

Міністерство освіти і науки України  
Сумський державний університет

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**КУМЕДА МАРІЯ ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 538.911; 539; 606:61; 661.842; 666.3-127

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ВПЛИВ МІКРОХВИЛЬОВОГО ОПРОМІНЕННЯ НА СТРУКТУРУ, СКЛАД,  
МОРФОЛОГІЮ ТА КІНЕТИКУ ВИВІЛЬНЕННЯ ГІДРОФОБНИХ  
ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ З 3D МАТРИЦЬ НА ОСНОВІ БІОПАТИТУ ТА  
БІОПОЛІМЕРІВ**

105 – Прикладна фізика та наноматеріали

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Кумеда М.О.

Науковий керівник: **Суходуб Леонід Федорович**, член-кореспондент  
Національної академії наук України, доктор фізико-математичних наук,  
професор

Суми – 2023

## АНОТАЦІЯ

*Кумеда М.О.* Вплив мікрохвильового опромінення на структуру, склад, морфологію та кінетику вивільнення гідрофобних лікарських засобів з 3D матриць на основі біоapatиту та біополімерів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 105 – «Прикладна фізика та наноматеріали» – Сумський державний університет, МОН України, Суми, 2023.

Наукова робота присвячена дослідженню впливу мікрохвильового опромінення на структуру, фазовий склад та здатність до вивільнення лікарських засобів з модифікованих наночастинками кальцій фосфат-біополімерних композитів гранульованої форми з метою удосконалення матеріалів для використання у регенеративній медицині.

У вступі обґрунтовано актуальність обраної теми дисертаційної роботи, висвітлено мету, об'єкт, предмет та завдання дослідження, узагальнено наукову новизну та практичну цінність отриманих результатів, перераховано кількісні показники виконаної роботи – перелік публікацій, з зазначенням особистого внеску автора та відомостей про апробацію результатів дослідження.

Перший розділ присвячений біоматеріалам, біокераміці на основі фосфатів кальцію і полімерів та характеристикам мікрохвильового опромінення.

Фосфати кальцію мають чудову біосумісність завдяки своїй хімічній та кристалічній схожості з кістковими мінералами, характерними для яких є заміщений кальцій-дефіцитний гідроксиapatит. Природній полімер хітозан широко використовується в різних галузях досліджень, він є біосумісним та проявляє гарну антибактеріальну дію, особливо сумісно з іонами металів. Унікальні властивості іншого біополімеру, альгінату, включають біосумісність,

здатність до біодеградації, нетоксичність, проліферацію клітин, гелеутворення, в'язкість і стабільність.

Також, розглянуто фактори, що впливають на вивільнення лікарського засобу з полімерних матриць, що включають: композитний склад, пористість і питому поверхню, тип і концентрацію лікарського засобу, взаємодію лікарського засобу з матрицею, а також механізми внесення і вивільнення лікарського засобу. Показано перспективність використання багатокомпонентних композитів в інноваційних біомедичних тканино-інженерних імплантатах.

Другий розділ зосереджений на синтезі наночастинок гідроксиапатиту (з метою вивчення впливу умов реакції на морфологію частинок), та композитах на основі отриманого апатиту з альгінатом і хітозаном, їх модифікації шляхом додавання вуглецевих наночастинок, характеристиках отриманих матеріалів і можливих технологіях синтезу, зокрема: звичайне хімічне осадження (ЗХО) і ЗХО/MW синтез. Описано вперше розроблений спосіб синхронного синтезу поліелектролітного матеріалу з безпосереднім утворенням кальцій фосфатної кристалічної фази у присутності біополімеру під час формування гранульованої форми. Для характеристики підготовлених матеріалів використовували скануючу електронну мікроскопію (SEM), трансмісійну електронну мікроскопію (ТЕМ), дифракцію рентгенівських променів (XRD), дослідження механічної міцності, інфрачервону спектроскопію Фур'є перетворення (FTIR) і високоефективну рідинну хроматографію (HPLC).

У третьому розділі наведено результати мікрохвильового синтезу гідроксиапатиту та композитів на його основі з вмістом альгінату натрію, оксиду графену та фулерену (C<sub>60</sub>). Кальцій фосфат, що утворюється під впливом мікрохвильового опромінення представлений кальцій-дефіцитним гідроксиапатитом (cdHA) з параметрами кристалічної решітки  $a = 0,938$  нм та  $c = 0,688$  нм. Цей факт був підтверджений за допомогою FTIR вимірювань, спектри

показують смугу поглинання карбонату при  $870\text{ см}^{-1}$ . Також наявні піки, що відповідають гідроксильній групі (ОН) при  $3416$  і  $631\text{ см}^{-1}$ ; а також смуги з піками при  $1038$ ,  $960$ ,  $602$  і  $562\text{ см}^{-1}$ , що відповідають коливанням  $\text{PO}_4^{3-}$  групи в cdHA.

Синтезовані гранули на основі альгінату натрію мали розмір  $\sim 1,5\text{-}2$  мм, для зручного заповнення кісткових дефектів. Додавання наночастинок фуллерену суттєво, вдвічі ( $79,5\%$  для контрольного зразку, та  $39,6\text{-}38,6\%$  для модифікованих), знижує рівень поглинання води експериментальними зразками порівняно з контрольним зразком, у той час як додавання оксиду графену призводить до зниження набрякання всього на  $6\text{-}7\%$  ( $79,5\%$  для контрольного зразку, та  $72,9\text{-}75,1\%$  для модифікованих) при рН  $7,3$ . Вивільнення ліків із різними хімічними структурами та фізичними властивостями за рН  $4,0$  та  $7,2$  показало, що вивільнення хлоргексидину (СНХ – амфифільний антисептик з антибактеріальними властивостями) з альгінатних матриць обумовлено лише ерозією та є нетривалим ( $120$  годин), у той час як вивільнення диклофенаку (DS – амфифільний нестероїдний протизапальний засіб) має складний характер та більшу довготривалість ( $264$  години). У нейтральному середовищі вивільнення хлоргексидину протягом першої доби ( $24$  години) з усіх зразків майже не відрізняється та становить близько  $80\%$ . Повний вихід СНХ (близько  $95\%$ ) при рН= $7.2$  зі зразку Alg/HAmw відбувається через  $72$  години. Вивільнення диклофенаку за першу добу в нейтральному середовищі (рН= $7.2$ ) із Alg/HAmw зразку становив близько  $70\%$  і концентрація в PBS складала  $0.546$  мг/мл, а повний вихід через  $264$  години склав біля  $90\%$ . В період від  $96$  до  $360$  годин в кислому середовищі концентрація вивільненого диклофенаку поступово збільшується на  $5\%$  для Alg/HAmw зразка без графену та на  $10\%$  для графен-вмісних зразків. Під час дослідження антибактеріальної здатності фулерен-апатит-альгінатних гранул виявлено більш ефективну антибактеріальну дію дослідних зразків проти *S.Aureus*. Проведені *in vivo* дослідження показали

часткову резорбцію біоматеріалу з заміною його кістковою тканиною впродовж місяця.

Четвертий розділ присвячено хітозан-апатитним матеріалам. Було досліджено вплив різних потужностей MW опромінення (300, 600 та 800 Вт) на морфологію та фізичні характеристики гранул без модифікаторів. Найбільш ефективною потужністю мікрохвильового синтезу була величина 800 Вт. У даному випадку отримували кальцій-дефіцитний гідроксиапатит з параметрами  $a=0,941$  нм та  $c=0,688$  нм, що означає, що присутність полімеру суттєво не впливає на кристалізацію гідроксиапатиту. Отриманий НА композитів відповідає JCPDS 00-046-0905, але рентгенограми зразків, спечених при  $600^{\circ}\text{C}$ , показують, що деякі піки дещо зміщені в бік низьких кутів порівняно зі стехіометричною гексогональною коміркою. Після сушіння при  $37^{\circ}\text{C}$  приблизний розмір утворених кристалітів становив 12-13 нм; для зразків, прожарених за  $600^{\circ}\text{C}$ , розмір кристалітів збільшився. Примітно, що при збільшенні потужності MW з 300 Вт до 800 Вт розмір кристалітів зменшився з 28 нм до 23 нм, відповідно.

Результати показали, що вивільнення ліофілізованого хлоргексидину зі зразків відбувалося з більшою швидкістю (100% за 312 годин), ніж вивільнення анестезину (AN – гідрофобний анестетик для поверхневої анестезії) (100% за 384 години). Найкращі параметри кінетичної моделі також було отримано для зразку синтезованого під впливом MW 800 Вт. У результаті індекс вивільнення  $n$  приймав значення від  $n = 0,75$  до  $n = 0,82$ , демонструючи кінетику дифузії, що не підпорядковується закону Фіка. У подальшому даний зразок був модифікований фулереном для порівняння з альгінатними гранулами. Цікаво, що зразки, які містять хітозан з фулереном володіють вищим ступенем набрякання (48%) ніж альгінатні (39%), однак демонструють кращу стабільність форми. Результати експериментів засвідчили, що зразки з вмістом фулерену 150 та 300 мкг/мл не виявили антимікробної активності. Додаткові випробування зі зразками з різним

вмістом фулерену показали, що при додаванні 0,004 мг/мл C<sub>60</sub> антибактеріальна активність комплексу збільшувалася зі зменшенням концентрації, що пояснювалося зменшеною агрегацією наночастинок у розчині хітозану. Випробування композитів, що містять 300 і 150 мкг/мл фулерену, на життєздатність клітин, не виявили токсичного впливу, а метод відновлення ресазурину показав достатню проліферацію остеобластів на 3-й день порівняно з позитивним контролем.

Останній розділ містить відомості про властивості вперше розроблених синхронно синтезованих хітозанових гранул. Новизна даного підходу полягає в кристалізації фосфатів кальцію безпосередньо у гранульованому полімері за надлишку фосфатів у розчині. XRD-спектри демонструють наявність в зразках декількох фаз ОФК, а саме НА (JCPDS 9-432), ОСР (октакальцій фосфат) (JCPDS 01-074-1301), ДСРА (дикальцій фосфат ангідрат) (JCPDS 2-1350), СРР (кальцій пірофосфат) (JCPDS 35-0002). Під впливом MW та з більшим співвідношенням Са до СS середній вміст НА/ОСР збільшується на 5, 7, 10 мас%, а частка СРР зменшується на 13, 12 та 14% у 0,15Cs/CaP, 0,45Cs/CaP, та 0,75Cs/CaP, відповідно до тих величин, які відповідають зразкам, синтезованим за допомогою конвекційного нагріву. Зі збільшенням співвідношення Са/СS очікувано збільшується вміст кальцію, фосфору, а вміст вуглецю та азоту зменшується. У зразках 1C\_MW, 2C\_MW, 3C\_MW до їх перебування в SBF збільшується вміст натрію, асоційованого з ТРР, в геометричній прогресії в 1,5, ≈3, ≈6 разів, відповідно. Вагове співвідношення Са/Р становить в середньому 0,12, що пояснюється значною кількістю фосфору, пов'язаною з присутністю ТРР. Оцінка модуля Юнга (E) показала, що значення E для зразка з MW дорівнює 780 МПа, що набагато вище порівняно зі зразком Са/СS = 0,75 без MW (517 МПа).

Слід зазначити, що гібридний композит, що містить CS, має відносно низький (< 100%) ступінь набрякання, що зі збільшенням частки кальцію наближається до значень попередньо описаних альгінатних та хітозанових гранул. Ефективність гібридного композиту в якості системи доставки лікарського засобу була досліджена на прикладі цефтриаксону (CF – гідрофільний цефалоспориновий напівсинтетичний антибіотик третього покоління). Лікарський засіб введений шляхом насичення вивільняється активно протягом першої доби, демонструючи «вибуховий» реліз поверхнево адсорбованого препарату. На противагу цьому, зі зразків де лікарський засіб введений під час синтезу, протягом перших двох діб вивільняється близько 10 % від загальної кількості лікарського засобу.

Вперше показано, що зразки демонструють адсорбцію амінокислот на прикладі Триптофану. Розраховані коефіцієнти для різних моделей адсорбції (ізотерма Генрі, Ленгмюра, Фрейндіха та Сіпса) для оцінки характеру адсорбції. Модель адсорбції синтезованих зразків відповідає ізотермі Фрейндіха, що визначає неоднорідність поверхні та експоненційний розподіл енергії активних центрів. Очевидно, що адсорбція Trp більше контролюється неорганічною частиною гібридного матеріалу. Таким чином, зразки 0,75Cs/CaP та 0,75mwCs/CaP демонструють найбільшу здатність адсорбувати Trp з його більш концентрованих розчинів (60-30 ммоль/л) через збільшення частки НА/ОСР. Дещо підвищена адсорбція на 0,15mwCs/CaP та 0,45mwCs/CaP зразках порівняно зі зразками 0,15Cs/CaP та 0,45Cs/CaP спостерігається через більш інтенсивне перетворення під впливом MW утвореного АСР на НА та ОСР, та більш розвинену зовнішню поверхню гранул, що дозволяє контактувати більшій кількості молекул.

Попередні дослідження *in vivo* на щурах щодо біосумісності гібридних композитів показали, що вже після 30 днів імплантації матеріал був локально в

зоні дефекту без міграції частинок у червоний кістковий мозок. Гранула була щільно оточена новоутвореною кістковою тканиною, яка у вигляді піків проникала в її крайові частини, замінюючи деградований композит.

Встановлено, що полімер-кальцій фосфатні матеріали синтезовані за мікрохвильовою технологією демонструють поліпшені структурні та фізико-хімічні властивості. Модифікація матеріалів карбоновими наночастинками призводить до поліпшення стабільності та механічної стійкості, підвищенню фармако-кінетичних, антимікробних та біологічних властивостей.

Ключові слова: Мікрохвильове опромінення, Гідроксиapatит, Хітозан, Альгінат, Карбонові наночастинки, Наноматеріали, Структура, Спектроскопія Фур'є перетворення, Рентгенівська дифрактометрія



## SUMMARY

Mariia O.Kumeda. Microwave irradiation affects the structure, composition, morphology, and hydrophobic drug release kinetics from 3D matrices based on bioapatite and biopolymers. – Qualifying scientific work is as a manuscript.

Thesis for a Candidate Degree in Physical and Mathematical Sciences in specialty 105 – "Applied Physics and Nanomaterials" – Sumy State University, MES of Ukraine, Sumy, 2023.

The scientific work is devoted to the study of the effect of microwave irradiation on the structure, phase composition, and ability to release drugs of modified calcium phosphate-biopolymer materials in granular form to solve the current issue of modern regenerative medicine.

The introduction substantiates the relevance of the chosen topic of the dissertation, highlights the purpose, object, subject and tasks of the research, summarizes the scientific novelty and practical value of the obtained results, lists the quantitative indicators of the completed work - a list of publications, indicating the author's contribution and information about the approbation of the research results.

The first chapter is devoted to biomaterials, bioceramics based on calcium phosphates and polymers, and characteristics of microwave irradiation.

Calcium phosphate is biocompatible due to its chemical and crystalline similarity to bone minerals characterized by substituted calcium-deficient hydroxyapatite. The natural polymer chitosan is widely used in various research fields; it is biocompatible and exhibits an excellent antibacterial effect, especially compatible with metal ions. The unique properties of the second biopolymer, alginate, include biocompatibility, biodegradability, nontoxicity, cell proliferation, gelation, viscosity, and stability.

Also, the factors affecting the release of the drug from polymer matrices are considered, including composition, porosity and specific surface area, type and

concentration of the drug, the interaction of the drug with the matrix, as well as mechanisms of loading and release of the drug. The perspective of using multicomponent composites in innovative biomedical tissue-engineering implants is shown.

The second section focuses on the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles (in order to study the influence of reaction conditions on the morphology of the particles), and composites based on the obtained apatite with alginate and chitosan, their modification by adding carbon nanoparticles, characteristics of the obtained materials and possible synthesis technologies, in particular: conventional chemical deposition (CCD) and CCD/MW synthesis. The method of synchronous synthesis of polyelectrolyte material with direct formation of calcium phosphate crystalline phase in the presence of biopolymer during the formation of granular form is described for the first time. Scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), mechanical strength studies, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and high-performance liquid chromatography (HPLC) were used to characterize the prepared materials.

The third chapter presents the results of microwave synthesis of hydroxyapatite and composites based on it with sodium alginate, graphene oxide, and fullerene content. Calcium phosphate formed under the influence of microwave irradiation is represented by calcium-deficient hydroxyapatite (cdHA) with crystal lattice parameters  $a = 0.9385$  nm and  $c = 0.6882$  nm. This fact was confirmed by FTIR measurements, which show a carbonate absorption band at  $870\text{ cm}^{-1}$ . There are also peaks corresponding to the hydroxyl group (OH) at  $3416$  and  $631\text{ cm}^{-1}$ ; bands with peaks at  $1038$ ,  $960$ ,  $602$ , and  $562\text{ cm}^{-1}$  correspond to vibrations of the  $\text{PO}_4^{3-}$  group in NA.

Synthesized granules based on sodium alginate had a size of  $\sim 1.5\text{-}2$  mm for convenient filling of bone defects. The addition of fullerene nanoparticles significantly, twice ( $79.5\%$  for the control sample and  $39.6\text{-}38.6\%$  for the modified ones), reduces

the level of moisture absorption of the experimental samples compared to the control sample, while the addition of graphene oxide leads to a decrease in swelling by only 6-7% (79.5% for the control sample and 72.9-75.1% for the modified ones) at pH 7.3. The release of drugs with different chemical structures and physical properties at pH 4.0 and 7.2 showed that the release of chlorhexidine from alginate matrices is due to erosion only and is short-lived (120 hours). In comparison, the release of diclofenac is complex and longer lasting (264 hours). In a neutral environment, the release of chlorhexidine during the first day (24 hours) in all samples is almost the same and is about 80%. The complete yield of SNH (about 95%) at pH=7.2 from the Alg/HAMw sample occurs after 72 hours. The release of diclofenac during the first day in a neutral medium (pH=7.2) from the Alg/HAMw sample was about 70% and, the concentration in PBS was 0.546 mg/ml, and the total release after 264 hours was about 90%. From 96 to 360 hours in an acidic environment, the concentration of released diclofenac gradually increases by 5% for the Alg/HAMw sample without graphene and 10% for the graphene-containing samples. The study of the antibacterial ability of fullerene-apatite-alginate granules revealed a more effective antibacterial effect of the experimental samples against *S. Aureus*. The *in vivo* studies showed partial resorption of the biomaterial with its replacement by bone tissue within a month.

The fourth chapter is devoted to chitosan-apatite materials. The effect of different MW powers (300, 600, and 800 W) on the morphology and physical characteristics of the granules without modifiers was investigated. The most effective power of microwave synthesis was 800 W. In this case, calcium-deficient hydroxyapatite with parameters  $a = 0.9415$  nm and  $c = 0.6882$  nm was obtained, which means that the presence of the polymer does not significantly affect the crystallization of hydroxyapatite. The obtained HA of the composites conforms to JCPDS 00-046-0905, but the X-ray patterns of samples sintered at 600°C show that some peaks are slightly shifted towards low pore angles nany with a stoichiometric hexagonal cell. After

drying at 37 °C, the approximate size of the formed crystallites was 12-13 nm; for the samples fired at 600 °C, the size of the crystallites increased. Notably, when the MW power increased from 300 W to 800 W, the crystallite size decreased from 28 nm to 23 nm, respectively.

The results showed that lyophilized chlorhexidine from the samples occurred at a higher rate (100% in 312 hours) than the release of anesthetic (100% in 384 hours). The best parameters of the kinetic model were also obtained for the sample synthesized under the influence of MW 800 W. As a result, the release index  $n$  took values from  $n = 0.75$  to  $n = 0.82$  (Table 4.2), demonstrating diffusion kinetics that do not obey Fick's law. Later, this sample was modified with fullerene for comparison with alginate granules. Interestingly, samples containing chitosan with fullerene have a higher degree of swelling (48%) than alginate samples (39%) but show better shape stability. The results of the experiments proved that samples with a fullerene content of 150 and 300  $\mu\text{g/ml}$  did not show antimicrobial activity. Additional tests with samples with different fullerene content showed that when 0.004 mg/ml was added, the antibacterial activity of the complex increased with decreasing concentration, which was explained by reduced aggregation of nanoparticles in the chitosan solution. Cell viability tests of composites containing 300 and 150  $\mu\text{g/mL}$  fullerene revealed no toxic effects, and the resazurin reconstitution method showed sufficient osteoblast proliferation on day three compared to the TCP positive control.

The last section contains information about the properties of the newly developed synchronously synthesized chitosan-calcium phosphate granules. The novelty of this approach lies in the crystallization of calcium phosphates directly in the granular polymer with an excess of phosphates in the solution. XRD spectra demonstrate the presence of several OFK phases in the samples, namely HA (JCPDS 9-432), OCP (JCPDS 01-074-1301), DCPA (JCPDS 2-1350), CPP (calcium pyrophosphate) (JCPDS 35-0002). Under the influence of MW and a higher ratio of Ca to CS, the average

content of HA/OCP increases by 5, 7, and 10 wt%. The fraction of CPP decreases by 13, 12, and 14% in 0.15Cs/CaP, 0.45Cs/CaP, and 0.75Cs/CaP, respectively, to values corresponding to samples synthesized by convection heating. As the Ca/CS ratio increases, calcium and phosphorus content is expected to increase while carbon and nitrogen content decreases. In samples 1C\_MW, 2C\_MW, 3C\_MW before their stay in SBF, the content of sodium associated with TPP increases in a geometric progression by 1.5,  $\approx 3$ , and  $\approx 6$  times, respectively. The Ca/P weight ratio averages 0.12, which is explained by the significant amount of phosphorus associated with the presence of TPP. Evaluation of the Young's modulus (E) showed that the E value for the sample with MW is 780 MPa, which is much higher compared to the Ca/CS = 0.75 sample without MW (517 MPa).

It should be noted that the hybrid composite containing CS has a relatively low (< 100%) degree of swelling, which, with an increase in the proportion of calcium, approaches the values of the previously described alginate and chitosan granules. The efficiency of the hybrid composite as a drug delivery system was investigated using the example of ceftriaxone. The drug introduced by saturation is actively released during the first day, demonstrating an "explosive" release of the surface-adsorbed drug. This effect is observed in all composites previously described in the work. In contrast, from the samples where the drug was introduced during the synthesis, during the first two days, about 10% of the total amount of the drug was released. It was shown for the first time that the samples demonstrate the adsorption of amino acids in the example of Tryptophan. Calculated coefficients for different adsorption models (Henry, Langmuir, Freundlich, and Sips isotherm) to assess the nature of adsorption. The adsorption model corresponds to the Freundlich isotherm, which determines the heterogeneity of the surface and the exponential distribution of the energy of active centers. It is evident that Trp adsorption is more controlled by the inorganic part of the hybrid material. Thus, samples 0.75Cs/CaP and 0.75mwCs/CaP demonstrate the greatest ability to adsorb Trp

from its more concentrated solutions (60-30 mmol/l) due to an increase in the proportion of HA/OCP. Slightly increased adsorption on 0.15mwCs/CaP and 0.45mwCs/CaP compared to 0.15Cs/CaP and 0.45Cs/CaP samples is observed due to a more intense conversion under the influence of MW of the formed ACP to NA and OCP, and a more developed outer surface of the granules, which allows more molecules to come into contact.

Preliminary *in vivo* studies on the biocompatibility of hybrid composites showed that after 30 days of implantation, the material was locally in the defect zone without particle migration into the red bone marrow. The granule was tightly surrounded by newly formed bone tissue, which, in the form of peaks, penetrated its marginal parts, replacing the degraded composite.

It is established that polymer-calcium phosphate materials are synthesized using microwave technology to demonstrate improved structural and physicochemical properties. Modifying materials with carbon nanoparticles leads to improved stability and mechanical resistance and increased pharmaco-kinetic, antimicrobial and biological properties.

Keywords: Microwave irradiation, Hydroxyapatite, Chitosan, Alginate, Carbon nanoparticles, Nanomaterials, Structure, Fourier transform spectroscopy, X-ray diffractometry

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у фахових виданнях України

1. **Kumeda MO**, Sukhodub LF. The effect of microwave irradiation on the synthesis of hydroxyapatite/biopolymer nanocomposites. *Himia Fiz Tehnol Poverhni* 2021;12(3):201-215. (Категорії A, Scopus) *(Особистий внесок здобувача: проведення літературного пошуку, написання статті та узагальнення результатів)*.

2. Sukhodub LF, Sukhodub LB, **Kumeda MO**. Physical and chemical factors affecting the porosity of apatite-biopolymer composites. *Himia Fiz Tehnol Poverhni* 2022;13(3):301-310. (Категорії A, Scopus) *(Особистий внесок здобувача: проведення літературного пошуку, участь у написанні статті)*.

### Статті в наукових періодичних виданнях, які індексуються

#### міжнародними базами даних

3. Sukhodub L, **Kumeda M**, Sukhodub L, Strelchuk V, Nasieka I, Vovchenko L, et al. Hybrid composite based on chitosan matrix mineralized by polyphasic calcium orthophosphates with enhanced bioactivity and protein adsorption capacity. *Mater Today Commun* 2022;31. (Scopus, WoS, Q2) *(Особистий внесок здобувача: синтез, проведення досліджень адсорбції, обговорення отриманих результатів, участь у написанні статті)*.

4. Sukhodub LB, **Kumeda M**, Bielai V, Sukhodub LF. Hydroxyapatite-biopolymers-ZnO composite with sustained Ceftriaxone release as a drainage system for treatment of purulent cavities. *Carbohydr Polym* 2021;266. (Scopus, WoS, Q1) *(Особистий внесок здобувача: синтез, проведення хроматографічних досліджень, обговорення отриманих результатів, участь у написанні статті)*.

5. Sukhodub L, Sukhodub LB, **Kumeda M**, Panda A, Baron P. ZnO coatings on Ti6Al4V substrate: Structural and antibacterial properties in literature review and

research. Manag Syst Prod Eng 2020;28(4):318-324. (Scopus, WoS, Q3) *(Особистий внесок здобувача: проведення антимікробних досліджень, обговорення отриманих результатів, участь у написанні статті).*

6. Sukhodub LB, Sukhodub LF, **Kumeda MO**, Prylutskyu YI, Pogorielov MV, Evstigneev MP, et al. Single-walled carbon nanotubes loaded hydroxyapatite—alginate beads with enhanced mechanical properties and sustained drug release ability. Prog Biomater 2020;9(1-2). (Scopus, WoS) *(Особистий внесок здобувача: синтез, проведення хроматографічних досліджень, обговорення отриманих результатів, участь у написанні статті).*

7. Sukhodub LB, Sukhodub LF, **Kumeda M**, Prylutskyu Y, Evstigneev M, Kostjukov V, et al. The effect of graphene oxide on the properties and release of drugs from apatite-polymer composites. J Nano Electron Phys 2020;12(4). (Scopus, Q3) *(Особистий внесок здобувача: синтез, проведення хроматографічних досліджень, обговорення отриманих результатів, участь у написанні статті).*

8. Sukhodub LF, Sukhodub LB, **Kumeda MO**, Denysenko AP, Kravchenko MI. Bioactive polymer-apatite coatings with antimicrobial properties on model titanium implants. J Nano Electron Phys 2020;12(3). (Scopus, Q3) *(Особистий внесок здобувача: проведення досліджень, обговорення отриманих результатів, участь у написанні статті).*

9. Sukhodub L, Panda A, Sukhodub L, **Kumeda M**, Dyadyura K, Pandova I. Hydroxyapatite and zinc oxide based two-layer coating, deposited on Ti6Al4V substrate. MM Sci J 2019:3494-3499. (Scopus, WoS, Q3) *(Особистий внесок здобувача: проведення досліджень, обговорення отриманих результатів, участь у написанні статті).*

10. Sukhodub LB, Sukhodub LF, **Kumeda MO**, Prylutska SV, Deineka V, Prylutskyu YI, et al. C60 fullerene loaded hydroxyapatite-chitosan beads as a promising system for prolonged drug release. Carbohydr Polym 2019;223. (Scopus, WoS, Q1)



*(Особистий внесок здобувача: синтез, проведення хроматографічних досліджень, обговорення отриманих результатів, участь у написанні статті).*

#### **Частини монографій видані міжнародними видавництвами**

11. **Kumeda M**, Korenkov A, Sukhodub LB, Sukhodub LF, Chapter 3. Medicobiological Aspects of Hydroxyapatite Application and Its Bioactive Coatings. In: Wythers MC, editor. Advances in Materials Science Research. Volume 53. New York: Nova; 2022. P. 95–123. *(Особистий внесок здобувача: проведення літературного пошуку, участь у написанні статті).*

12. **Kumeda M**, Sukhodub LB, Sukhodub LF, Chapter 2. Influence of Microwave Sintering on Hydroxyapatite Modified Materials. In: Wythers MC, editor. Advances in Materials Science Research. Volume 53. New York: Nova; 2022. P. 63-94. *(Особистий внесок здобувача: проведення літературного пошуку, узагальнення результатів, участь у написанні статті).*

#### **Апробація матеріалів дисертації**

13. **Kumeda M**, Sukhodub LF, Prylutskyu Yu, Sukhodub L. Fullerene C60-containing Hydroxyapatite/polymer Polyelectrolyte Composite for Dental Applications. In: Nanomaterials: Applications & Properties (NAP-2019): 9th International Conference; Odesa, Ukraine; 2019. P. 02BA05-1–02BA05-4. (Scopus)

14. Sukhodub LB, **Kumeda MO**, Sukhodub LF. Influence of MW irradiation on the hydroxyapatite/chitosan composite structure and drug release kinetics. In: 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, 2020 IFMBE; Chisinau, Moldova; 2019. P. 343–348. (Scopus)

15. Sukhodub LB, Sukhodub LF, **Kumeda MA**. Influence of Synthesis Technique on the Bioactivity of Chitosan-Hydroxyapatite Nanocomposites. In:

International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2020); 2020. P. 243.

