетику вивільнення лікарського засобу – диклофенаку натрію.

Об'єктами дослідження були композитні матеріали з вмістом наночастинок фулерену C_{60} та лікарського засобу – диклофенаку натрію. Щодо кінетики вивільнення диклофенаку методом ВЕРХ було досліджено 2 групи зразків, а саме: 1) біокомпозитні гідроксиапатит- хітозанові покриття (НА-CS-F), нанесені на модельні титанові субстрати методом термодепозиції з відповідних маточних розчинів; 2) композитні матеріали на основі гідроксиапатиту та альгінату у формі гранул.

Диклофенак натрію (ДН) – це нестероїдний протизапальний та знеболювальний засіб. Його властивості не пригнічують біосинтез протеоглікантів у хрящовій тканині за умов концентрацій, які еквівалентні фізіологічним розчинам. Структурна формула диклофенаку представлена на рисунку 9.1.

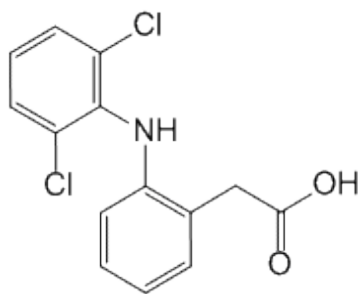


Рисунок 9.1 – Структурна формула Диклофенаку натрію

Фулерен C_{60} , як одна з кількох алотропних модифікацій карбону, має унікальну структуру, що включає sp^2 зв'язки вуглецю, які утворюють високо симетричну решітку. Молекула C_{60} є акцептором електронів, а значить є окислювачем і може утворювати реактивні види кисню (ROS), зокрема, в разі опромінення ультрафіолетом [19]. Його дисперсія може викликати антиоксидантні властивості в організмі, головним чином шляхом нейтралізації та/або приєднання АТР (аденозинтрифосфат) вільних радикалів. Водні суспензії C_{60} проявляють відносно сильну антибактеріальну активність, яка залежить від розміру частинок: чим менший розмір тим більша антибактеріальна активність [132].

Оскільки вивільнення лікарського засобу з матеріалу залежить від структури та фізико-хімічних властивостей зразків, надається коротка інформація щодо технологічних умов їх отримання.

9.1 Дослідження впливу технологічних умов на процес утворення НА-CS-F покриттів, отриманих методом термодепозиції на титанових субстратах

Матеріали

При виконанні експерименту були використані наступні реактиви: безводний кальцій хлорид $CaCl_2$, ортофосфорна кислота H_3PO_4 , натрію гідроксид NaOH (виробництво “Merk”), хітозан (М.М.100-300 кДа, ACROS ORGANIC, USA), фулерен C_{60} - водний колоїдний розчин із середнім

розміром частинок 50 нм, приготовлений відповідно до [117] та отриманий від партнерів з Німеччини, комерційно доступний фармацевтичний диклофенак натрію (ДН), 25 мг/мл. Всі реагенти були аналітичного класу чистоти.

Експериментально було визначено, що структура НА-CS та НА-CS-F покриттів, утворених з розчинів прекурсорів методом термодепозиції, змінюється залежно від рН розчину, температури та концентрації утворюючих іонів в маточному розчині. Визначено, що при $\text{pH} > 6$ переважаючим компонентом отриманих на титанових субстратах покриттів є кальцій дефіцитний гідроксиапатит (cdHA). Під час дослідження спостерігалась пряма залежність структури та швидкості осадження покриття від рівня рН (рис. 9.2), а саме: при збільшенні рівня рН більше, ніж 6,43 але менше, ніж 6,73 структура поверхні ставала неоднорідною в результаті седиментації спонтанно утворених кальцій фосфатних частинок у об'ємі материнського розчину. При цьому товщина покриття зменшувалась в результаті збіднення розчину іонами кальцію та фосфору. При збільшенні рівня рН більше, ніж 6,73 седиментація і збіднення розчину відбувалось настільки швидко, що призводило до відсутності покриття. При значеннях рН більше ніж 6,43 середня маса покриттів зменшується до 10 разів. В той же час додавання фулерену нівелює роль рН та сприяє більш ефективному осадженню НА-CS-F покриттів при $\text{pH}=6,73$.

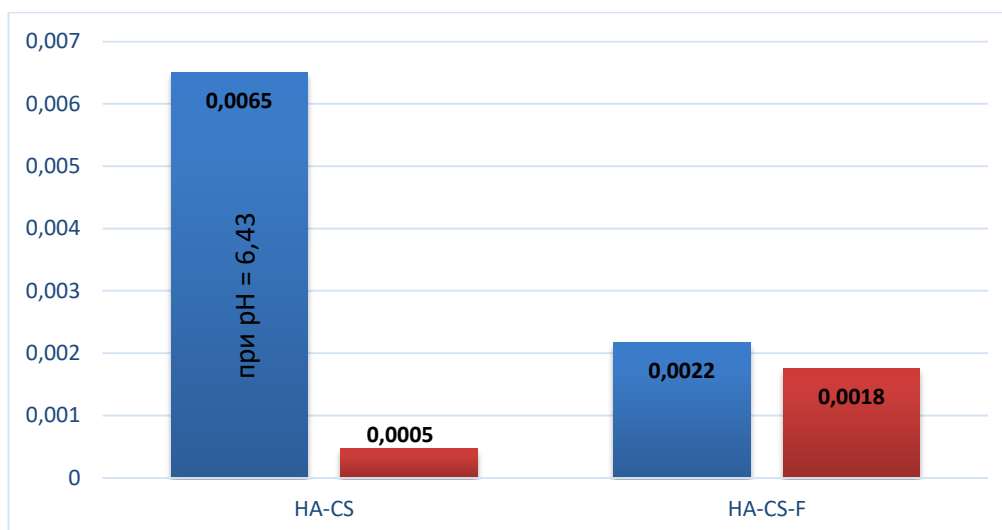


Рисунок 9.2 – Вплив значення рН на процес осадження зразків з вмістом фулерену HA-CS-F та без фулерену HA-CS при рН=6,43(синім кольором) та при рН=6,73 (помаранчевим кольором)

Виявлено, що вміст НА у покриттях збільшується із збільшенням температури та часу депозиції. При збільшенні температури субстрату на 10-15 градусів швидкість осадження прискорюється, внаслідок чого збільшується товщина покриття на 30%. При збільшенні часу депозиції при сталих вище зазначених показниках рН та температури було також виявлено пропорційну тривалості процесу зміну товщини покриття в бік збільшення. На рисунку 9.3 приведена залежність маси отриманого покриття від температури субстрату в процесі осадження. Оптимальною температурою для отримання покриттів HA-CS та HA-CS-F є 100 ± 3 °C.

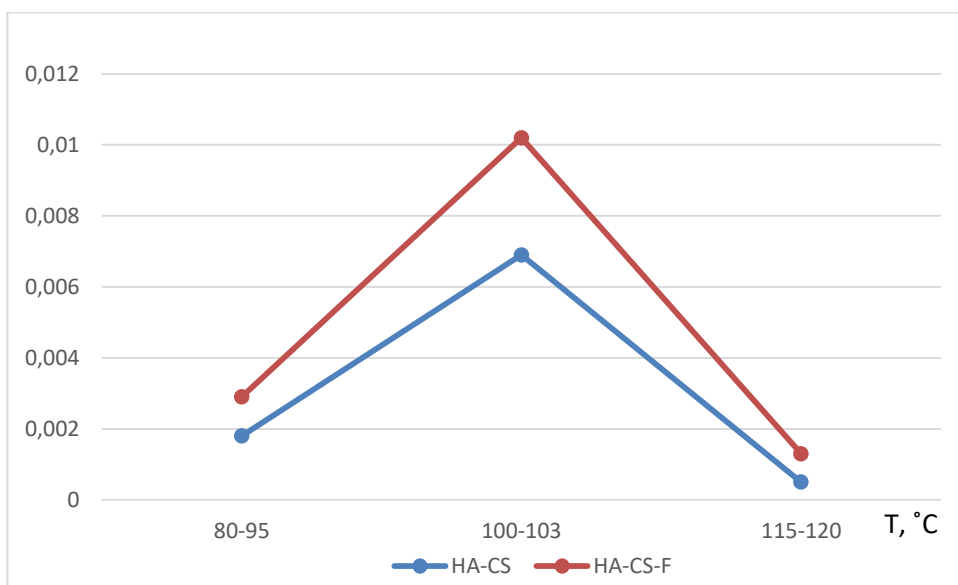


Рисунок 9.3 – Залежність маси зразків HA-CS та HA-CS-F (в грамах) від температури субстрату в процесі осадження

Висновок:

Доведено вплив фулерену C₆₀ на технологічний процес утворення комбінованого апатит-хітозан-фулерен (HA-CS-F) покриття на модельному титановому субстраті. Присутність фулерену у маточному розчині (4,5мкг/мл) при значеннях рН = 6,43 зменшує середню масу утвореного покриття до 10 разів у порівнянні з покриттям, нанесеним без фулерену (HA-CS). При рН=6,73 маси покриттів в обох випадках є близькими. Таким чином, додавання фулерену та сприяє більш ефективному осадженню HA-CS-F покриттів при значеннях рН ≥ 6,73.

9.2 Дослідження вивільнення диклофенаку натрію з HA-CS та HA-CS-F покриттів методом ВЕРХ

Динаміку вивільнення диклофенаку натрію (ДН), як модельного лікарського засобу, досліджували методом ВЕРХ на зразках HA-CS та з вмістом фулерену HA-CS-F при значеннях рН 6,43 та 6,73. В якості контрольного зразка для порівняння динаміки виділення ДН було взято

HA-CS покриття без вмісту фулерену. Зразки були насичені у розчині ДН протягом 2 годин. Вимірювання концентрацій ДН у PBS розчині проводили через 1, 2, 3, 4, 24, 48, 72, 96 годин (рис. 9.4).

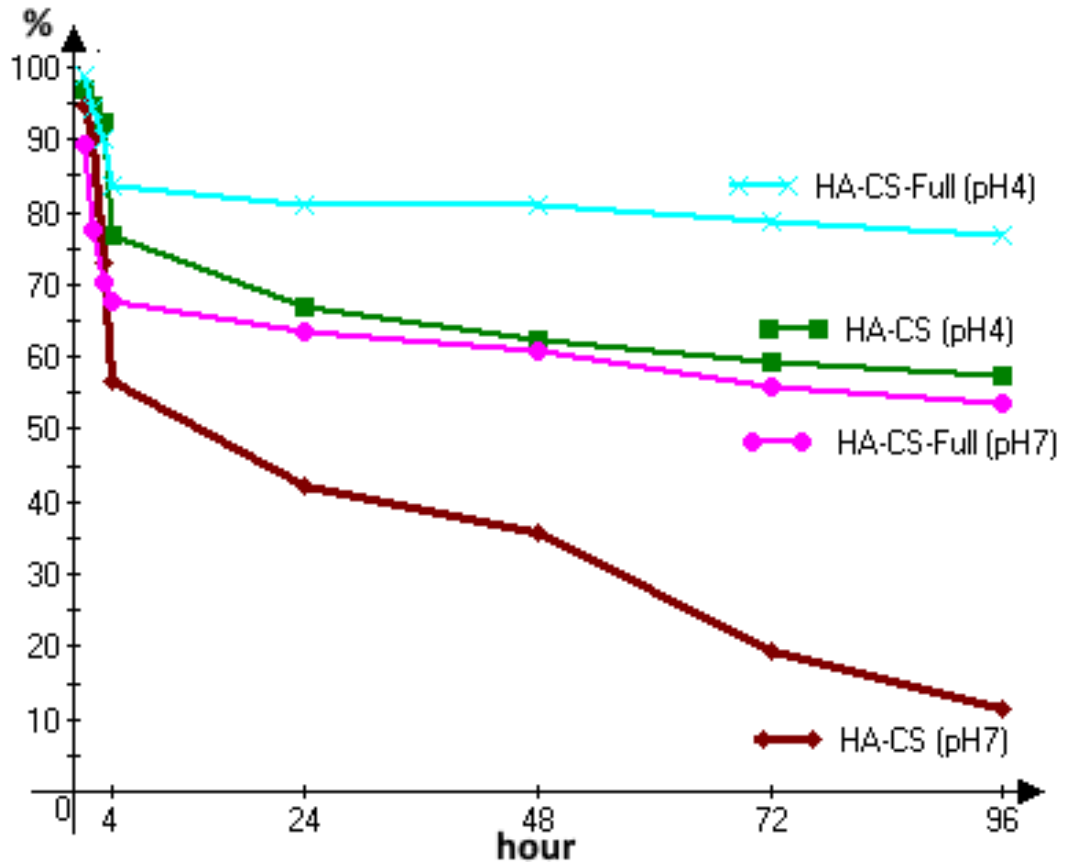


Рисунок 9.4 – Динаміка вивільнення ДН з експериментальних зразків при різних рН значеннях фосфатно-буферного розчину

На хроматограмі, яка відображає результати дослідження спостерігаються два етапи вивільнення ДН: від 0 до 4 годин та від 4 до 96 годин. Виділення ДН на першому етапі дослідження відбувається стрімко. Протягом перших чотирьох годин в кислому середовищі (рН=4) виділяється до 98 % ДН, а в нейтральному до 95 % з обох досліджуваних зразків. З огляду на невелику товщину покриття, адсорбція ДН в матеріалі фактично є поверхневою. Маса адсорбованого лікарського засобу також є незначною. При цьому, за рахунок незначного розчинення HA-CS апатит-полімерної матриці в кислому середовищі фосфатно-буферного розчину (PBS) дифузія ДН зі зразка в розчин відбувається швидше, ніж в нейтральному середовищі.

На другому етапі до від 4 до 96 годин відбувається поступове вивільнення ДН, зв'язаного з компонентами покриття за рахунок Н-водневих і/або Ван дер-Ваальсових взаємодій. Незважаючи на розведення PBS розчину, яке відбувається при кожному відборі проби і додаванні аналогічного об'єму свіжого PBS, в експериментальних пробірках спостерігається збереження концентрації препарату з поступовим її зниженням. Це означає, що надходження ДН в розчин із зразків продовжується. При цьому зменшення концентрації у розчині відбувається швидше при кислих значеннях рН, ніж при нейтральних.