16. Dubņika A, Sukhodub L, **Kumeda M**, Sukhodub L. The effect of biopolymer matrix on the drug release from hydroxyapatite based hybrid scaffolds. In: International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2020); 2020. P. 255.

17. **Kumeda M**, Sukhodub LB, Bielai V, Sukhodub LF, Zhdanov S. Sorption composite based on hydroxyapatite and biopolymers for drainage of purulent cavities. In: IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications&Properties” (NAP 2020); Odesa, Ukraine; 2020. 9309711. (Scopus)

18. Бєлай ВС, **Кумєда МО**, Остольський ВВ, Суходуб ЛБ, Суходуб ЛФ. In Vivo дослідження композитних дренажних систем на основі гідроксиапатиту. In: IV Міжнародна науково-практична конференція Priority Directions Of Science And Technology Development; Київ, Україна; 2020. P. 95.

19. **Kumeda M.**, Sukhodub LB, Sukhodub LF, Potapov O, Tsyndrenko O, Kmyta O. Biodegradable Nanostructured Nerve Conductors: Electrical Properties And Adsorption Kinetic Model. In: 2021 IEEE 11th International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2021); Odesa, Ukraine; 2021. 176891. (Scopus)

20. **Kumeda MO**, Sukhodub LB, Sukhodub LF. The Zero-order kinetic of Ceftriaxone release from microwave-induced Octacalcium phosphate–Chitosan hybrid composite. In: International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2021); 2021.

21. **Kumeda MO**, Sukhodub LB, Sukhodub LF. Drug release kinetics from apatite-biopolymer scaffolds: HPLC study. In: 7th International Conference «NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects»; Kharkiv, Ukraine; 2021. P. 60.

22. **Kumeda M**, Bielai V, Sukhodub LF, Sukhodub LB, Dudka A. Hydroxyapatite-polymer sorption-aspiration drainage system. In: 2ND MULTIDISCIPLINARY CONFERENCE FOR YOUNG RESEARCHERS Sustainable Development Trends and Challenges under COVID-19; Sumy, Ukraine; 2021. P. 53. (Усна доповідь).

23. **Kumeda M**, Sukhodub LB, Shevel A, Sukhodub LF, Derevianko V. Investigation of novel polymer wound healing material. In: Science, innovations and education: problems and prospects. Proceedings of the 6th International scientific and practical conference; CPN Publishing Group; Tokyo, Japan; 2022. P. 226-230.

24. Sukhodub LF, **Kumeda MO**, Derevianko VG, Sukhodub LB. Antimicrobial Properties of Nanocomposite Biomaterial for the Treatment of Purulent Wounds and Infected Ulcers. In: International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2022); 2022. P. 280.

25. **Kumeda M**, Sukhodub LB, Sukhodub LF, Krmela J, Krmelová V. Dependence of Nerve Conduits Structure on Chemical Parameters and Composition. In: MACHINE MODELLING AND SIMULATIONS 2022; Rydzyna, Poland; 2022. P. 76.

## ЗМІСТ

ЗМІСТ .....	20
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	22
ВСТУП .....	24
РОЗДІЛ 1. СИНТЕЗ КАЛЬЦІЙ ФОСФАТНОЇ КЕРАМІКИ ПІД ВПЛИВОМ МІКРОХВИЛЬОВОГО ОПРОМІНЕННЯ (ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД).....	30
1.1 Типи біоматеріалів в сучасній медицині .....	30
1.1.1 Гідроксиапатит як головний представник сімейства ортофосфатів кальцію у регенеративній медицині.....	31
1.1.2 Природні біополімери та їх застосування .....	35
1.1.3 Багатокомпонентні композитні матеріали модифіковані наночастинками ... .....	40
1.1.4 Матриці для контрольованої доставки лікарських засобів .....	42
1.2 Мікрохвильове опромінення.....	45
1.2.1 Механізми взаємодії мікрохвильового випромінювання з матеріалами ...	45
1.2.2 Застосування мікрохвильового опромінення в процесі хімічного синтезу біоматеріалів.....	51
ВИСНОВКИ ДО ПЕРШОГО РОЗДІЛУ .....	54
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	55
2.1 Синтез апатит-біополімерних нанокомпозитів.....	55
2.2 Методи дослідження отриманих зразків .....	59
2.3 Математичний аналіз вивільнення лікарських засобів з апатит-полімерних матриць.....	68
ВИСНОВКИ ДО ДРУГОГО РОЗДІЛУ .....	72

РОЗДІЛ 3 АПАТИТНІ КОМПОЗИТИ НА ОСНОВІ АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ .....	73
3.1 Отримання НА під впливом MW опромінення .....	73
3.2 Модифіковані альгінат-апатит-оксид графенові композити .....	75
3.3 Модифіковані альгінат-апатит-фулерен композити.....	89
ВИСНОВКИ ДО ТРЕТЬОГО РОЗДІЛУ .....	94
РОЗДІЛ 4 АПАТИТНІ КОМПОЗИТИ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ.....	96
4.1 Хітозан-апатитні композити синтезовані під впливом MW.....	96
4.2 Модифіковані хітозан-апатит-фулерен композити .....	104
ВИСНОВКИ ДО ЧЕТВЕРТОГО РОЗДІЛУ .....	114
РОЗДІЛ 5 СИНХРОННО СИНТЕЗОВАНІ ХІТОЗАН-КАЛЬЦІЙ ФОСФАТНІ ГРАНУЛИ.....	116
5.1 Вивчення структурно-механічних і фізико-хімічних властивостей.....	117
5.2 Фармакокінетичні та мікробіологічні дослідження .....	127
ВИСНОВКИ ДО П'ЯТОГО РОЗДІЛУ .....	134
ВИСНОВКИ.....	136
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	139

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- ЗХО – звичайне хімічне осадження
- ОФК – ортофосфати кальцію (група)
- АСР – аморфний кальцій фосфат
- Alg – натрій альгінат
- AN – анастезин
- at. % - атомні відсотки
- ВСР – двофазний кальцій фосфат
- С60 – фулерен (Full)
- cdHA – кальцій-дефіцитний гідроксиапатит.
- CF – цефтриаксон
- СНХ – хлоргексидин
- CNM – вуглецеві наноматеріали
- CNT – вуглецеві нанотрубки
- СРР – кальцій пірофосфат
- CS – хітозан.
- СТАВ – цетилтриетиламоній бромід
- ДСРА – дикальцію фосфат ангідрит (монетит).
- ДСРD – дикальцію фосфат дігідрат (брушит).
- DLS – динамічне розсіювання світла
- DS – натрій диклофенак
- ЕСМ – позаклітинний матрикс
- ED – електронна дифракція
- EDA – енергодисперсійна спектрометрія.
- EDTA – етилендіамін тетраоцтова кислота
- FTIR – інфрачервона спектроскопія Фур'є

GO – графен оксид

HC – гібридний композит

HPLC – високоефективна рідинна хроматографія

IRS – інфрачервона спектроскопія.

JCPDS – об'єднаний комітет стандартів порошкової дифракції

MRSA – метицилінрезистентний золотистий стафілокок

MW – мікрохвильове опромінення

MWCNT – багатостінні вуглецеві нанотрубки

PBS – фосфатний буферний розчин

PFO – кінетична модель псевдо-першого порядку

PMMA – поліметилметакрилат

PSO – кінетична модель псевдо-другого порядку

ROS – реактивні форми кисню

SBF – імітована рідина організму

SEM – скануюча електронна мікроскопія

SF – фіброїн шовку

SWCNT – одностінні вуглецеві нанотрубки

TPP – триполіфосфат натрію

TRP – триптофан

US – ультразвукові хвилі

XRD – рентгенівська дифрактометрія

ZOI – зона затримки росту мікроорганізмів

HA – гідроксиапатит

OCP – октакальцій фосфат

TEM – просвічуюча електронна мікроскопія

TCP – трикальцій фосфат

## ВСТУП

Актуальність теми. Робота присвячена вивченню впливу мікрохвильового опромінення на утворення cdHA у присутності природних полісахаридів (альгінат натрію, хітозан) та розробці нової технології створення полімер-апатитних 3D композитних каркасів із заданими фізичними властивостями – ступенем пористості, кристалічністю, розсмоктуванням. Досліджено залежність динаміки вивільнення лікарських засобів від структури отриманих полімер-апатитних композитів з метою отримання більш ефективної системи доставки препарату в зону імплантації.

Використання мікрохвильового випромінювання дозволяє поліпшити структурні, механічні та біологічні властивості 3D матриць на основі cdHA та біополімерів. При застосуванні MW під час хімічної реакції відбувається суттєвий вплив на агрегацію наночастинок гідроксиапатиту, що в свою чергу призводить до їх більшої біоактивності *in vivo*. Окрім того, при застосуванні мікрохвильового випромінювання значно змінюється структура полімерних матриць, підвищується пористість, тому важливо детально дослідити властивості отриманих остеоматеріалів для впровадження їх у практичне використання.

Актуальним підходом до підвищення ефективності біоактивних матеріалів для контрольованої доставки лікарських засобів в зону пошкодження кісткової тканини є використання біорозкладних 3D матриць комбінованих з ортофосфатами кальцію та карбоновими наночастинами. Таргетна доставка протимікробних агентів та частинок неогранічного походження дозволяє водночас поєднати процеси остеосинтезу, а також зменшити запальні процеси характерні для традиційних методів лікування. В ряді робіт описано синтез та дослідження впливу складу композитних матеріалів на здатність пролонговано вивільняти ліки, проте залишається актуальним питання удосконалення фізико-структурних параметрів синтезованих матеріалів.



Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота виконана на кафедрі біофізики, біохімії, фармакології та біомолекулярної інженерії в рамках таких проектів:

- **2018-2020** Грант Міністерства освіти і науки України «Фізичні основи формування складу апатит-біополімерних пористих матриць для контрольованої доставки лікарських засобів в зону імплантації» №0118U003581;
- **2020-2021** В рамках проекту Чеської Республіки «Міжвузівське співробітництво як інструмент підвищення якості обраних університетів України» «Дослідження властивостей сорбційно-аспіраційної дренажної модельної системи, що містить гідроксиapatит, за умов перитоніту у білих щурів»;
- **2023-2025** Грант Національного фонду досліджень України «Фізичні основи формування апатит-біополімер-вуглецевих 3D нанометричних матриць біомедичного призначення з пролонгованою доставкою протимікробних засобів у зону імплантації» №0122U001154;
- **2022-2024** Грант Міністерства освіти і науки України «Фізико-хімічні аспекти формування композитного наноструктурованого біорозкладного матеріалу для лікування ушкоджених периферичних нервів» №0122U000775.

Мета і завдання дослідження.

*Мета* дисертаційного дослідження полягає у вивченні впливу мікрохвильового опромінення на кристалічну структуру гідроксиapatиту, фазовий склад та мікроструктуру матеріалів синтезованих у присутності біополімерів, а також на їх механічні, фізико-хімічні та біологічні властивості. Всі синтезовані матеріали планується використовувати у регенеративній медицині.

Відповідно до поставленої мети було сформульовано такі наукові *завдання*:

- провести вибір оптимальних матеріалів (прекурсорів) для синтезу біоматеріалів для їх потенційного застосування в регенеративній медицині;
- провести синтез дослідних зразків та підбір оптимальних умов застосування мікрохвильового опромінення;
- провести вибір набору методів для вивчення структури апатит-біополімерних матриць.
- оцінити вплив мікрохвильового опромінення на структурний склад зразків, мікроструктуру та пористість, здатність до поглинання рідини та лікарських засобів;
- дослідити здатність до поступового релізу лікарських засобів зі складу синтезованих композитних матеріалів, розрахувати параметри кінетичних моделей вивільнення.

Об'єкт і предмет дослідження.

*Об'єкт дослідження* – апатит-полімерні 3D матриці з вмістом частинок неорганічного походження синтезовані під впливом мікрохвильового опромінення.

*Предмет дослідження* – фізико-хімічні, структурні та біологічні властивості апатит-біополімерних матриць синтезованих під дією мікрохвильового опромінення для використання у регенеративній медицині та здатність вивільнення лікарських засобів зі складу синтезованих матеріалів.

Методи дослідження.

Для виконання дисертаційного дослідження задіяні експериментальні методи (рентгенівська дифрактометрія; растрова електронна мікроскопія; просвічуюча електронна мікроскопія; інфрачервона спектроскопія;

високоєфективна рідинна хроматографія), біологічні методи (дослідження антимікробної активності, біодеградації, токсичності), методи аналізу, узагальнення та обробки експериментальних результатів (оцінка апатитних кристалітів, пористості, здатності до поглинання, розрахунок параметрів хроматографічної моделі).

Наукова новизна отриманих результатів.

У результаті дослідження, сформульовано низку положень і висновків, що містять елементи наукової новизни, зокрема: вперше створено методику синхронного синтезу кальцій фосфатної кераміки у присутності полімеру у формі гранул в фосфорно-збагаченому розчині з подальшим зшиванням CS; проведено дослідження впливу співвідношення кальцію до хітозану на структуру, фізико-хімічні властивості, здатність до вивільнення лікарських засобів та біоактивність гібридних композитів.

Удосконалено методику синтезу гідроксиapatиту без, та в присутності біополімерів з застосуванням MW технології; отримані закономірності впливу MW опромінення на розмір кристалітів НА, на пористість та стабільність форми синтезованих 3D гідроксиapatит-біополімерних матриць; отримані НА-полімерні матриці модифіковано вуглецевими наночастинками (фулерен, оксид графену), досліджено вплив наночастинок на антимікробні, механічні та біологічні властивості.

Практична значимість отриманих результатів.

Одержані результати дозволяють оцінити вплив мікрохвильового опромінення на кристалічну структуру біоматеріалів на основі апатиту та біополімерів (альгінат та хітозан). Зміни параметрів мікроструктури матеріалів призводять до зміни їх біомедичних і механічних властивостей.

Керований вплив мікрохвильового опромінення призводить до зміни пористості та фазового складу матеріалів, що в свою чергу має значущий вплив на здатність синтезованих композитів до контрольованого вивільнення лікарських засобів.

Показано, що апатит-полімерні композитні матеріали можуть бути ефективними матрицями для цільової доставки ліків, зокрема протимікробних та протизапальних препаратів: хлоргексидину, анестезину, диклофенаку натрію та амінокислоти триптофану.

Вказані результати дають можливість отримувати нові конкурентноспроможні біосумісні медичні матеріали з широким спектром контрольованих властивостей, що можуть бути використані в регенеративній медицині, зокрема в ортопедії та стоматології для лікування кісткових дефектів.

Особистий внесок здобувача.

Внесок здобувача полягає у проведенні пошуку та аналізу літературних джерел, проведенні експериментальної роботи (спільно з к.х.н. Суходуб Л.Б.), здійсненні статистичного опрацювання, аналізу та оформлення отриманих даних, підготовці та написанні частини публікацій (відповідно до зазначеного внеску у переліку публікацій за тематикою дисертаційного дослідження).

Вибір теми, постановка завдань дослідження, обговорення результатів та їх узагальнення проведено спільно з науковим керівником, д.фіз.-мат.н. Суходубом Л.Ф. Основні наукові результати доповідалися особисто автором на наукових семінарах і конференціях. Формулювання висновків дисертаційної роботи було здійснено особисто здобувачем.

Апробація результатів.

Результати роботи були представлені на Всеукраїнських та Міжнародних конференціях: International research and practice conference: Nanotechnology And

Nanomaterials (NANO-2019), Nanomaterials: Applications & Properties (NAP-2019), 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering (2020), International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2020), IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications&Properties” (NAP 2020), IV Міжнародна науково-практична конференція Priority Directions Of Science And Technology Development (2020), 11th International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2021), International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2021), 7th International Conference «NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects» (2021), 2nd Multidisciplinary Conference For Young Researchers Sustainable Development Trends and Challenges under COVID-19 (2021).

За темою дисертаційного дослідження опубліковано 10 статей, 8 з яких входять до наукометричної бази даних Scopus, 2 частини монографії та 13 тез доповідей на конференціях.

Структура дисертації та її обсяг.

Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, літературного огляду (розділ 1), експериментальної частини (розділ 2), обговорення одержаних результатів (розділи 3, 4, 5), висновків, переліку використаних джерел (150 посилань). Роботу викладено на 161 сторінці друкованого тексту, вона містить 47 рисунків, 10 таблиць, 1 додаток.

## РОЗДІЛ 1. СИНТЕЗ КАЛЬЦІЙ ФОСФАТНОЇ КЕРАМІКИ ПІД ВПЛИВОМ МІКРОХВИЛЬОВОГО ОПРОМІНЕННЯ (ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД)

### 1.1 Типи біоматеріалів в сучасній медицині

Протягом останніх років було розроблено численні синтетичні замітники кісткової тканини, щоб подолати проблеми, пов'язані з використанням аутотрансплантатів і алотрансплантатів, що є обмеженими у кількості, викликають ускладнення донорської ділянки та підвищують ризик передачі захворювання та імунного відторгнення.

За реакцією живої тканини на певний імплантат можна навести наступний поділ біоматеріалів: біоінертні, біоактивні, біодеградуючі. Біоінертні матеріали – це матеріали, які вперше з'явилися наприкінці 1970-х – початку 1980-х років і були спрямовані лише на відновлення функціональності без токсичних реакцій [1]. До цієї групи матеріалів належать імплантати на основі оксидів металів, наприклад,  $ZrO_2$ ,  $Y_2O_3$ ,  $TiO_2$ ,  $\alpha-Al_2O_3$  [2,3].

Далі (з середини 1980-х років) фокус розробок переключився на біоактивні матеріали – це матеріали, які здатні викликати контрольовану реакцію на місці імплантації, без утворення фіброзної тканини [4]. До таких матеріалів відносяться: біоскло, біоактивна склокераміка та неорганічно-органічні композити (наприклад, неорганічний компонент – гідроксиапатит (НА), органічний компонент – поліметилметакрилат) [5,6]. Зазвичай, дані матеріали використовуються у парі з біоінертними, як поверхневі покриття, адже володіють меншою механічною міцністю.

Матеріали, що резорбуються (біорозкладаються), – це матеріали, які можуть бути видалені клітинною активністю або розчиненням у біологічному середовищі без появи метаболічно шкідливих речовин та формування фіброзної межі. При їх застосуванні лікувальний ефект спостерігається обмежено в залежності від часу. Основна функція цих матеріалів – забезпечити «будівельний» матеріал у процесі

регенерації кісткової тканини. У процесі регенерації імплантований матеріал поступово розсмоктується. До цієї групи матеріалів відносяться, наприклад, фосфати, сульфати, карбонати, трикальційфосфат (ТСР), біоскло, композитні матеріали на основі біополімерів та інші [7,8].

Якщо розглядати біоматеріали за матеріальною природою то можна відокремити наступні види: кераміка, метали, полімери синтетичного та натурального походження, і композити, що створені на основі попередніх варіантів.

#### 1.1.1 Гідроксиапатит як головний представник сімейства ортофосфатів кальцію у регенеративній медицині

Фосфати кальцію мають чудову біосумісність завдяки своїй близькій хімічній та кристалічній схожості з кістковим мінералом, що представлений заміщеним кальцій-дефіцитним гідроксиапатитом. Загалом вони є остеокондуктивними, але не остеоіндуктивними, за винятком пористих синтетичних НА і  $\alpha/\beta$  ТСР, які, як було показано [9,10], мають здатність утворювати кісткові структури в ектопічних ділянках у різних тварин без додавання остеогенних факторів [11–13].

У Таблиці Таблиця 1.1 наведено перелік основних ортофосфатів кальцію з параметрами їх кристалічної ґратки, співвідношенням Са/Р та щільністю.

Хімічно, синтетичні матеріали для заміни кісткової тканини зазвичай базуються на НА чи  $\beta$ -ТСР (або поєднанні НА та  $\beta$ -ТСР). Вимоги до ідеального замітника зазвичай такі: пористість із діаметром пор приблизно 100 мкм (щоб забезпечити вrostання кісткових клітин), швидкість біодеградації порівнянна з швидкістю утворення кісткової тканини (тобто від кількох місяців до приблизно двох років), а також достатню механічну стійкість.

Таблиця 1.1 – Основні представники кальцій фосфатів та їх властивості [14]

Кальцій фосфат	Тип кристалічної ґратки	Параметри кристалічної комірки, нм	Ca/P	Густина (кг/м <sup>3</sup> )
DCPD (брушит)	моноклінна	a=5,812 b=15,180 c=6,239	1,0	2,32
DCPA (монетит)	триклінна	a=6,910 b=6,627 c=6,998	1,0	2,89
ОСР	триклінна	a=19,62 b=9,523 c=6,835	1,33	2,61
α-ТСР	моноклінна	a=12,887 b=27,28 c=15,219	1,5	2,86
β-ТСР	ромбічна	a= b=10,418 c=37,35	1,5	3,07
НА	гексагональна	a= b=9,367 c=6,884	1,67	3,16

НА більш стабільний, ніж α- і β-ТСР у фізіологічних умовах, оскільки він має нижчу розчинність і повільнішу кінетику резорбції. Чистий НА кристалізується в моноклінній просторовій групі P21/b. Однак при температурах вище 250 °C відбувається моноклінний фазовий перехід у гексагональний НА (просторова група P63/m). Деякі домішки, наприклад часткове заміщення гідроксиду іонами фтору або хлориду, стабілізують гексагональну структуру НА при температурі навколишнього середовища. З цієї причини дуже рідкісні монокристали природного НА завжди демонструють гексагональну просторову групу [14].

Стехіометричний НА має співвідношення Ca/P 1,67 і хімічну формулу Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH). Однак його часто записують як Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, щоб вказати, що гексагональна елементарна комірка складається з двох молекул [15]. Стехіометричний НА ніколи не був виявлений в біологічних системах. Проте, він широко використовується як замітник кісткового трансплантата, або як покриття для ортопедичних пристроїв (наприклад, протезів кульшового суглоба) і зубних



імплантатів через його хімічну та структурну схожість з природним кістковим мінералом. Кристалічна структура НА може вміщувати різноманітні катіонні та аніонні заміщення різними іншими іонами для груп  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ),  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ ) та  $\text{OH}^-$  ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ).

НА можна синтезувати за допомогою різних методів (Таблиця 1.2), такими як сухі методи (реакції в твердому стані), вологі методи (ЗХО, гідроліз, золь-гель, емульсія та гідротермальний синтез) та альтернативні методи (опромінення мікрохвилями (MW), сонохімічні методи та зелений синтез) [16,17]. Залежно від техніки приготування можна отримати НА з різною морфологією (сфери, голки, стрижні, квіткоподібні або рівновісні частинки), розміром частинок (мікро- чи нанорозмір), стехіометрією та рівнем кристалічності.

Таблиця 1.2 – Методи отримання гідроксиапатиту

Метод	Реагенти	Умови синтезу	Параметри синтезованого НА
ЗХО	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{H}_3\text{PO}_4$	60-100 °C pH 7-12	Ca/P ≤ 1,67, невелика кристалічність, неоднорідні
Гідротермальний	Фосфати кальцію	100-200 °C 1-2 МПа	Ca/P = 1,67, висока кристалічність, однорідність
Золь-гель	Гель + $\text{Ca}^{2+} + \text{PO}_4^{4-}$	60 °C pH 7-10	Ca/P < 1,67 Фракції брушиту, монетиту
Твердофазна реакція	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CaCO}_3$ $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 + \text{CaCO}_3$	900-1300 °C	Ca/P = 1,67 неоднорідні
Випалювання	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{PO}_4^{3-} \cdot \text{CaF}_2$ , $\text{CaCl}_2$	1650 °C	Великі кристали з неповноцінною граткою
Гідроліз	$\text{CaF}_2$ , $\text{CaCl}_2$ , $\text{Ca}(\text{OH})_2$	1325 °C	граткою

Серед цих методів метод преципітації (ЗХО) є найбільш простим і широко використовуваним методом приготування НА. Він містить реагуюче джерело іонів  $\text{PO}_4$  з джерелом кальцію в присутності інших добавок, таких як основа або

кислота. Використовуються різні джерела цих двох реагентів, і процес зазвичай здійснюється при значеннях рН від 3 до 12 і при температурах від кімнатної до температури кипіння води, при цьому реакційні умови суттєво впливають на структуру синтезованого НА. Через що, цей метод часто може давати нестехіометричний НА ( $\text{Ca/P} \neq 1,67$ ). Стехіометрія НА дуже важлива, коли необхідна термічна обробка матеріалу. Незначне зниження стехіометричного співвідношення кальцію і фосфору в НА може викликати утворення  $\alpha$ - або  $\beta$ -трикальційфосфату при спіканні. Доведено, що існування фаз ТСП покращує механічну поведінку НА і підвищує її здатність до біологічного розкладання. Навпаки, якщо співвідношення  $\text{Ca/P}$  НА перевищує значення 1,67, під час спікання утворюється  $\text{CaO}$ . Повідомляється, що присутність  $\text{CaO}$  знижує міцність матеріалу і може навіть призвести до декогезії всього матеріалу через накопичення напруги, що виникає внаслідок подальшого утворення  $\text{Ca(OH)}_2$ , який зрештою перетворюється на  $\text{CaCO}_3$  [15,18].

Швидкість розчинення НА *in vitro* залежить від типу та концентрації буферного чи небуферного середовища, рН розчину, кристалічності НА та кількості інших фаз відмінних від НА, ступеня мікро- та макропористості та співвідношення тверда речовина/розчин. Ступінь розчинення зменшується в наступному порядку [17]: Аморфний НА  $\gg$   $\alpha$ -ТСП  $\gg$   $\beta$ -ТСП  $\gg$  кристалічний НА.

Механічні властивості НА залежать головним чином від форми (щільна чи пориста), розміру частинок, умов спікання та присутності відмінних від НА фаз. Таблиця 1.3 підсумовує механічні властивості НА кераміки порівняно з кістковими матеріалами.

Дана робота має за мету включити різні антимікробні речовини до різних форм НА та композитів на його основі, та дослідити ефективність використання того чи іншого протимікробного агента.

Таблиця 1.3 – Механічні властивості НА та кісткової тканини [17]

Параметр	Щільний НА	Пористий НА	Кортикальна кістка (*поперечно)	Губчата кістка
Модуль Юнга (ГПа)	35-120	–	17-20 *6-13	0,1-5
Міцність на розрив (МПа)	38-300	3	79-151 *51-56	10-20
Міцність на стиск (МПа)	120-900	2-100	170-193 *133	7-10
Межа текучості (МПа)	38-250	2-11	131-224 *106-131	20
В'язкість руйнування (МПа/м)	0,7-1,2	0,1	2-12	0,1

### 1.1.2 Природні біополімери та їх застосування

Біополімери дуже часто отримують з живих організмів або природних джерел. Полімери – це сполуки, що складаються з мономерних одиниць, ковалентно зв'язаних з утворенням макромолекул. Ці макромолекули взаємодіють одна з одною за допомогою слабких вторинних зв'язків, таких як водневі, гідрофобні та ван-дер-ваальсові зв'язки, утворюючи зв'язані структури. Завдяки ковалентному міжатомному зв'язку всередині молекул полімери виявляють низькі теплові та електричні властивості. На їх термічну та механічну поведінку впливає низка факторів, у тому числі склад полімерного ланцюга, хімічні бічні групи, структури ланцюга та молекулярна маса [19].

Існує багато подібних сполук, які можна розділити на полінуклеотиди, білки, полісахариди та інші сполуки з більш ніж одним мономером [20].

Широкий спектр джерел біологічного походження доступний як багатообіцяюча альтернатива викопному паливу [21].

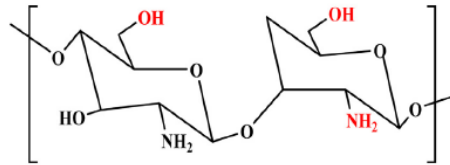
Полімери на біологічній основі – це матеріали, які виробляються з відновлюваних ресурсів, і ці полімери можуть біологічно розкладатися або не розкладатися [22]. Біопластики можуть бути біорозкладаними, однак вони не обов'язково отримуються з біологічних джерел. Деякі полімери на нафтовій основі також можуть бути біологічно розкладаними, наприклад полікапролактон і полібутиленсукцинат, тоді як деякі полімери на біологічній основі не піддаються біологічному розкладанню [23].

У порівнянні з полімерами, отриманими з викопного палива, біополімери пропонують ряд переваг, таких як здатність до біологічного розкладання, нетоксичність і біосумісність, що робить біополімери чудовими кандидатами для широкого спектру застосувань у медицині, фармакології та промисловості, включаючи упаковку, косметику, абсорбенти, електроніку, сільське господарство, очищення води, тканини для одягу, пластмаси та біосенсиори [24]. Протягом останніх 5 років було опубліковано низку оглядів, що аналізують різні теми, пов'язані з біополімерами [25,26], [27,28].

Природні полімери можна вважати першими біорозкладними біоматеріалами, які використовуються в клінічній практиці. Хімічна модифікація природних полімерів також може впливати на швидкість їх деградації. Природні полімери мають кілька притаманних переваг, таких як біоактивність, здатність надавати клітинам ліганди, що зв'язують рецептори, сприйнятливість до клітинної протеолітичної деградації та природного ремоделювання. Однак вони мають деякі недоліки, такі як можлива імуногенність (через їх біоактивність), структурна складність і нижчі біомеханічні властивості [29].

Для даного розділу було обрано лише кілька прикладів біополімерів, які безпосередньо застосовувалися для виконання дослідження.

Хітозан (деацетильований хітин) (Рисунок 1.1) є біополімером тваринного походження, отриманим природним шляхом у вигляді амінополікатіонного полімеру.