Висновок:

Методом ВЕРХ доведено, що вміст фулерену C₆₀ у складі НА-CS-F покриттів зменшує майже в 2 рази швидкість та пролонгує тривалість (до 24 год) вивільнення ДН. Зразки з фулереном демонструють уповільнення виділення ДН в порівнянні з контрольними зразками НА-CS. Це вказує на додаткове зв'язування молекул ДН з молекулами C₆₀, що чинить вплив на дифузію лікарського препарату із структури покриття.

9.3 Дослідження вивільнення диклофенаку натрію з Alg- НА та xFull- Alg- НА гранульованих композитів методом ВЕРХ

Матеріали. Були використані наступні матеріали та хімічні речовини: фулерен C₆₀ (водний колоїдний розчин із середнім розміром частинок 50 нм), хлорид кальцію CaCl₂, альгінат натрію (низької в'язкості, харчова домішка E407, вироблений в Китаї), натрій диклофенак (ДН) – комерційно доступний фармацевтичний лікарський засіб, 25 мг/мл. Всі реагенти були аналітичного ступеню чистоти.

Розчин фулерену C₆₀ (Full) у надчистій воді (2,6 мг/мл) додавали до 3% водного розчину альгінату. Суміш обробляли ультразвуком протягом 20 хв. Готували дві однорідні колоїдні суспензії Full-Alg, в яких концентрація

Full становить 0,05 та 0,5 мг/мл. Кожну з цих двох суспензій додавали до гідрогелю НА (технологія отримання описана раніше) у ваговому співвідношенні 1:1, і суміші піддавали ультразвуковій дії протягом 5 хвилин з подальшим диспергуванням в 0,25 М розчин хлориду кальцію для іотропного зшивання протягом 24 годин. Утворені гранули відокремлювали від рідкої фракції фільтруванням, ретельно промивали деіонізованою водою і сушили при кімнатній температурі. В подальшому отримані зразки будуть позначені як 0.05Full-Alg-НА та 0.5Full-Alg-НА. Для порівняння фізичних та хімічних властивостей використовували контрольні гранули Alg-НА, що були отримані за вищеописаною технологією, але без використання Full.

В цьому експерименті було досліджено вплив складу матеріалу на динаміку вивільнення ДН, який був використаний в якості модельного лікарського препарату.

Гранули насичувались розчином ДН протягом доби з наступним сушінням при 37 °С. Для проведення тесту на вивільнення ДН, було взято по 0,15 г кожного зразка, а саме Alg-НА, 0.05Full-Alg-НА та 0.5Full-Alg-НА, насиченого фармацевтичним розчином ДН з концентрацією 25,00 мг/мл. Зразки поміщали в 6,0 мл PBS (рН 7,4) та інкубували при 37 °С з постійним перемішуванням в шейкері при 80 об/ хв, при температурі 37°С. Швидкість вивільнення ДН з композитів визначали, відбираючи щоденно аліквоту 600 мкл PBS з кожної дослідної пробірки з додаванням рівноцінної за об'ємом кількості чистого PBS протягом 4 діб.

Хроматографічне дослідження було проведено з застосуванням колонки C18 (4,6 мм 150 мм. В якості елюента використовували 0,05 М розчин ортофосфорної кислоти (рН 2,0) 35% та ацетонітрилу 65% зі швидкістю потоку 2,0 мл/хв. Хроматографічні криві, які характеризують процес виділення ДН зі складукомполімерів, приведений на рис. 9.5.

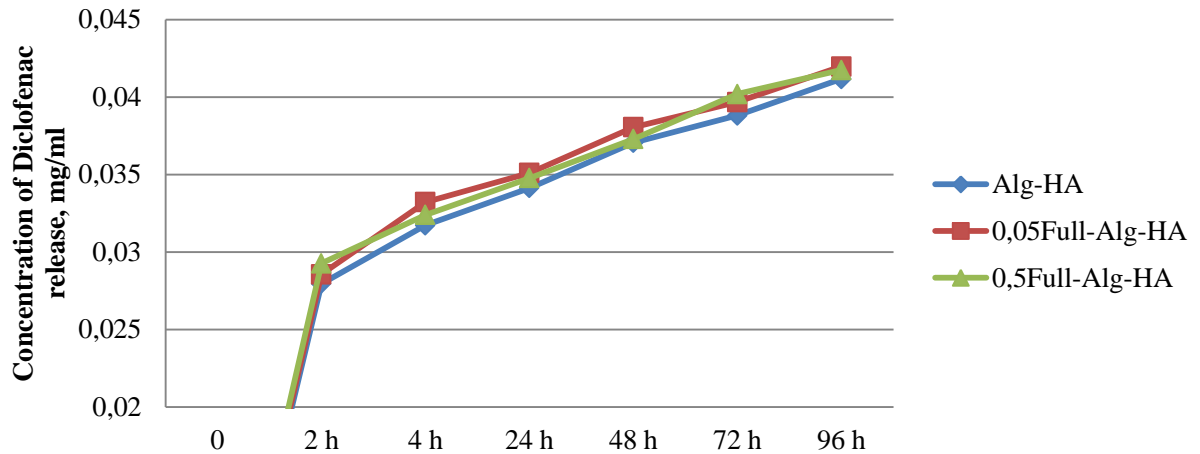


Рисунок 9.5 – Динаміка вивільнення ДН з гранульованого композитного матеріалу на основі гідроксиапатиту з вмістом фулерену C_{60} .

Дослідження контрольних зразків показали, що максимальна концентрація ДН, вивільненого з 0,15 г зразків, в розчині PBS складала близько 0,045 мг/мл. Таким чином, протягом 96 годин виділилося близько 95% поглинутого гранулами лікарського засобу. При цьому, протягом перших 2 годин вивільнення ДН склало близько 60% для всіх зразків. Очевидно, що це був ДН, адсорбований поверхнею гранульованого матеріалу. В період від 2 до 96 годин відбувалося вивільнення лікарського засобу, зв'язаного з компонентами композиту водневими або іншими зв'язками. Динаміка вивільнення ДН показує незначний вплив фулерену на цей процес. Спостерігається незначне підвищення об'єму вивільненого ДН в період 4-48 годин із зразків з вмістом фулерену. Даний факт можна пояснити більш розвиненою поверхнею адсорбції ДН за рахунок вмісту наночастинок фулерену, а, значить, і дещо збільшеною кількістю десорбованого лікарського засобу.

Висновок:

Методом ВЕРХ доведено, що вивільнення ДН з *гранульованого* композитного матеріалу на основі гідроксиапатиту з вмістом фулерену C_{60} (xFull-Alg-HA) відбувалося протягом 96 годин, при чому протягом перших 2

годин вивільнилось близько 60% поверхнево адсорбованого ДН. Результати демонструють незначний вплив фулерену C_{60} на динаміку вивільнення ДН, причиною чого є низький вміст C_{60} (0,05 та 0,5 мг на кожен мл альгілату) та утруднена дифузія наночастинок C_{60} із об'єму важкорозчинної сполуки. Основний вплив на пролонговане вивільнення ДН в даному випадку чинять сорбційні властивості НА та Alg.

10 МЕДИКО-БІОЛОГІЧНІ *IN VITRO* ТА *IN VIVO* ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОТИМІКРОБНО ДІЇ ТА БІОСУМІСНОСТІ КОМПОЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ

На даному етапі проекту було вивчено та проаналізовано цитотоксичність біоматеріалів *in vitro*, а також проведені медико-біологічні *in vivo* дослідження біосумісності матеріалів на експериментальних тваринах.

10.1 Дослідження біологічних особливостей композитного матеріалу з вмістом одностінних вуглецевих нанотрубок HA-Alg-SWCNT

Характеристика SWCNTs

SWCNT були отримані з Technical University of Ilmenau, Німеччинна. Їх виготовлення проводилось із використанням графітових електродів в атмосфері He (700 мбар) методом дугового розряду. Для процесу синтезу було просвердлено порожнину в аноді, а потім заповнено порошком каталізатора (графіт, 1% Y_2O_3 , 4,2% NiO). Дуговий розряд виконували струмом 150 А. Створені SWCNT обробляли гарячою концентрованою соляною кислотою (6 М) у зворотньому холодильнику з метою видалення забруднень, таких як аморфний вуглець та металеві частинки каталізатора.

Синтез HA, гідрогелю та гранул HA-Alg та HA-Alg-SWCNT

Для синтезу HA використовували 50 мл $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ (0,167 М) та 50 мл $(NH_4)_2HPO_4$ (0,1 М). Гідрофосфат амонію додавали по краплях до тетрагідрату нітрату кальцію. Значення рН суміші доводили до 10,5 додаванням розчину аміаку при перемішуванні. 100 мл отриманої суспензії переносили в споживчу MW-піч Samsung M1712NR для її WB-опромінення протягом 3хв. Після охолодження та промивання тверду фракцію зразка відокремлювали центрифугуванням. Вміст вологи в отриманому гідрогелі HA становив близько 90%.

На другій стадії синтезу 0,75 г Alg натрію розчиняли у 50 мл деіонізованої води при температурі 37°C протягом 5 годин, утворюючи 1,5% колоїдний розчин, до якого додавали 0,0025 г SWCNT у формі дрібнодисперсного порошку, щоб отримати концентрацію SWCNT в розчині Alg 0,05 мг/мл. Суміш обробляли ультразвуком при низькій (90 Вт) потужності протягом 20 хв., до утворення однорідної стабільної колоїдної суспензії Alg-SWCNT. Після цього до суспензій Alg-SWCNT поступово додавали гідрогель НА із ваговим співвідношенням 1: 1 та обробляли ультразвуком протягом 5 хв. Суміші капали в 0,25 М розчин хлориду кальцію протягом 24 годин. Утворені гранули відокремлювали від розчину фільтруванням, ретельно промивали деіонізованою водою і сушили при кімнатній температурі. В кінцевому продукті вміст SWCNT складав 0,05 та 0,5 мас.% щодо порошку НА. Зразки позначені як НА-Alg-0,05SWCNT та НА-Alg-0,5SWCNT, відповідно. Зразок НА-Alg, що не містить SWCNT, був синтезований за вищезазначеною технологією та використаний як контрольний.

Аналіз життєздатності клітин

Первинні культури клітин остеобластів людини культивували в поживному середовищі Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) з використанням L-глутаміну, що містить 100 одиниць/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В, 10% бичачої сироватки та 1,0 нг/мл bFGF. Клітини витримували при температурі 37 °C у зволоженому інкубаторі з 5% CO₂ протягом 24 год, поки не отримали моношар із покриттям понад 80%. Остеобласти висівали в кожну лунку при щільності клітин (4×10^4 клітин на лунку). Через 24 години культивування клітин в лунки додавали cdHA-Alg-SWCNT та cdHA-Alg в кількості 0,026 - 0,028 г

Життєздатність клітин аналізували за методом колориметричного аналізу аламарового синього, в якому синій барвник резазурин відновлюється до резорурфіну рожевого кольору лише життєздатними

мітохондріями. Синій аламар (Invitrogen) додавали у кількості, що дорівнює 10% від обсягу, у кожен лунку. В якості негативного контролю, розчин Alamar Blue додавали до середовища без клітин. В якості позитивного контролю Alamar Blue додавали до середовища, яке в лунках містить лише клітини без зразків (контроль тканинної культури (ТКК)). Зразки інкубували протягом 4 годин при 37 °С у темряві. Потім середовище переносили на іншу 96-лункову платівку та вимірювали адсорбцію за допомогою спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) при довжинах хвиль 570 нм та 600 нм. Життєздатність клітин вимірювали на першому та третьому дні культивування клітин. Всі експерименти повторювали 3 рази. Розрахунок відсотка зменшення аламарного синього проводився за рівнянням згідно з протоколом виробника [133]. Ріст та проліферацію клітин контролювали за допомогою системи візуалізації клітин EVOS XL Core (ThermoFisher Scientific, США) на 3 день після спільного культивування.

Результати дослідження представлені на рис. 10.1. Аналіз культури клітин остеобластів не показав токсичності клітин як для зразків HA-Alg, так і для HA-Alg-0.5SWCNT. 24 години культивування показали задовільну адгезію клітин між $85,4 \pm 3,7\%$ та $92,5 \pm 7,3\%$ без суттєвої різниці з контрольною групою ТКК ($89,6 \pm 6,8\%$).

Триденне культивування вказує на кращу проліферацію остеобластів з експериментальними композитами порівняно з ТКК, очевидно, завдяки специфічним стимулам, що присутні в композитах HA та Alg. На 3-й день ми можемо спостерігати повне злиття клітин як на зразках HA-Alg, так і на HA-Alg-0,5SWCNT. Залишки продуктів розпаду візуалізуються між остеобластами і не проникають крізь клітинну мембрану. Остеобласти мають типову морфологію міжклітинного зв'язку, що додатково передбачає біосумісність композицій HA-Alg та HA-Alg-0.5SWCNT.