Chitosan

Рисунок 1.1 – Структурна формула мономеру хітозану (CS).  
Адаптовано з [30]

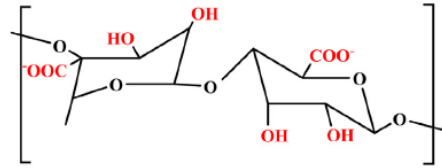
Хітозан, лінійний полісахарид, утворюється через  $\beta$ -зв'язки N-ацетилглюкозаміну та D-глюкозаміну. Безхребетні (панцири крабів і креветок, кальмари, дюфрен, тощо), членистоногі (скорпіони, жуки, тощо) і мікроорганізми (зелені водорості, дріжджі, гриби, міцелій, тощо) є багатими джерелами хітозану [31]. Як і целюлоза, хітозан широко використовується в різних сферах досліджень, включаючи фармацевтику, медичні препарати, упаковку харчових продуктів, сільське господарство, тощо [32]. Завдяки активним функціональним групам, таким як гідроксильні групи в положеннях C-3 і C-6 і аміногрупи в положенні C-2, хітозан здатний демонструвати цікаву динаміку своїх властивостей, а також здатний піддаватися етерифікації та зшиванню [33]. Наприклад, хітозан демонструє розчинні та нерозчинні переходи при різних рН середовищ в результаті того, що аміногрупа сприйнятлива до процесів реакції протонування та депротонування. Це надає йому чудові властивості, включаючи здатність до біологічного розкладання, біосумісність, нетоксичність і адсорбцію [34].

Вважається, що хітин, хітозан та їх похідні мають різноманітну дію, включаючи антиоксидантну та протимікробну дію. Таким чином, їх можна

використовувати в терапевтичних цілях для профілактики або лікування хронічних захворювань [35], [36], [37].

Ступінь деацетилювання та молекулярна маса хітозану є важливими параметрами його біоактивності [38]. Хітозани з різним ступенем деацетилювання та надвисокою молекулярною масою ( $>10^6$  кДа) були отримані з  $\beta$ -хітину шляхом м'якого деацетилювання для вивчення впливу ступеню деацетилювання хітозану та значення рН його розчину/суспензії на антибактеріальну активність проти *E. Coli* і *S. Aureus*. Значення рН 6,0 було оптимальним для найвищої бактерицидної активності, та антибактеріальна активність розчину хітозану при рН 6,0 посилювалася зі збільшенням ступеня деацетилювання [37]. Як правило, більш висока антимікробна активність хітозану спостерігається при нижчих значеннях рН, і він має високу антимікробну активність як катіонний полімер, коли рН нижче 6,5. Позитивно заряджений хітозан може взаємодіяти з негативно зарядженою поверхнею мікробної клітини та порушувати аніон-катіонний баланс, таким чином надаючи інгібуючий ефект [39]. Незалежно від молекулярної маси, механізм антимікробної активності хітозану полягає в амінопротонуванні та подальшому катіонному утворенні [28].

Альгінат (Alg) є широко використовуваним біополімером у багатьох сферах застосування завдяки його властивості гелеутворення та хімічній структурі з гідроксильними та карбоксилатними фрагментами. Альгінати — це природні аніонні, ланцюгоутворюючі, гідрофільні, колоїдні гетерополісахариди з довільно розташованими лінійними нерозгалуженими ланцюгами залишків  $\alpha$ -1-гулуронату (G-блок) і  $\beta$ -d-маннуронату (M-блок), які є C5-епімерами (Рисунок 1.2).



Alginate

Рисунок 1.2 – Структурна схема мономеру альгінату натрію. Адаптовано з [30]

Альгінати містять багато вільних гідроксильних (-ОН) і карбоксильних (-COOH) груп, що дозволяє їм утворювати внутрішньомолекулярні водневі зв'язки. Альгінат є відомим полісахаридом, компонентом клітинних стінок бурих водоростей і екзополісахаридом деяких бактерій [40], [41].

Очікується, що обсяг ринку альгінатів суттєво зросте, причому загальний річний темп зростання з 2021 по 2028 рік оцінюється в 5,0% [33]. Карбоксильні та гідроксильні функціональні групи альгінату дозволяють утворювати різні похідні шляхом естерифікації. Крім того, ці функціональні групи підвищують його розчинність у воді, на яку, однак, впливають такі фактори, як рН розчинника, загальна іонна сила розчиненої речовини та вміст гелеутворюючих іонів у розчиннику. Унікальні властивості альгінатів включають біосумісність, біорозкладаність, нетоксичність, здатність до проліферації клітин, гелеутворення, в'язкість і стабілізація [42], що розширює сферу його застосування [43]. На підставі кількох досліджень нанокompозитні волокнисті каркаси з гідроксиапатиту/альгінату вважаються ідеальними для адгезії, росту, проліферації та диференціації остеобластів з подальшою мінералізацією *in situ* [44], що вказує на перспективну можливість використання в інженерії кісткової тканини.

### 1.1.3 Багатокомпонентні композитні матеріали модифіковані наночастинками

Останнім часом резистентність патогенів до антибіотиків зростає через надмірне та неналежне використання звичайних антимікробних засобів. Отже, виробництво нових протимікробних сполук є необхідністю. Вуглецеві наноматеріали (CNM) (Рисунок 1.3), такі як вуглецеві нанотрубки, графен/оксид графену та фулерени, як новий клас матеріалів, можуть виявляти значну антимікробну активність, особливо у нанокompозитних формах, придатних для різних галузей, включаючи біомедичне та харчове застосування [45].

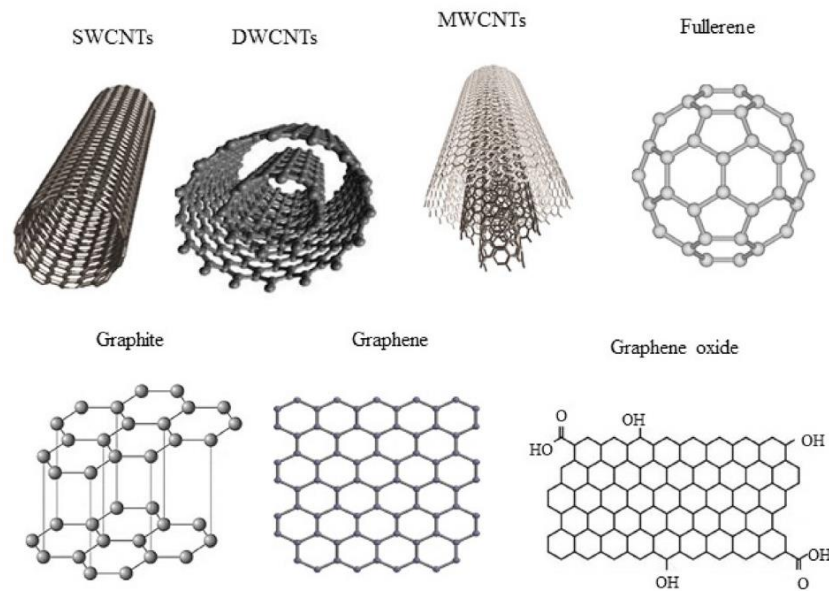


Рисунок 1.3 – Різні структури CNM: одностінні вуглецеві нанотрубки SWCNTs; двостінні вуглецеві нанотрубки DWCNT; багатостінні вуглецеві нанотрубки MWCNT, фулерен (C60), графен оксид (GO). Адаптовано з [45]

Велика міцність та універсальність вуглецевих нанотрубок (CNT) роблять їх чудовими зміцнюючими матеріалами в конструюванні композитів кісткової тканини, різної аерокосмічної техніки, нанопроменів, нанострижнів, мікропристроїв/сенсорів у біомедичній чи оптичній промисловості [46].



Вуглецеві нанотрубки можуть формувати хороший зв'язок із композитним інтерфейсом, переміщувати навантаження та підвищувати міцність матеріалів скафолду [47]. Крім того, тривимірна пориста структура CNT має високу площу поверхні та хороші механічні властивості, що сприяє більшій кількості взаємодій білка та прикріплення клітин [48]. Також, каркас зшитої наномережі та відповідні пористі CNT-вмісні композити корисні для позаклітинного матриксу (ECM) у твердій кістковій тканині [49]. Їх рухливу поверхню та високу взаємодію з клітинними білками можна використовувати для управління морфологією клітин і сприяння поділу основних мікроорганізмів на остеоцити, зокрема остеобласти та генеалогічні клітини нейронів [50].

Електропровідність CNT можна контролювати шляхом зміни ширини, довжини та ступеня скручування, що бере участь в управлінні фізіологічною поведінкою клітин і дозволяє їх використання у якості електронно-клітинних біосенсорів [51]. Крім того, порожниста форма і нанорозмірність CNT роблять їх придатними для вивільнення біомолекул, аптамерів, пептидів і різних лікарських засобів [52].

Більшість методів виготовлення композиту HA–CNT використовують високу температуру через високу температуру плавлення HA (1614 °C). Однак, цю проблему було вирішено шляхом безпосереднього впровадження синтезованих наночастинок до полімер-апатитних матриць.

Консолідовані композити HA–CNT можна класифікувати на дві групи залежно від цільового застосування: це, окремі композитні застосування, що використовуються як протез або його частина, і композитні покриття на металевих імплантатах. Основні міркування під час консолідації полягають у контролі пористості, підтримці гарної дисперсії CNT і в той же час мінімізації хімічної дисоціації HA під дією високої температури. Для підтримки механічної міцності композиту необхідний контроль дисоціації HA на інші фази, такі як

трикальцій фосфат. Контроль пористості та розподілу CNT в основному полягає в досягненні хороших механічних властивостей композитної структури. Хоча найнижча пористість забезпечує найкращі механічні властивості, але це не завжди бажано для ортопедичного застосування. Пористість сприяє вrostанню тканини та інтеграції кістки на поверхню імплантату/протеза.

Отже, намір додавання CNM до НА полягає в тому, щоб покращити механічні властивості композиту, зберігаючи певний ступінь пористості [53].

#### 1.1.4 Матриці для контрольованої доставки лікарських засобів

Дослідження можливостей доставки ліків за допомогою НА активізувалися в останні кілька років. Матеріали на основі НА використовуються для вивільнення антибіотиків і протизапальних препаратів для подолання хірургічних інфекцій та протиракових агентів. Вони також можуть бути використані для доставки білків, вітамінів і гормонів до тканин людини [54,55].

Фактори, що впливають на елювання лікарського засобу з полімерних матриць, включають склад і властивості композиту, пористість і питому поверхню, тип і концентрацію лікарського засобу, взаємодію лікарського засобу з матрицею, а також механізми завантаження і вивільнення лікарського засобу [56] (Рисунок 1.4).

Під час процесу приготування спосіб включення лікарського засобу в композитну суміш впливає на поведінку вивільнення з отриманої матриці. Фізико-хімічні властивості композиту після затвердіння, добавки в матриці і тип лікарського засобу є основними факторами, що визначають профіль вивільнення лікарського засобу, але експериментальні умови, такі як рН, температура і тип середовища, в якому інкубуються зразки, також відіграють важливу роль в кінетиці вивільнення [56].



Рисунок 1.4 – Схематична діаграма факторів, що впливають на вивільнення лікарського засобу з композитів, створена за допомогою BioRender.com. Адаптовано [56]

НА разом з іншими біомолекулами, такими як альгінат, агароза, хітозан, колаген і желатин використовується як композитні матеріали для завантаження ліків і контрольованого їх вивільнення [57]. Дослідження *in vitro* показали, що біокомпозити з НА дуже добре підходять для тривалого контрольованого вивільнення ліків і працюють краще, ніж чистий НА [58].

Іноді дуже важливо націлюватися на конкретні вогнища в конкретний час, залежно від актуальних проблем. Згідно з дослідженнями, проведеними різними дослідниками, намагнічені носії підходять для лікування пухлин [59].

Також, незважаючи на радикальні розробки в хірургічних підходах і протимікробних препаратах, недостатній контроль хронічного остеомієліту, особливо того, що викликається *S. aureus*, резистентним до метициліну і оксациліну, є нагадуванням про те, що необхідно знайти більш стійкі рішення. Група вчених [60] використовували кульки та прокладки з поліметилметакрилату

(PMMA) і покривали їх антибіотиком. Потім їх застосовували місцево для лікування остеомієліту та інфекцій глибоких тканин. Однак цей підхід вимагає вторинної хірургічної процедури для вилучення елементів з PMMA та заміни їх трансплантатами та протезами.

Наночастинки HA, наповнені ципрофлоксацином, синтезовані у роботі [61], були спрямовані на стабільне вивільнення антибіотика. Техніку осадження змінювали з точки зору початкової концентрації, щоб контролювати точну кількість ципрофлоксацину на наночастинках. Кінетику вивільнення препарату вивчали за допомогою двох моделей. Модель Хігучі, яка описує вивільнення антибіотиків шляхом дифузії, продемонструвала чудові данні із високими значеннями коефіцієнтів регресії до 0,99. Експериментальні дані також добре узгоджувалися з моделлю Рітера-Пеппаса.

Магнітні іони, такі як  $Fe^{3+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  та інші, були включені в матрицю наночастинок HA за допомогою методів гідротермального та мікрохвильового опромінення [62]. Завдяки надійним феромагнітним характеристикам ці конструкції допомагають у лікуванні пухлин за допомогою магнітної гіпертермії.

Нанострижні та квіткоподібні структури HA з імобілізованими гемоглобіном та ібупрофеном, що були використані відповідно як білок і лікарський засіб, вивчалися у роботі [63]. Концентрація гемоглобіну досягла 137 мг/г для структур у формі квітів, при концентрації 3,2 мг/г для нанострижнів. Це може бути пояснено тим, що квіткоподібні частинки мали порівняно вищу питому поверхню та об'єм пор, що може полегшити процес адсорбції білка на доступних ділянках [64].

## 1.2 Мікрохвильове опромінення

### 1.2.1 Механізми взаємодії мікрохвильового випромінювання з матеріалами

Мікрохвилі належать до електромагнітного спектру з довжинами хвиль від 1 мм до 1 м і відповідними частотами від 300 МГц до 300 ГГц. Було розроблено різні моделі поглинання енергії, які враховують проникний вплив факторів нагрівання матеріалу; мікрохвильове тепло, яке генерується в матеріалі, повинно мати можливість проникати в матеріал і передавати енергію. Діелектрична проникність ( $\epsilon'$ ) і коефіцієнт діелектричних втрат ( $\epsilon''$ ) кількісно визначають ємнісні та провідні компоненти діелектричної характеристики. Дані компоненти здебільшого виражаються через комплексну діелектричну проникність ( $\epsilon^*$ ):

$$\epsilon^* = \epsilon' - i \epsilon'' \quad (1.1)$$

Деякі властивості впливають на діелектричну поведінку матеріалів. Зокрема, мова йде про електронну та атомну поляризацію, іонну провідність, дипольну (орієнтаційну) поляризацію, механізми поляризації Максвелла-Вагнера. На мікрохвильових частотах дипольна поляризація вважається найважливішим механізмом передачі енергії на молекулярному рівні [65]. Крім того, поляризація Максвелла-Вагнера також є важливим механізмом нагрівання в композитних матеріалах, що є наслідком накопичення заряду в зонах розділу матеріалу [65]. Локальний заряд рухається у відповідь на прикладене електричне поле в діелектричних матеріалах. У середині матеріалів заряд також зв'язаний; рух зв'язаного заряду призводить до поляризації. Поляризація електричного заряду, де поступальний рух обмежений, або поляризація молекул, де обертальний рух обмежений, призводить до затримки між зміною електричного поля та явищем поляризації. Ця затримка часу, відома як час релаксації, зумовлена розсіюванням енергії у вигляді тепла в матеріалі. Ця діелектрична релаксація призводить до мікрохвильового нагріву.

Явища релаксації часто виникають у різних хімічних, механічних або електричних системах. Час релаксації зазвичай визначають диференціальними рівняннями вигляду (де  $h$  і  $k$  — змінні):

$$\tau \cdot \partial k / \partial t + k = h \quad (1.2)$$

Явище релаксації в діелектричних матеріалах аналогічно релаксації в електромобілях. Здатність матеріалів нагріватися пов'язана зі здатністю диполів реагувати в електромагнітному полі, і ця здатність реагувати визначає діелектричні властивості [66], [67].

Діелектричні властивості матеріалів у поєднанні з прикладеними електромагнітними полями призводять до перетворення електромагнітної енергії в тепло. Якщо електричне поле вважається рівномірним по всьому об'єму, наведено наступне спрощене рівняння потужності, що поглинається на одиницю об'єму:

$$P = 2\pi f \varepsilon'' E^2 \quad (1.3)$$

Коли енергія поглинається всередині матеріалу, електричне поле зменшується залежно від відстані від поверхні матеріалу. Отже, останнє рівняння діє лише для дуже тонких матеріалів. Глибина проникнення та знання того, як зменшується електричне поле від поверхні, особливо важливі при обробці товстих матеріалів. Якщо глибина проникнення мікрохвильового опромінення значно менша за товщину матеріалу, нагрівається лише поверхня. Решта зразка нагрівається за допомогою провідності. Останнє рівняння дає уявлення про те, які діелектричні матеріали придатні для мікрохвильової обробки. Матеріали з високою провідністю і низькою ємністю (наприклад, метали) мають високі коефіцієнти діелектричних втрат. Оскільки коефіцієнт діелектричних втрат стає дуже великим, глибина проникнення наближається до нуля. Матеріали з такою

діелектричною поведінкою вважаються відбивачами. Матеріали з низькими коефіцієнтами діелектричних втрат мають дуже велику глибину проникнення. Як результат, дуже мало енергії поглинається матеріалом, і матеріал прозорий для мікрохвильової енергії. Через таку поведінку мікрохвилі найефективніше передають енергію матеріалам, що мають коефіцієнти діелектричних втрат в середині діапазону провідності (Рисунок 1.5). На відміну від цього, звичайне нагрівання передає тепло найефективніше матеріалам з високою провідністю.

На немагнітні матеріали впливає лише компонент електричного поля мікрохвильового опромінення. Таким чином, двома основними механізмами втрат немагнітних матеріалів (таких як Al, Cu, вода, полімери та кераміка) є дипольні втрати та втрати провідності.

Дипольні втрати більш ефективні в діелектричних ізоляційних матеріалах, де диполі утворюються під впливом зовнішнього електричного поля. До таких матеріалів належать вода, кераміка, композити на основі кераміки та полімерів, харчові продукти. Змінне електричне поле викликає зіткнення молекулярних диполів під час обробки цих матеріалів (Рисунок 1.5). Рисунок ілюструє, як молекулярні диполі у воді (з позитивною полярністю на атомі водню та негативною полярністю на атомі кисню) перебудовуються, щоб бути у фазі з електричним полем  $E$ . Інерційні сили, сили натягу, тертя та сили молекулярної взаємодії протистоять цим частковим змінам у впорядкуванні молекул, які збільшують молекулярну кінетичну енергію та призводять до кругового нагрівання. Збільшення кінетичної енергії всіх диполів у матеріалі підвищує температуру матеріалу протягом короткого часу [68].

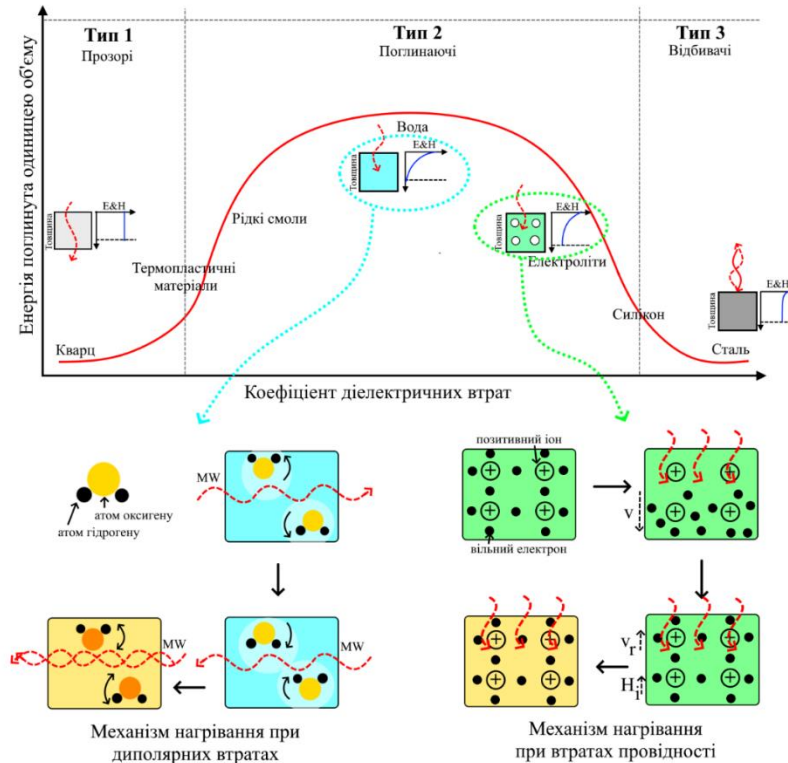


Рисунок 1.5 – Класифікація матеріалів відповідно до їхньої взаємодії з MW та переважаючих механізмів нагрівання в них [69]

При обробці грубих матеріалів глибина проникнення та знання того, як електричне поле зменшується з заглибленням від поверхні, є критичними. Якщо глибина проникнення MW набагато менша за товщину матеріалу, нагрівається лише поверхневий шар. Інша частина зразка нагрівається кондуктивно. Механізм провідності показаний на Рисунку Рисунок 1.5.

Матеріали з високою провідністю і низькою ємністю (наприклад, метали) мають високі коефіцієнти діелектричних втрат. У той же час матеріали з низькими коефіцієнтами діелектричних втрат мають колосальну глибину проникнення. В результаті матеріал поглинає дуже мало енергії, і матеріал прозорий для мікрохвильової енергії. Завдяки такій поведінці мікрохвилі найбільш ефективно передають енергію матеріалам з коефіцієнтом діелектричних втрат в середині діапазону провідності. Навпаки, звичайне



нагрівання найбільш ефективно передає тепло матеріалам з високою електропровідністю.

Композитні матеріали — це змішані поглинаючі матеріали, в яких на поглинання мікрохвиль впливають властивості матриці та модифікаторів. У нашому випадку найбільш цікаві два типи композиційних матеріалів: на основі полімерної матриці та кераміка. Мікрохвилі реагують з компонентом, який має високі діелектричні втрати в композитному матеріалі, якщо є така фаза наявна. Компонент із високими діелектричними втратами поглинає мікрохвильову енергію, виділяє тепло та нагріває інші компоненти за допомогою звичайних режимів нагрівання. Це локалізоване гібридне та вибіркоче нагрівання композитних матеріалів під час мікрохвильової обробки покращує властивості композиту завдяки більш рівномірному нагріванню, ніж звичайні методи обробки композиту. Якщо жодна з фаз, присутніх у композиті, не має високих діелектричних втрат, матеріал, в принципі, поводитиметься як матеріал, що не поглинає мікрохвилі [70]. Розмір і магнітні властивості цих добавок також впливають на характеристики нагріву композитів через компонент магнітного поля мікрохвиль [71]. Оптимальна концентрація добавок також може контролювати перегрів і переохолодження композиційних матеріалів [72].

Очевидно, мікрохвильова обробка або нагрівання істотно відрізняється від звичайного нагріву. При традиційній термічній обробці енергія передається матеріалу за рахунок конвекції, провідності та теплового випромінювання від поверхонь матеріалу. У той же час мікрохвильова енергія потрапляє в матеріали безпосередньо через молекулярну взаємодію з електромагнітним полем. Під час теплопередачі енергія передається за допомогою теплових градієнтів, тоді як мікрохвильове нагрівання є перетворенням електромагнітної енергії в теплову, а не теплопередачею. Ця різниця в способі перетворення енергії може призвести

до багатьох потенційних переваг використання мікрохвиль для обробки матеріалів.

Традиційне нагрівання часто характеризується повільними темпами нагрівання, які обирають для досягнення рівномірного розподілу тепла в матеріалі та мінімізації різких температурних градієнтів, які призводять до напруги, викликані процесом. Для полімерів і кераміки [68], які є матеріалами з низькою теплопровідністю, це може призвести до значного збільшення часу обробки. Таким чином, при звичайній обробці часто існує баланс між часом обробки та якістю продукту. Навпаки, мікрохвильова енергія здатна безпосередньо нагрівати цільові матеріали на молекулярному рівні без необхідності нагрівати печі та стінки реактора.

Окрім об'ємного нагрівання, передача енергії на молекулярному рівні може мати деякі інші переваги. Мікрохвилі також можна використовувати для вибіркового нагрівання матеріалів. Молекулярна структура впливає на здатність мікрохвиль взаємодіяти з матеріалами та передавати енергію. Коли контактні матеріали мають різні діелектричні властивості, мікрохвилі вибірково поєднуються з матеріалом із більшими втратами. Явище селективного нагрівання можна використовувати для багатьох цілей.

Таким чином, вибір технології обробки залежить від бажаних властивостей біокераміки, що синтезується. Звичайне нагрівання займе набагато більше часу, але дозволяє одержати більші розміри кристалів. Навпаки, мікрохвилі можна використовувати там, де наголос робиться на швидкому утворенні біокераміки, особливо менших кристалів. Такі наноструктури частіше використовуються на практиці, ніж більші кристали, завдяки їх: а) більшій площі поверхні та, як наслідок, більшим можливостям для взаємодії з клітинами, фізіологічною рідиною та прилеглими тканинами, б) підвищеній кінетиці їх резорбції *in vivo*.

### 1.2.2 Застосування мікрохвильового опромінення в процесі хімічного синтезу біоматеріалів

Синтез ОФК за допомогою MW техніки дозволяє отримувати різні морфології та розміри та фази відповідно до параметрів реакції.

У роботі [73] розробили нанострижні НА, використовуючи MW до розчину прекурсору, що містить  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , двохосновний безводний фосфат натрію ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) і цетилтриметиламоній бромід (СТАВ). Катіонна поверхнево-активна речовина СТАВ сприяє епітаксійному росту кристалів НА. Численні дослідження в літературі повідомляють, що синтез при використанні високочастотної потужності, призводить до утворення нанострижнів НА діаметром від 20 до 80 нм і довжиною від 40 до 400 нм. Одне з цих досліджень пояснило вирішальний вплив рН і натрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти (EDTA) на морфологію НА [74]. Спостерігалось утворення частинок у формі нано-меча (голки) (рН = 9), нанострижнів (рН = 11) або листоподібних пластівців (рН = 13). Існує метод синтезу НА у вигляді нанодротів з прекурсорів –  $\text{CaCl}_2$  і  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [75]. Автори отримали кристали апатиту довжиною понад 100 нм у розчині олеату натрію. Відмічено, що використання мікрохвильового опромінення значно підвищило кристалічність зразків.

MW метод також використовувався для синтезу аморфних попередників фосфату магнію, які показали біосумісність з клітинами остеобластів *in vitro* [76]. MW також використовувався для нарощування твердого карбідного поверхневого покриття на імплантатах, виготовлених зі сплаву Co–Cr–Mo, який використовувався в штучних суглобах для покращення їхніх механічних властивостей [77]. Отриманий за допомогою MW модифікований НА також використовували для захисту навколишнього середовища [78] та антимікробних застосувань [79].

Протягом останніх п'яти років більше уваги приділялося синтезу модифікованого та заміщеного гідроксиапатиту [80–83]. Як зазначалось раніше (розділ 1.1.1), у НА є багато потенційних іонних заміників, які мають суттєвий вплив на біологічні та структурні параметри НА. Відомо, що заміна невеликої кількості іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у структурі НА може призвести до розладів ґратки, зменшення розміру частинок, зниження кристалічності та збільшення біорезорбції. У іншому прикладі, наведеному в роботі [81], ербій використовувався в  $\text{Er}_2\text{O}_3$  для створення зон для поглинання лазерної енергії для формування щільнішого мінералу емалі порівняно зі звичайним дентином. Було встановлено, що співвідношення Ca/P для Er-НА було близьким до природного або синтетичного НА.

Sr, Mg і Zn заміщений НА (Sr/Mg/Zn-НА) були синтезовані [84] з використанням гліцину як матриці шляхом заморожування. Результати показали, що синтезований Sr/Mg/Zn-НА підтримує ріст апатиту та прискорює його. Вирішальну роль у синтезі НА має подібність будови та властивостей синтетичного та природного НА, що входить до складу кісткової структури. Особливу увагу приділено безвідходним та безпечним для природи методам «зеленого» синтезу. Одним із них є синтез апатиту з яєчної шкаралупи [85,86]. Частинки яєчної шкаралупи можуть служити шаблоном для отримання добре контрольованих голчастих наночастинок НА. Виробництво контрольованих голчастих наночастинок гідроксиапатиту без будь-яких поверхнево-активних речовин робить їх чудовим наноматеріалом для біомедичних застосувань, оскільки біологічні тканини чутливі до забруднення.

Технологія MW усунула багато обмежень, які існували для полімерних біоматеріалів [87]. Наприклад, виробництво хітозану та  $\epsilon$ -капролактону стало можливим у значно коротші терміни, ніж раніше. Вивчено використання MW для децелюляризованих м'яких тканин (сухожилля, хрящі). Однак було зазначено, що

підвищення ефективності децелюляризації тканин можливо шляхом оптимізації електромагнітного поля в печі [88].

Зважаючи на велику кількість робіт по MW технології, дуже мало було опубліковано робіт, які описують мікрохвильовий синтез наночастинок ОФК у присутності полімерів. Серед наявних робіт більша увага приділяється синтезу наночастинок апатиту з імітованої рідини організму (SBF) на вже сформованих полімерних пористих каркасах [89,90]. Біоміметичний метод у розчині SBF може сформувати шар апатиту на підкладці без спеціального обладнання або високих температур обробки. Однак процес відбувається повільно, і формування ОФК на занурених субстратах здійснюється в період від кількох днів до 2 тижнів. Для прискорення цього процесу використовуються розчини SBF з більшою концентрацією іонів ( $n$  SBF;  $n = 2x, 4x, 5x, 8x, 10x$ ) [91]. Група авторів [91] розробила технологію MW для індукції осадження НА на 3D каркасах, виготовлених з хітозану в концентрованому розчині SBF. Під час мікрохвильової дії функціональні аміногрупи хітозану активуються, енергія передається іонам, присутнім у концентрованому SBF, і стимулюється зародження апатиту.