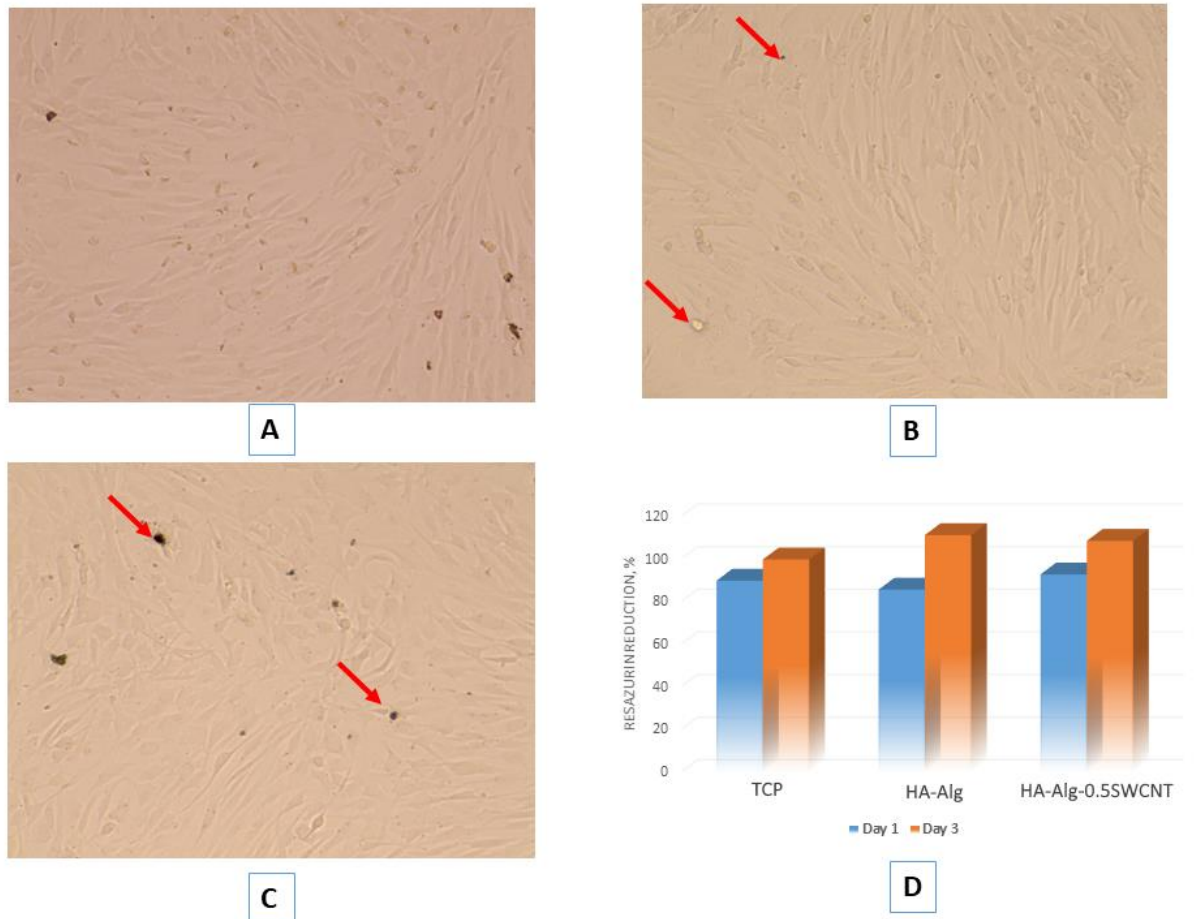


Рисунок 10.1 – Оптичне зображення клітинних людських первинних остеобластів на 3 день після культивування на ТКК (А), HA-Alg (В) та HA-Alg-0,5SWCNT (С) та дані відновлення резазурину на 1 та 3 день (D).

Червоними стрілками показані продукти деградації

Висновок:

Доведена життєздатність клітин остеобластів людини в присутності експериментальних зразків з вмістом SWCNT. Типова морфологія міжклітинного зв'язку остеобластів додатково доводить біосумісність композицій. Доведено відсутність токсичності, задовільну адгезію клітин до поверхні матеріалу. Триденне культивування показало стимуляцію проліферації остеобластів з експериментальними композитами порівняно з контрольною ТКК пластиною.

10.2 Порівняльна характеристика протимікробної активності C₆₀ –вмісних гідрогелів та гранул, синтезованих на основі гідроксиапатиту

В даному дослідженні було зроблено порівняльну характеристику протимікробної дії композитних матеріалів з вмістом фулерену C₆₀ у формі гранул та гідрогелів щодо грамнегативної *E.Coli* ATCC 25922 та грампозитивної *S.Aureus* ATCC 25923 бактерій. Крім того, для визначення впливу гідроксиапатиту на протимікробну активність матеріалів, було синтезовано та досліджено гранули та гідрогелі з вмістом НА та без нього. Дане дослідження було вмотивоване фактом, що НА є важкорозчинною речовиною і може затримувати дифузію фулерену C₆₀ і, таким чином, послаблювати протимікробну дію матеріалу в цілому. Перелік, склад досліджених зразків наведено в таблицях 10.1 та 10.2, а на рис. 10.2 представлено зображення результатів протимікробної активності експериментальних зразків.

Протимікробну активність матеріалу щодо *E.coli* та *S.aureus* перевіряли методом дифузії в агар. Для цього виливали стерильне живильне середовище Мюллера-Хінтона у стерильні чашки Петрі шаром товщиною 4 мм та залишали при кімнатній температурі до затвердіння. Потім готували суспензію досліджуваних мікроорганізмів (посівний матеріал). Для цього використовували чисту добову культуру, вирощену на твердому поживному середовищі. Ідентично чітко ізольовані колонії були відібрані та перенесені в тест-пробірку зі стерильним сольовим розчином. Помутніння посівного матеріалу регулювали до стандарту Макфарленда 0,5, що відповідає $1,5 \times 10^8$ КУО (колонієутворюючих одиниць) в 1 мл.

Таблиця 10.1 – Протимікробна активність зразків на основі НА (хF C₆₀ НА:Alg)

Зразок	Концентрація F C ₆₀ в НА-Alg гідрогелі, мг/мл	Вміст F C ₆₀ щодо НА, %	Зона затримки росту <i>E. Coli ATCC 25922</i> , мм		Зона затримки росту <i>S. Aureus ATCC 25923</i> , мм	
			гідрогель	гранули	гідрогель	гранули
1. НА:Alg	-	-	10	-	11	12
2. 0.4F C ₆₀ - НА: Alg	0.0002	0.0004	11.5	-	13	14
3. 4F C ₆₀ - НА: Alg	0.002	0.004	13,5	12	14	16
4. 0.05F C ₆₀ - НА:Alg	0.05	0.1	12	10	15.5	20
5. 0.5F C ₆₀ - НА: Alg	0.5	1.0	13	12	15	18

Таблиця 10.2 – Протимікробна активність зразків без вмісту НА (хF C₆₀ :Alg)

Sample	Концентрація F C ₆₀ в Alg, мг/мл	Зона затримки росту <i>E. Coli ATCC 25922</i> , мм		Зона затримки росту <i>S. Aureus ATCC 25923</i> , мм	
		гідрогель	гранули	гідрогель	гранули
6. 0.4F C ₆₀ - Alg	0.0004	13	-	13,5	12
7. 4F C ₆₀ - Alg	0.004	17	11	16	17
8. 0.05F C ₆₀ - Alg	0.1	13,5	10	18	23
9. 0.5F C ₆₀ - Alg	1.0	14	13	16,5	20

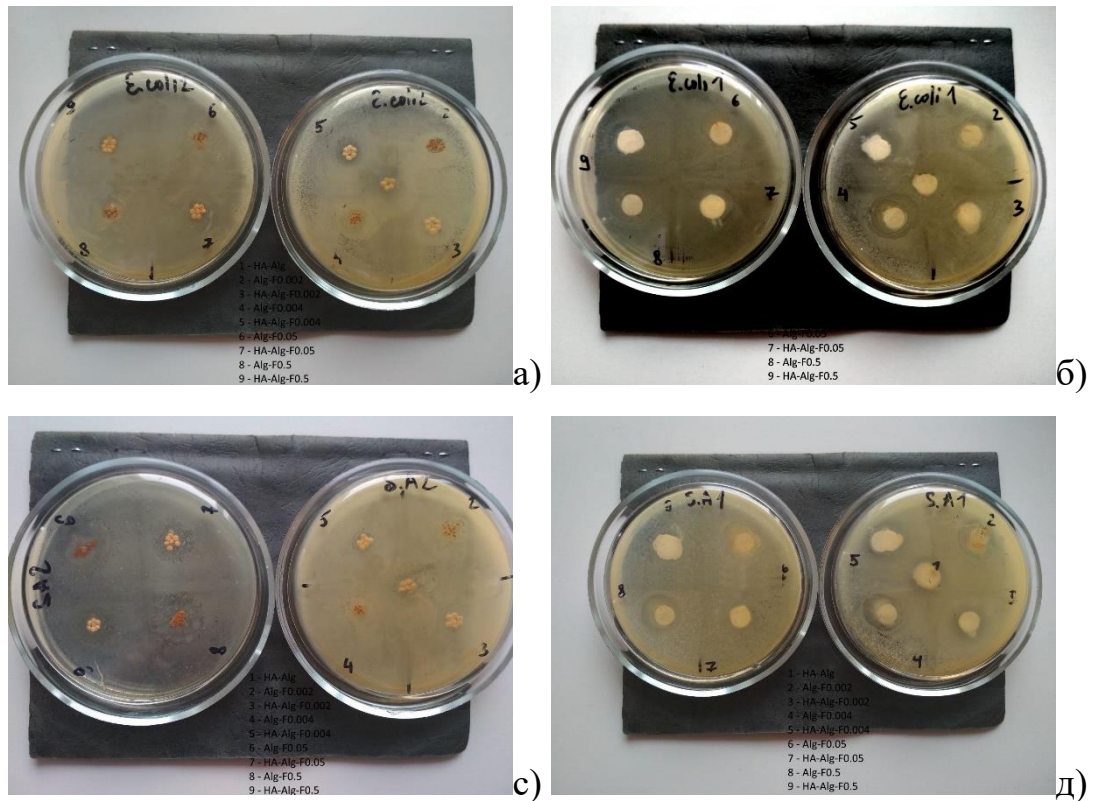


Рисунок 10.2 – Протимікробна активність зразків : щодо мікроорганізму *E. Coli* а)-гранули; б) гідрогелі; щодо мікроорганізму *S. Aureus* в)-гранули; г)-гідрогелі.

Інокулят 2 мл наносили на поверхню живильного середовища в чашці Петрі і рівномірно розподіляли по поверхні агару струшуванням, потім зайву рідину видаляли. Відкриті чашки залишали при кімнатній температурі впродовж 10 хвилин для сушіння. Гранули експериментальних зразків попередньо змочували у стерильній воді та розміщували на поверхні живильного середовища. Гідрогелі наносили на стерильні паперові диски діаметром 5мм, які також розміщували на інокульований мікроорганізмами агар. Після експозиції зразків чашки Петрі інкубували при температурі 37 ° С протягом 24 годин у термостаті, після чого заміряли зони інгібування росту мікроорганізмів.

В експерименті досліджувався фулерен C_{60} на предмет його протимікробної дії у складі композитного матеріалу на основі НА у формі гідрогелів та гранул. Концентрації фулерену були достатньо низькими з

огляду на можливість його токсичної дії, про що повідомляє ряд дослідників, а саме від 1,0 до 0,004% по відношенню до вмісту гідроксиapatиту. Не зважаючи на це, ми спостерігаємо наявність протимікробних властивостей. Наявність зон інгібування росту (ЗІР) вказує на те, що механізм протимікробної дії наночастинок фулерену C_{60} , який передбачає порушення мембрани шляхом утворення поверхневих реакційних форм кисню (ROS), призводить до загибелі мікроорганізмів. У цьому дослідженні було встановлено, що ЗІР збільшувались при збільшенні концентрації наночастинок фулерену у всіх зразках. В цілому була також очевидною більш ефективна протимікробна дія експериментальних зразків щодо мікроорганізму *S. Aureus*. Що стосується форми матеріалу, то гранули проявляли більшу ефективність щодо *S. Aureus*, а гідрогелі – щодо *E. Coli*. Найбільшу протимікробну активність проявив зразок 0.05FC₆₀-НА:Alg. Так, ЗІР, спричинена гранулами цього зразку щодо *S. Aureus* складала 20 мм, а гідрогелю -15.5мм; щодо *E. Coli* – 10 та 12 мм, відповідно. Слід зазначити, що в нашому випадку дифузія частинок фулерену C_{60} в агар могла бути обмеженою присутністю важкорозчинної сполуки – НА. Для перевірки цього факту було проаналізовано зразки у формі гідрогелів та гранул з аналогічним вмістом фулерену та альгінату, але без НА. Результати представлені в таб.3.2. Експеримент показав, що тенденція залежності протимікробної активності всіх зразків від форми матеріалу та тестового штаму збереглася в порівнянні зі зразками, що містили НА. Водночас підвищились розміри ЗІР обох типів експериментальних бактерій. Так, ЗІР, спричинена дією вищезгаданого зразку 0.05F C_{60} -НА:Alg щодо *S. Aureus* складала 23 мм, а гідрогелю -18 мм; щодо *E. Coli* – 10 та 13,5 мм, відповідно.

Механізм антимікробної дії C_{60} ще не зовсім вивчений. Літературні джерела свідчать про залежність протимікробної активності фулерену від розміру частинок, модифікації поверхні, оточуючих умов. Відомо, що молекули C_{60} здатні локалізуватися в багатих на ліпіди ділянках, таких як клітинні мембрани. Відомо, що фулерен має окислювальні властивості і може

утворювати реактивно здатні іони кисню (ROS). Вважається, що ROS бере участь у порушенні бактеріальної мембрани клітин та перекисному окисненні ліпідів [128]. Ще один механізм протимікробної дії фулерену, наведений в [19] заключається у наступному (рис. 10.3): фулерен C_{60} в основному стані поглинає фотон, переходить у короткостроковий (наносекунди) збуджений синглетний стан, який може зазнавати міжсистемного переходу до тривалого (мікросекунди) збудженого триплетного стану. Триплетний фулерен може перейти до основного стану, випромінюючи фосфоресценцію, але також може провокувати передачу енергії до молекул триплетного кисню ($3O_2$) з утворенням реакційноздатного синглетного кисню ($1O_2$, тип 2) або може провокувати реакції перенесення електронів у форму HO^\bullet , супероксид і H_2O_2 (тип 1). Ці ROS ($1O_2$ та HO^\bullet) можуть пошкоджувати ліпіди, білки та нуклеїнові кислоти, що призводить до руйнування всіх типів мікробних клітин, та ефективно вбивати ракові клітини та знищувати пухлини.

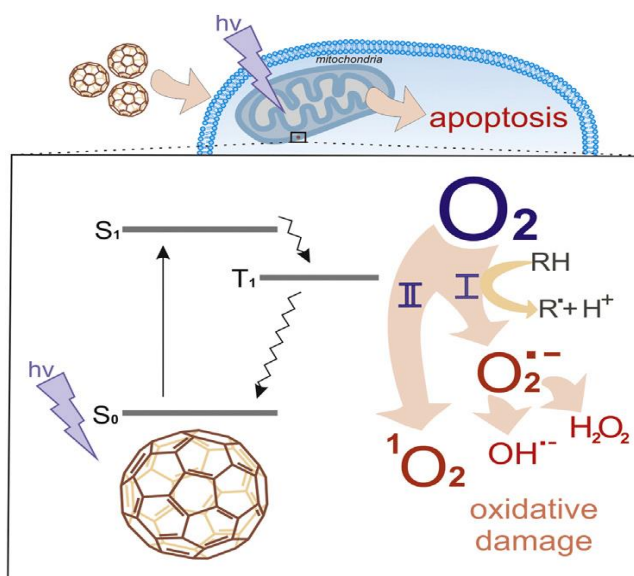


Рисунок 10.3. – Діаграма Яблонського. Механізм антимікробної дії фулерену [19]

Висновок:

Дослідження фулерен C_{60} -вмісних апатит-полімерних композитів у формі гідрогелів та гранул показало вплив форми матеріалу на протимікробні

властивості фулерену, а саме гідрогелі є більш активними щодо грамнегативної бактерії *E. Coli ATCC 25922*, а гранули - щодо грампозитивної *S. Aureus ATCC 25923*.