У роботі [92] технології мікрохвильового опромінення та газового спінювання були успішно поєднані для отримання надпористих гідрогелів на основі хітозану. Отримані результати свідчать про те, що впровадження мікрохвильової технології може підвищити ефективність формування біокераміки НА та сприятиме утворенню рівномірного та щільного покриття НА на поверхні 3D каркасів. У дослідженні [93] мікрохвильове опромінення протягом 20 хвилин було використано для отримання магнітних частинок із розчинів солей заліза в присутності декстрану. Отриману суспензію додавали до суміші прекурсорів для отримання гідроксиapatиту. Метод мікрохвильового випромінювання також використовувався в [94] при синтезі нанокompозиту на основі гідроксиapatиту, що містить магнетит  $Fe_3O_4$ . На обох стадіях синтезу використовували мікрохвильове нагрівання. Результатом став

нанокомпозит з ієрархічною структурою, пористою поверхнею та супермагнітними властивостями. Зразки НА та карбонатзаміщеного гідроксиапатиту (зНА) отримували під впливом фізичних факторів, а саме ультразвукового (US) та мікрохвильового випромінювань [68]. Ультразвукова кавітація може збільшити перенасичення та посилити зародження [95,96]. Результати FTIR та XRD підтвердили утворення кальцій-дефіцитних НА та НА типу В із співвідношенням Са/Р у межах 1,62–1,87.

### ВИСНОВКИ ДО ПЕРШОГО РОЗДІЛУ

У цьому розділі подано огляд нових тенденцій синтезу наночастинок ОФК і детально обговорено три ключові проблеми: 1) підготовка та характеристика наночастинок ОФК, зокрема за допомогою мікрохвильового опромінення; 2) вибір оптимальних додаткових компонентів для остеоматеріалів (полімери, наночастинок) 3) застосування наночастинок ОФК у якості систем доставки лікарських засобів. Кальцій-фосфатні цементи є найбільш економічним та ефективним біоматеріалом для заповнення кісткових порожнин завдяки своїй біосумісності, здатності до біологічного розкладання, ін'єкційного введення та самозастиганню. Вони також широко використовуються як носії для доставки ліків завдяки своїй здатності стабільно вивільняти різні органічні молекули, такі як антибіотики та фактори росту, що сприяють регенерації кісткової тканини. Наночастинки на основі ОФК загалом мають низку потенційних переваг для доставки ліків: 1) легко доступні за помірною ціною; 2) біосумісні та позбавлені явної токсичності чи імунної відповіді; 3) біологічно розкладаються в біологічному середовищі; 4) мають стабільні біохімічні властивості, які не впливають на біоактивність корисного навантаження; і 5) володіють гнучкими та модифікованими функціями для створення багатофункціональних наноматеріалів.

## РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1 Синтез апатит-біополімерних нанокомпозитів

#### 2.1.1 Матеріали та реактиви

Для синтезу використовували наступні хімічні речовини:

1. Біополімери: хітозан біомедичної якості (М.М. 100–300 кДа, ступінь деацетилювання 85%, Acros organics, США); натрію Alg низької в'язкості (E407, Shanghai Chemical Company Ltd, Китай).

2. Реактиви: кальцій нітрат тетрагідрат  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , діамоній дигідрофосфат  $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ , амоній гідроксид  $\text{NH}_4\text{OH}$  (придбані у Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.), кальцій хлорид  $(\text{CaCl}_2)$ , 85% ортофосфорна кислота  $(\text{H}_3\text{PO}_4)$ , гідроксид натрію  $(\text{NaOH})$  (аналітичного сорту, постачалися Merck); кальцій ацетат  $\text{C}_4\text{H}_6\text{CaO}_4$ , натрій дигідроортофосфат  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , оцтова кислота  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , натрій триполіфосфат  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  (виробництво Китай).

3. Наночастинки: С60 (водний колоїдний розчин із середнім розміром частинок 50 нм), приготовлений згідно [97,98], порошок GO (Sigma-Aldrich, США).

4. Лікарські засоби: комерційно доступний аптечний анестезин AN (М.м 165,189 г/моль), хлоргексидин СНХ (М.м 505,4 г/моль), диклофенак натрію DS, цефтриаксон CF, амінокислота триптофан TRP.

#### 2.1.2 Кристалізація гідроксиapatиту з водних розчинів

Синтез гідроксиapatиту розпочинали з додавання 0,5М розчину  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  по краплях до 0,3М розчину  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Після доведення рН до 10,5 (додаванням розчину аміаку) суспензію переносили в побутову мікрохвильову піч Samsung M1712NR (частота 2,45 ГГц) для її опромінення протягом 3 хв при потужності 600 Вт. Після охолодження, промивання та

центрифугування (6 хв, 8000 об./хв.) отримували MW-оброблений гідрогель НА, який в подальшому використовувався для синтезу композитних матеріалів [99].

Також, гідрогель НА готували в присутності природнього біополімеру хітозану. До 100 мл 0,1М розчину  $\text{CaCl}_2$  додавали 10М розчин  $\text{NaOH}$  до досягнення  $\text{pH} = 12$ . До вищевказаного розчину по краплях додавали 100 мл 0,06М розчину  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , що містив 0,4 г хітозану. Отриману суміш розділяли на 4 зразки. Контрольний зразок CS/НА був синтезований класичним методом, який включав нагрівання до  $80\text{ }^\circ\text{C}$  та витримку протягом 24 год без впливу MW. Три інші зразки опромінювали побутовими мікрохвилями при різній потужності (300, 600 і 800 Вт) протягом 5 хв. Зразки отримали назви 300mwCS/НА, 600mwCS/НА, 800mwCS/НА. Після охолодження та центрифугування отримували гелі CS/НА з вологістю 90 мас.% [100].

### 2.1.3 Синтез модифікованих гідроксиапатит-біополімерних гранул

Хітозан-апатитні гранули. Готували 3% розчин CS в 1% оцтовій кислоті та додавали до гелю НА-CS у ваговому співвідношенні 1:1, суміш обробляли ультразвуком протягом 5 хв, після чого додавали в 1% розчин триполіфосфату натрію (TRP) для зшивання протягом 24 год. Сформовані гранули ретельно промивали і висушували при кімнатній температурі. В якості модельних препаратів використовували фармацевтичний розчин AN концентрацією 12 мг/мл і 0,05% СНХ. Експериментальні кульки насичували AN і СНХ протягом 24 годин з подальшим висушуванням при  $37\text{ }^\circ\text{C}$  [100].

Фулерен-хітозан-апатитні гранули. Для отримання модифікованих матеріалів з вмістом карбонових наночастинок до 3% розчину CS в 1% оцтовій кислоті додавали розчин C60 в ультрачистій воді (2,6 мг/мл) для досягнення концентрації наночастинок в розчині 150 та 300 мкг/мл. Суміш обробляли



ультразвуком протягом 20 хв. Подальші кроки були аналогічні до попередньо описаних. Потужність мікрохвильового опромінення становила 300W. Згодом зразки отримали назву 150Full-CS/HA та 300Full-CS/HA. Кінцевий вміст С60 в отриманих гранулах становив 0,0004 % та 0,0008 % (у перерахунку на масу сухого С60 до маси порошку HA). Як модельний препарат використовували фармацевтичний розчин AN концентрацією 12 мг/мл [101].

Оксид графен та фулерен альгінат-апатитні гранули. Технологічна схема отримання гранул показана на Рисунку Рисунок 2.1.

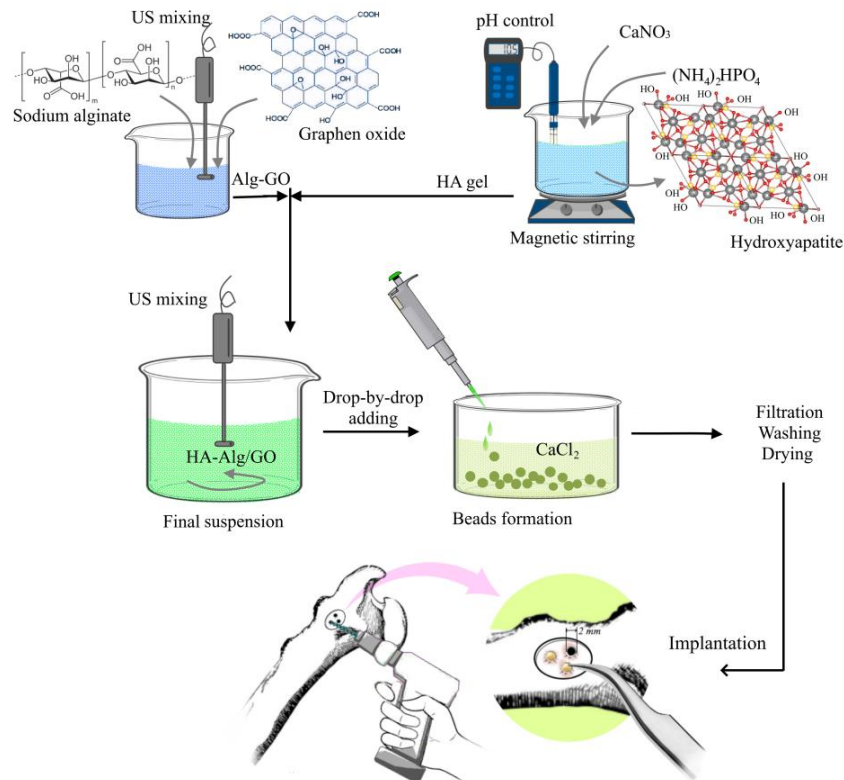


Рисунок 2.1 – Приготування композитів HA-Alg, з вмістом GO

Порошок GO диспергували в 2 % розчині Alg при концентраціях GO 15 і 150 мкг/мл. Колоїдні суспензії Alg-GO обробляли ультразвуком протягом 10 хвилин (40 кГц), а потім перемішували протягом ночі при 37 °C у темряві. Гідрогель HA з вологістю близько 85 % отримували за описаною раніше методикою [4]. Гідрогель HA поступово додавали до колоїдних суспензій Alg-

GO у ваговому співвідношенні 1:1 і обробляли ультразвуком (100 Вт) протягом 3 хв. Отриману дисперсію додавали до 100 мл 0,25М розчину  $\text{CaCl}_2$ , у якому гранули витримували протягом 24 годин. Отримані зразки потім збирали фільтрацією, промивали та сушили при  $37^\circ\text{C}$  протягом 24 годин. Кінцевий вміст GO в отриманих гранулах становив 0,0004 % та 0,004 % (у перерахунку на масу порошку GO до маси порошку HA). Зразки отримали назви 15GO-Alg/mwHA та 150GO-Alg/mwHA. В якості модельних препаратів використовували фармацевтичний СНХ (0,05 % розчин) і DS (2,5 мг/мл).

Насичення зразків експериментальними препаратами проводили замочуванням 0,2 г ліофілізованих кульок у 2 мл розчинів СНХ або DS протягом 2 год з наступним висушуванням при  $37^\circ\text{C}$ .

#### 2.1.4 Синхронний мікрохвильовий синтез гідроксиапатит-хітозанових гранул

На базі лабораторії «Біонаноконкомпозит» був розроблений альтернативний метод синхронного синтезу композитних матеріалів (Рисунок 2.2).

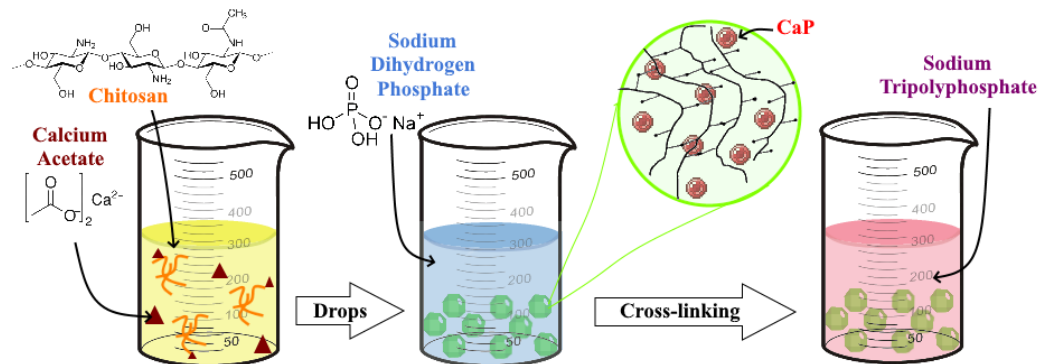


Рисунок 2.2 – Схема синтезу гібридного композиту

Як вихідні розчини готували 6% CS в 1% оцтовій кислоті, 0,5М розчин ацетату кальцію, 0,3М розчин дигідроортофосфату натрію та 1% розчин ТРР. CS додавали до ацетату кальцію (рН 6,86) при урахуванні співвідношення Ca/CS

(маса/маса), що становив 0,15, 0,45 та 0,75. Суміші струшували протягом 3 год (37 °С, 110 об./хв.) з подальшим поступовим додаванням у надлишок 0,3М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (рН 8,0), достатній для вільного розташування утворених експериментальних зразків. Реакцію залишали на 2 години при рН 6,86. Потім частина зразків була піддана впливу MW-випромінювання (300 Вт) протягом 75 с (імпульсним впливом – 5 разів по 15 секунд, для запобігання перегрівання реакційної суміші), де суміш досягла 60 °С. Конвекційне нагрівання при 60 °С було застосовано до іншої частини зразків з таким самим співвідношенням Ca/CS, що синтезували для порівняння та визначення впливу MW опромінення на структуру синтезованих зразків. Після охолодження розчин  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  замінювали на 1% TPP (рН 9,0), який використовували як хімічний зшивач макромолекул CS протягом 12 годин, що забезпечувало стабільність форми гранул та спорідненість іонів кальцію *in vivo*. Отримані гібридні гранули промивали дистильованою водою та сушили при 37 °С. За відношенням Ca/CS (0,15, 0,45, 0,75) зразки, синтезовані з використанням конвекційного нагріву, отримали назву 0,15CS/CaP, 0,45CS/CaP, 0,75CS/CaP, а з використанням MW – 0,15mwCS/CaP, 0,45mwCS/CaP, 0,75mwCS/CaP відповідно [102].

Насичення зразків експериментальними препаратами проводили замочуванням та безпосереднім додаванням під час синтезу, шляхом додавання порошку до розчину хітозану. У якості модельного лікарського засобу використовували цефтриаксон.

## 2.2 Методи дослідження отриманих зразків

Дослідження синтезованих матеріалів проводили на базі Сумського державного університету, а саме: центру колективного користування науковим обладнанням «Лабораторія матеріалознавства геліоенергетичних, сенсорних та наноелектронних систем» та в лабораторії «Біонанокомпозит», яка є структурним

підрозділом кафедри біофізики, біохімії, фармакології та біомолекулярної інженерії навчально-наукового медичного інституту СумДУ.

### 2.2.1 Рентгенівська дифрактометрія

Рентгеноструктурні дослідження (XRD) кристалографічної структури зразка проводили на автоматизованому дифрактометрі ДРОН-3 (НПП «Буревісник»). Використовували CuK $\alpha$ -випромінювання (довжина хвилі 0,154 нм) по Бреггу-Брентано  $\theta$ -2 $\theta$  (5.0–60,0°) з кроком 0,02° і часом підрахунку 2 с, струм складав 30 мА, прискорювальна напруга 40 кВ. Ідентифікацію кристалічних фаз проводили за допомогою каталогу карток JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) та бази ICDD (International Centre for Diffraction Data).

Середній розмір кристалітів розраховували як функцію від напівширини досліджуваного піку за формулою [99]:

$$L = \frac{K \lambda}{\beta_m \cos \theta} \quad (2.1)$$

де  $\theta$  – кут ковзання;  $\lambda$  – довжина хвилі рентгенівського випромінення;  $\beta_m$  – напівширина дифракційного профілю (розширення через малі розміри кристалічної решітки);  $K=1$  (константа, залежна від форми кристалітів).

### 2.2.2 Електронна мікроскопія та енергодисперсійний аналіз

Морфологічні дослідження виконували за допомогою растрового електронного мікроскопа (SEM, FEI Inspect S 50), EDX з детектором AZtecONE X-MAXN20 (Oxford Instruments plc) та Vega 3 Tescan (Тренчинський університет ім. А. Дубчека, Факультет промислових технологій, Словаччина, в рамках наукового стажування за програмою Erasmus+). Мікрофотографії поверхні

зразків були зроблені в режимі вторинних електронів при напрузі  $HV = 10.00\div 20.00$  кВ.

Структуру та фазовий склад синтезованих зразків досліджували за допомогою просвічуючого електронного мікроскопа ПЕМ-125К (SELMІ, Суми, Україна). Прискорювальна напруга становила 90 кВ. Дисперсні зразки перед аналізом фіксували на пористих вуглецевих плівках міді (30 x 30 мкм) та нікелю (50 x 50 мкм) (10-20 нм). Розмір наночастинок вимірювали за допомогою TEM-зображень.

### 2.2.3 Структурне моделювання

Структуру комплексу побудовано за допомогою програмного забезпечення HyperChem 8.0 та мінімізовано за допомогою методу молекулярної механіки MM+. Просторова структура елементарної комірки НА була отримана [103] з рентгенівського аналізу синтетичного зразка H<sub>6</sub>L і була взята нами з American Mineralogist Crystal Structure Database у формі AMCfile (код 0002297). Далі, цю комірку було використано для побудови плоскої кристалічної структури, що складається з чотирьох 2x2 комірок, які добре відповідають формі та розмірам відповідної ромбовидної молекули GO за допомогою програми VESTA (версія 3.4.4). Структура GO [104] була побудована за допомогою програмного забезпечення HyperChem 8.0, а енергія була мінімізована за допомогою Gaussian09W на теоретичному рівні DFT (B3LYP) з базовим набором 6-31G\*\*. Структура Alg була побудована за допомогою програмного забезпечення HyperChem 8.0 (модуль Sugar Builder) шляхом чергування гіалуронових (HYL) і маннуринових (MAN) одиниць, з'єднаних глікозидними зв'язками  $\alpha$ -1,4. Довжину олігоцукру встановлювали таким чином, щоб покривати периметр межі розділу між НА і GO і складали 17 одиниць: (HYL-MAN)<sub>8</sub>-HYL. Атоми водню карбоксильних груп полісахаридів були заміщені на атоми натрію [105].

#### 2.2.4 Міцність на стиск

Для вимірювання міцності при одноосьовому стиску зразки формували в таблетки діаметром 5 мм і товщиною 2,4-2,6 мм шляхом холодного пресування з використанням гідравлічного преса (при  $\sim 100$  МПа). Механічні властивості зразків під навантаженням досліджували на оригінальній випробувальній машині. Дослідження проводилося на базі Київського національного університету ім. Т.Г.Шевченка [105].

#### 2.2.5 Інфрачервона спектроскопія

Інфрачервоні спектри Фур'є (FTIR) були отримані за допомогою спектрометра PerkinElmer Spectrum BX в діапазоні  $400-4000$   $\text{cm}^{-1}$  з роздільною здатністю  $1$   $\text{cm}^{-1}$ . Зразок порошку змішували з порошком KBr у співвідношенні 1:100 та пресували в таблетки.

#### 2.2.6 Високоєфективна рідинна хроматографія

Експеримент проводили за допомогою високоєфективної рідинної хроматографії (HPLC) з використанням Agilent 1200 з DAD-детектором ( $\lambda = 210-270$  нм) і хроматографічної колонки C18 (Zorbax SB-C18  $4,6 \times 150$  мм, 5 мкм) за температури навколишнього середовища.

Експериментальні зразки, насичені лікарськими засобами (Рисунок 2.3), поміщали в 6 мл PBS (фосфатний буферний розчин) при різному рН (7,2 і 4,0) та інкубували при  $37$  °C при безперервному струшуванні 80 об/хв. PBS – це водний сольовий розчин, що містить дигідрофосфат натрію (10 ммоль/л), хлорид натрію (137 ммоль/л), хлорид калію (2,7 ммоль/л) і дигідрофосфат калію (1,8 ммоль/л).

Вивільнення препаратів контролювали погодинно протягом першої доби, а потім щоденно. З кожної пробірки брали аліквоти по 600 мкл PBS, а потім

додавали рівний об'єм свіжого середовища для підтримки постійного початкового об'єму в пробірках. Дегазацію досягали за допомогою ультразвукової обробки протягом 45 хв.

*Визначення виділення анастезину (AN):* рухома фаза складалася з двох розчинів, 10% метанолу та 90% крижаної оцтової кислоти (10%, об./об.), при швидкості потоку 2 мл/хв. Використовували ізостатичну обробку, температура аналітичної колонки 40 °С. Об'єм ін'єкції становив 20 мкл, а детектування відбувалося при 210 нм. Час дослідження проби – 5 хвилин.

Анастезин – етиловий ефір п-амінобензойної кислоти (ПАВК), місцевий анестетик для поверхневої анестезії. Перешкоджає виникненню больових відчуттів у чутливих нервових закінченнях і проведенню больових імпульсів по нервових волокнах.

*Визначення виділення хлоргексидину (CHX):* рухома фаза складалася з двох розчинів у співвідношення 68:32 – 68 % 0,05 М калій гідрофосфатного буфера з 0,2 % триетиламіну (рН=3,0 при 21 °С) та 32 % ацетонітрилу, при швидкості потоку 2 мл/хв. Використовували ізостатичну обробку, температура аналітичної колонки 40 °С. Об'єм ін'єкції становив 20 мкл, а детектування відбувалося при 262 нм. Час дослідження проби – 5 хвилин.

Хлоргексидин використовується в антисептиці (дезінфекція шкіри рук), косметиці (добавка до кремів для обличчя, зубної пасти, дезодорантів і антиперспірантів) і фармацевтиці (консервант для очних крапель, антисептична діюча речовина для лікування ран і пов'язок і полоскання ротової порожнини). Коли рН середовища наближається до фізіологічних значень, сіль хлоргексидину дисоціює, вивільняючи позитивно заряджений катіон хлоргексидину. Бактерицидний ефект є результатом зв'язування цієї катіонної молекули з негативно зарядженою клітинною стінкою бактерії. У низьких концентраціях

хлоргексидин має бактеріостатичну дію, у високих концентраціях порушує клітинні мембрани і викликає загибель клітин.

*Визначення виділення диклофенаку натрію (DS):* рухома фаза складалася з двох розчинів у співвідношенні 35:65 – 35% 0,05 ортофосфорної кислоти (рН 2,0) та 65 % ацетонітрилу, при швидкості потоку 2,0 мл/хв. Використовували ізостатичну обробку, температура аналітичної колонки 40 °С. Об'єм ін'єкції становив 20 мкл, а виявлення відбувалося при 254 нм. Час дослідження проби – 3 хвилини.

Диклофенак, похідне фенілоцтової кислоти, відноситься до групи нестероїдних протизапальних засобів. Має протизапальну, безпечну та жарознижуючу дію за рахунок пригнічення синтезу простагландинів, завдяки чому зменшується всі прояви запалення (біль, набряк, локалізована гіпертермія).

*Визначення виділення цефтриаксону (CF):* рухома фаза складалася з двох розчинів у співвідношенні 35:65 – 35% 0,05 ортофосфорної кислоти (рН 2,0) та 65 % ацетонітрилу, при швидкості потоку 2,0 мл/хв. Використовували ізостатичну обробку, температура аналітичної колонки 40 °С. Об'єм ін'єкції становив 20 мкл, а виявлення відбувалося при 254 нм. Час дослідження проби – 3 хвилини.

Цефтриаксон – цефалоспориновий напівсинтетичний антибіотик третього покоління для парентерального застосування широкого спектру дії. Бактерицидна активність цефтриаксону зумовлена пригніченням синтезу клітинної стінки. Цефтриаксон активний *in vitro* проти різноманітних грамнегативних і грампозитивних мікроорганізмів. Цефтриаксон характеризується дуже високою стійкістю до бета-лактамаз (пеніцилінази та цефалоспоринази), більшості грампозитивних і грамнегативних бактерій.

*Визначення адсорбції триптофану (TRP):* рухома фаза складалася з двох розчинів у співвідношенні 92:8 – 92% ацетонітрилу та 2 % натрій ацетатного



буферу (рН=3,5), при швидкості потоку 1,0 мл/хв. Використовували ізостатичну обробку, температура аналітичної колонки 40 °С. Об'єм ін'єкції становив 5 мкл, а виявлення відбувалося при 254 нм. Час дослідження проби – 7 хвилин.

Для всіх методик були побудовані калібрувальні криві поглинання лінійним методом ( $R_2 > 0,995$ ).

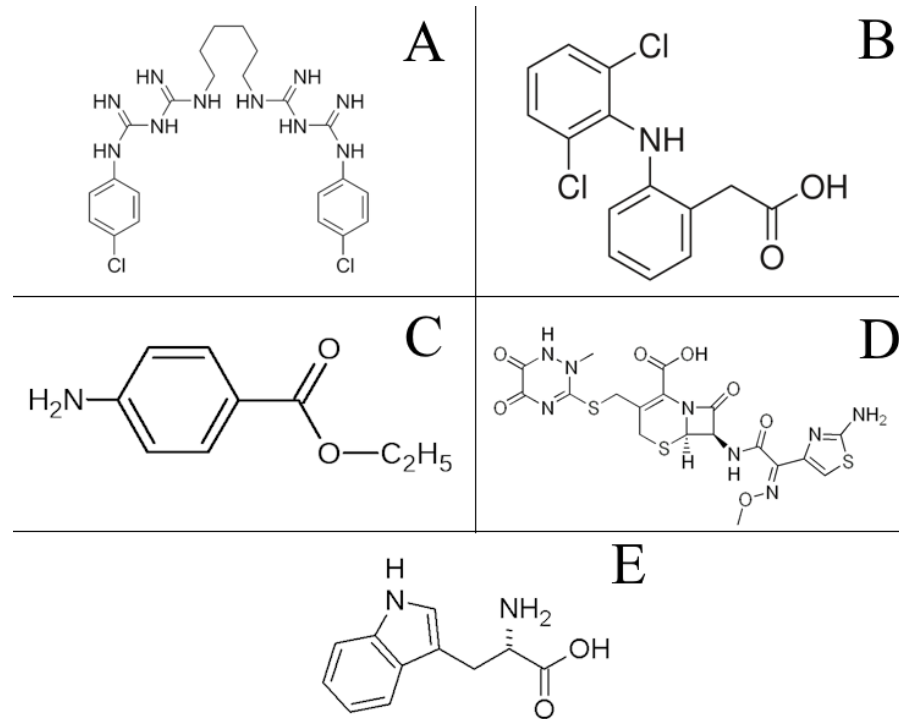


Рисунок 2.3 – А) Хлоргекседин, В) Диклофенак натрію, С) Анастезин, D) Цефтриаксон, Е) Триптофан

### 2.2.7 Біологічні дослідження *in vitro* та *in vivo*

Рівноважний ступінь набрякання визначали кількісно шляхом вимірювання змін маси зразка як функції часу занурення зразка у фосфатно-сольовий буфер при рН=7,33. Осмолярність та концентрація іонів PBS відповідали таким у фізіологічному розчині людини (приблизно 300 мосм/л) [106].

Через 24 години зразки діставали, видаляли фільтрувальним папером надлишок поверхневої рідини та зважували з точністю до четвертого знаку.

Коефіцієнт набрякання ( $S_w$ ) розраховували за допомогою наступного рівняння [107]:

$$S_w = W - W_o / W_o * 100\% \quad (2.2)$$

де  $W_o$  – початкова маса зразку, а  $W$  – кінцева маса набряклого зразку.

*Антибактеріальна активність* вимірювалася методом дискової дифузії [108]. Спосіб полягає у розміщенні фільтрувального паперу  $d=0,8$  мм, насичених синтезованими зразками, у чашки Петрі на поверхню агару, засіяного індикаторними бактеріями. Як тест-штам використовували культуральні суспензії грамнегативних *E. coli* (ATCC 25922) і грампозитивних *S. aureus* (ATCC 25923) з концентрацією  $1,5 \times 10^8$  КУО/мл (0,5 мутності за МакФарландом). Чашки Петрі із зразками інкубували в термостаті при  $37$  °C протягом 24 год. Антибактеріальні властивості оцінювали шляхом вимірювання зони пригнічення росту (ZOI), що оточує зразки.

*Дослідження життєздатності клітин.* Первинні клітини остеобластів людини культивували в модифікованому середовищі Дульбекко F-12 (DMEM/F-12) з L-глутаміном, що містить 100 одиниць/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 2,5 мкг/мл амфотерицину В, 10 % фетальної бичачої сироватки та 1,0 нг/мл bFGF. Клітини витримували при  $37$  °C у зволоженому інкубаторі з 5%  $CO_2$  протягом 24 годин до отримання моношару з більш ніж 80% конфлюентністю. Остеобласти висівали в кожну лунку з щільністю клітин ( $4 \times 10^4$  клітин на лунку). Через 24 години в лунки додавали гранули для культивування клітин масою 0,026 – 0,028 г.

Життєздатність клітин аналізували за допомогою колориметричного аналізу *Alamar blue*, у якому резазурин є синім барвником, який відновлюється до рожевого резорурфіну лише життєздатними мітохондріями. У кожну лунку додавали *Alamar blue* (Invitrogen) у кількості, що дорівнює 10% об'єму. Як

негативний контроль додавали розчин *Alamar Blue* до середовища без клітин. Як позитивний контроль додавали розчин *Alamar blue* до середовища, лунки якого містять лише клітини без зразків. Планшети інкубували протягом 4 годин при 37 °C у темряві. Середовище переносили в інший 96-лунковий планшет і вимірювали абсорбцію за допомогою пристрою для зчитування планшетів Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) при довжинах хвиль 570 і 600 нм. Життєздатність клітин вимірювали на 3-й день культивування клітин. Розрахунок відсотка зменшення *Alamar blue* проводили як рівняння згідно з протоколом виробника. Контроль росту та проліферації клітин відбувався за допомогою системи зображення клітин EVOS XL Core (ThermoFisher Scientific, США).