11 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ХІТОЗАНУ В КОМПЛЕКСІ З ІОНАМИ ТА НАНОЧАСТИНКАМИ СРІБЛА НА ПРОТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОКРИТТІВ НА ОСНОВІ НА, НАНЕСЕНИХ НА МОДЕЛЬНІ ТИТАНОВІ ІМПЛАНТИ

Зважаючи на підвищену резистентність мікроорганізмів до широкого ряду антибіотиків в останнє десятиліття, вчені намагаються знайти альтернативні речовини в якості протимікробних засобів [134,135].

Саме тому в даній роботі було застосовано частинки неорганічного походження, а саме наночастинки та іони срібла в якості протимікробних агентів. Для порівняння протимікробної активності до складу покриттів було внесено лікарський засіб – хлоргексидин.

Протимікробна активність покриттів була визначена щодо мікроорганізму *S. aureus* (ATCC 25923). Для дослідження було взято наступні 4 зразки: а) покриття на основі гідроксиапатиту та хітозану було використано в якості контрольного; б) покриття НА-CS з вмістом протимікробного лікарського засобу – хлоргексидину (СН) було використано для порівняння результатів протимікробної активності лікарського засобу та наночастинок неорганічного походження; в) НА-CS покриття з вмістом іонів срібла (Ag^+); г) НА-CS покриття з вмістом наночастинок срібла (Ag нано).

Результати свідчать, що найменшу протимікробну активність проявляє зразок НА-CS, який не містить додаткових протимікробних домішок. Незначна протимікробна активність цього зразку відбувається завдяки присутності хітозану та пояснюються тим, що порушується метаболізм мікробної клітини та її загибель при приєднанні позитивно зарядженої протонованої NH^{3+} групи хітозану до її поверхні.

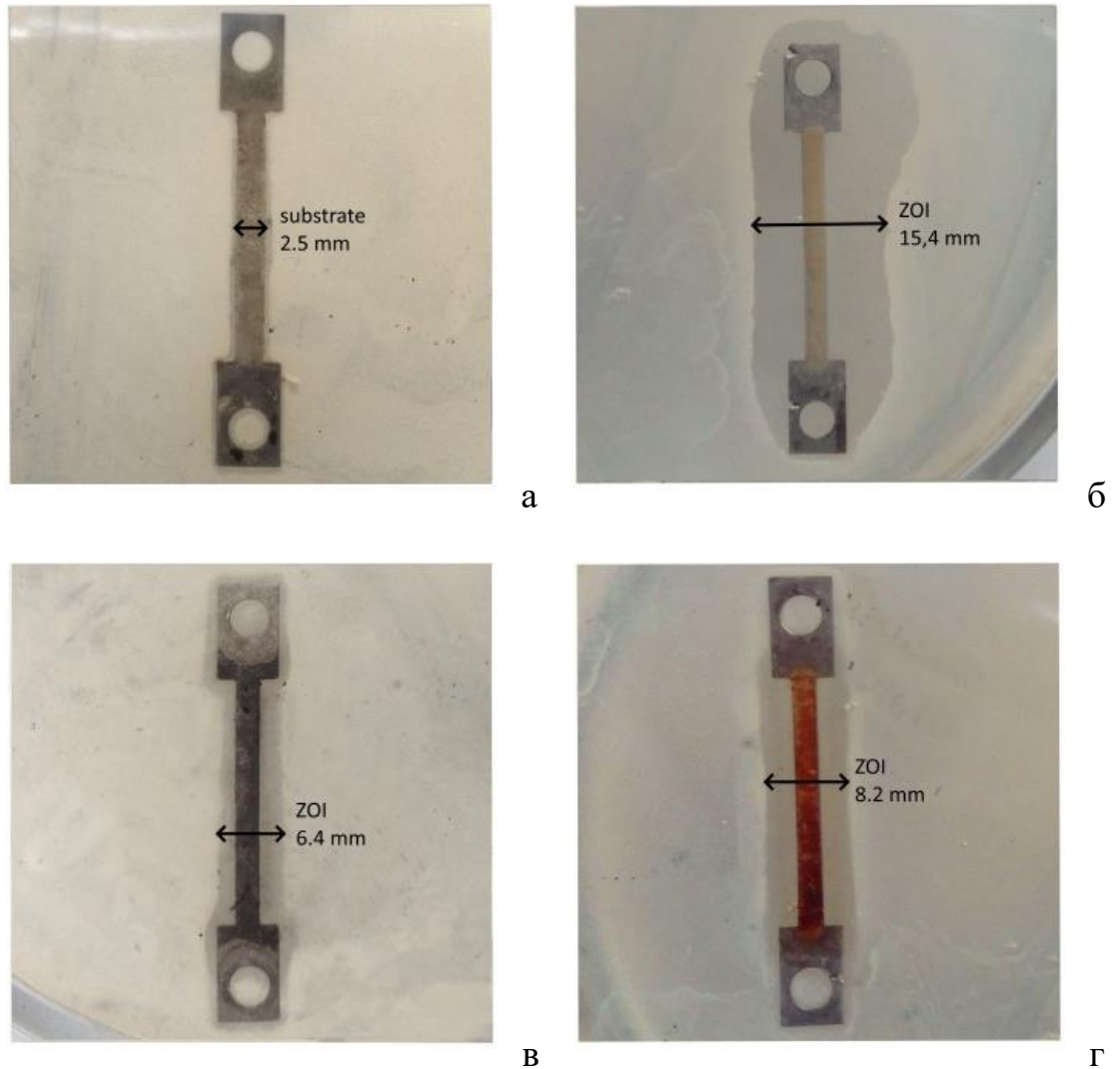


Рисунок 11.1. – Протимікробна активність зразків: а) HA-CS; б) HA-CS-CH в) HA-CS-Ag⁺; г) HA-CS-Agnano. Ширина титанової пластини з покриттям 2мм.

Було зроблено порівняльне дослідження протимікробної активності зразків з вмістом іонів та наночастинок срібла. Зразки HA-CS-Ag⁺ та HA-CS-Agnano (рис. 11.1.в,г) демонструють зони інгібування росту мікроорганізмів 6,4 мм та 8,2 мм, відповідно. Найкращий показник протимікробної активності демонструє зразок з вмістом лікарського препарату хлоргексидину, зона затримки росту складає 15,4 мм. Це пов'язано з тим, що хлоргексидин добре розчиняється в воді і його дифузія до

мембрани протимікробної клітини є більш інтенсивною в порівнянні до іонів та наночастинок срібла.

Висновок:

Порівняльне визначення протимікробної дії іонів та наночастинок срібла (Ag) у складі хітозан-гідроксиапатитних (НА-CS) покриттів показало вищу активність Ag наночастинок щодо мікроорганізму *S. aureus* (ATCC 25923) в порівнянні з іонами Ag⁺.

12 МЕДИКО-БІОЛОГІЧНІ *IN VITRO* ТА *IN VIVO* ДОСЛІДЖЕННЯ

12.1 Дослідження цитотоксичності частинок магнетиту у складі композитів на основі НА

Основною передумовою тканинної інженерії є розвиток покриттів та імплантатів для відновлення функцій ушкоджених тканини людини. Одна з основних функцій таких матеріалів є сприяння прикріплення, росту та проліферації клітин остеобластів [136]. Крім того, вони також покликані зберегти відповідний фенотип і життєздатність клітин. Відомо, що НА та Alg мають позитивний (або нейтральний) ефект на проліферацію клітин-остеобластів. Магнетит виконує терапевтичну функцію (наприклад, у методі гіпертермії при лікуванні пухлин кісток) і має певний ступінь токсичності, незначно знижуючи ступінь проліферації. Ось чому ми провели ретельне дослідження цитотоксичності створеного трикомпонентного біоматеріалу.

Магнетит (Fe_3O_4) - найпоширеніший оксид заліза, що використовується в біомедицині через низьку токсичність, відносну легкість функціоналізації і високу намагніченість при кімнатній температурі [137]. Магнітні матеріали, введені в до складу остеопластичних матеріалів, сприяють формуванню кісток [138]. Біомедичне застосування магнітних наночастинок (МНЧ) зросло в останні десятиліття [139].

Приготування дослідних зразків:

На першій стадії готували 5 мл 2% водного розчину альгінату натрію, значення рН 10 досягали за допомогою 18% розчину NaOH. До розчину лужного альгінату додали 10 мл 0,4 М $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ з подальшим обробкою ультразвуком. Після наступного додавання 10 мл 0,4М $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ суміш витримували при 80 °С протягом 10 хвилин. Осад, що осідає, промивали дистильованою водою до нейтрального рН. Після висихання отримували наноструктурований порошок магнетиту, з кінцевим співвідношенням компонентів Fe_3O_4 : Alg = 10: 1

До 0,11 г Fe_3O_4 порошку поступово додавали 8,00 г гідрогелю НА та обробляли ультразвуком низької (90 Вт) потужності. При цьому вміст магнетиту становив 1% від НА (в розрахунку на масу сухих порошоків). Зразки названі НА – Fe_3O_4 (гідрогель).

Гідрогель НА – Fe_3O_4 додавали до 2% розчину альгінату у ваговому співвідношенні НА – Fe_3O_4 : Alg = 1: 1 змішували в УЗД протягом 12 хв. Композиційний матеріал у формі гранул (далі - НА – Fe_3O_4 – Alg) було отримано методом диспергування отриманої суспензії у розчині 0,125-М кальцію хлориду. Через 25 хв експозиції гранули були відфільтровані, промиті дистильованою водою до нейтральної реакції і висушені. Отримання магнетиту Fe_3O_4 проводили методом хімічного осадження за наступною реакцією:



Дослідження цитотоксичності та біоактивності

Цитотоксичність гідрогелю НА – Fe_3O_4 та гранул НА – Fe_3O_4 – Alg досліджували за допомогою клітинних культур фібробластів мишей.

Пряму цитотоксичність матеріалів оцінювали за ефективністю прикріплення клітин фібробластів до зразків. Для видалення незакріплених клітин після 48 годинного культивування плівки промивали фосфатно-натрієвим буферним розчином. Кількість прикріплених клітин оцінювали за методом МТТ, який є одним з найчутливіших методів визначення метаболічної активності клітин. Концентрація клітин NIH-3T3 становила 5×10^4 клітин на лунку. Після проведення підготовчих процедур, клітини фібробластів NIH-3T3 були оброблені суспензіями НА – Fe_3O_4 – Alg з різними концентраціями (200 мкг / мл) та інкубували протягом 24 та 48 год. Контрольний зразок - без додавання НА – Fe_3O_4 – Alg. Визначення життєздатності клітин проводили з застосуванням барвника формазану методом спектрофотометричної адсорбції при довжині хвилі УФ

випромінювання 570 нм та за допомогою спеціального програмного забезпечення (Biotek PowerWave 340, США). Життєздатний стан NIH-3T3 клітин підтверджували за допомогою інвертованої фазово-контрастної мікроскопії. Експерименти повторювали тричі. Відсоток життєздатності клітин оцінювали за рівнянням, як співвідношення оптичних густин клітин в експериментальному та контрольному середовищах. Адгезія, розповсюдження та подальша проліферація клітин досліджувались після 3- та 5-денного культивування (флуоресцентний мікроскоп Zeiss AxioVert 25, Німеччина). Мікрофотографії клітин отримували через 5 днів культивування.

Біосумісність композиційного матеріалу *in vitro* оцінювали за рівнем життєздатності, адгезивними властивостями, морфологією, ступенем проліферації та диференціації клітин. На рис. 12.1а,б представлено цитологічне дослідження стану культивованих фібробластів.

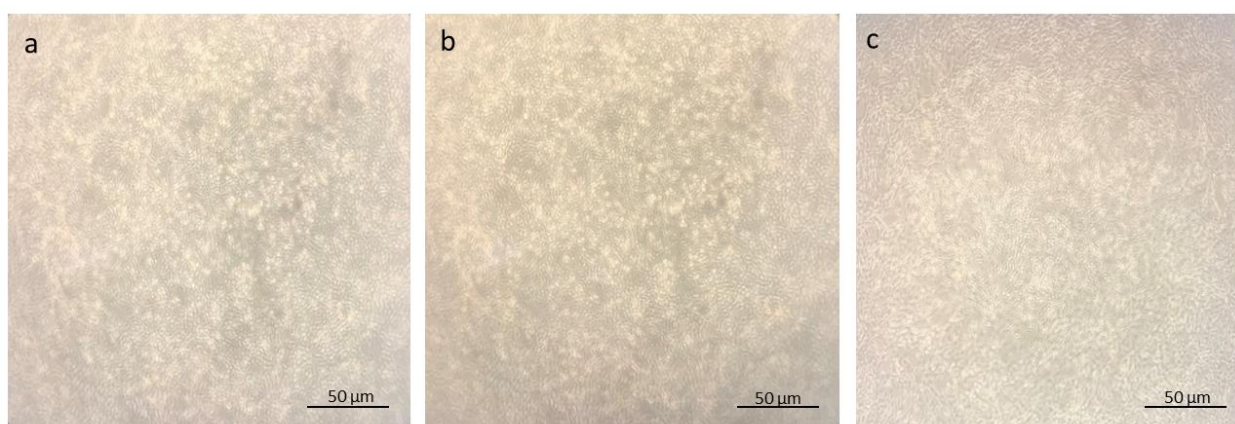


Рисунок 12.1 – Морфологія клітин фібробластів а) - протягом 3 днів; б) протягом 5 днів культивування з матеріалами HA-Fe₃O₄ гідрогель та HA-Fe₃O₄-Alg; в) – 5 днів без експериментальних зразків,(X50)

На 3-й день у культурах з експериментальними зразками і в контрольній культурі відмінностей не виявлено. Структурна організація клітин свідчила про їх приналежність до молодих фібробластів. На 5-й день культивування спостерігалось значне збільшення щільності клітин. І це були клітини переважно зрілі фібробласти, які зберігали свій фенотип у культурах.

Дослідження цитотоксичності було проведено для зразків, представлених в двох агрегатних формах - гідрогелі та гранули. Вивчення кількості мертвих клітин та загальної кількості клітин у культурах проводили на 3 і 5 день після впливу зразків на культуральне середовище. Розподіл загальної кількості клітин і кількості мертвих клітин за участю експериментальних зразків не мали суттєвої різниці порівняно з контролем культури (табл. 12.1, рис. 12.2).

Таблиця 12.1 – Динаміка виживання та проліферації клітин при контакті з експериментальними зразками ($p \leq 0,05$).

Зразок	3 дні		5 днів		Збільшення загальної кількості клітин за 2 дні, %
	Загальна кількість клітин	Кількість мертвих клітин, в т.ч. %	Загальна кількість клітин	Кількість мертвих клітин, в т.ч. %	
Культура (контроль)	1.98×10^4	6.93×10^2 3.5 %	3.21×10^4	1.96×10^3 6.1 %	62.1
HA-Alg гранули	1.81×10^4	1.41×10^3 7.8 %	2.96×10^4	1.09×10^3 10.9 %	63.5
HA-Fe ₃ O ₄ гідрогель	1.83×10^4	7.69×10^2 4.2 %	2.95×10^4	1.59×10^3 5.4 %	61.2
HA-Fe ₃ O ₄ -Alg гранули	1.92×10^4	1.94×10^3 10.1 %	3.02×10^4	3.90×10^3 12.9 %	57.3

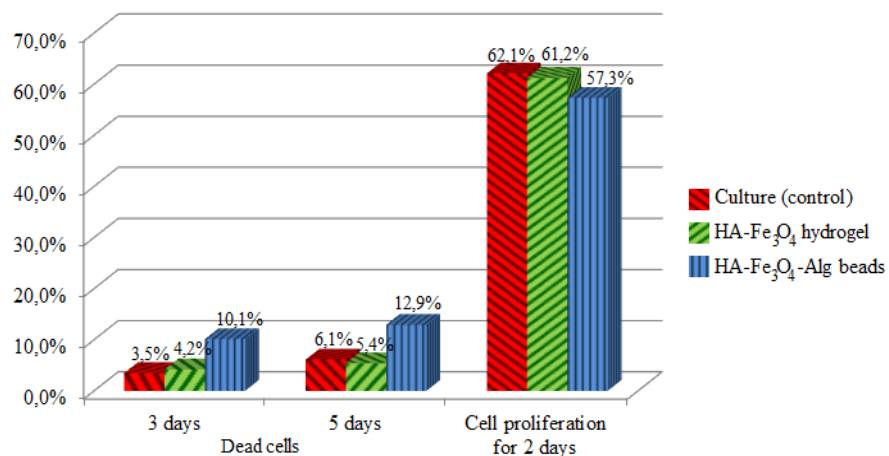


Рисунок 12.2 – Порівняльна характеристика впливу експериментальних зразків на поведінку клітин у поживному середовищі

Кількість мертвих клітин контрольної культури через 5 днів культивування становила 6,1%; тоді як для експериментальних культур з гідрогелем НА – Fe₃O₄ та гранулами НА – Fe₃O₄ – Alg, ці значення становили 5,4% та 12,9% відповідно, що не перевищує допустимі межі для первинних культур. Увага звертається до того факту, що найбільша кількість загиблих клітин (12,9%) зареєстрована для зразка гранул з магнетитом НА – Fe₃O₄ – Alg. Ріст клітин протягом 3-5 днів для цієї вибірки також є найменшим (57,3%) порівняно з контролем та зразками гідрогелю. Експериментальні дані показують, що поведінка остеобластів і фібробластів залежить від структурних особливостей агрегатної форми матеріалу. Так, для гідрогелю НА – Fe₃O₄ характерна менша кількість мертвих клітин. Більше того, ці зразки мають вищий ступінь проліферації клітин у період від 3 до 5 днів порівняно до гранул НА – Fe₃O₄ – Alg. Цей факт можна пояснити наступним чином: гідрогель має більш розвинену поверхню, що передбачає більш високий ступінь контакту між гідроксиапатитом та клітинами. Отже, НА сприяє клітинному розвитку виживання та їх розповсюдження. З іншого боку, макромолекули альгінату натрію, як відомо, є поживною речовиною для проліферації клітин. У випадку з гранулами контакт клітин з НА відбувається лише на їх поверхні, що знижує рівень виживання клітин. Очевидно, що Fe₃O₄ частинки також впливають на поведінку фібробластів.

Зразки, що містять магнетит, демонструють нижчий ступінь проліферації порівняно з гранулами НА – Alg без магнетиту. Для цього зразка, який також використовувався в експерименті (таб. 12.1), кількість мертвих клітин через 5 днів впливу становила 10,9%, що також не перевищує допустиму межу для первинних культур. Крім того, зростання кількості клітин в період від 3 до 5 днів становило 63,5%, що є найвищим показником порівняно з результатами інших зразків. Таким чином, застосований вміст частинок магнетиту (1% до НА у перерахунку на сухі речовини) не виявляє негативного впливу на життєздатність клітин. Адгезивні та проліферативні властивості клітин, оцінені за допомогою флуоресцентної мікроскопії,

приведені на рис. 12.2. Для візуалізації клітин, їх попередньо фарбували фторогенним барвником DHR-123, який забезпечує флуоресценцію активних клітини в метаболізмі зеленим кольором.

Фібробласти, що виростили в контрольному середовищі через 48 год, мали типову веретеноподібну морфологію та покривали дно пластини лунки. Однак фібробласти, вирощені на целюлозних мембранах, мали круглу морфологію через 2 дні культивування (рис. 12.3 а ,b). Причина відмінностей у фенотипі клітин на поверхні пластикових пластин, гідрогелів НА – Fe₃O₄ та гранул НА – Alg – Fe₃O₄ пов'язана з різницею субстратів. Було показано, що клітини демонструють більш широку та рівну морфологію на жорстких підкладках, ніж на м'яких. Слід відзначити, що фібробласти, які росли в середовищі, що містить НА–Alg, через 48 год показали утворення веретеноподібної структури з хорошим покриттям дна, схожої до структури контролю. Клітини характеризувались нормальною морфологією і проявляли хорошу адгезивну здатність. Зелена флуоресценція культивованих клітин свідчить про їх метаболічну активність.

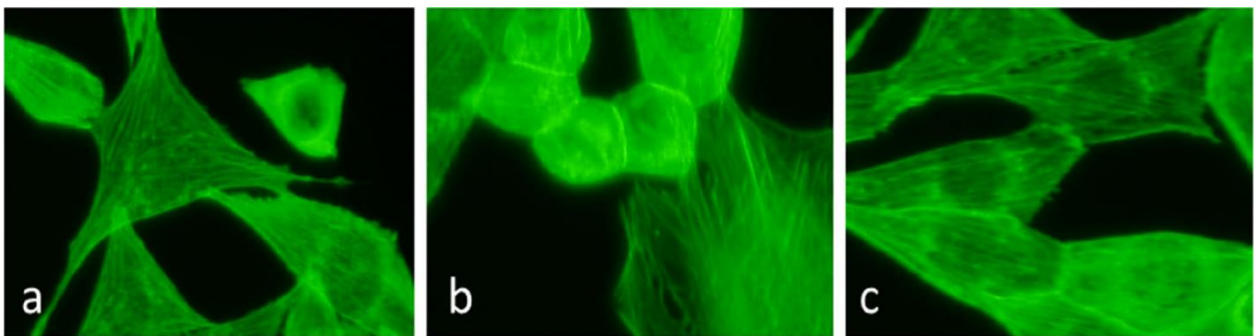


Рисунок 12.3 – Флуоресцентні зображення клітин NIH-3T3, культивованих з експериментальними зразками: а) контроль; б) гідрогель НА – Fe₃O₄; с) НА – Alg – Fe₃O₄

Висновок:

Досліджені цитологічні характеристики фібробластів щодо композитів на основі НА з вмістом магнетиту. Збільшення загальної кількості клітин у

культурах, спосіб їх облаштування, кількість деструктивно модифікованих та мертвих клітин підтверджують стійкий ріст фіброblastів на 5-й день експерименту як в контролі, так і в експериментальній серії зразків. Наявність застосованої концентрації магнетиту (1% від НА) в живильному середовищі не впливали на життєздатність клітин, що підтверджує біосумісність експериментальних зразків. Хоча результати *in vitro* досліджень не можна екстраполювати на *in vivo*, вони можуть надати дуже цінну інформацію для тканинної інженерії.

12.2 Дослідження протимікробної активності щодо мікроорганізмів E.coli, K. pneumonia, S. aureus біоактивних покриттів на основі НА та цинку сульфідів (ZnS), нанесених на модельні титанові імплантати

Для дослідження та порівняння протимікробної активності були взяті зразки покриттів з цинку сульфідів (ZnS) та цинку сульфідів, утвореного в присутності альгінату натрію (ZnS-Alg). Покриття були нанесені на модельні титанові субстрати методом термодепозиції. Результати дослідження приведені на рис. 12.4 та в таблиці 12.2.

Аналіз експериментальних даних показав, що більш високу антимікробну активність проявляють ZnS-Alg покриття. Відомо, що антимікробні властивості наночастинок цинкових сполук забезпечуються перш за все їх високою реакційною здатністю, яка визначається розміром наночастинок (менше 100 нм) [140]. У нашому експерименті введення альгінату у структуру призводить до зменшення розміру кристалітів, що може впливати на ступінь протимікробної дії. Також при розчиненні ZnS утворюється сульфідний аніон, в якому атом сірки має нерозділену пару електронів. Таким чином, даний аніон може утворювати донорно-акцепторні зв'язки з функціональними групами компонентів клітинної стінки бактерій, порушуючи їх метаболізм.

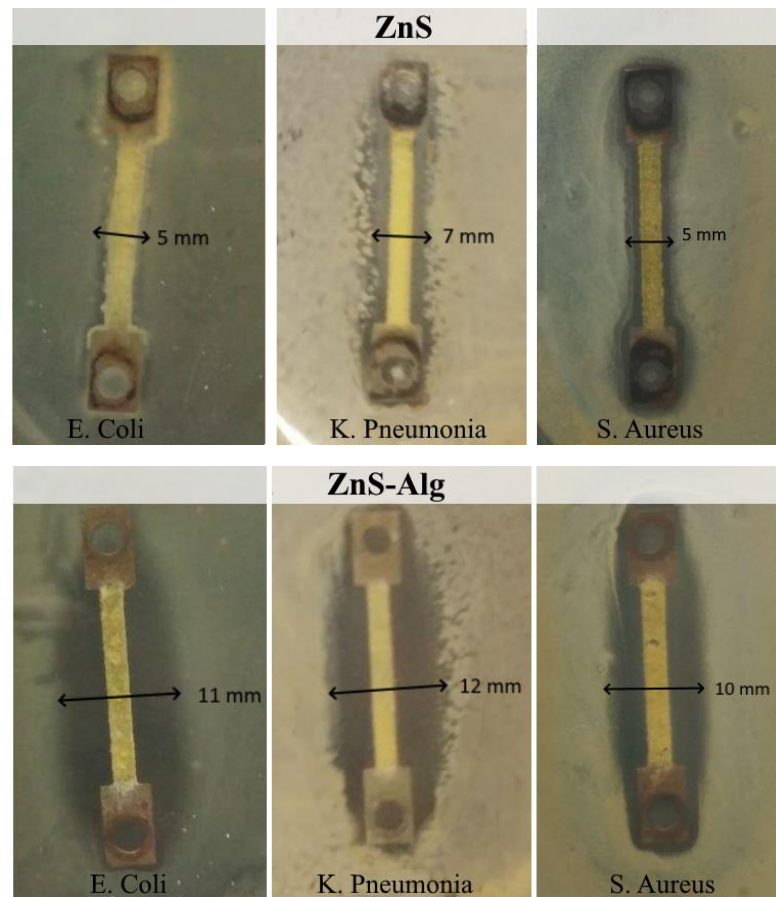


Рисунок 12.4 – Протимікробна активність ZnS та ZnS-Alg покриттів щодо мікроорганізмів *E.coli*, *K. pneumonia*, *S. aureus*.

Таблиця 12.2 – Зони затримки росту бактеріальних культур під дією експериментальних покриттів, $p \leq 0,05$

Мікроорганізм	Зона затримки росту, мм	
	ZnS	ZnS-Alg
<i>E. Coli</i>	5±0.2	11±0.5
<i>K. pneumonia</i>	7±0.25	12±0.55
<i>S. Aureus</i>	5±0.2	10±0.5

Наукові джерела дають два основні механізми протимікробної дії частинок сполук цинку: а) токсичний вплив іонів цинку на клітинну мембрану бактерій; б) токсичність ROS (реактивні частинки кисню), утворені за участю ZnO та ZnS, на компоненти бактеріальної клітини. Основний

механізм антибактеріальної дії синтезованих покриттів на основі наночастинок ZnS-Alg пов'язаний з розвитком оксидативного стресу, який зумовлений взаємодією нанокристалів ZnS з клітинами мікроорганізмів. Антибактеріальна активність є результатом утворення ROS, як перекис водню (H_2O_2), аніон пероксиду (O^{2-}), гідроксильні радикали (OH^\cdot). Ці частинки пошкоджують клітинні компоненти, такі як ДНК, ліпіди та білки [103]. Позитивно заряджені іони цинку також можуть безпосередньо взаємодіяти з негативно зарядженими компонентами бактеріальної стінки [141]. Також відомо, що композити, з вмістом ZnO, порушують цілісність клітинної мембрани, що призводить до пошкодження мембранних білків і ліпідного шару [142].

Висновок:

Методом термічної депозиції були отримані HA, ZnS та ZnS-Alg покриття з протимікробними властивостями на модельних титанових субстратах. Доведена протимікробна активність покриттів ZnS та ZnS-Alg. При чому ZnS-Alg покриття демонструють вищий ступінь протимікробної активності за рахунок специфічних електростатичних взаємодій з компонентами мембран бактеріальних клітин. Представлені результати підкреслюють можливе використання наночастинок ZnS у різних біологічних матеріалах. Основними механізмами протимікробної дії частинок сполук цинку є: а) токсичний вплив іонів цинку на клітинну мембрану бактерій; б) токсичність ROS (реактивні частинки кисню), утворених за участю ZnO та ZnS, на компоненти бактеріальних клітин.

12.3 In vivo дослідження композитного матеріалу у вигляді альгінат-хітозанового поліелектролітного пористого каркасу з різним вмістом ZnO та з сорбційними властивостями

Під час експерименту всі експериментальні тварини перебували в належних умовах під наглядом ветеринара. Експериментальна робота проводилась відповідно до міжнародних вимог щодо гуманного поводження з тваринами з дотриманням правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Рада Європи, 18.03.1986). Всі експерименти з тваринами були схвалені комісією з етики СумДУ (Протокол No2 / 17 від 14 лютого 2019 р.).