*Дослідження in vivo на моделі щурів.* Усі досліди на тваринах проводилися відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985 р., Гельсінська декларація Генеральна асамблея Всесвітньої медичної асоціації (2000)). Досліди проводили на 3-місячних білих статевозрілих лабораторних щурах (жива маса 220-250 г) за ISO10993-6. Моделювання дефекту проводили в метафізарній частині стегнової кістки щурів під загальною внутрішньо-м'язовою анестезією (10 мг/кг аміназину, 50 мг/кг кетаміну) за допомогою стоматологічної бормашини (діаметром 2 мм).

Утворений дефект кісткової тканини заповнювали досліджуваним біоматеріалом. Після цього тваринами опікувався ветеринар. На 30-ту добу після операції тварин виводили з експерименту передозуванням ефіру для наркозу з подальшим видаленням дефектної кістки для гістологічного дослідження.

### 2.2.8 Статистичний аналіз

Вимірювання представлені як середнє стандартне відхилення ( $\pm$ , SD). Кожен тест в експерименті повторювався тричі. Т-критерій Стьюдента використовувався для аналізу будь-яких статистичних відмінностей у діапазонах даних із 95% довірчим інтервалом.

### 2.3 Математичний аналіз вивільнення лікарських засобів з апатит-полімерних матриць

Найбільш часто використовуваними кінетичними моделями адсорбції є моделі псевдопершого порядку (PFO) [109], псевдодругого порядку (PSO) [110] і моделі комплексної дифузії [111]. Найпоширенішою моделлю, яка використовується для визначення кінетики адсорбції забруднюючих речовин із водного середовища за допомогою адсорбентів, індукованих MW, є PSO. Модель підтверджує процес хемосорбції, який включає ковалентний зв'язок або іонний обмін. PSO описує кінетику адсорбції 83,93 % усіх адсорбуючих матеріалів на основі НА та полімерів різного походження, синтезованих під дією MW. Модель PFO є другою моделлю, яка успішно використовується для визначення кінетики поглинання у випадку адсорбентів індукованих MW і складає приблизно 12,5%.

Поряд з процесом адсорбції розглядається процес десорбції - явище виділення речовин, у тому числі лікарських, зі складу композиційного матеріалу. Слід зазначити, що системи вивільнення лікарських засобів можна розділити на два різні класи: а) з пролонгованим вивільненням і б) з контрольованим вивільненням. Системи пролонгованого вивільнення включають суміш агентів, які впливають на чисту швидкість розчинення лікарського засобу. Системи контрольованого вивільнення складаються в основному з молекули ліків і біоінертного або біосумісного полімеру. Такі системи здатні контролювати [112] швидкість вивільнення препарату, забезпечувати постійне всмоктування препарату,

підтримувати стабільну концентрацію препарату в плазмі протягом тривалого періоду часу та запобігати розвитку концентраційно-залежних побічних ефектів [101]. Багато базових препаратів демонструють профіль вивільнення першого порядку, який часто називають «вибуховим» вивільненням (тобто вивільнення великої частки препарату) на ранній стадії, після чого слідує постійне зниження фізіологічної концентрації препарату [113]. Фармакокінетика цього підходу виявляє численні екстремальні низькі та високі показники, які характеризують нерівномірне вивільнення ліків, і це неприйнятно з точки зору обмеження передозування потенційно токсичних ліків. Ідеальний фармакокінетичний процес може бути представлений профілем кінетики вивільнення нульового порядку, який описує системи, в яких швидкість вивільнення лікарського засобу є постійною протягом певного періоду часу [111].

Розчинення лікарського засобу з фармацевтичних лікарських форм, які не дезагрегують і вивільняють лікарський засіб повільно (припускаючи, що область не змінюється і не виникають умови рівноваги), може бути представлена наступним рівнянням:

$$W_0 - W_t = Kt \quad (2.3)$$

де  $W_0$  початковий вміст лікарського засобу у фармацевтичній лікарській формі,  $W_t$  вміст лікарського засобу у час  $t$  та  $K$  коефіцієнт пропорційності.

Ділимо дане рівняння на  $W_0$ , спростуємо та отримуємо:

$$f_t = K_0 t \quad (2.4)$$

де  $f_t = 1 - (W_t/W_0)$  та  $f_t$  відображує частку лікарського засобу, що розчинений за час  $t$  та  $K_0$ , - константа швидкості розчинення або константа вивільнення нульового порядку.

Таким чином, графік залежності частки розчиненого лікарського засобу від часу буде лінійним, якщо були виконані попередні умови.

Це співвідношення може бути використано для опису декількох типів модифікованого вивільнення фармацевтичних лікарських форм, як у випадку деяких трансдермальних систем, так і матричних таблеток з малорозчинними лікарськими засобами [114], покритих форм, осмотичних систем і т.д. Фармацевтичні лікарські форми, що відповідають цьому профілю, вивільняють однакову кількість лікарського засобу за одиницю часу і це ідеальний спосіб вивільнення лікарського засобу для досягнення фармакологічно пролонгованої дії.

Застосування цієї моделі до досліджень розчинення лікарських засобів було вперше запропоновано Гібальді і Фельдманом (1967), а потім Вагнером (1969). Ця модель також використовувалася для опису поглинання та/або виведення деяких лікарських засобів [115], хоча важко концептуалізувати цей механізм теоретично.

Наступне співвідношення також може відобразити дану модель:

$$Q_t = Q_0 e^{-K_1 t} \text{ or } \ln\left(\frac{Q_t}{Q_0}\right) = -K_1 t \text{ or } \ln q_t = \ln Q_0 - K_1 t \quad (2.5)$$

де  $Q_t$  - кількість лікарського засобу, що вивільняється в момент часу  $t$ ,  $Q_0$  - початкова кількість лікарського засобу в розчині і  $K$  - константа вивільнення першого порядку.

Таким чином, графічне зображення десяткового логарифму звільненої кількості препарату від часу буде лінійним. Фармацевтичні лікарські форми, що відповідають цьому профілю розчинення, такі як ті, що містять водорозчинні лікарські засоби в пористих матрицях [116], вивільняють лікарський засіб таким чином, що він пропорційний кількості лікарського засобу, що залишається в його внутрішній частині, тобто, таким чином, що кількість препарату, що вивільняється за одиницю часу, зменшується.

Автори роботи [117] розробили просту, напівемпіричну модель, яка експоненційно пов'язана з виходом лікарського засобу до минулого часу ( $t$ ), що була названа моделлю Корсмейєра-Пеппаса. Якщо дифузія є основним механізмом вивільнення лікарського засобу, графік, що відображає кількість лікарського засобу, що вивільняється, у заданих умовах, порівняно з квадратним коренем часу, повинен виходити з прямої лінії. У деяких експериментальних ситуаціях механізм вивільнення відхиляється від рівняння Фіка після аномальної поведінки (нефікціан). У цих випадках може використовуватися більш загальне рівняння:

$$f_t = kt^n \quad (2.6)$$

де  $k$  - постійна, що включає структурні та геометричні характеристики лікарської форми лікарського засобу,  $n$  - показник вивільнення, що вказує на механізм вивільнення лікарського засобу, а функція  $t$  це  $M_t / M_\infty$  (часткове вивільнення лікарського засобу).

Пеппас використовував це значення  $n$  для того, щоб охарактеризувати різні механізми вивільнення, укладаючи значення  $n=0.5$  для дифузії Фіка і більш високі значення  $n$ , між 0.5 і 1.0, або  $n=1.0$ , для моделі, що не відповідає дифузії Фіка (для плоских зразків). У разі циліндричних або зразків іншої будови  $n=0.45$  замість 0.5, а 0.89 замість 1.0. Рівняння (2.6) можна використовувати тільки в системах з коефіцієнтом дифузії лікарського засобу, достатньо незалежним від концентрації. До визначення показника  $n$  частина кривої вивільнення, повинні використовувати  $\frac{M_t}{M_\infty} < 0.6$ . Для використання цього рівняння також необхідно, щоб вивільнення відбувалося одновимірним способом і що відношення ширини-товщини або довжини-товщини системи повинно бути не менше 10. Ця модель, як правило, використовується для аналізу вивільнення фармацевтичних

полімерних лікарських форм, коли механізм вивільнення не є добре відомим або коли може бути задіяний більш ніж один тип вивільнення.

Модифікована форма цього рівняння [118] була розроблена з урахуванням часу затримки ( $l$ ) на початку вивільнення лікарського засобу з фармацевтичної лікарської форми:

$$\frac{M_{t-l}}{M_{\infty}} = a(t - l)^n \quad (2.7)$$

Дане рівняння охоплює також випадки, коли вивільнення лікарського засобу відбувається нерівномірно. Наприклад, на першому етапі спостерігається вивільнення поверхнево адсорбованого засобу шляхом «вибухового» релізу. В таких випадках відлік та розрахунок моделі починається з моменту стабілізації вивільнення і час вибухового релізу вкладається в величину  $l$ .

## ВИСНОВКИ ДО ДРУГОГО РОЗДІЛУ

Описано технології отримання трьох типів композитних матеріалів: на основі альгілату, на основі хітозану, та синхронно синтезовані композити. Усі матеріали містять у своєму складі різні активні речовини: біокераміка (НА та ОФК), біополімери (альгілат та хітозан), біоактивні добавки (карбонові наночастинки), а також лікарські засоби.

За допомогою методів наведених у даному розділі, отримано залежності структурних параметрів від часу та потужності мікрохвильового опромінення.

Особлива увага приділена кінетичним моделям адсорбції та вивільнення різних типів лікарських засобів.



## РОЗДІЛ 3 АПАТИТНІ КОМПОЗИТИ НА ОСНОВІ АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ

### 3.1 Отримання НА під впливом MW опромінення

Першочерговим завданням було дослідити вплив мікрохвильового випромінювання на синтез гідроксиапатиту. Звичайний метод синтезу займає дуже багато часу на етапі нагрівання, що суттєво збільшує вартість отриманого матеріалу. Мікрохвильовий синтез дозволяє отримувати суспензію гідроксиапатиту впродовж одного-двох днів, при цьому позитивно впливаючи на якість та структурні властивості.

Активовані процеси, такі як мікрохвильове спікання та мікрохвильове нагрівання, можуть бути додатково використані для обробки біокерамічних порошків гідроксиапатиту та інших ОФК. Мікрохвильове спікання економить час, енергію та пов'язані з цим витрати на обробку. Цей метод дає нанорозмірні або дрібнозернисті структури [119,120].

Зміна морфології пов'язана з обмеженням росту кристалів уздовж осі  $c$  і зв'язуванням кристалів, яке відбувається переважно в площині  $a$ - $c$ . Таким чином, показана можливість селективності розміру та форми нанорозмірних частинок НА під впливом MW.

На Рисунку Рисунок 3.1 наведено зовнішній вигляд висушеного при 37 °C порошку НА синтезованого методом MW.



Рисунок 3.1 – Фото НА: суспензія (зліва) та висушений при 37 °C

Згідно з даними XRD (Рисунок 3.2), атомне відношення Ca/P у синтезованому матеріалі становить 1,65, тоді як для стехіометричного НА це відношення дорівнює 1,67. Константи кристалічної решітки, розраховані в площинах (002) і (211) отриманого НА ( $a = 0,938$  нм;  $c = 0,688$  нм), також відрізняються від стехіометричних ( $a = 0,942$  нм;  $c = 0,688$  нм), що передбачає утворення збідненого кальцієм НА з низьким вмістом вуглецю (cdHA).

Цей факт був підтверджений за допомогою FTIR вимірювань (Рисунок 3.3), яка показує смугу поглинання карбонату при  $870\text{ cm}^{-1}$ . Також наявні піки, що відповідають гідроксильній групі (OH) при  $3416$  і  $631\text{ cm}^{-1}$ ; смуги з піками при  $1038$ ,  $960$ ,  $602$  і  $562\text{ cm}^{-1}$  відповідають коливанням  $\text{PO}_4^{3-}$  групи в НА.

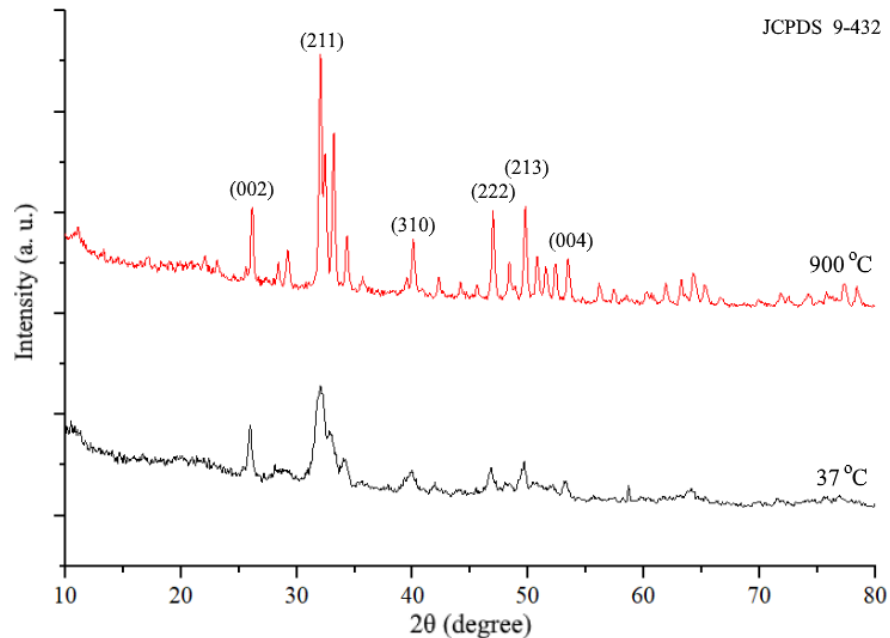


Рисунок 3.2 – XRD спектри отриманого НА [105]

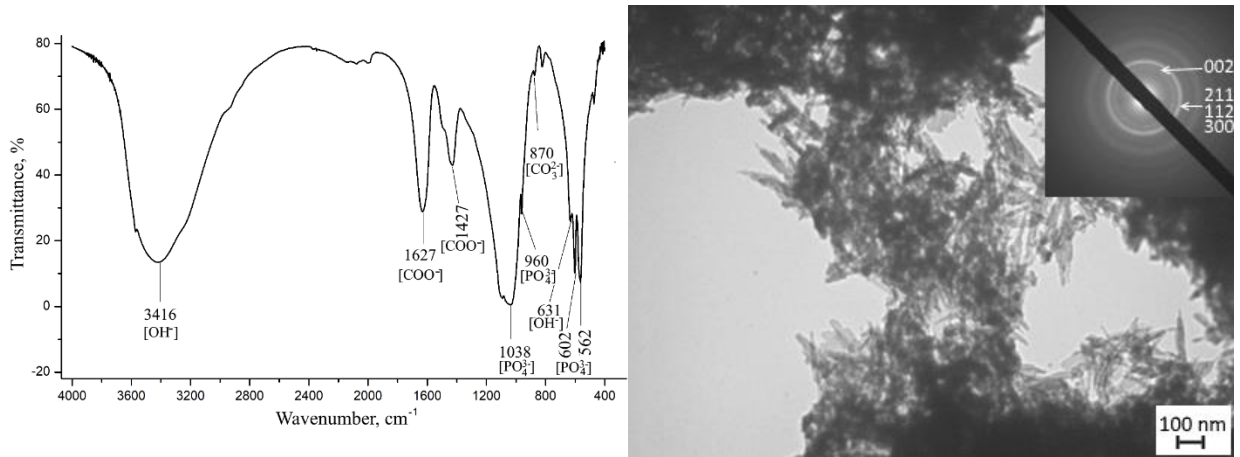


Рисунок 3.3 – FTIR спектри та TEM знімок НА отриманого методом MW [105]

На спектрі XRD НА має низьку кристалічність, типову для сирого (необробленого) ОФК. Дифракційний пік (002) відповідає середньому діаметру кристалітів близько 30 нм.

Як описувалося раніше, саме кальцій дефіцитний НА представлений у живих організмах, що свідчить про більшу прийнятність синтезованого матеріалу для медичних цілей. В подальшому, саме даний MW-синтезований НА використовуватиметься для синтезу композитних матеріалів.

### 3.2 Модифіковані альгінат-апатит-оксид графенові композити

Було досліджено дифрактограми комплексів Alg/HA<sub>mw</sub>, 15GO-Alg/HA<sub>mw</sub> та 150GO-Alg/HA<sub>mw</sub>, висушених за 37°C. Дифрактограми досліджуваних зразків показують наявність тільки однієї фази - НА (JCPDS 01-086-0740), що означає, що GO не вносить змін до дифракційних спектрів. Однак, за рахунок додавання полімеру на низьких кутах спостерігається зона з підвищеною інтенсивністю. Як згадувалося вище, НА був синтезований під впливом MW опромінення.

Спектри FTIR відповідали альгінату та НА, що підтверджує відсутність хімічних взаємодій між GO та іншими компонентами. Передбачається, що між

ними існує або фізична адсорбція, або інтеркаляція молекулярної структури НА-Alg між шарами GO.

ТЕМ зображення та електронно-дифракційні (ED) картини синтезованих композитів (Рисунок 3.4) показують утворення голчастих кристалів НА та їхніх агрегатів розміром понад 100 нм.

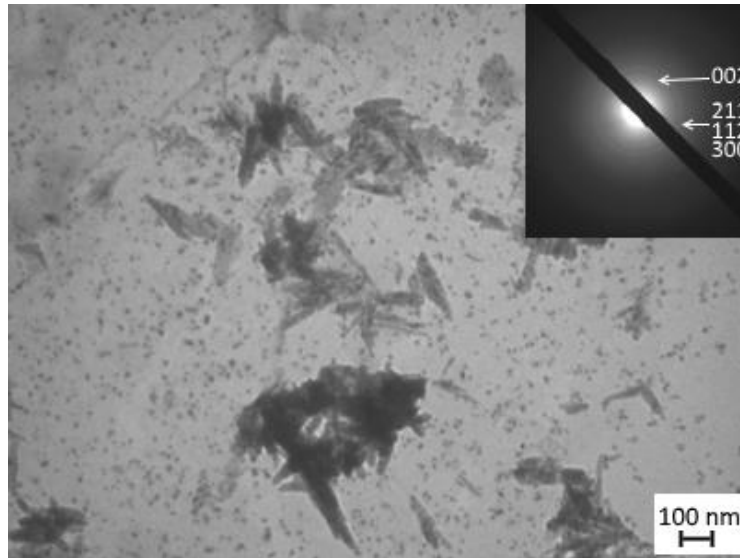


Рисунок 3.4 – ТЕМ та ED знімки зразку 15GO-Alg/HA<sub>mw</sub> [105]

ED підтверджує наявність єдиної фази НА, а також, що зі збільшенням вмісту GO кристалічність композиту зменшується, про що свідчить ослаблення дифракційного кільця [002] на спектрі ED. Вимірювання DLS (Рисунок 3.5) проводили для моніторингу розподілу частинок GO у водному розчині; ступінь агрегації частинок GO може впливати на їхню біологічну активність [121]. Через високу питому поверхню GO має тенденцію до утворення необоротних агрегатів внаслідок ван-дер-ваальсових взаємодій. Водний розчин GO при кімнатній температурі за даними DLS є полідисперсною системою із середнім розміром частинок приблизно 1 мкм при концентрації 0,15 мг/мл. Базальна поверхня GO і численні кисневі функціональні групи на межах утворюють міжфазні зв'язки з гідроксильними групами Alg, забезпечуючи однорідний розподіл GO в матриці Alg [122], ТЕМ підтвердила, що диспергування GO в розчині Alg шляхом

соніфікації призводить до розподілу GO з розміром наночастинок 10-20 нм, що призводить до однорідного розподілу GO в розчині Alg [122].

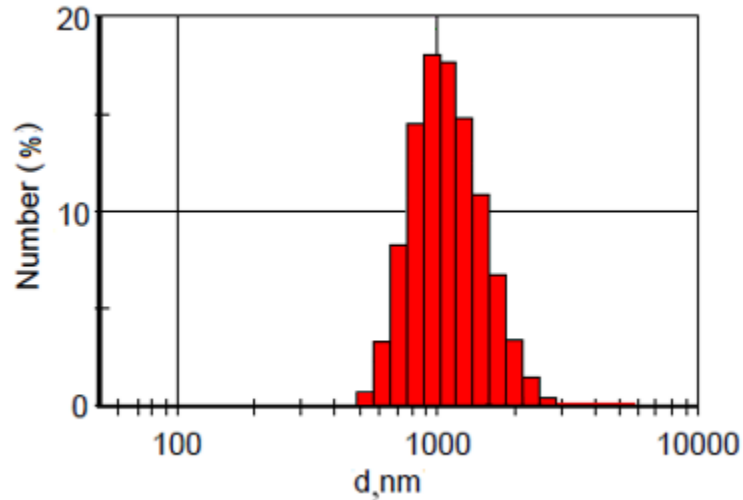


Рисунок 3.5 – Дані DLS (гідродинамічний розмір) для розподілу GO (0,15 мг/мл) у воді [105]

*Структурне моделювання системи GO-Alg/HAmw.* Можливість комплексоутворення HA, Alg і GO у водних сумішах було перевірено методами молекулярної механіки. Молекулярна структура стабілізована здебільшого сольвофобними/ван-дер-ваальсовими взаємодіями між поверхнями GO і HA, а також водневими зв'язками ( $\approx 4$  зв'язки) між групою OH GO і атомами кисню HA. Н-зв'язки були практично відсутні між OH-групами Alg і GO ( $\approx 3$  зв'язки) і між атомами кисню HA ( $\approx 3$  зв'язки). Енергії внутрішньо- і міжмолекулярних взаємодій комплексу GO-Alg/HAmw були розраховані в рамках методу MM+:  $E_{\text{total}}=6172.35$  ккал/моль,  $E_{\text{GO}}=3715.50$  ккал/моль,  $E_{\text{HA}}=1303.33$  ккал/моль і  $E_{\text{Alg}}=1440.94$  ккал/моль. Ці розрахунки дозволили уявити структурну картину експериментального композиту GO-Alg/HAmw (Рисунок 3.6). Розрахунки дали змогу оцінити внесок міжмолекулярних взаємодій у загальну енергію утворення комплексу:

$$\Delta E = E_{\text{total}} - E_{\text{GO}} - E_{\text{HA}} - E_{\text{Alg}} \approx -287 \text{ ккал/моль} \quad (\text{Таблиця 3.1}) \quad (3.1)$$

Ця величина має збільшуватися зі зростанням стабілізації комплексу сольвофобними взаємодіями. Останнє може бути оцінено за площею поверхні, доступною для розчинника (A) кожної молекули. Враховуючи мікроскопічний поверхневий натяг води  $\gamma = 0,05 \text{ ккал/моль } \text{\AA}^2$ , гідрофобний внесок можна оцінити як:

$$\Delta G_{\text{Hyd}} = \gamma - (A_{\text{total}} - A_{\text{GO}} - A_{\text{HA}} - A_{\text{Alg}}) \approx -134 \text{ ккал/моль} \quad (3.2)$$

Це вказує на те, що на сольвофобну взаємодію припадає одна третина енергії стабілізації, а інша частина припадає на енергію ван-дер-ваальсового укладання і Н-зв'язку.

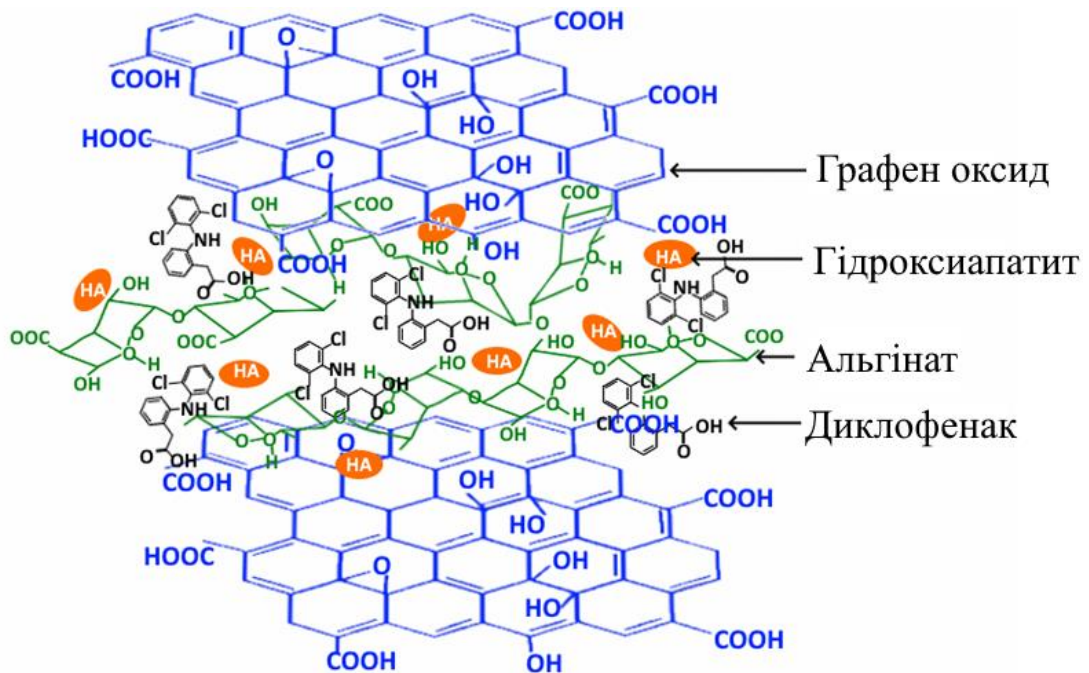


Рисунок 3.6 – Розрахована структурна схема триплексів GO-Alg/HA<sub>mw</sub> [105]

Таблиця 3.1 – Енергії (Е) внутрішньо- та міжмолекулярних взаємодій за кислих (4,0) і нейтральних (7,2) значень рН та функціональних груп, які можуть утворювати водневі зв'язки [105]

	Е, ккал/моль	Функціональні групи	Поверхнева площа поверхні (Å <sup>2</sup> )	Енергії внутрішньо- і міжмолекулярних взаємодій комплексу	
				Н- та Ван-дер-ваальські зв'язки	Сольвофобні зв'язки
GO	3715.50	-ОН -COOH	1044.62		
HA	1303.33	-O	2430.58		
Alg	1440.94	-COOH -ОН	3272.94		
GO-Alg/HAmw комплекс				≈-287 ккал/моль	≈-134 ккал/моль

З Рисунку Рисунок 3.7А видно, що додавання GO до Alg/HAmw трохи підвищує міцність зразків на стиск. Максимальна відносна деформація до руйнування трьох зразків знаходиться в межах (0,1-0,14). Загалом таке підвищення міцності GO-вмісних зразків пов'язане з високим аспектним співвідношенням і чудовими механічними властивостями графена (питома поверхня – 2630 м<sup>2</sup>/г, міцність на розрив – 130,5 МПа, модуль Юнга – близько 1,0 ТПа). Отже, підвищення міцності зразків, що містять GO, також можна пояснити зв'язуванням частинок GO з матрицею Alg/HAmw, що призводить до ефективної передачі напруги на GO.

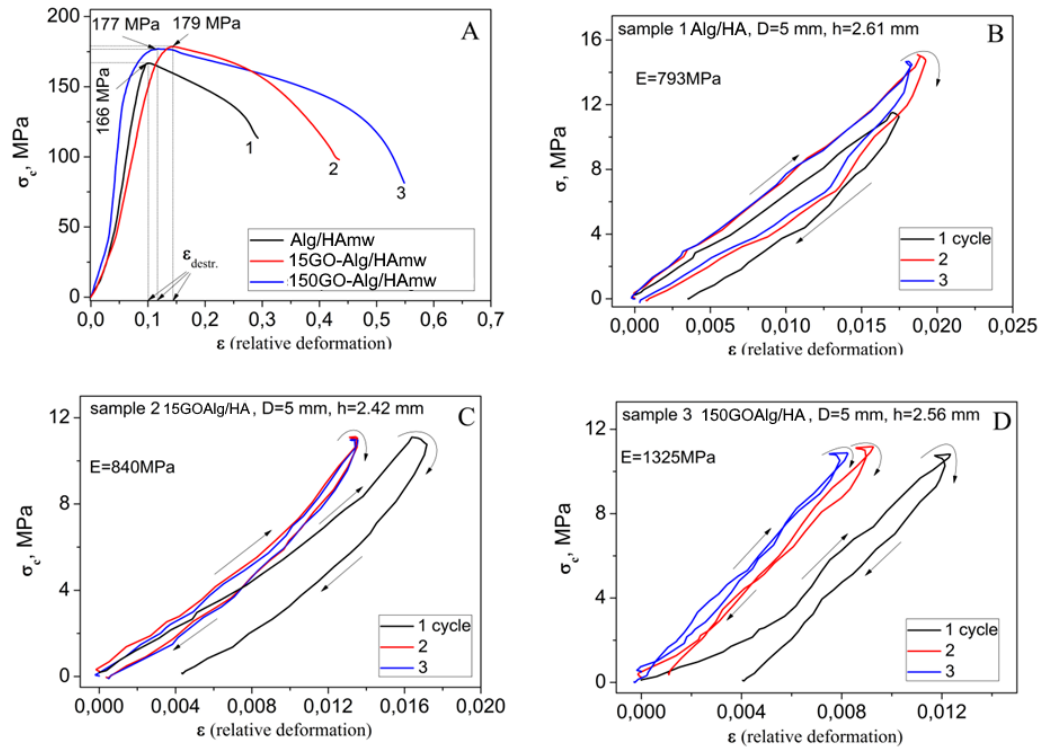


Рисунок 3.7 – А. Міцність на стиск експериментальних гранул, виміряна при одноосному стисненні. В, С, D Діаграми «навантажувально-розвантажувальних вимірювань» гранул Alg/HAmw, 15GO-Alg/HAmw та 150GO-Alg/HAmw, виміряні при одноосному стисканні протягом трьох циклів навантаження відповідно [105]

На Рисунку Рисунок 3.7В-D показано діаграми «операцій завантаження та розвантаження» для досліджуваних зразків. Оцінка модуля Юнга (E) показала, що зразки, що містять GO, мали значно вищий модуль Юнга порівняно з контрольним Alg/HAmw.

Покращені механічні властивості композитів в основному зумовлені сумісною та специфічною взаємодією гідроксильних груп Alg з функціональними групами GO. Покращені властивості розтягування пов'язані з водневими зв'язками GO та Alg. Структура композиту Alg-GO забезпечує більш рівномірний розподіл напруги та мінімізує існування центрів концентрації



напруги, тим самим значно покращуючи механічні властивості нанокompозиту. Крім того, хімічне зшивання між листами GO можна збільшити шляхом додавання двовалентних іонів  $\text{Ca}^{2+}$  під час утворення частинок, тим самим покращуючи механічні властивості композиту.

Для оцінки стабільності форми гранул за різних значень рН і водонаповнюваності проводили вимірювання набрякання (Рисунок 3.8). Додавання GO до вмісту гідроксиапатит-альгінатних матриць покращує стабільність форми гранул завдяки сильнішим міжмолекулярним взаємодіям за обох значень рН. Було виявлено, що додавання GO зменшує ступінь набрякання композиту приблизно на 10% за нейтрального і на 15% за кислого рН. Цей факт можна пояснити збільшенням щільності. Відносна вологість також підвищується з додаванням GO. Це можна пояснити здатністю GO адсорбувати та утримувати воду через водневі зв'язки.

Слід також зазначити, що через усадку альгінатної матриці ступінь набрякання всіх зразків, включно зі зразками без GO, був нижчим у кислих умовах, ніж у нейтральних.

Також проводили оцінювання біологічної активності композитів вимірюванням зміни рН сольового розчину в якому знаходився досліджуваний матеріал. Тест на біоактивність показав, що рН контрольного SBF (без зразка) не змінювався протягом періоду спостереження. Водночас рН SBF зі зразками змінювався, що означало розчинення НА з вивільненням іонів  $\text{Ca}^{2+}$  і  $\text{PO}_4^{3-}$  в SBF.

Метод ВЕРХ було використано для визначення та порівняння динаміки вивільнення хлоргексидину та диклофінаку натрію з експериментальних зразків у PBS. Слід зазначити, що досліджені композитні матеріали потенційно можуть бути використані для лікування кісткової тканини, розташованої в організмі, яка перебуває в процесі безперервного ремоделювання. Остеокласти щільно

прилипають до поверхні кістки та розчиняють її, утворюючи кисле середовище (рН 4-4,5) для розчинення фосфату кальцію та вивільнення колагенази [123].

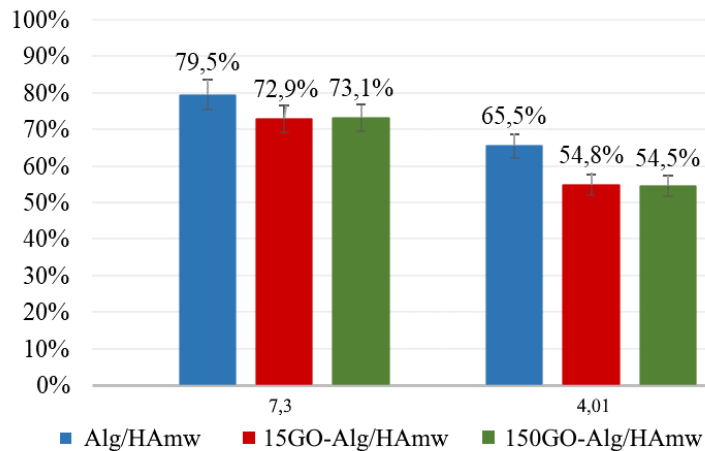


Рисунок 3.8 – Набрякання експериментальних зразків через 24 години при різних значеннях рН (7,3 та 4,01) у модельному розчині PBS

Остеобласти постійно створюють нову кістку, і обидва процеси перебувають у рівновазі. Тому було досліджено динаміку вивільнення ліків із різними хімічними структурами (див. пункт 2.2.4) та фізичними властивостями за рН 4,0 та 7,2, враховуючи можливе існування локальних зон із різним рівнем кислотності.

Кінетика вивільнення препарату показана на Рисунках Рисунок 3.9 та 3.10. Кількість вивільненого препарату було побудовано залежно від часу інкубації. Перш за все, слід зазначити, що обидва дослідження (з хлоргексидином і диклофенаком) показують загальну поведінку композитного матеріалу в буферному розчині. Експерименти наочно продемонстрували, що додавання графену сприяло стабільності форми гранул, що призвело до зниження швидкості ерозії матриці. Вміст НА в гранулах також знижує рухливість альгінатної матриці, що може сприяти зниженню вивільнення лікарського засобу. У кислому середовищі, з одного боку, відбувається часткове розчинення НА і посилюється дифузія ліків, а з іншого боку, усадка альгінатної матриці зменшує дифузію. Ці

аспекти впливають на ступінь вивільнення обох досліджуваних препаратів у розчин.

Молекули хлоргексидину навряд чи зможуть утворити міжмолекулярні зв'язки за донорно-акцепторним механізмом із компонентами комплексу в кислому та нейтральному середовищі, тому їхнє вивільнення визначається режимом ерозії матриці. У першій фазі (до 4 годин) відбувається вивільнення молекул СНХ, адсорбованих на поверхні. За обох значень рН вивільнення СНХ (мкг/мл) з контрольного зразка Alg/НАmw без GO відбувається інтенсивніше порівняно зі зразком, що містить графен. Це пов'язано зі швидшою ерозією альгінатної матриці внаслідок іонного обміну між іонами  $\text{Ca}^{2+}$  іонно-зшитої альгінатної матриці та іонами  $\text{Na}^+$  фосфатного буфера (Рисунок 3.9).

Додавання графену в композит сприяє збереженню форми гранул до руйнування, що в свою чергу призводить до зменшення релізу СНХ в фосфатно-буферний розчин. В нейтральному середовищі реліз хлоргексидину протягом першої доби (24 години) у всіх зразків майже не відрізняється та становить близько 80%. Повний вихід СНХ (близько 95%) при рН=7.2 зі зразку Alg/НАmw відбувається через 72 години.

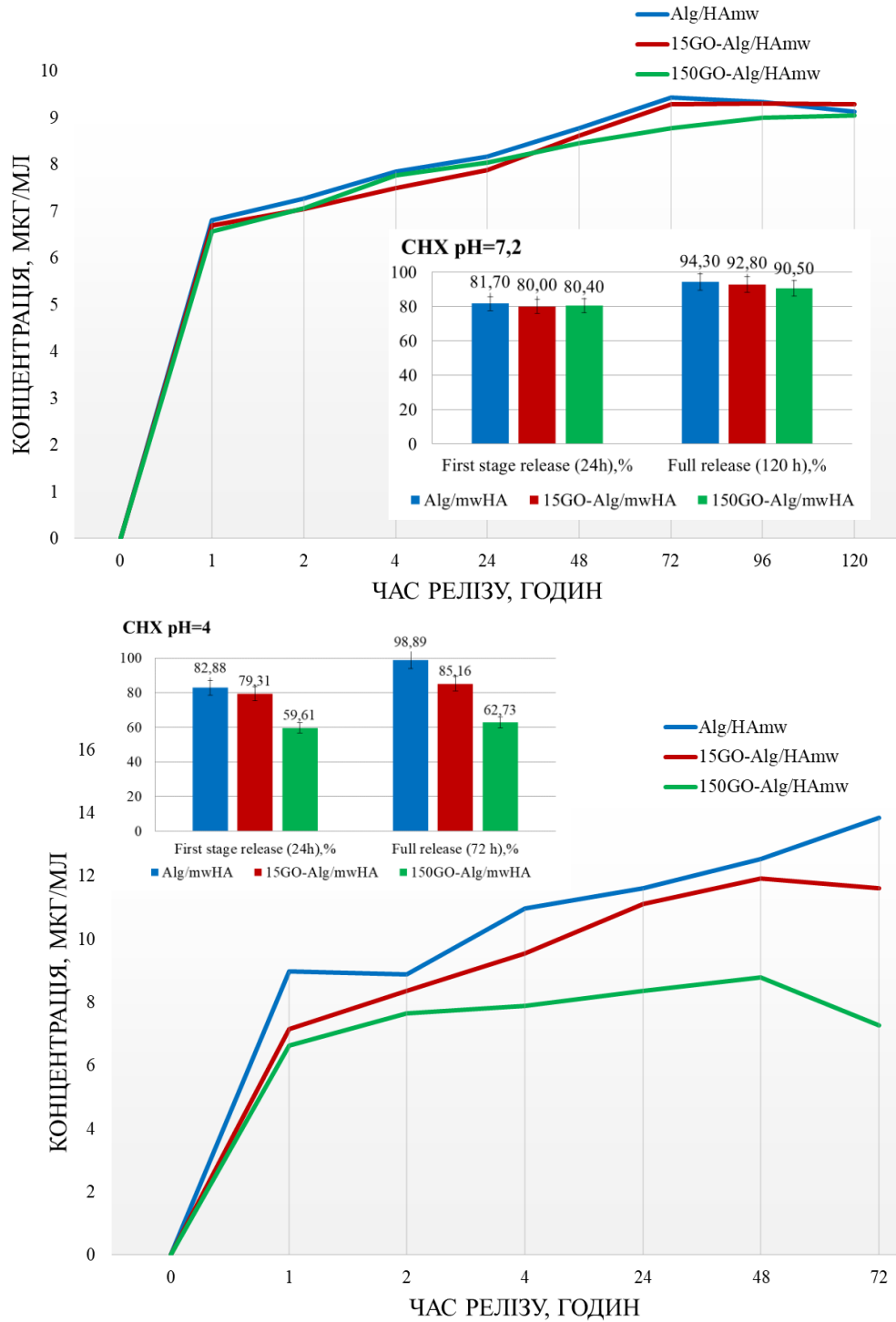


Рисунок 3.9 – Динаміка виділення хлоргексидину (мкг/мл) з експериментальних композитів у середовище PBS та порівняння повного вивільнення СНХ на першу добу і в кінці дослідження в % при різних значеннях рН (А, В)

В той же час вміст оксиду графену у зразках 15GO-Alg/HA<sub>m</sub>w та 150GO-Alg/HA<sub>m</sub>w дещо зменшує об'єм повного виходу (близько 90%), але пролонгує час повного виходу СНХ до 120 годин, очевидно в результаті додаткових водневих зв'язків між гідрофільними функціональними групами GO та альгінату, що сприяє утриманню лікарського засобу в структурі композиту. В кислому середовищі (Рисунок 3.9В) уповільнення релізу є більш помітним з GO-вмісних зразків, завдяки збільшенню кількості зв'язків між OH- та COOH групами та киснем в базисній площині оксиду графену та функціональними групами альгінату. Даний факт зменшує час релізу до 48 годин та ефективність повного виходу СНХ з графен вмісних зразків (60-80%) порівняно до контрольного зразка. При цьому зменшення ступеню релізу пропорційне збільшенню вмісту GO. Контрольний зразок у кислому середовищі демонструє 100% вихід СНХ протягом 120 годин.

Інша ситуація виникає при вивільненні диклофенаку натрію (DS). Так, за першу добу в нейтральному середовищі (pH=7.2) із Alg/HA<sub>m</sub>w зразку виділилося близько 70% диклофенаку і його концентрація в PBS складала 0.546 мг/мл (Рисунок 3.10), а повний вихід через 264 години склав біля 90%. На першому етапі, відбувалося вивільнення поверхнево-адсорбованої речовини, далі, в продовж декілька діб спостерігався процес десорбції препарату з розчину. На другому етапі, відбувалася деструкція матриці зразків і вивільнявся зв'язаний лікарський препарат. На цьому етапі процес мав неоднорідний характер.

Вивільнення DS зі зразків з вмістом GO у процентному відношенні за першу добу складає близько 40%, при цьому вихід DS з контрольного зразку був суттєво більший. Причиною такого суттєвого зменшення об'єму релізу може бути як зменшення здатності GO-вмісного композиту поглинати DS під час насичення, так і сильне зв'язування GO з DS, що перешкоджає повній дифузії лікарського засобу із композиту.

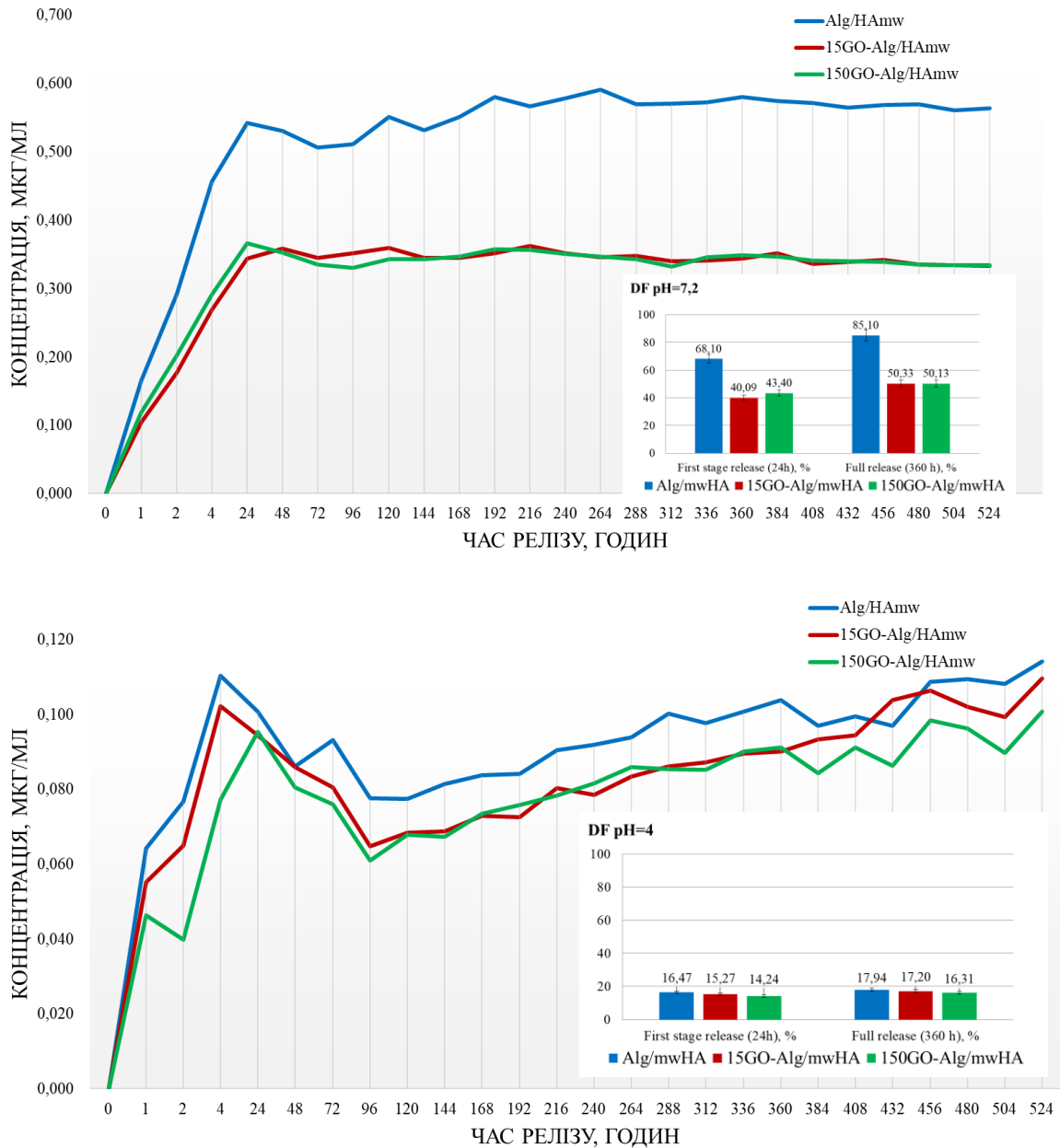


Рисунок 3.10 – Динаміка виділення DS (мкг/мл) з експериментальних композитів у середовище PBS та відсоток виділення DS при різних значеннях pH (А, В)

Отримані результати вказують на те, що в нейтральному середовищі вивільнення DS із зразків, що містять GO, відбувається в основному тільки з поверхні. Так як, після першої доби кількість вивільненого препарату майже не змінюється. Тобто відсутній «другий етап» релізу характерний для контрольного зразку.

В кислому середовищі при  $pH=4$  повний DS реліз через 360 годин склав близько 18% для контрольного зразка, а для GO-вмісних зразків DS реліз дещо зменшувався пропорційно збільшенню вмісту GO і становив близько 15% (Рисунок 3.10). Суттєве зменшення виходу DS в кислому середовищі порівняно до нейтрального можна пояснити значною кількістю водневих зв'язків між функціональними групами  $COOH$ ,  $OH$  альгінату та оксиду графену з одного боку, а з іншого – утворенню кластерів молекул DS за участю протонів  $H^+$ , яких при  $pH=4$  на три порядки більше в розчині у порівнянні з нейтральним розчином ( $pH=7,22$ ) (Рисунок 3.11).

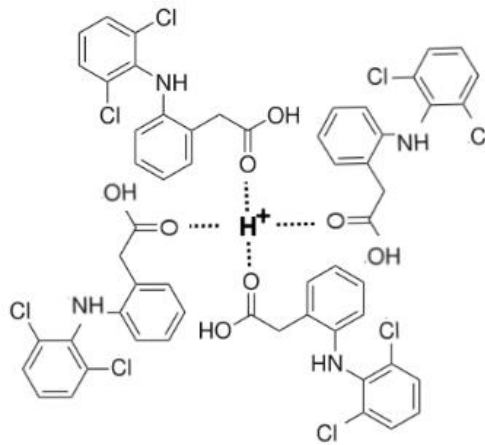


Рисунок 3.11 – Схема утворення кластерів з молекул диклофенаку в кислому середовищі [105]

Крім того, оксид графену є амфіфільною речовиною, оскільки містить не тільки гідрофільні ділянки по краях, але і гідрофобні в базисній площині. В кислому середовищі його гідрофобність зростає [124]. За рахунок амфіфільної природи можливі додаткові гідрофобні взаємодії між GO та DS. Так, після першого етапу вивільнення поверхнево адсорбованого DS, який триває 24 години, починається другий етап незначного зменшення концентрації DS у розчині, який триває до 96 годин. Це означає, що гранули зберігають свою цілісність протягом цього періоду і вивільнення препарату не відбувається. Було візуально доведено підвищену стабільність форми гранул у кислому середовищі

при рН 4.0, хоча часткове розчинення НА є можливим в даних умовах і може підвищувати мобільність матриці та сприяти подальшій дифузії DS. В період від 96 до 360 годин в кислому середовищі концентрація вивільненого диклофенаку поступово збільшується на 5% для Alg/HA<sub>mw</sub> зразка без графену та на 10% для графен-вмісних зразків. Таким чином, DS реліз в кислотному середовищі контролюється в основному силами дифузії, яка уповільнюється зазначеною кластеризацією DS та гідрофобними взаємодіями між GO and DS.

Дослідження *in vivo*. Для дослідження остеоінтеграційної здатності синтезованих матеріалів зразок 15GO-Alg/HA<sub>mw</sub> імпантували у стегнову кістку щура та витримували протягом 30 днів.

Під час мікроскопічного дослідження виявлено, що ділянка дефекту заповнена імпантованим 15GO-Alg/HA<sub>mw</sub> (Рисунок 3.12А). Біоматеріал відрізнявся кольором і структурою, що свідчить про зміни його властивостей. Фрагменти біоматеріалу в області дефекту оточені новою кістковою тканиною різної зрілості. Між новоутвореною трабекулярною кісткою в дефектному просторі є червоний і жовтий кістковий мозок. Від маргінальної ділянки трабекулярна кістка росте всередину, утворюючи шар, оточений зруйнованими фрагментами матеріалу імпантату. Прямо прилеглі до області дефекту фрагменти кори кістки були тісно зрощені з новоствореною кістковою тканиною (Рисунок 3.12В). На кісткових трабекулах спостерігали високу густину остеоцитів. Утворення сполучних шарів не спостерігалось (Рисунок 3.12С). Ніяких ознак запальної реакції в кістковому мозку або в місцях дефекту не спостерігалось. В області імпантації резорбція біоматеріалу синхронно протікала з формуванням нових кісткових тканин.

На 30-й день біоматеріал 15GO-Alg/HA<sub>mw</sub> у постімпантаційній кістці частково резорбувався та замінювався новоутвореною кістковою тканиною. Матеріал має високу остеокондуктивність та остеоінтеграцію, про що свідчить відсутність деструкції та запалення.



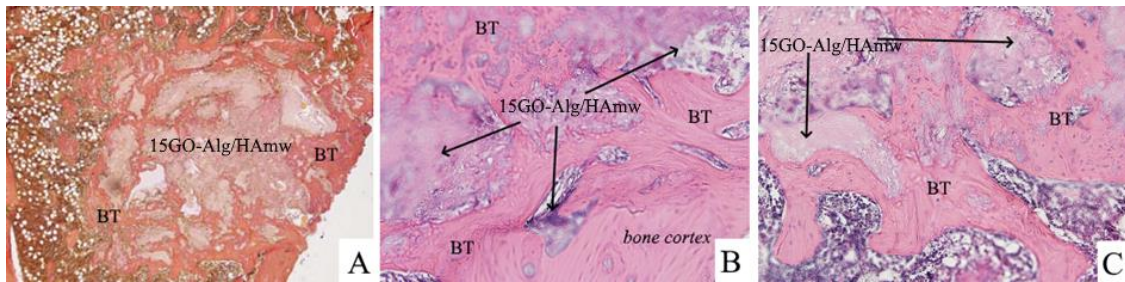


Рисунок 3.12 – А) Композитний матеріал 15GO-Alg/HAmw у дефектній зоні з кістковими трабекулами (BT); В та С) Композитний матеріал 15GO-Alg/HAmw оточений кістковою тканиною (BT). Аналіз проводили на 30-й день після імплантації. Збільшення  $\times 200$  [105]

### 3.3 Модифіковані альгінат-апатит-фулерен композити

На основі апатиту синтезованого за мікрохвильовою технологією також було розроблено матеріал з вмістом фулерену. Концентрація фулерену в зразках становила 50 та 500 мкг/мл (0,0001 та 0,001%). На Рисунок Рисунок 3.13 видно, що додавання наночастинок фулерену суттєво (вдвічі) знижує рівень поглинання води експериментальними зразками порівняно з контрольним зразком, у той час як додавання графен оксиду призводить до зниження набрякання всього на 6-7% при рН 7,3.

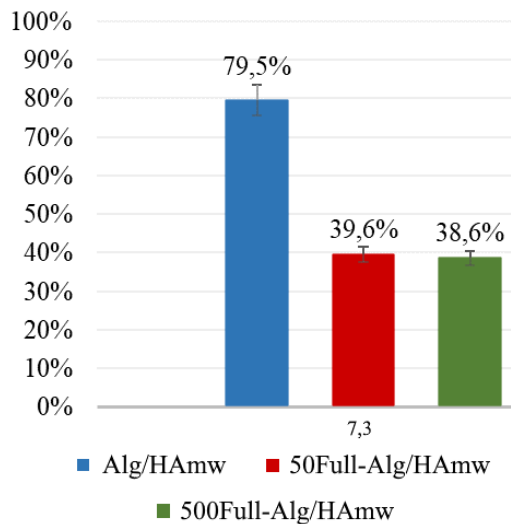


Рисунок 3.13 – Набрякання експериментальних зразків з вмістом фулерену через 24 години у модельному розчині PBS

Це пояснюється тим, що фуллерен має високу поверхневу площу, яка додатково зв'язує складові композиту впливаючи на однорідність та зменшуючи рівень пористості матеріалу. Даний факт підтверджується і дослідженням мікроструктури на скануючому електронному мікроскопі (Рисунок 3.14).

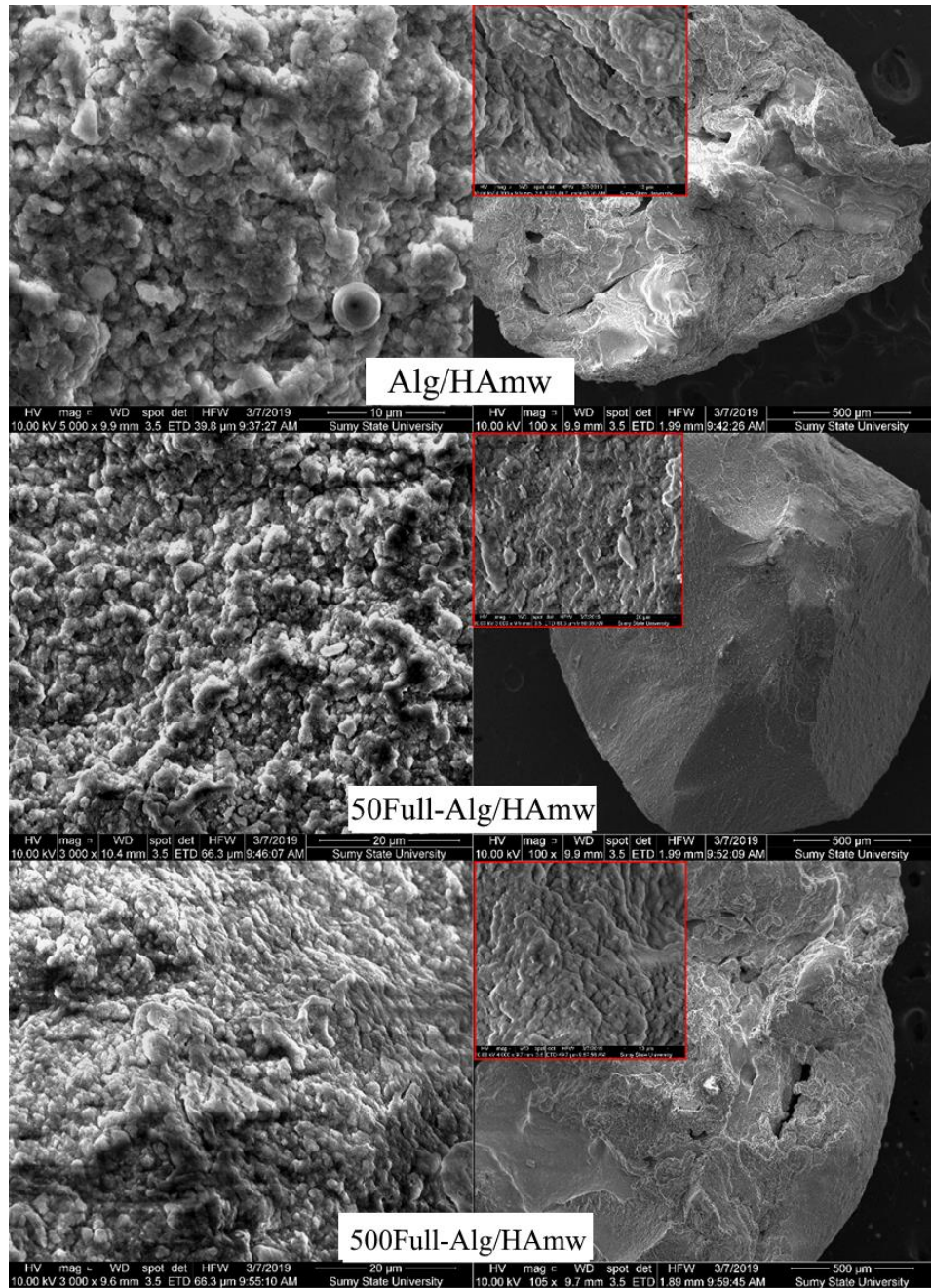


Рисунок 3.14 – SEM зображення експериментальних зразків з вмістом фулерену

Метод ВЕРХ було використано для визначення динаміки вивільнення диклофінаку натрію з експериментальних зразків у PBS. Хроматографічні криві, які характеризують кінетику виділення DS зі складу композитів, наведені на Рисунку Рисунок 3.15.