Не всі властивості НА достатньо вивчені в умовах живого організму, де роль ферментів не можна переоцінити. Біологічна сумісність НА, його природне походження, здатність сорбувати білки та продукти їх розпаду, бактеріальні токсини, мікробні клітини і рідини, при цьому пролонговано вивільняючи в міжтканинну рідину нанорозмірні частинки цинку, срібла та ін., що входять до складу композиту, роблять його універсальним сорбентом з можливістю моделювання його властивостей шляхом включення антисептичних або антибактеріальних препаратів. Можна допускати можливість створення матеріалу на основі НА, як універсального сорбенту з властивостями лікувального препарату, який, перебуваючи в біологічному середовищі, діє на макроорганізм і проявляє локальну терапевтичну дію.

Проведеним в ході цього проекту експериментом започатковано створення, дослідження та потенційне впровадження в практичну діяльність лікарів так званих дренажних систем для лікування вогнищ гнійних запалень. Такий підхід дозволить знизити кількість застосовуваних антибіотиків (як дозування так і тривалість прийому), поліпшити ефективність лікування за рахунок загальної і місцевої дії композитів на основі НА, за рахунок

наданих їм дезінтоксикаційних, протизапальних і антибактеріальних властивостей, які зменшать терміни перебування пацієнта в лікарні і вартість лікування.

Композитний матеріал у вигляді альгінат-хітозанового поліелекторолітного пористого каркасу та модифікації його дрібнодисперсними (≤ 63 мкм) частинками наноструктурованого гідроксиapatиту був досліджений *in vivo*. У якості біоактивного лікувального агенту виступають частинки оксиду цинку, які проявляють протимікробні властивості та надають матеріалу додаткової механічної міцності. Крім того, до складу аплікаційного композиту включений антибіотик III покоління-цефтріаксон. В медицині широко використовуються сорбенти на основі біополімерів, у тому числі природних органічних волокон («харчові волокна») – полісахаридів, поліфенолів, тощо. Застосовані полісахариди природного походження (хітозан, альгінат) надають синтезованому матеріалу гідрофільності завдяки поверхневим кисневмісним групам: гідроксильній, карбонільній, карбоксильній. Висока сорбційна здатність гідроксиapatиту та полісахаридів дозволяє іммобілізувати лікарський засіб в структурі композиту. Як раніше було доведено [132], вказані біополімери забезпечують пролонговане вивільнення лікарського засобу в оточуюче середовище. Завдяки застосованій технології синтезу та ліофільної сублімації, аплікований композитний матеріал забезпечений еластичністю, механічною міцністю, характеристиками водопоглинання, біосумісністю та тривимірною взаємопроникаючою структурою каналів або пористістю. Розмір пор впливає на рівномірність розподілу негативного тиску в процесі дренажу та дренажний ефект ранового секрету і некротичної тканини.

Попередні *in vivo* дослідження новоствореного дренажу були проведені на білих мишах вагою 50 -100 г з штучно викликаним перитонітом шляхом введення суспензії *E. Coli ATCC 25922* (10^{10} КУО/мл в кількості 1.0-1.5 мл на тваринку). На 4 добу після введення інфекційного агента при ревізії черевної порожнини виявлені яскраві ознаки розлитого гнійного перитоніту (рис.

12.5,а) та встановлений зразок дренажної системи з аплікацією біополімер-гідроксиапатитного композиту(рис. 12.5,б).

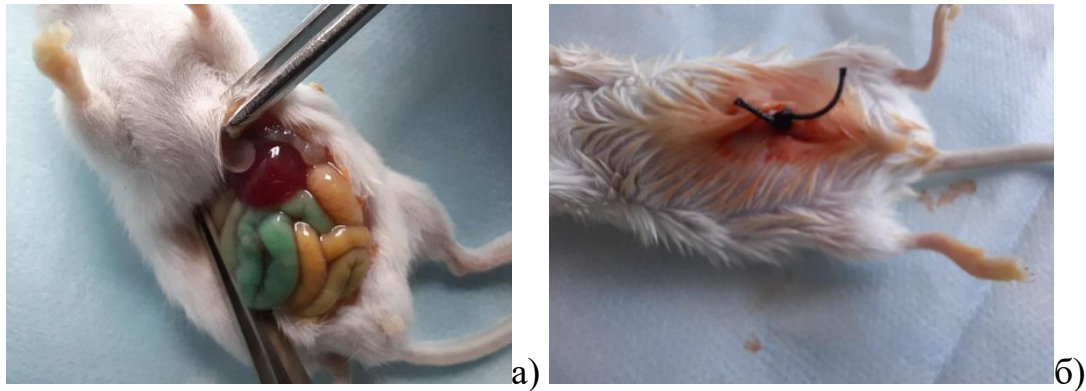


Рисунок 12.5 – In vivo дослідження на білих лабораторних мишах:а)- картина штучно викликаного перитоніту; б)- імплантований композитний матеріал на основі НА

Імплантація була проведена під наркозом (кетамін 50мг/кг), контроль проводили через 1,2,3 доби шляхом виведення тварин з експерименту передозуванням кетаміну (100мг/кг). Досліджували бактеріальний склад перитонеального випоту, гістологічні зміни в печінці, нирках, кишці, очеревині.

Був досліджений бактеріальний вміст черевної порожнини на 4,5,6,7, добу після внесення суспензії *E. Coli ATCC 25922* для набуття еспериментальними тваринами стану розвинутого перитоніту, та через 1,2,3 доби після імплантації композитного матеріалу на основі НА та з вмістом частинок ZnO. Для цього досліджуваний матеріал брали стерильним ватним тампоном вносили у пробірку з 5мл ізотонічного розчину , тампон ретельно струшували, отриману суміш наносили по 0,1см³ на 5% кров'яний агар в чашки Петрі, які з посівами інкубували при температурі 37±1°C протягом 24 годин. Підрахунок числа колоній, що вирости, перераховували на 1см³ розчину.

Результати оцінювання бактеріального вмісту черевної порожнини експериментальних 3,4, 5 груп представлені в таблиці 12.3.

Таблиця 12.3 – Оцінка змін бактеріальної флори(*E. Coli ATCC 25922*) черевної порожнини за імплантації композитного матеріалу з вмістом НА , ZnO ,а також звичайного силіконового дренажу.

Група	1 доба	2 доба	3 доба	4 доба	5 доба	6 доба	7 доба
1.Контроль лінії тварин							
2.Контроль(без перитоніту) з імплантованим композитом на основі НА	-						
3.Контроль інфекційного агента	Введення <i>E.coli</i> 10 ¹⁰ КУО/мл			<i>E.coli</i> 10 ⁵ КУО/мл	<i>E.coli</i> 10 ⁶ КУО/мл	<i>E.coli</i> 10 ⁷ КУО/мл	<i>E.coli</i> 10 ⁷ КУО/мл
4.Модель перитоніту з імплантованим композитом на основі НА	Введення <i>E.coli</i> 10 ¹⁰ КУО/мл			Імплантація матеріалу на основі НА <i>E.coli</i> 10 ⁵ КУО/мл	<i>E.coli</i> 10 ⁴ КУО/мл	<i>E.coli</i> 10 ³ КУО/мл	<i>E.coli</i> 10 ²⁻³ КУО/мл
5. Модель перитоніту з силіконовою трубкою в якості дренажу	Введення <i>E.coli</i> 10 ¹⁰ КУО/мл			<i>E.coli</i> 10 ⁵ КУО/мл	<i>E.coli</i> 10 ⁶ КУО/мл	<i>E.coli</i> 10 ⁶ КУО/мл	<i>E.coli</i> 10 ⁶⁻⁷ КУО/мл

Для підтвердження антибактеріальних властивостей синтезованих композитів було проведено визначення чутливості культур мікроорганізмів , які найбільш частіше зустрічаються в перитонеальному випоті *E. Coli ATCC 25922*, *Kl.pneumoniae*, *S.aureus ATCC 25923*. Облік результатів визначення чутливості проводився диско-дифузійним методом EUCAST. Визначали чутливість мікроорганізмів до композитних матеріалів на основі НА з вмістом біоактивних частинок ZnO в різних концентраціях 10%, 20%, 30% . у вигляді гелю та твердої субстанції, що може в перспективі застосовуватись у якості покриття для силіконових дренажних трубок. Попередні результати протимікробних досліджень представлені на рис. 12.6 та в таблиці 12.4.

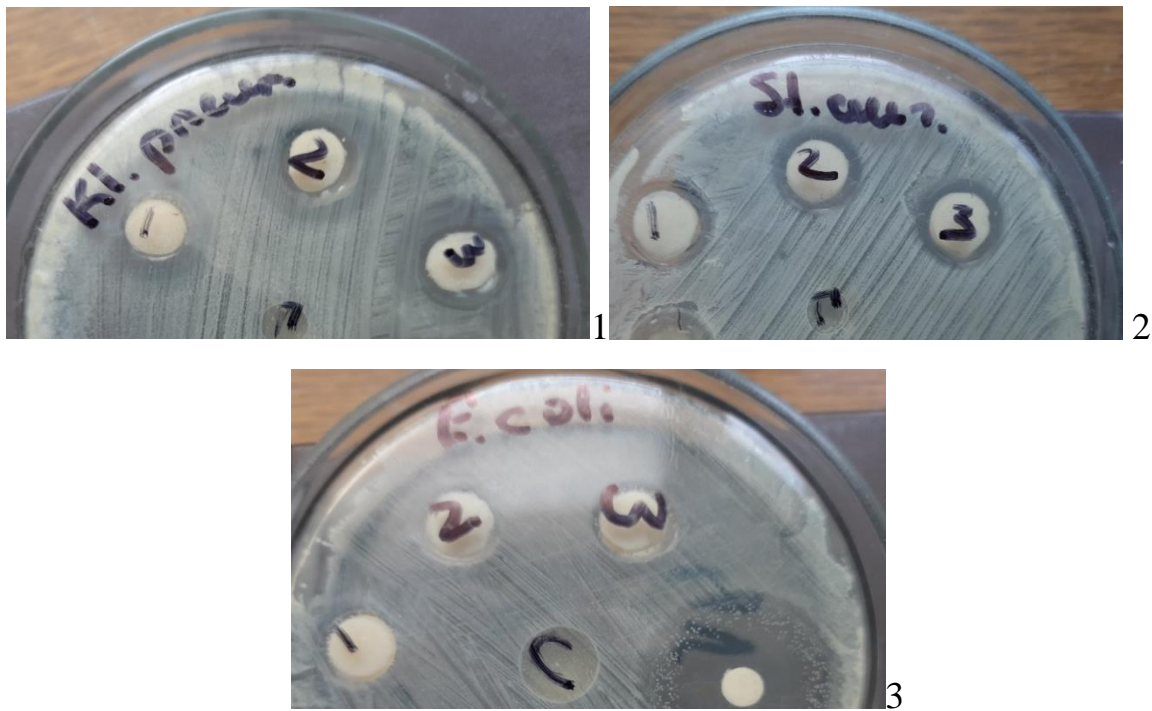


Рисунок 12.6 – Чутливість мікроорганізмів, 1) *Kl.pneumoniae*, 2) *S.aureus* ATCC 25923, 3) *E. Coli* ATCC 25922 щодо композитів з вмістом ZnO в кількості 10, 15, 20% по відношенню до вмісту НА (1,2,3 відповідно на чашках Петрі).

Таблиця 12.4 – Протимікробна активність зразків композитного матеріалу на основі НА з вмістом ZnO.

Мікрофлора	Вміст ZnO,%; Зона пригнічення росту, мм			
	10%	15%	20%	гель
<i>E. Coli</i> ATCC 25922	12мм	12мм	12мм	0мм
<i>Kl.pneumoniae</i> ,	14мм	20-21мм	20-21мм	0мм
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	15мм	15мм	16мм	14мм

Примітка $p \leq 0,05$.

Висновки:

Композитний матеріал на основі НА з вмістом ZnO є ефективним в якості адсорбента білків та продуктів їх розпаду, бактеріальних токсинів, мікробних клітин і рідини при дренажуванні черевної порожнини у щурів в умовах змодельованого перитоніту. Підтверджена біологічна безпечність

імплантованого матеріалу та відсутність будь яких ускладнень. Про це свідчить дослідження тварин 2ї групи (з імплантованим композитом, без перитоніту), які протягом експерименту були абсолютно здорові, рухливі, своєю поведінкою та фізіологічними відправленнями не відрізнялись від тварин контрольної 1ї групи. Шляхом візуального порівняння морфологічних змін в черевній порожнині тварин 4ї та 5 груп виявлено значне зменшення ексудату у тварин з імплантованим композитним матеріалом на основі НА. Бактеріологічні дослідження довели зменшення кількості мікробних *E. Coli* клітин через 3 доби на 10^4 КУО/мл, що свідчить про бактеріостатичну дію дослідного матеріалу.

ВИСНОВКИ

Розроблено методику хімічного синтезу наноструктурованого біоматеріалу на основі кдГА, Alg, іонів Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} у формі плівок (< 1 мм) або скафолдів для заповнення ясневих кишень при парадонтозі або аплікацій на ясна, з вмістом хлоргексидину (СН)-речовини з антибактеріальними властивостями.

Встановлена відмінність у вивільненні СН з матеріалу в залежності від вмісту Alg для трьох груп зразків (висушених при 37°C , ліофілізованих при -55°C , відпалених при 1100°C): максимальне вивільнення СН в PBS досягається протягом 72 годин з максимальною швидкістю для ліофілізованих зразків – 0.04 мг/л; 0.83 мкг/г відповідно.

Розроблено методику синтезу гібридного матеріалу на основі кдГА, Alg з добавками багатостінних вуглецевих нанотрубок ($\text{MWCNTs}+\text{Fe}^{2+}$) з метою підвищення структурної цілостності гранул та пролонгованого вивільнення СН до 24 годин при заповненні кісткових дефектів різної геометрії.

Розроблено методику синтезу композитного матеріалу на основі ГА, хітозану (CS) під впливом мікрохвильового опромінення (МХО) різної потужності (P); знайдено, що розміри кристалітів ГА завдяки макромолекул CS і впливу МХО зменшуються від 31 нм (P=300Вт) до 24 нм (P=800Вт).

Проведені біологічні дослідження отриманих композитів, а саме складу та форми зразків, які слабо впливають на біосумісність, так само як і неорганічні домішки (Ag^+ , Fe_3O_4 , ZnO) на цитотоксичність остеобластів і фібробластів.