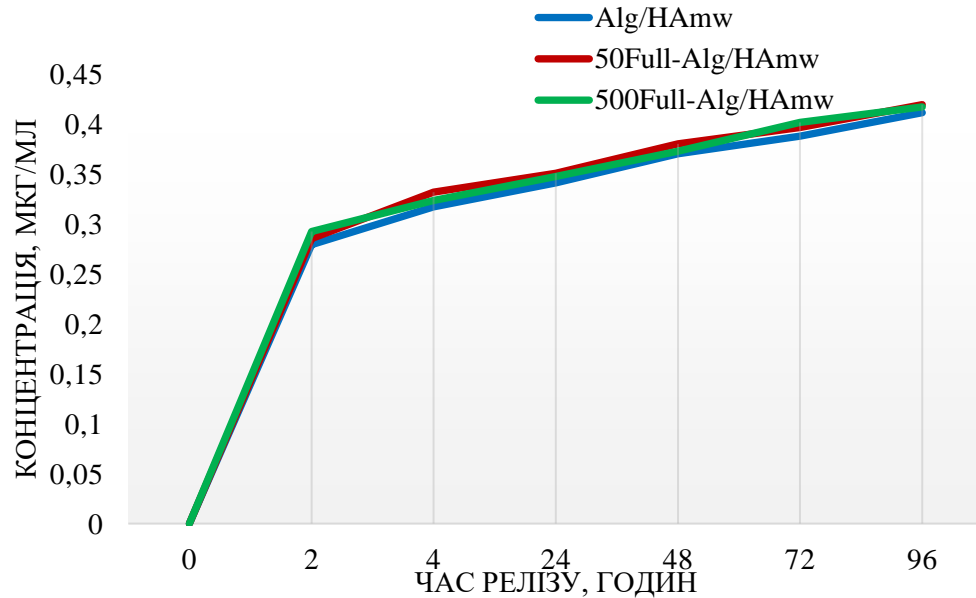


Рисунок 3.15 – Динаміка вивільнення DS з композитного матеріалу на основі НА з вмістом фулерену

Контрольне дослідження показало, що максимальна концентрація DS, що вивільняється зразком (0,15 г) у розчин PBS, становить близько 0,045 мг/мл. Відповідно, приблизно 95% препарату, поглиненого частинками, вивільняється протягом 96 годин. При цьому реліз DS з усіх проб становив близько 60% за перші 2 години. Це так званий «вибуховий реліз», тобто – DS адсорбується на поверхні твердого матеріалу і вивільняється протягом нетривалого часу на початку дослідження. Протягом періоду від 2 до 96 годин вивільняється той препарат, що приєднався до компонентів композиту за допомогою водневих або інших зв'язків. Динаміка виділення DS свідчить про незначний вплив фулеренів на цей процес. Зразки, що містять фулерени, вивільняли дещо більшу кількість

DS протягом 4-48 годин. Цей факт можна пояснити більш розвиненою адсорбційною поверхнею DS за рахунок вмісту наночастинок фулерену, що дещо збільшує кількість десорбованого препарату. При цьому, структурна стабільність даних зразків є вищою. Тобто, якщо теоретично проектувати внутрішню будову зразків з вмістом фулерену, то вона буде щільнішою за рахунок більш тісної взаємодії компонентів з зовнішньою поверхнею фулерену, але при цьому залишатимуться місця для приєднання лікарських засобів, можливо, всередині самих колеподібних структур фулерену.

Наявність ділянки швидкого вивільнення та відносно нетривалий час вивільнення DS заважає якісному розрахунку кінетичної моделі вивільнення. Тому, було вирішено в подальшому не використовувати DS як модельний препарат.

Також, було проведено порівняльне дослідження протимікробної дії композитних матеріалів з вмістом фулерену у формі гранул щодо грамнегативних мікроорганізмів *E.Coli* ATCC 25922 та грампозитивних бактерій *S.Aureus* ATCC 25923.

Протимікробну активність матеріалу щодо *E.coli* та *S.aureus* перевіряли методом дифузії в агар. Враховуючи досвід інших дослідників, концентрація фулеренів була обрана досить низькою, тобто від 1,0% до 0,004% відносно гідроксиапатиту, щоб врахувати можливість їх токсичної дії. Тим не менш, незважаючи на відносно невеликий вміст наночастинок, ми спостерігали наявність антимікробних властивостей. Наявність зони інгібування росту (ZOI) свідчить про те, що антибактеріальний механізм наночастинок фулерену C60 включає руйнування мембрани через утворення поверхневих активних форм кисню (ROS), що призводить до загибелі мікроорганізмів. У цьому дослідженні було виявлено, що ZOI збільшується зі збільшенням концентрації наночастинок фулерену у всіх зразках. Загалом виявлено більш ефективну антибактеріальну

дію дослідних зразків проти *S.Aureus*. Найбільшу антибактеріальну активність виявив зразок 500Full-Alg/HAmw. Слід зазначити, що в нашому випадку дифузія частинок фулерену в агар може бути обмежена наявністю малорозчинної сполуки – НА.

Механізм антимікробної дії C60 не є досконало дослідженим. Літературні дані містять відомості про залежність протимікробної активності фулерену від розміру частинок, модифікації поверхні, оточуючих умов. Відомо, що молекули Full локалізуються в багатих на ліпідні областях, таких як клітинні мембрани. Також, виявлено що фулерени мають окисні властивості і можуть утворювати активні форми кисню (ROS). Вважається, що ROS беруть участь у руйнуванні клітинної мембрани бактерій і перекисному окисленні ліпідів [134]. Інший механізм антибактеріальної дії фулеренів, наведений у [135], полягає в наступному (Рисунок 3.16): Full в основному стані поглинає фотон і переходить у короткочасний (наносекундний) збуджений синглетний стан, який може зазнавати міжсистемного переходу до довгострокових (мікросекундних) триплетних збуджених станів.

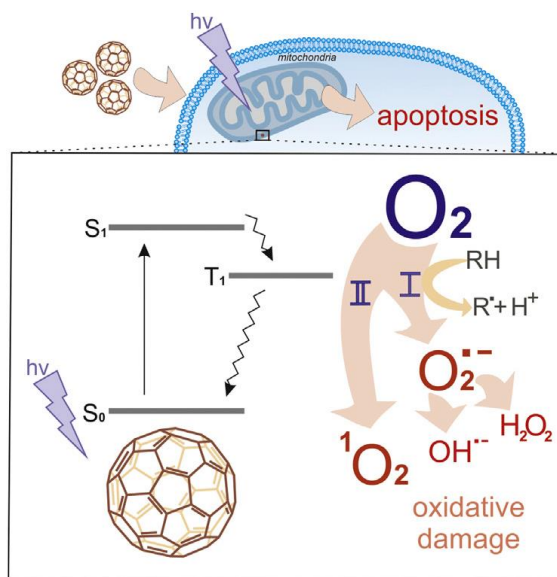


Рисунок 3.16 – Механізм антимікробної дії фулерену. Діаграма Яблонського [125]



Триплетні фулерени можуть переходити в основний стан, випромінюючи фосфоресценцію, але також можуть збуджувати передачу енергії до триплетних молекул кисню ( $3O_2$ ), утворюючи реакційноздатний синглетний кисень ( $1O_2$ , тип 2), або можуть збуджувати реакції переносу електронів у формі супероксиду та пероксиду  $H_2O_2$  (тип 1). Дані ROS можуть пошкоджувати ліпіди, білки та нуклеїнові кислоти, що призводить до руйнування всіх типів мікробних клітин.

## ВИСНОВКИ ДО ТРЕТЬОГО РОЗДІЛУ

За допомогою MW методу було синтезовано гідрогель гідроксиапатиту та досліджені його параметри. Рентгендіфракційні спектри показали утворення кальцій-дефіцитного НА з співвідношенням Ca/P 1,65, що є ідеальним результатом для використання в медицині для заміщенням дефектної кісткової тканини в організмі людини.

На основі отриманого НА також було синтезовано два типи полімер-модифікованих композитів – з вмістом оксид графену та фулерену.

Наночастинки GO в поєднанні з альгінатом, зшитим іонами  $Ca^{2+}$ , сприяють поліпшенню механічних властивостей отриманих матеріалів (1,325 ГПа для модифікованих зразків, 0,793 ГПа для контрольного зразку), стабільності гранул і зменшують швидкість ерозії матриці.

Дослідження HPLC використовували для визначення динаміки вивільнення лікарських засобів зі зразків, що містять НА, Alg та GO, на прикладі гідрофільного СНХ та гідрофобного DS у кислотному та нейтральному середовищі. Вміст НА та кислотність зменшують рухливість альгінатної матриці та сприяють зниженню вивільнення лікарського засобу. Вміст GO пролонгує вихід СНХ на 48 годин у нейтральному середовищі та скорочує час та ефективність релізу у кислому середовищі. У нейтральному середовищі реліз

відбувається більш активний та за рахунок двох процесів – поверхневого вивільнення та вивільнення адсорбованого засобу під час ерозії матриці, а в кислому середовищі реліз зумовлений силами дифузії, яка уповільнюється кластеризацією DS та гідрофобними взаємодіями між і DS.

Дослідження фулерен-вмісних апатит-полімерних композитів у формі гранул показало наявність у матеріалу протимікробних властивостей щодо грамнегативної бактерії *E. Coli* ATCC 25922 та грампозитивної *S. Aureus* ATCC 25923. При цьому на відміну від зразків з GO, при дослідженні релізу DS у модифікованих зразках спостерігається вивільнення більшої кількості лікарського засобу, що можна пояснити більш розвиненою поверхнею фулерену. Модельний препарат DS не є ефективним для даних композитів, тому в подальшому було прийнято рішення його не використовувати.

## РОЗДІЛ 4 АПАТИТНІ КОМПЗИТИ НА ОСНОВІ ХІТОЗАНУ

### 4.1 Хітозан-апатитні композити синтезовані під впливом MW

На Рисунку Рисунок 4.1 наведено рентгенограми зразків CS/HA, 300mw-CS/HA, 600mw-CS/HA, 800mw-CS/HA, висушених при 37°C, з яких видно, що HA формується одразу після мікрохвильового опромінення. Отриманий HA композитів відповідає JCPDS 00-046-0905, але рентгенограми зразків, спечених при 600°C, показують, що деякі піки дещо зміщені в бік низьких кутів порівняно зі стехіометричною гексогональною коміркою. Загалом, рентгенівські піки зміщуються з трьох основних причин: зміна параметра ґратки, наявність залишкових напружень і концентрація дефектів. У нашому випадку всі зміни в дифракційній картині можна пояснити наявністю в композитному матеріалі CS.

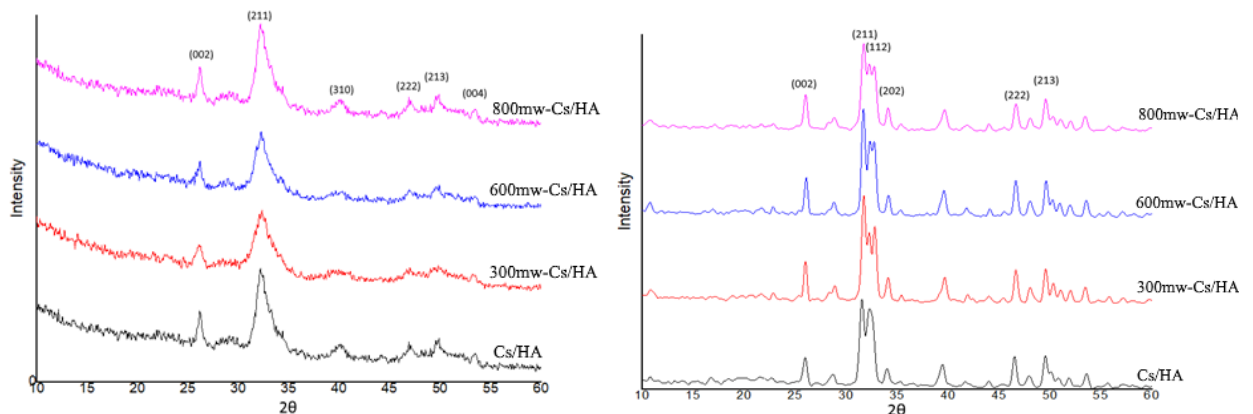


Рисунок 4.1 – Рентгенограми CS/HA, 300mw-CS/HA, 600mw-CS/HA, 800mw-CS/HA, висушених при 37°C (А) та обпалених при 600°C (В) [100]

Після сушіння при 37 °C приблизний розмір утворених кристалітів становив 12-13 нм; для зразків, прожарених за 600 °C, розмір кристалітів збільшився. Примітно, що при збільшенні потужності MW з 300 Вт до 800 Вт розмір кристалітів зменшився з 28 нм до 23 нм, відповідно.

Поглинання і вивільнення молекул води має вирішальне значення у зміні розмірів біоматеріалів, включаючи полімери. Надмірне набрякання полімерів



може призвести до значного збільшення ваги та об'єму матеріалу, що може мати негативний вплив на навколишнє фізіологічне середовище.

CS має три реактивні функціональні групи: аміногрупу в положенні C-2 кожної деацетильованої структурної одиниці та первинну і вторинну гідроксильні групи в положеннях C-6 і C-3 відповідно.

CS є полімером, що має первинні аміногрупи та може бути протонований кислотами. Цей процес починається, коли рН нижче 6,3-6,5 (ізоелектрична точка CS). Набрякання CS також залежить від використовуваної кислоти і рН. У цьому експерименті фосфорна кислота використовувалася для формування гідрогелю НА-CS, а оцтова кислота використовувалася як розчинник CS для остаточного формування гранул. Крім того, утворення композитів було досягнуто шляхом зшивання макромолекул CS з TRP. Низькомолекулярний TRP належить до групи неорганічних поліфосфатів, відомих як терапевтичні агенти, що стимулюють фактори росту фібробластів і сприяють остеогенній диференціації стовбурових клітин [126].

Відомо, що набрякання під дією оцтової кислоти починається за рН 6,2, що близько до рKa CS. І навпаки, такі кислоти, як соляна і фосфорна, стимулюють набрякання хітозану за нижчих рН. Вважається, що специфічний ефект полівалентної фосфорної кислоти зумовлений здебільшого іонним зв'язком, який протидіє набряканню. Іонний зв'язок і пов'язане з ним зменшення гелю може відбуватися тільки в присутності аніонів. Карбоксильні та аміногрупи можуть набувати заряду і відповідають за сильну взаємодію з полярними молекулами води та набрякання системи.

Ступінь набрякання гідрогелів на основі CS, отриманих шляхом зшивання з TRP, залежить від методу приготування. Набрякання за високого рН пояснюється депротонуванням аміногруп CS і руйнуванням зшитих сольових містків. Найбільший

ступінь набрякання спостерігався в гелях, отриманих за рН 1,2. Водночас гелі, індуковані при рН 6,8, показали незначне набрякання [127].

Експериментальні дані щодо набрякання композитів узгоджуються з літературними даними. Так, у досліджених групах зразків (Рисунок 4.2) найбільший ступінь набрякання спостерігається для 800mw-CS/HA, дещо нижчий для 600mw-CS/HA та 300mw-CS/HA і найменший для зразків, синтезованих без впливу MW. Під час дослідження найнижча здатність до набрякання спостерігалася у фізіологічному розчині за рН 6,49 для всіх експериментальних зразків. У цьому випадку аміногрупи переважно депротоновані, а карбоксильні групи недиссоційовані. Набрякання композиту збільшувалося зі збільшенням і зменшенням значень рН розчину: при зниженні значення рН до 4,6 відбувалося протонування аміногруп, і набрякання гідрогелю збільшувалося. Аналогічний механізм також мав місце при збільшенні значення рН до 7,3, що підтверджує іонізацію карбоксильних груп і утворення високополярних структур. Ці механізми ґрунтуються на загальному принципі, згідно з яким набрякання матеріалу збільшується зі збільшенням кількості високоіонізованих груп у структурі гідрогелю [128].

Експериментальні зразки також піддавали умовам близьким до фізіологічних шляхом безперервного струшування в розчині PBS за 37°C протягом 30 днів, після чого оцінювали їхню здатність до поглинання та утримання рідини (Рисунок 4.2). Результати показали, що різниця між поглинанням і утриманням рідини була найбільшою для зразку 800mw-CS/HA, тоді як для контрольного CS/HA ця різниця була найменшою. Це вказує на те, що дія MW створює унікальну поверхню з високою здатністю до адсорбції та десорбції рідин.

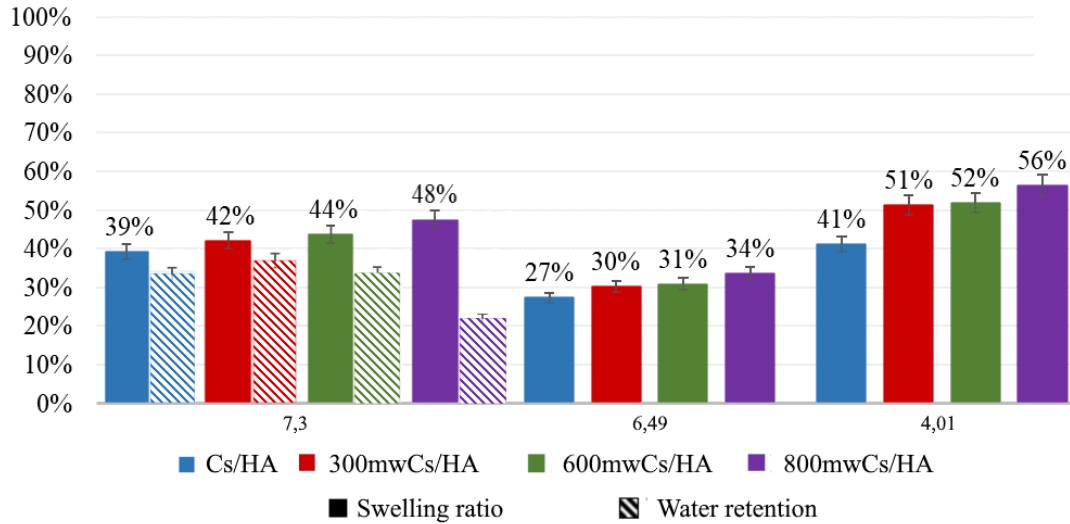


Рисунок 4.2 – Швидкість набрякання та здатність до утримування вологи зразків CS/HA, 300mw-CS/HA, 600mw-CS/HA, 800mw-CS/HA, у розчині PBS за значень рН 4,01; 6,49 та 7,3 [100]

Відомо, що взаємодія CS з ліками та іншими складними компонентами, набрякання та дифузія ліків відіграють важливу роль у контролі вивільнення ліків; хімічні реакції під час синтезу гелів HA-CS та під час формування гранул шляхом зшивання зменшили кількість активних функціональних груп у CS, які відповідальні за сильну взаємодію з полярними молекулами води та розчинами ліків. Однак не всі групи зазнали реакції зшивання. Тому іммобілізація препарату на поверхні композитного матеріалу могла відбуватися як за рахунок електростатичних сил, так і за рахунок зв'язування з хітозановим ланцюгом одним хімічним зв'язком.

Фармакокінетичні профілі вивільнення залежать від багатьох чинників, згаданих вище (фізико-хімічні властивості CS, розмір частинок, рН), але зшивання CS може призвести до покращення профілів вивільнення ліків, навіть для CS із низьким ступенем деацетилювання [129].

В експериментальних умовах як зшивальний агент для полімерів CS використовували ТРР. Кінетика вивільнення СНХ і АН з експериментальних зразків представлена на Рисунках Рисунок 4.3 та 4.4.

Слід зазначити, що зразки зберігали високий ступінь стабільності форми протягом усього дослідження. Таким чином, фармакокінетика вивільнення в основному визначалася адсорбцією препарату на поверхні матеріалу і його дифузійним потенціалом. Особливу увагу було приділено зразку 800mw-CS/HA. Результати показали, що вивільнення ліофілізованого СНХ з цього зразка відбувалося з більшою швидкістю (100% за 312 годин), ніж вивільнення АН (100% за 384 години). Кінетика вивільнення СНХ з 800mw-CS/HA також подібна до контрольного CS/HA, з найвищою швидкістю вивільнення СНХ у перші 72 години з досліджених зразків.

Інша тенденція спостерігається з гідрофобним АН. Швидкість вивільнення препарату найнижча у HA-CS-MW800 і найвища у контрольного HA-CS. У перші дві години найменша кількість (близько 32%) АН вивільняється зі зразка 800mw-CS/HA, що є позитивним моментом. В інших зразках вивільнення препарату в перші кілька годин становить близько 45%. Більше того, 800mw-CS/HA показує найтриваліший час вивільнення (384 години) порівняно з іншими експериментальними зразками (288 годин). Цей факт є результатом гідрофобних взаємодій між АН та компонентами матеріалу, причому вплив MW сприяє специфічному розташуванню сайтів зв'язування та доступу молекул АН до цих сайтів.

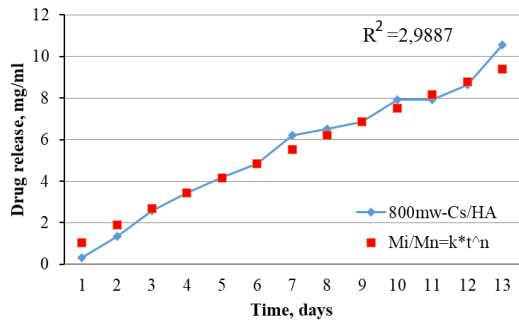
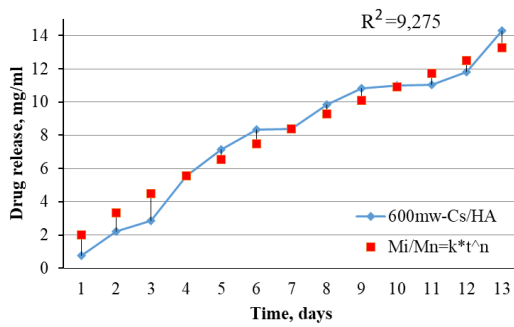
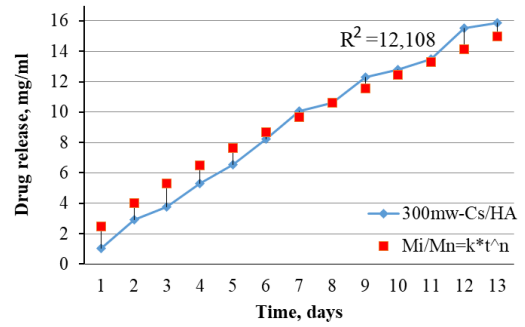
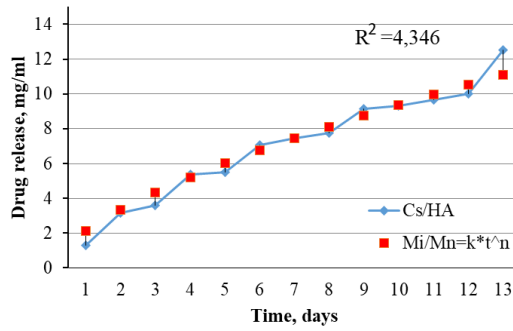
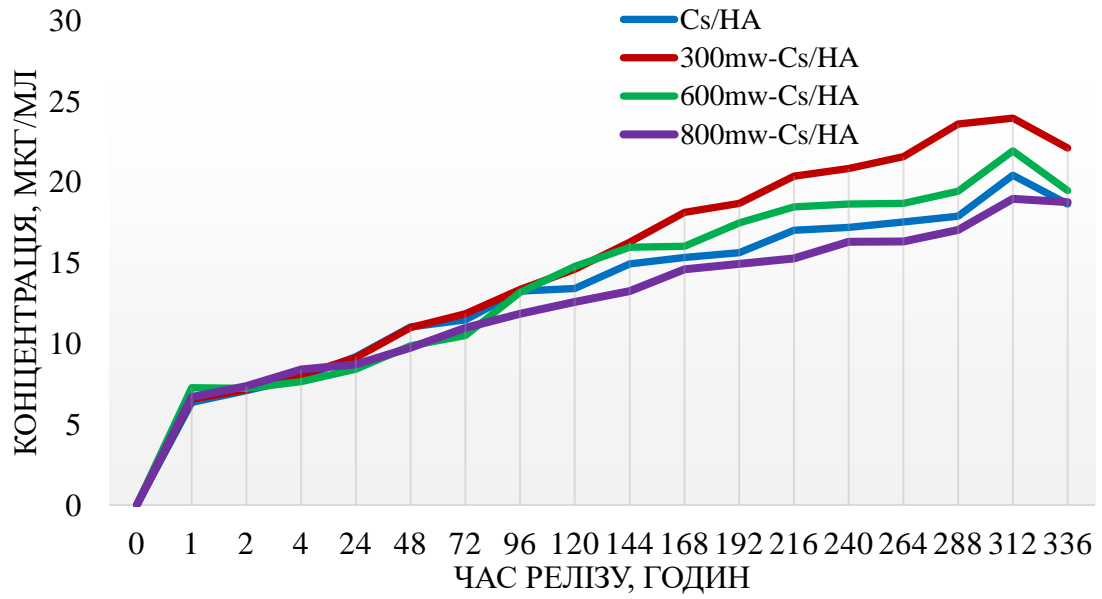


Рисунок 4.3 – Вивільнення СНХ з експериментальних зразків через 336 ГОДИН

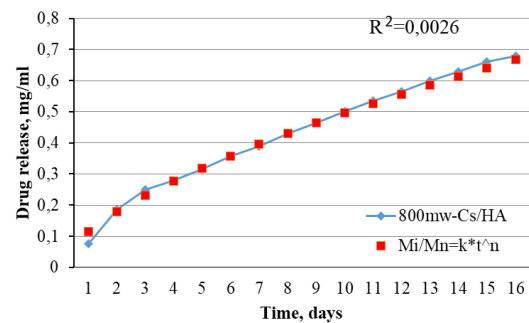
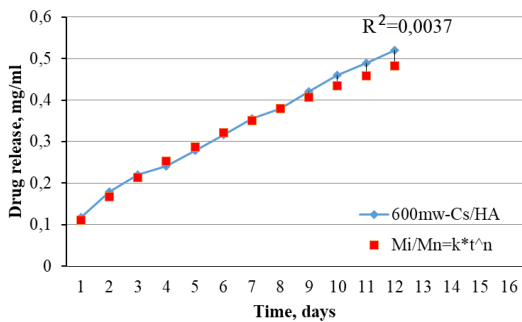
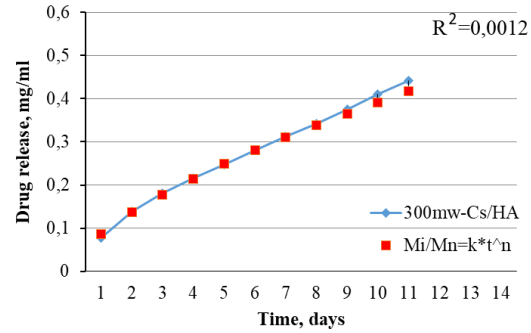
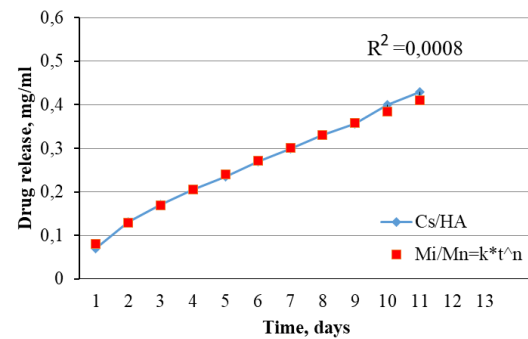
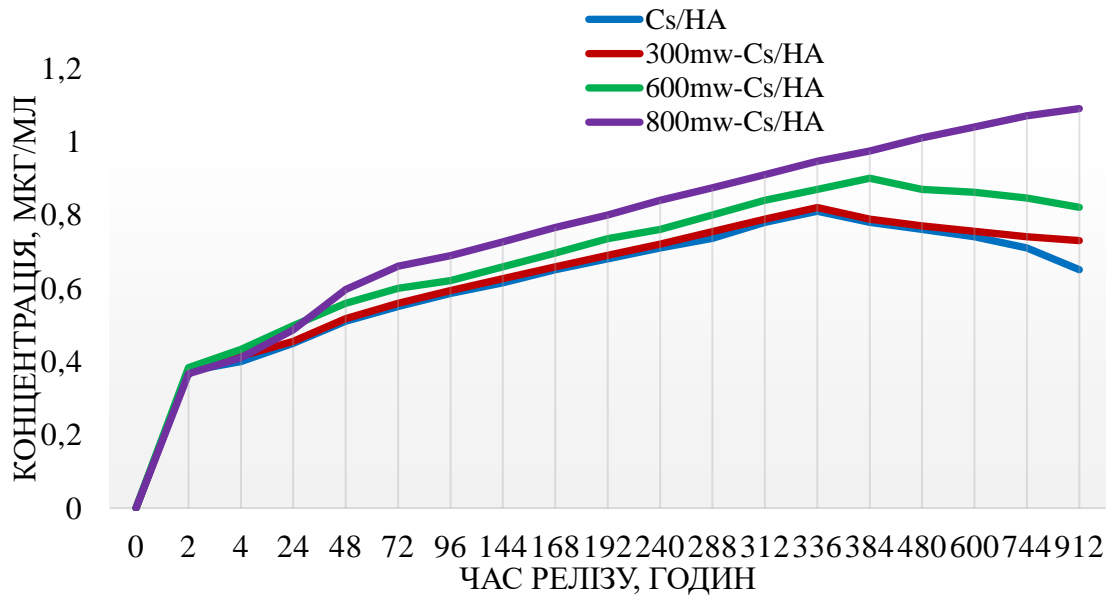


Рисунок 4.4 – Виділення AN з дослідних зразків протягом 912 год

Слід зазначити, що системи вивільнення лікарських засобів можна розділити на два різні класи: зі стійким вивільненням та з контрольованим вивільненням [112]. Системи зі стійким вивільненням являють собою суміші лікарських препаратів, які впливають на швидкість розчинення чистої форми

препарату. Системи контрольованого вивільнення складаються в основному з молекул ліків і біоінертних або біосумісних полімерів. Такі системи можуть контролювати швидкість вивільнення ліків, підтримувати сталу абсорбцію препарату, зберігати стабільну концентрацію у плазмі крові протягом тривалого часу та запобігати розвитку побічних ефектів, що залежать від концентрації. Багато препаратів мають профіль вивільнення, часто званий "вибуховим вивільненням", за якого концентрація препарату безперервно знижується у фізіологічному середовищі [113]. Фармакокінетика за такого підходу є найбільш неідеальною, оскільки виявляє множинні мінімуми та максимуми, які характеризують гетерогенне вивільнення ліків і обмежують потенційне токсичне передозування молекул ліків. Ідеальний фармакокінетичний процес може бути представлений кінетичним профілем вивільнення нульового порядку, що описує систему, в якій швидкість вивільнення ліків є постійною протягом певного періоду часу [111].