Розроблено методику хімічного, «мокрого» синтезу композитного біоматеріалу у формі гранул на основі кдГА, Alg та оксиду графену (GO) для потенційного використання в ортопедії.

Встановлено, що додавання наночастинок GO суттєво підвищує пружні властивості композиту, про що свідчить зростання модуля Юнга від 0.79 GPa

(без GO) до 1.3 GPa (з GO); також зростає пролонговане вивільнення СН із композиту до 48 годин.

Створено композит з підвищеними протимікробними властивостями у формі гідрогелю та гранул на основі ГА, Alg з добавками мікрочастинок ZnO під впливом МХО. Знайдено, що додавання мікрочастинок ZnO збільшує пористість композиту в 5 разів і підвищує його набрякання у кислому (рН 4.5) середовищі.

На основі термодепозиції у водних розчинах, розроблена технологія отримання однофазних CaP покриттів на Ti6Al4V субстратах (модель Ti медичних імплантатів) після плазмо-електролітичної обробки (ПЕО): кдГА покриття (300 мкм) отримано при температурі субстрату 140°C, а DCPD (брушит, 50 мкм) – 85°C.

Розроблено методику синтезу поліелектролітного композиту на основі ГА (кдГА), Alg, CS у формі мембран із вмістом наночастинок фулерену C60; встановлено, що включення C60 в композит веде до зниження ступеня набрякання на ~ 60 %, підвищенню протимікробної дії (0.004 мг/мл C60 проти S.aureus та E.coli : ZOI: 16±1 та 10±2 мм відповідно) і пролонгованого вивільнення СН до 48 годин; МХО (P=600 Вт) значно (до 3 хв) скорочує час утворення ГА-CS гідрогелю і не впливає на структуру CS.

Розроблено методику хімічного синтезу композитного матеріалу у формі гідрогелю та гранул на основі кдГА, Alg та C60 під впливом ультразвуку (УЗ) з метою підвищення протимікробних властивостей біоматеріалу.

Знайдено, що система штамів S.aureus ATCC 25923, S.aureus ОНУ 443, P.Vulgaris ATCC 6896 проявляють підвищену чутливість до гранульованої форми матеріалу.

Продемонстровано пролонговане (до 96 днів) вивільнення диклофенаку натрію (ДН) - препарату з вираженими знеболювальними/протизапальними властивостями – з гранульованого композиту з вмістом C60 (0.05 та 0.5 мг на 1 мл Alg розчину) внаслідок сорбційних властивостей ГА та Alg.

Розроблено низку методів нанесення біоміметичних покриттів на основі ГА, CS, Alg, ZnS, Ag⁺ на модельні титанові імплантати, а також виявлено, що додавання С60 до маточного розчину у концентрації 4.5 мкг/мл сприяє осадженню ГА-CS-F композиту в 2 рази, а також характеризується пролонгованим вивільненням ДН до 24 годин; ZnS-Alg покриття за рахунок специфічних електростатичних взаємодій має найвищу ступінь протимікробної дії щодо E.coli, K.pneumonia, S.aureus бактеріальних клітин.

In vitro дослідження отриманих матеріалів на основі ГА/кдГА, SWCNTs, Fe₃O₄, Alg довели життєздатність клітин остеобластів людини, стимуляцію проліферації остеобластів протягом триденного культивування з експериментальними ГА-Alg-SWCNTs – композитами порівняно з контрольною ТКК пластиною.

Розпочато створення експериментального зразку на основі Alg-CS поліелектролітного скафолду з вмістом мікро- і наночастинок ZnO в якості ефективного сорбенту білків та продуктів їх розпаду, бактеріальних токсинів, мікробних клітин при дренажуванні черевної порожнини за наявності гнійно-запальних вогнищ.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Laurenti M., Cauda V. ZnO Nanostructures for Tissue Engineering Applications // *Nanomaterials*. 2017. Vol. 7, № 11.
2. Tripathi A. et al. Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper–zinc for bone tissue engineering // *Int. J. Biol. Macromol.* 2012. Vol. 50, № 1.
3. Ronen A., Semiat R., Dosoretz C.G. Antibacterial Efficiency of a Composite Spacer Containing Zinc Oxide Nanoparticles // *Procedia Eng.* 2012. Vol. 44.
4. Hie M. et al. Zinc deficiency decreases osteoblasts and osteoclasts associated with the reduced expression of Runx2 and RANK // *Bone*. 2011. Vol. 49, № 6.
5. Nagata M., Lönnerdal B. Role of zinc in cellular zinc trafficking and mineralization in a murine osteoblast-like cell line // *J. Nutr. Biochem.* 2011. Vol. 22, № 2.
6. Zhang Y. et al. Nano Ag/ZnO-Incorporated Hydroxyapatite Composite Coatings: Highly Effective Infection Prevention and Excellent Osteointegration // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2018. Vol. 10, № 1.
7. Li Q. et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications // *Water Res.* 2008. Vol. 42, № 18.
8. Moldovan M. et al. Structural and morphological properties of HA-ZnO powders prepared for biomaterials // *Open Chem.* 2015. Vol. 13, № 1.
9. Raffa V. et al. Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells // *Int. J. Nanomedicine*. 2011.
10. Raghupathi K.R., Koodali R.T., Manna A.C. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles // *Langmuir*. 2011. Vol. 27, № 7.
11. Gunalan S., Sivaraj R., Rajendran V. Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens // *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 2012.

- Vol. 22, № 6.
12. Ma J. et al. Development of polymer composites using modified, high-structural integrity graphene platelets // *Compos. Sci. Technol.* 2014. Vol. 91.
 13. Zhao X. et al. Enhanced Mechanical Properties of Graphene-Based Poly(vinyl alcohol) Composites // *Macromolecules.* 2010. Vol. 43, № 5.
 14. Qu Y. et al. Advances on graphene-based nanomaterials for biomedical applications // *Mater. Sci. Eng. C.* 2018. Vol. 90.
 15. Chwalibog A. et al. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells // *Int. J. Nanomedicine.* 2013.
 16. Kang Y. et al. Graphene oxide and reduced graphene oxide induced neural pheochromocytoma-derived PC12 cell lines apoptosis and cell cycle alterations via the ERK signaling pathways // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. Vol. Volume 12.
 17. Li M. et al. An overview of graphene-based hydroxyapatite composites for orthopedic applications // *Bioact. Mater.* 2018. Vol. 3, № 1.
 18. Markovic Z., Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60) // *Biomaterials.* 2008. Vol. 29, № 26.
 19. Grebinyk A. et al. C60 fullerene accumulation in human leukemic cells and perspectives of LED-mediated photodynamic therapy // *Free Radic. Biol. Med.* 2018. Vol. 124.
 20. Yudoh K. Water-soluble fullerene (C60) inhibits the osteoclast differentiation and bone destruction in arthritis // *Int. J. Nanomedicine.* 2009.
 21. Lyon D.Y. et al. Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size [†] // *Environ. Sci. Technol.* 2006. Vol. 40, № 14.
 22. Franskevych D. et al. Fullerene C60 Penetration into Leukemic Cells and Its Photoinduced Cytotoxic Effects // *Nanoscale Res. Lett.* 2017. Vol. 12, № 1.
 23. Prylutska S. V. et al. Complex of C60 Fullerene with Doxorubicin as a Promising Agent in Antitumor Therapy // *Nanoscale Res. Lett.* 2015. Vol.

- 10, № 1.
24. Epple M. Biomaterials and biomineralization. Tomsk: Wind, 2007. undefined-165 p.
 25. Zhao G. et al. Effect of milling conditions on the properties of HA/Ti feedstock powders and plasma-sprayed coatings // Surf. Coatings Technol. 2014. Vol. 251.
 26. Fakhri Nabavi H., Aliofkhaezrai M., Sabour Rouhaghdam A. Morphology and corrosion resistance of hybrid plasma electrolytic oxidation on CP-Ti // Surf. Coatings Technol. 2017. Vol. 322.
 27. Kazek-Kęsik A. et al. PLGA-amoxicillin-loaded layer formed on anodized Ti alloy as a hybrid material for dental implant applications // Mater. Sci. Eng. C. 2019. Vol. 94.
 28. Choi J.W. et al. Synthesis of Zirconium–Titanium oxide mixed layers on Ti substrates by plasma electrolytic oxidation and plasma-enhanced electrophoresis // J. Alloys Compd. 2017. Vol. 726.
 29. Truc N.T. et al. Modification of type I collagen on TiO₂ surface using electrochemical deposition // Surf. Coatings Technol. 2018. Vol. 344.
 30. Jarosz M. et al. Nanoporous anodic titanium dioxide layers as potential drug delivery systems: Drug release kinetics and mechanism // Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2016. Vol. 143.
 31. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications // Mater. Sci. Eng. C. 2015. Vol. 55.
 32. Kuroda K., Okido M. Hydroxyapatite Coating of Titanium Implants Using Hydroprocessing and Evaluation of Their Osteoconductivity // Bioinorg. Chem. Appl. 2012. Vol. 2012.
 33. Yanovska A. et al. A study of brushite crystallization from calcium-phosphate solution in the presence of magnesium under the action of a low magnetic field // Mater. Sci. Eng. C. 2012. Vol. 32, № 7.
 34. Suchanek W., Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants // J. Mater.

- Res. 1998. Vol. 13, № 1.
35. Uswatta S.P., Okeke I.U., Jayasuriya A.C. Injectable porous nano-hydroxyapatite/chitosan/tripolyphosphate scaffolds with improved compressive strength for bone regeneration // *Mater. Sci. Eng. C*. 2016. Vol. 69.
 36. Sukhodub L. Antimicrobial activity of Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ ions doped chitosan nanoparticles // *Ann. Mechnikov Inst.* 2015. Vol. 1. P. 39–43.
 37. Kuznetsov V., Sukhodub L., Sukhodub L. Structural and Substructural Features of Apatite-biopolymer Composites: the Comparison of Data Obtained Using X-Ray Diffraction and Scanning Electron Microscopy with Electron Diffraction // *J Nano- Electron. Phys.* 2014. Vol. 4. P. 04039–04045.
 38. Dubnika A., Loca D., Berzina-Cimdina L. Functionalized hydroxyapatite scaffolds coated with sodium alginate and chitosan for controlled drug delivery // *Proc. Est. Acad. Sci.* 2012. Vol. 61, № 3.
 39. Anita Lett J., Sundareswari M., Ravichandran K. Porous hydroxyapatite scaffolds for orthopedic and dental applications - the role of binders // *Mater. Today Proc.* 2016. Vol. 3, № 6.
 40. Kovtun A. et al. Chlorhexidine-loaded calcium phosphatenanoparticles for dental maintenance treatment: combination of mineralising and antibacterial effects // *RSC Adv.* 2012. Vol. 2, № 3.
 41. Soskolne W.A. et al. Sustained Local Delivery of Chlorhexidine in the Treatment of Periodontitis: A Multi-Center Study // *J. Periodontol.* 1997. Vol. 68, № 1.
 42. Soskolne W.A. et al. An in vivo Study of the chlorhexidine release profile of the PerioChip™ in the gingival crevicular fluid, plasma and urine // *J. Clin. Periodontol.* 1998. Vol. 25, № 12.
 43. Arends J. et al. A calcium hydroxyapatite precipitated from an aqueous solution // *J. Cryst. Growth.* 1987. Vol. 84, № 3.
 44. Kee C.C., Ismail H., Mohd Noor A.F. Effect of Synthesis Technique and

- Carbonate Content on the Crystallinity and Morphology of Carbonated Hydroxyapatite // *J. Mater. Sci. Technol.* 2013. Vol. 29, № 8.
45. Neuman W.F., Toribara T.Y., Mulryan B.J. The Surface Chemistry of Bone. IX. Carbonate: Phosphate Exchange ¹ // *J. Am. Chem. Soc.* 1956. Vol. 78, № 17.
 46. Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z., Paluszkiewicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods // *J. Mol. Struct.* 2005. Vol. 744–747.
 47. Fowler B.O. Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution // *Inorg. Chem.* 1974. Vol. 13, № 1.
 48. Kailasanathan C., Selvakumar N., Naidu V. Structure and properties of titania reinforced nano-hydroxyapatite/gelatin bio-composites for bone graft materials // *Ceram. Int.* 2012. Vol. 38, № 1.
 49. Pereira R. et al. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications // *Int. J. Biol. Macromol.* 2013. Vol. 52.
 50. Malesu V.K., Sahoo D., Nayak P.L. Chitosan–sodium alginate nanocomposites blended with cloisite 30b as a novel drug delivery system for anticancer drug curcumin // *Int. J. Appl. Biol. Pharm. Technol.* 2011. Vol. 3. P. 402–411.
 51. Grechnev G.E. et al. Structure and magnetic properties of multi-walled carbon nanotubes modified with iron // *Low Temp. Phys.* 2010. Vol. 36, № 12.
 52. Prylutska S. et al. Effect of iron-doped multi-walled carbon nanotubes on lipid model and cellular plasma membranes // *Mater. Sci. Eng. C.* 2012. Vol. 32, № 6.
 53. Elliott J. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. 1st ed. Amsterdam-London-NewYork-Tokyo: Elsevier Science, 1994. Vol. 18. undefined-404 p.
 54. Elliott J.C. Calcium Phosphate Biominerals // *Rev. Mineral. Geochemistry.*

2002. Vol. 48, № 1.
55. Strutynska N. et al. Preparation, Characterization, and Thermal Transformation of Poorly Crystalline Sodium- and Carbonate-Substituted Calcium Phosphate // *Eur. J. Inorg. Chem.* 2015. Vol. 2015, № 4.
 56. Farzadi A. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation // *Ceram. Int.* 2011. Vol. 37, № 1.
 57. Lobo A.O. et al. Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites // *Mater. Sci. Eng. C.* 2013. Vol. 33, № 7.
 58. Sampath Kumar T., Manjubala I., Gunasekaran J. Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave irradiation // *Biomaterials.* 2000. Vol. 21, № 16.
 59. Tolkachov M. et al. Study of biocompatibility effect of nanocarbon particles on various cell types *in vitro* // *Materwiss. Werksttech.* 2016. Vol. 47, № 2–3.
 60. Leikin J.B., Paloucek F.P. *Poisoning and Toxicology handbook*. 4th ed. New York: Informa, 2008. undefined-184 p.
 61. Yue W. Prevention of browning of depolymerized chitosan obtained by gamma irradiation // *Carbohydr. Polym.* 2014. Vol. 101.
 62. Bano I. et al. Characterization and potential applications of gamma irradiated chitosan and its blends with poly(vinyl alcohol) // *Int. J. Biol. Macromol.* 2014. Vol. 65.
 63. Hassan M.N. et al. Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes // *Ceram. Int.* 2016. Vol. 42, № 3.
 64. Qi C. et al. Hydroxyapatite Hierarchically Nanostructured Porous Hollow Microspheres: Rapid, Sustainable Microwave-Hydrothermal Synthesis by Using Creatine Phosphate as an Organic Phosphorus Source and Application in Drug Delivery and Protein Adsorption // *Chem. - A Eur. J.* 2013. Vol. 19, № 17.
 65. Beşkardeş I.G. et al. Microwave-assisted fabrication of chitosan-

- hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2015. Vol. 9, № 11.
66. Moseke C. et al. Chemical characterization of hydroxyapatite obtained by wet chemistry in the presence of V, Co, and Cu ions // *Mater. Sci. Eng. C.* 2013. Vol. 33, № 3.
67. Wan Y.Z. et al. Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper // *Vacuum.* 2007. Vol. 81, № 9.
68. Oh K.S. et al. Cytotoxicity and Antimicrobial Effect of Ag Doped Hydroxyapatite // *Key Eng. Mater.* 2004. Vol. 264–268.
69. Miao S. et al. Sol–gel preparation of Zn-doped fluoridated hydroxyapatite films // *Surf. Coatings Technol.* 2005. Vol. 198, № 1–3.
70. Zhang L. et al. ZnO nanofluids – A potential antibacterial agent // *Prog. Nat. Sci.* 2008. Vol. 18, № 8.
71. Padmavathy N., Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study // *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2008. Vol. 9, № 3.
72. Phaechamud T. et al. Antimicrobial activity of ZnO-doxycycline hyclate thermosensitive gel // *ScienceAsia.* 2012. Vol. 38, № 1.
73. M. Awwad A., M. Salem N. A Green and Facile Approach for Synthesis of Magnetite Nanoparticles // *Nanosci. Nanotechnol.* 2013. Vol. 2, № 6.
74. Bretcanu O. et al. Magnetic properties of the ferrimagnetic glass-ceramics for hyperthermia // *J. Magn. Mater.* 2006. Vol. 305, № 2.
75. Sirelkhatim A. et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism // *Nano-Micro Lett.* 2015. Vol. 7, № 3.
76. Gopi D. et al. Synthesis and spectroscopic characterization of magnetic hydroxyapatite nanocomposite using ultrasonic irradiation // *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012. Vol. 87.
77. Stanislavov A.S. et al. Structural features of hydroxyapatite and carbonated apatite formed under the influence of ultrasound and microwave radiation and their effect on the bioactivity of the nanomaterials // *Ultrason.*

- Sonochem. 2018. Vol. 42.
78. Sukhodub L.B. et al. Composite material based on hydroxyapatite and multi-walled carbon nanotubes filled by iron: Preparation, properties and drug release ability // *Mater. Sci. Eng. C*. 2018. Vol. 93.
 79. Dicu M. et al. Preparation of ceramic coatings on titanium formed by micro-arc oxidation method for biomedical application // *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 2012. Vol. 14. P. 125–130.
 80. Jadalannagari S. et al. Lanthanum-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles as Biocompatible Fluorescent Probes for Cellular Internalization and Biolabeling // *Sci. Adv. Mater.* 2014. Vol. 6, № 2.
 81. Tuček J. et al. Emerging chemical strategies for imprinting magnetism in graphene and related 2D materials for spintronic and biomedical applications // *Chem. Soc. Rev.* 2018. Vol. 47, № 11.
 82. Radha G. et al. Structural, Mechanical and Biological Insights on Reduced Graphene Nanosheets Reinforced Sonochemically Processed Nano-Hydroxyapatite Ceramics // *Ceram. Int.* 2018. Vol. 44, № 8.
 83. Rajkumar M., Meenakshisundaram N., Rajendran V. Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: Synthesis and characterisation // *Mater. Charact.* 2011. Vol. 62, № 5.
 84. Haque S., Rehman I., Darr J.A. Synthesis and Characterization of Grafted Nanohydroxyapatites Using Functionalized Surface Agents // *Langmuir*. 2007. Vol. 23, № 12.
 85. Stanislavov A.S. et al. Structural features of hydroxyapatite and carbonated apatite formed under the influence of ultrasound and microwave radiation and their effect on the bioactivity of the nanomaterials // *Ultrason. Sonochem.* 2018. Vol. 42.
 86. Lak A. et al. Self-Assembly of Dandelion-Like Hydroxyapatite Nanostructures Via Hydrothermal Method // *J. Am. Ceram. Soc.* 2008. Vol. 91, № 10.
 87. Dwivedi S. et al. Reactive Oxygen Species Mediated Bacterial Biofilm

- Inhibition via Zinc Oxide Nanoparticles and Their Statistical Determination // PLoS One. 2014. Vol. 9, № 11.
88. Okido M. Hydroxyapatite coating on titanium by means of thermal substrate method in aqueous solutions // Solid State Ionics. 2002. Vol. 151, № 1–4.
 89. Durdu S. et al. Characterization and formation of hydroxyapatite on Ti6Al4V coated by plasma electrolytic oxidation // J. Alloys Compd. 2013. Vol. 551.
 90. Krzakała A. et al. Characterisation of bioactive films on Ti–6Al–4V alloy // Electrochim. Acta. 2013. Vol. 104.
 91. Kuznetsov V.N. et al. Controllability of brushite structural parameters using an applied magnetic field // Mater. Sci. Eng. C. 2016. Vol. 60.
 92. Bhattacharjee P. et al. Animal trial on zinc doped hydroxyapatite: A case study // J. Asian Ceram. Soc. 2014. Vol. 2, № 1.
 93. Feng Z. et al. Electrophoretic Deposited Stable Chitosan@MoS₂ Coating with Rapid In Situ Bacteria-Killing Ability under Dual-Light Irradiation // Small. 2018. Vol. 14, № 21.
 94. Xie X. et al. Synergistic Bacteria Killing through Photodynamic and Physical Actions of Graphene Oxide/Ag/Collagen Coating // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2017. Vol. 9, № 31.
 95. Xie X. et al. Tuning the Bandgap of Photo-Sensitive Polydopamine/Ag₃PO₄/Graphene Oxide Coating for Rapid, Noninvasive Disinfection of Implants // ACS Cent. Sci. 2018. Vol. 4, № 6.
 96. Jin C. et al. Ag/AgBr-loaded mesoporous silica for rapid sterilization and promotion of wound healing // Biomater. Sci. 2018. Vol. 6, № 7.
 97. Mao C. et al. Photo-Inspired Antibacterial Activity and Wound Healing Acceleration by Hydrogel Embedded with Ag/Ag@AgCl/ZnO Nanostructures // ACS Nano. 2017. Vol. 11, № 9.
 98. Reddy K.M. et al. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems // Appl. Phys. Lett. 2007. Vol. 90, № 21.
 99. Rasmi K.R. et al. Active Nano Metal Oxide Coating for Bio-fouling Resistance // Trans. Indian Inst. Met. 2018. Vol. 71, № 6.

100. Choi J.H., Tabata H., Kawai T. Initial preferred growth in zinc oxide thin films on Si and amorphous substrates by a pulsed laser deposition // *J. Cryst. Growth*. 2001. Vol. 226, № 4.
101. Ambia M.G., Islam M.N., Hakim M.O. The effects of deposition variables on the spray pyrolysis of ZnO thin film // *J. Mater. Sci.* 1994. Vol. 29, № 24.
102. Lee J. et al. Optimizing n-ZnO/p-Si heterojunctions for photodiode applications // *Thin Solid Films*. 2002. Vol. 403–404.
103. Ann L.C. et al. Antibacterial responses of zinc oxide structures against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pyogenes* // *Ceram. Int.* 2014. Vol. 40, № 2.
104. Wang X. et al. A study on the antibacterial activity of one-dimensional ZnO nanowire arrays: effects of the orientation and plane surface // *Chem. Commun.* 2007. № 42.
105. Yang H. et al. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition // *J. Appl. Toxicol.* 2009. Vol. 29, № 1.
106. Talebian N., Amininezhad S.M., Doudi M. Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2013. Vol. 120.
107. Zhang Y., Mu J. Controllable synthesis of flower- and rod-like ZnO nanostructures by simply tuning the ratio of sodium hydroxide to zinc acetate // *Nanotechnology*. 2007. Vol. 18, № 7.
108. Brayner R. et al. Alginate-Mediated Growth of Co, Ni, and CoNi Nanoparticles: Influence of the Biopolymer Structure // *Chem. Mater.* 2007. Vol. 19, № 5.
109. Sharma N. et al. Synthesis, characterisation and antimicrobial activity of manganese- and iron-doped zinc oxide nanoparticles // *J. Exp. Nanosci.* 2016. Vol. 11, № 1.
110. Rao S., Ugale G., Warad S. Bone morphogenetic proteins: Periodontal regeneration // *N. Am. J. Med. Sci.* 2013. Vol. 5, № 3.

111. Hafdani F., Sadeghinia N. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial // *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 2011. Vol. 74. P. 257–261.
112. Sukhodub L.F. et al. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-alginate nanostructured composites for the controlled drug release // *Mater. Chem. Phys.* 2018. Vol. 217.
113. Costantini L. et al. Synthesis of carbon nanotubes loaded hydroxyapatite: Potential for controlled drug release from bone implants // *J. Adv. Ceram.* 2016. Vol. 5, № 3.
114. Pogrebniak A. et al. Composite material with nanoscale architecture based on bioapatite, sodium alginate and ZnO microparticles // *Ceram. Int.* 2019.
115. DOI K. et al. Inorganic polyphosphate adsorbed onto hydroxyapatite for guided bone regeneration: An animal study // *Dent. Mater. J.* 2014. Vol. 33, № 2.
116. Scharff P. et al. Effect of X-Ray and UV irradiation of the C60 fullerene aqueous solution on biological samples // *Carbon N. Y.* 2004. Vol. 42, № 5–6.
117. Ritter U. et al. Structural Features of Highly Stable Reproducible C₆₀ Fullerene Aqueous Colloid Solution Probed by Various Techniques // *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures.* 2015. Vol. 23, № 6.
118. Chen C.-W. et al. Synthesis, characterization, and dispersion properties of hydroxyapatite prepared by mechanochemical–hydrothermal methods // *J. Mater. Chem.* 2004. Vol. 14, № 15.
119. Palasz A.T. et al. 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.* 2008. Vol. 70, № 9.
120. Tanase C.E., Popa M.I., Verestiuc L. Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates // *Mater. Lett.* 2011. Vol. 65, № 11.
121. Sukhodub L. Metal Ions Doped Chitosan Nanoparticles // *J. Nano- Electron. Phys.* 2014. Vol. 6, № 4.

122. Cascone S. Modeling and comparison of release profiles: Effect of the dissolution method // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017. Vol. 106.
123. Huang X., Brazel C.S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems // *J. Control. Release.* 2001. Vol. 73, № 2–3.
124. Dash S. et al. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, // *Acta Pol. Pharm.* 2010. Vol. 67, № 3. P. 217–223.
125. Korsmeyer R.W. et al. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers // *Int. J. Pharm.* 1983. Vol. 15, № 1.
126. Vora L., V G S., Vavia P. Zero order controlled release delivery of cholecalciferol from injectable biodegradable microsphere: In-vitro characterization and in-vivo pharmacokinetic studies // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017. Vol. 107.
127. Oberdörster E. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C₆₀) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass // *Environ. Health Perspect.* 2004. Vol. 112, № 10.
128. Goodarzi S. et al. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend // *Mater. Today.* 2017. Vol. 20, № 8.
129. Qi H. et al. Megator, an Essential Coiled-Coil Protein that Localizes to the Putative Spindle Matrix during Mitosis in *Drosophila* // *Mol. Biol. Cell.* 2004. Vol. 15, № 11.
130. Rabea E.I. et al. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action // *Biomacromolecules.* 2003. Vol. 4, № 6.
131. Gharbi N. et al. [60]Fullerene is a Powerful Antioxidant in Vivo with No Acute or Subacute Toxicity // *Nano Lett.* 2005. Vol. 5, № 12.
132. Sukhodub L.B. et al. C60 fullerene loaded hydroxyapatite-chitosan beads as a promising system for prolonged drug release // *Carbohydr. Polym.* 2019. Vol. 223.
133. Mansour N.R., Bickle Q.D. Comparison of Microscopy and Alamar Blue Reduction in a Larval Based Assay for Schistosome Drug Screening // *PLoS*

- Negl. Trop. Dis. 2010. Vol. 4, № 8.
134. Geng Z. et al. Incorporation of silver and strontium in hydroxyapatite coating on titanium surface for enhanced antibacterial and biological properties // Mater. Sci. Eng. C. 2017. Vol. 71.
 135. Vranceanu D.M. et al. In vitro evaluation of Ag doped hydroxyapatite coatings in acellular media // Ceram. Int. 2019. Vol. 45, № 8.
 136. Sinclair And R.D., Ryan T.J. PROTEOLYTIC ENZYMES IN WOUND HEALING: THE ROLE OF ENZYMATIC DEBRIDEMENT // Australas. J. Dermatol. 1994. Vol. 35, № 1.
 137. Hajinasab A. et al. Preparation and characterization of a biocompatible magnetic scaffold for biomedical engineering // Mater. Chem. Phys. 2018. Vol. 204.
 138. Díaz E. et al. Development of Magnetically Active Scaffolds for Bone Regeneration // Nanomaterials. 2018. Vol. 8, № 9.
 139. Cardoso V.F. et al. Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications // Adv. Healthc. Mater. 2018. Vol. 7, № 5.
 140. Malarkodi C., Annadurai G. A novel biological approach on extracellular synthesis and characterization of semiconductor zinc sulfide nanoparticles // Appl. Nanosci. 2013. Vol. 3, № 5.
 141. Sinha R. et al. Interaction and nanotoxic effect of ZnO and Ag nanoparticles on mesophilic and halophilic bacterial cells // Bioresour. Technol. 2011. Vol. 102, № 2.
 142. Padmavathy N., Vijayaraghavan R. Interaction of ZnO Nanoparticles with Microbes—A Physio and Biochemical Assay // J. Biomed. Nanotechnol. 2011. Vol. 7, № 6.