Для визначення найкращих моделей для опису профілю вивільнення АН, для кількох математичних моделей вивільнення лікарських засобів, а саме моделей нульового порядку і Корсмейєра-Пеппаса, було розраховано коефіцієнт найменших квадратів, який являє собою суму квадратів відхилень теоретично розрахованих точок від отриманих фактичних значень. На графіках наведено коефіцієнт відхилення  $R^2$ . У результаті розрахунків (Рисунок 4.11) було обрано модель Корсмейєра-Пеппаса [130], виражену таким рівнянням:

$$M_t/M_\infty = k \cdot t^n \quad (4.1)$$

де  $k$  - кінетична константа системи ліки-полімер,  $M_t$  - кількість вивільненого препарату в момент часу  $t$ ,  $M_\infty$  - загальна кількість вивільненого препарату,  $n$  - індекс, що характеризує механізм вивільнення з системи ліки-полімер. Більш детально дана модель описана в розділі 2.3.

Таблиця 4.1 – Параметри профілів вивільнення ліків з експериментальних зразків

Зразок	СНХ			АН		
	k	n	r*	k	n	r*
CS/HA	2,132	0,643	0,981	0,080	0,680	0,996
300mw-CS/HA	2,452	0,705	0,995	0,087	0,655	0,996
600mw-CS/HA	1,995	0,738	0,973	0,111	0,591	0,998
800mw-CS/HA	1,051	0,854	0,998	0,115	0,636	0,998

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

За отриманими даними, можна зробити висновок, що профіль вивільнення анестезину є більш рівномірним, що видно з параметру  $r$ . Це також підтверджується параметром  $n$ , який близький до 0,5, що свідчить про фікіанську дифузію. Однак, якщо розглядати параметри розрахованої кінетичної моделі Корсмейєра-Пеппаса для зразків насичених хлоргексидином, спостерігається вищий параметр  $n$ , близький до 0,89, що для зразків кулястої форми свідчить про відповідність дифузії, що не підпорядковується закону Фіка (дифузія PFO).

#### 4.2 Модифіковані хітозан-апатит-фулерен композити

Отримані гранули (Рисунок 4.5) являють собою скафолди, сформовані шляхом зшивання CS-полімерних каркасів з ТРР, і містять іммобілізовані неорганічні частинки НА і С60. Гранули синтезовані за мікрохвильовою технологією при потужності опромінення 800 Вт.



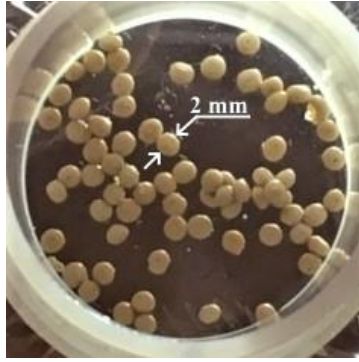


Рисунок 4.5 – Вигляд композитних гранул на основі хітозану

Були проведені рентгенографічні дослідження CS/HA, 150Full-CS/HA, 300Full-CS/HA після сушіння за 37 °C і відпалювання за 700 °C для одержання структур із вищою кристалічністю і роздільною здатністю піків. Результати показали наявність однієї фази HA (JCPDS 9-432) в обох випадках: аналіз рентгеновських дифракційних картин показав, що постійна кристалічної решітки HA в отриманому композиті ( $a = 0,941$  нм;  $c = 0,688$  нм) була дещо нижчою, ніж у стехіометричного HA ( $a = 0,942$  нм;  $c = 0,688$  нм). Припускається, що HA під час синтезу адсорбував невелику кількість карбонат-іонів з атмосферного діоксиду вуглецю. Це призвело до утворення кальцій-дефіцитного карбонат-заміщеного HA з відношенням Ca/P 1,63.

Як видно з розділу 3.1, отримане значення співвідношення Ca/P синтезованого HA дещо нижче від HA синтезованого без присутності полімеру. Таким чином, наявність хітозану в реакційній суміші має вплив на реакційну здатність прекурсорів HA.

Цей факт підтверджується подальшими FTIR дослідженнями, які показують наявність смуг поглинання карбонату за  $874\text{ cm}^{-1}$  і  $1420\text{ cm}^{-1}$  [131], що вказує на утворення карбонатного апатиту типу B унаслідок часткового заміщення  $\text{PO}_4^{3-}$  групи на карбонатні іони [132,133].

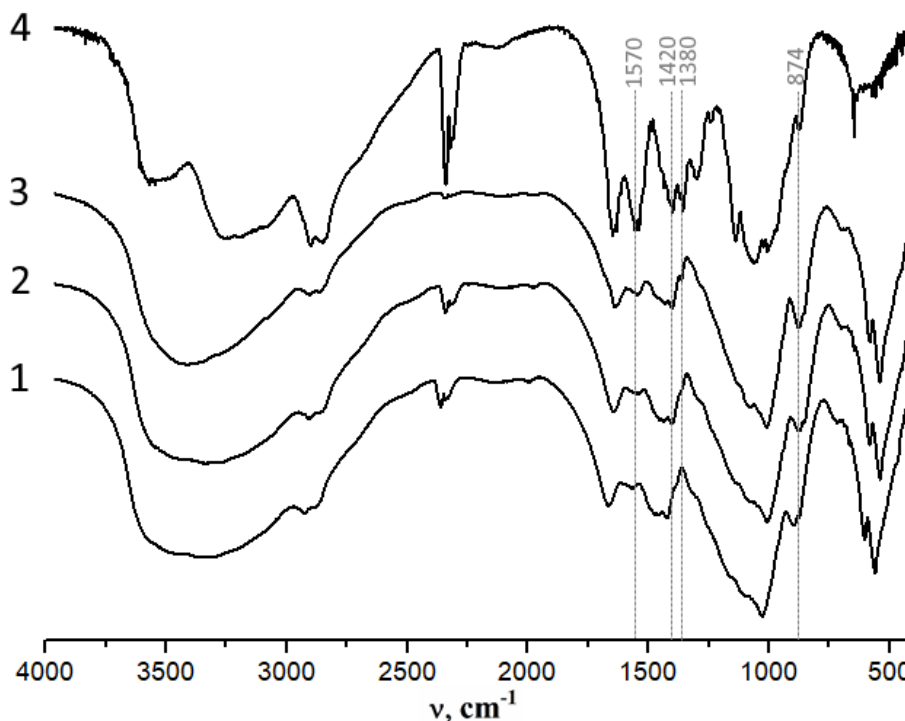


Рисунок 4.6 – FTIR-спектри підготовлених зразків: 1 – CS/HA, 2 – 150Full-CS/HA, 3 – 300Full-CS/HA та порошок CS (4) [101]

На Рисунку Рисунок 4.6 показано FTIR-спектри отриманих композитів. Експериментальні зразки показали характерні смуги поглинання при 1190-970  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ) та 670-520  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ) для  $\text{PO}_4^{3-}$  групи HA; широка смуга при 3200-3500  $\text{cm}^{-1}$  обумовлена адсорбованою водою (розтягуванням Н-ОН). Незалежно від кількості С60 в композиті, ІЧ-спектри всіх зразків подібні: 2850 і 2990  $\text{cm}^{-1}$  (смуги розтягування аліфатичного  $-\text{CH}_2$ ), 1660  $\text{cm}^{-1}$  (амід I  $\text{C}=\text{O}$ ), 1570  $\text{cm}^{-1}$  (амін  $\text{NH}_2$ ) і 1380  $\text{cm}^{-1}$  (амід III). Також на Рисунку Рисунок 4.6 показані специфічні смуги поглинання CS; після утворення гідрогелів CS/HA під впливом мікрохвильового випромінювання всі основні смуги CS зберігаються, що свідчить про відсутність впливу мікрохвильового випромінювання на макромолекули CS. У той же час, після зшивання полімеру CS розчином TPP у спектрах С60-вмісних гранул виявлено, що інтенсивність смуг С60 1380  $\text{cm}^{-1}$  (С-N розтягнення у поєднанні з NH при площинній деформації), 1660  $\text{cm}^{-1}$

(C- O розтягнення) та  $1570\text{ cm}^{-1}$  смуг, зумовлених  $\text{NH}_3^+$  групами, значно зменшується.

Зображення електронної мікроскопії та електронної дифракції композиту CS/НА (Рисунок 4.7) показують, що під час синтезу в присутності CS та під впливом мікрохвильового випромінювання утворюються голкоподібні кристали НА. Агрегати кристалів мають середній розмір 80 нм; очевидно, що нанокристали, синтезовані під дією MW, мають найвищу поверхневу енергію. Це сприяє підвищенню швидкості агрегації; ED підтвердила, що неорганічна складова досліджуваного матеріалу представлена фазою НА.

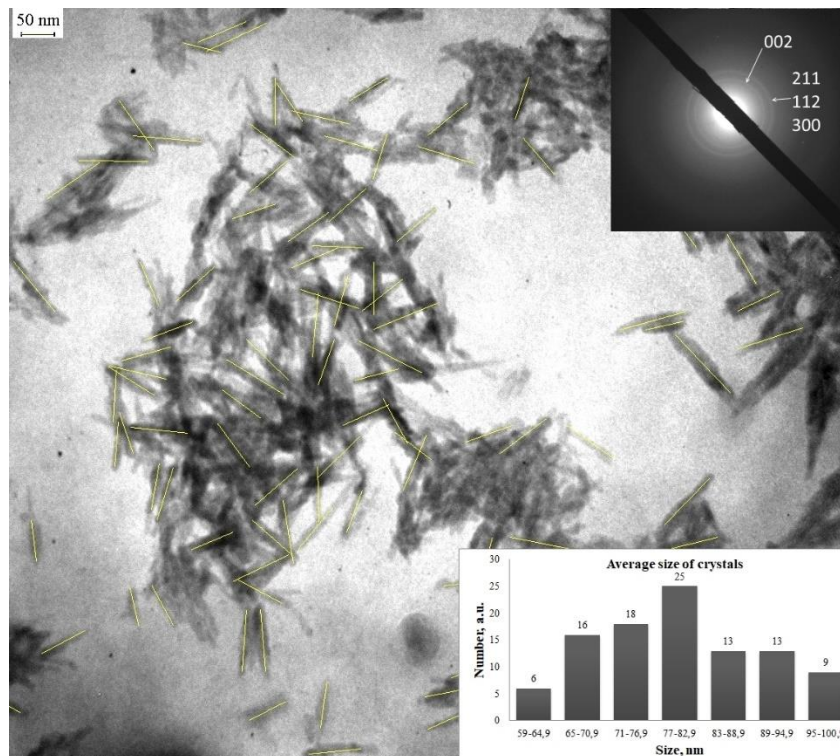


Рисунок 4.7 – Зображення TEM і спектри ED показують кристали НА в експериментальному композиті [101]

Морфологія композитів, досліджених за допомогою TEM, була близькою для всіх експериментальних зразків; на Рисунку Рисунок 4.8 показано зображення поверхні 150Full-CS/НА. Зразок, що містить С60, характеризується багат шаровою поверхнею, що містить кристалічні агрегати НА, які є досить

щільними, а також мають форму кулі. Контрольний зразок HA-CS має меншу щільність і більші пори, ніж інші зразки.

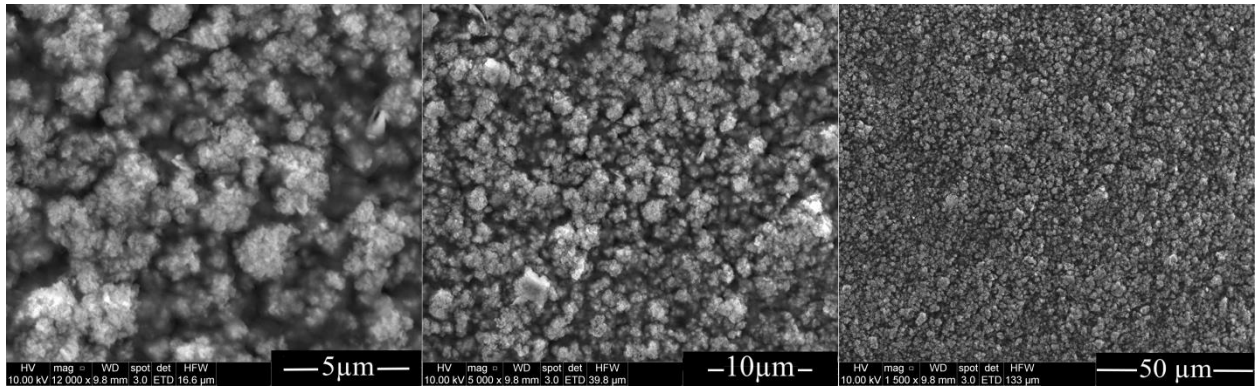


Рисунок 4.8 – Морфологія зразків 150Full-CS/HA при різних збільшеннях [101]

Для визначення ступеня набрякання гранули CS/HA, 150Full-CS/HA, 300Full-CS/HA поміщали в пробірки з розчином PBS (pH = 7,4) при 37°C і безперервно перемішували на шейкері (об/хв 80) протягом 14 днів. Результати показали, що всі зразки зберегли свою форму, а ступінь набрякання коливався від 38% для контрольного CS/HA до 48% для 300Full-CS/HA. Важливо відмітити, що ступінь набрякання контрольного зразку значно менший, ніж у композиту Alg/HA. При цьому, якщо у альгінатних композитах додавання фулерену зменшувало ступінь набрякання, додавання фулерену до композитів на основі хітозану збільшує їх ступінь набрякання. Відносно низький ступінь набрякання зразків, що містять CS, пояснюється тим, що вже на першій стадії утворення гідрогелю CS/HA іони  $Ca^{2+}$  взаємодіють з гідроксильними групами молекули CS, утворюючи міцний зв'язуючий комплекс між CS і HA, що утворюється [134], залишаючи менше гідрофільних груп, які можуть взаємодіяти з водою. Крім того, на другій стадії синтезу з утворенням гранул матриця CS формується за рахунок протонування аміногруп полімеру оцтовою кислотою та взаємодії з негативно зарядженими іонами солі TPP [135]. Порівняно з гранулами Alg/HA, що

використовують іони кальцію в якості зшивачів у фізіологічних розчинах, ГРР чітко утворює стабільну структуру з CS.

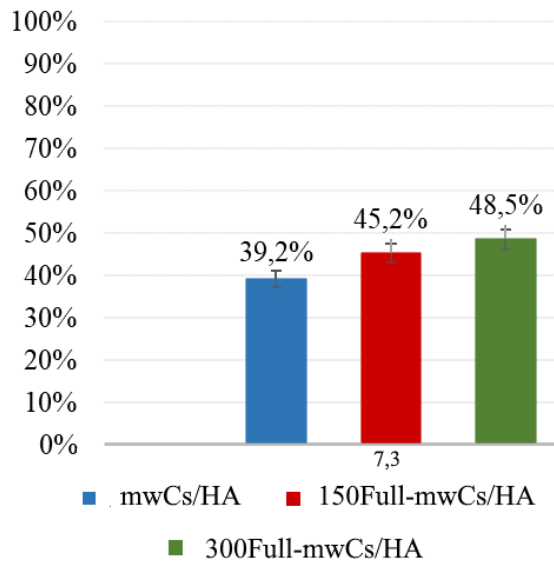


Рисунок 4.9 – Водопоглинальна здатність композитів CS/HA, 150Full-CS/HA, 300Full-CS/HA у PBS протягом 14 днів. Примітка:  $p \leq 0,05$

Цікаво, що зразки, які містять C60 з вищим ступенем набрякання, демонструють поліпшену стабільність форми. Це можна пояснити тим, що C60 впливає на просторове розташування макромолекул CS, спричиняючи утворення іншої структури порівняно з контрольним зразком без C60: додавання C60, очевидно, збільшує ступінь когезії комплексу, що вказує на фундаментальну міцність міжмолекулярної взаємодії.

Подальші дослідження HPLC (Рисунок 4.10) підтвердили, що ступінь деградації зразків, виражений в кількості вивільнених продуктів деградації, був значно вищим в контрольному зразку без C60 порівняно зі зразком із вмістом фулерену.

Насичені анестезином гранули 150Full-CS/HA були досліджені методом HPLC як система для пролонгованого вивільнення лікарського засобу (Рисунок 4.10). Як згадувалося вище, AN був введений у зразки шляхом насичення при 37°C

протягом 24 годин. Тому поверхня зразка була областю з найвищою концентрацією AN. Це сприяло вивільненню препарату в перший день.

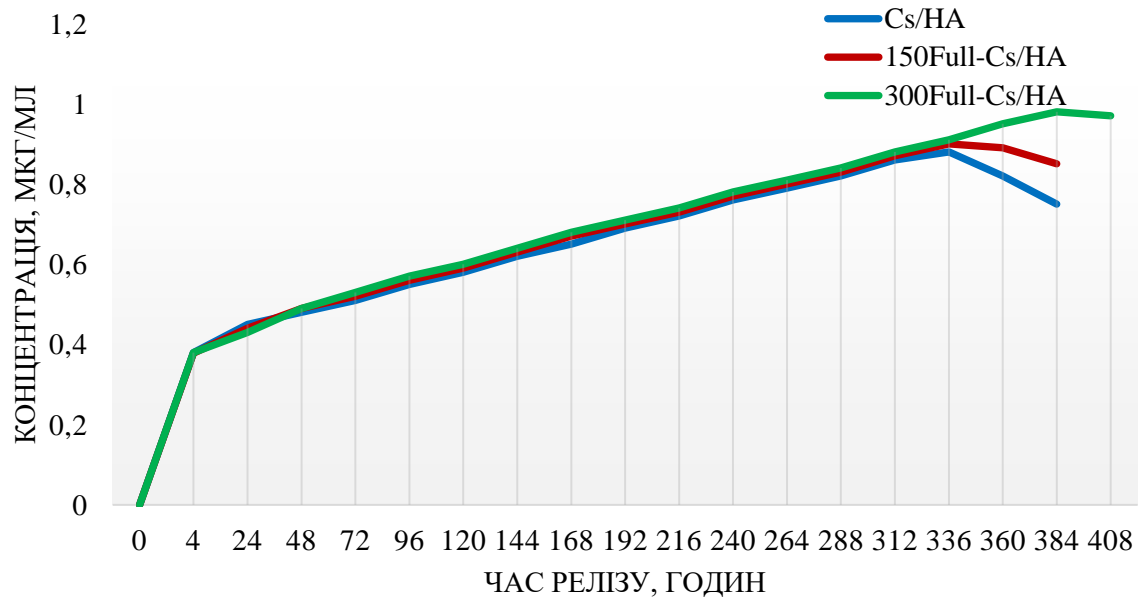


Рисунок 4.10 – Концентрація AN (мкг/мл) у PBS, що виділяється з експериментальних зразків протягом 18 днів

На Рисунку Рисунок 4.10 можна виокремити дві основні стадії вивільнення препарату з експериментальних зразків: протягом першого дня та після першого дня до кінця вивільнення. Перша фаза характеризується відносно високою швидкістю вивільнення адсорбованого на поверхні AN. Після першого дня вивільнення препарату з усіх експериментальних зразків відбувається практично рівномірно впродовж усього періоду дослідження: 15, 16 та 18 днів для mwCS/HA, 150Full-mwCS/HA, 300Full-mwCS/HA відповідно.

Вивільнення препарату контролюється виключно силами дифузії, в той час як для контрольного зразку вивільнення препарату визначається як дифузією препарату, так і деградацією гранул. Зі збільшенням концентрації вивільнення AN подовжувалося на 2 дні; припускається, що затримка вивільнення препарату зі зразків, що містять C60, є результатом гідрофобних взаємодій між C60 і AN.

Таким чином, час вивільнення препарату можна регулювати, змінюючи вміст С60.

Дослідження кінетики вивільнення АН дали змогу перевірити здатність С60 контролювати профіль вивільнення препарату.

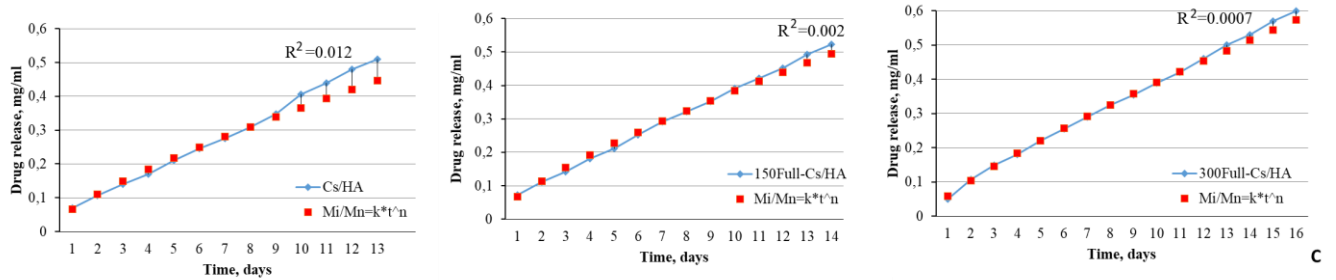


Рисунок 4.11 – Графічне представлення кінетичного профілю вивільнення АН з експериментальних зразків, де  $R^2$  - квадратичний коефіцієнт відхилення [101]

Розрахунки проводили для рівномірного вивільнення препарату, яке відбувається через 1 день (стадія II, рис. 5), оскільки на першій стадії Анастезин активно вивільнявся з поверхневого шару. У результаті індекс вивільнення  $n$  приймав значення від  $n = 0,75$  до  $n = 0,82$  (Таблиця 4.2), демонструючи кінетику дифузії, що не підпорядковується закону Фіка [117].

Якщо порівнювати з результатами отриманими для зразків без домішок (розділ 4.1), спостерігається підвищення значення параметру  $n$ , що свідчить про більш складний характер дифузії.

Таблиця 4.2 – Параметри профілів вивільнення ліків з експериментальних зразків [101]

Зразок	$k$	$n$	$r^*$
CS/HA	0.065	0.748	0.9985
150Full-mwCS/HA	0.067	0.757	0.9996
300Full-mwCS/HA	0.059	0.818	0.9991

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



Тим не менш, значення коефіцієнта кореляції, розраховане для досліджуваного зразка,  $r = 0,99$ , означає, що вивільнення АН протягом 18 днів все ще близьке до кінетичного профілю вивільнення нульового порядку, що узгоджується з літературними даними для розрахунку [136].

Антимікробну активність експериментальних зразків досліджували проти грамнегативних *E. coli* ATCC 25922 та грампозитивних *S. aureus* ATCC 25923 бактерій методом зонного інгібування. Слід зазначити, що експериментальні зразки характеризуються низькою розчинністю, що уповільнює дифузію наночастинок С60 з комплексу. Тому антимікробний тест було проведено з використанням гідрогелів того ж складу. Зона інгібування росту (мм) відображає антимікробну сприйнятливість зразка, при цьому більша зона інгібування вказує на вищу антимікробну активність.

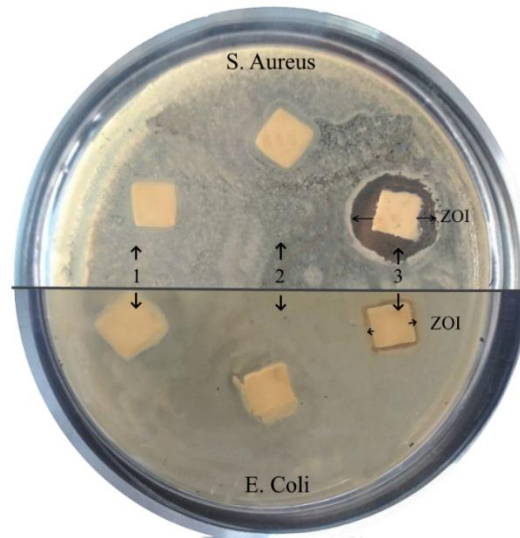


Рисунок 4.12 – Антимікробна активність зразків CS/HA, 0.4Full-mwCS/HA, 4Full-mwCS/HA проти *S. aureus* ATCC 25923 (угорі) і *E. coli* ATCC 25922 (знизу). Примітка:  $p \leq 0,05$  [101]

Результати експериментів засвідчили, що зразки mwCS/HA, 150Full-mwCS/HA, 300Full-mwCS/HA не виявили антимікробної активності. Додаткові випробування зі зразками з різним вмістом С60 показали, що при концентрації наночастинок



0,004 мг/мл антибактеріальна активність комплексу 0.4Full-mwCS/HA збільшувалася зі зменшенням концентрації. Навпаки, концентрація С60 0,04 мг/мл практично не виявляла антимікробної активності (ZOI близько  $10 \pm 2$  мм) проти *E. coli* ATCC 25922 (Рисунок 4.12). Також було показано, що чим менші агрегати С60, тим вища антимікробна активність. Це явище пояснюється тим, що в суспензії менші агрегати С60 мають більшу загальну площу поверхні та забезпечують вищу антимікробну активність [137]. Оскільки CS є складним компонентом, вважається, що за антимікробний ефект відповідає синергетичний ефект CS і С60. Позитивно заряджені частинки CS взаємодіють з негативно зарядженими клітинними мембранами, збільшуючи проникність мембрани та зрештою розриваючи її, забезпечуючи витік внутрішньоклітинних компонентів [138]. Інший ймовірний механізм полягає в тому, що CS хелатує мікроелементи, спричиняючи інгібування активності ферментів [139]. Відомо, що вони локалізуються в багатих на ліпіди ділянках, таких як клітинні мембрани, та мають окисно-відновну активність [140]. Вважається, що ROS беруть участь у порушенні мембран бактеріальних клітин і виробництві перекисів ліпідів [141].

Метод відновлення ресазурину показав достатню проліферацію остеобластів на 3-й день порівняно з позитивним контролем TSP (пластик для культури тканини) (Рисунок 4.13D), не було суттєвої різниці між mwCS/HA, 150Full-mwCS/HA, 300Full-mwCS/HA (вміст С60 0,3 мг/мл.) значно підвищував життєздатність клітин порівняно з іншими експериментальними групами ( $p=0,034$ ). Під мікроскопом остеобласти мали нормальну структуру, але в лунках зі зразками 300Full-mwCS/HA конфлюенція клітин була кращою (Рисунок 4.13С); у лунках із mwCS/HA і 150Full-mwCS/HA можна було візуалізувати деякі продукти деградації (Рисунок 4.13А та В), які, імовірно, впливають на життєздатність клітин.

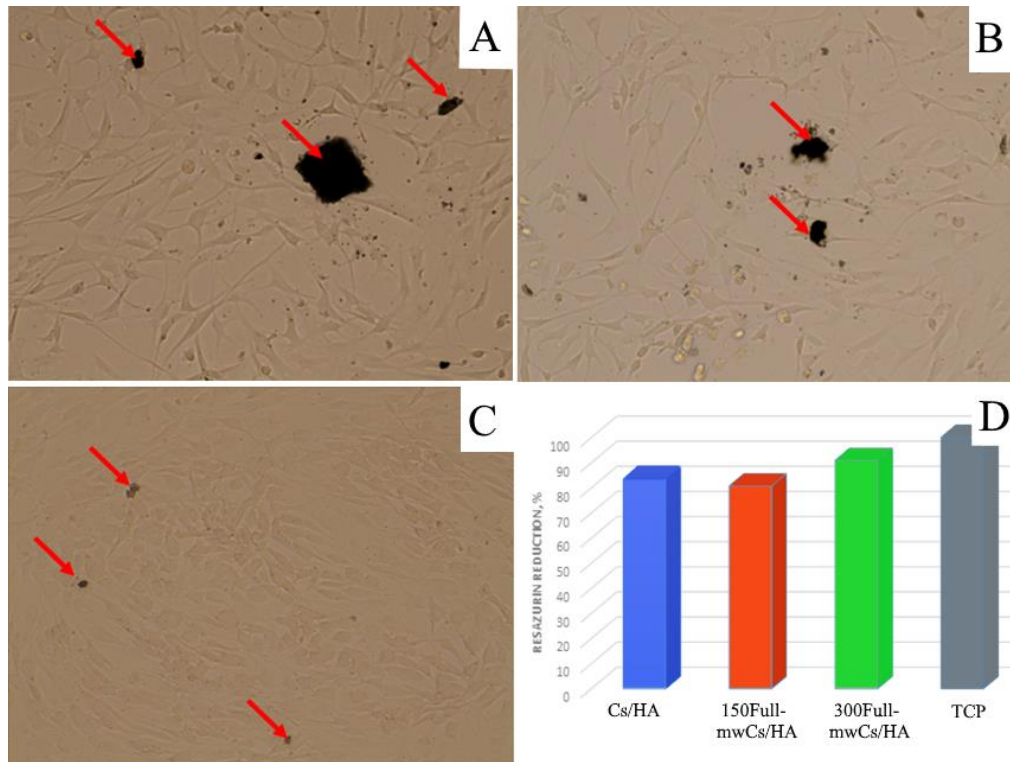


Рисунок 4.13 – Оптичні зображення зразків CS/HA (A), 150Full-mwCS/HA (B), 300Full-mwCS/HA (C) та дані редукції Ліссажу первинних людських остеобластів на 3-й день після культивування з експериментальними зразками (D). Червоні стрілки вказують на продукти деградації [101]

Випробування на життєздатність клітин композитів, що містять 300 і 150 мкг/мл С60, не виявили токсичного впливу, що добре узгоджується з нещодавніми результатами для чистого С60: концентрації до 0,144 мг/мл не виявляють токсичності проти клітин ембріональної нирки людини (НЕК293), а ІС 50 становить 0,383 мг/мл (дані неопубліковані).

## ВИСНОВКИ ДО ЧЕТВЕРТОГО РОЗДІЛУ

Формування гідрогелів НА-CS, що лежать в основі композитних матеріалів, відбувалося під впливом MW, що значно скоротило час синтезу (до 3 хв, без впливу на структуру) порівняно з класичним методом, який передбачає

конверсійне нагрівання і витримку розчину щонайменше 24 години. Тести на набрякання показали, що зразок HA-CS-MW800, синтезований за максимальної потужності, мав найбільшу різницю в поглинанні та утриманні рідини, тоді як ця різниця була найменшою для контрольного HA-CS. HPLC дослідження показало значні відмінності у швидкості вивільнення гідрофільного CHX і гідрофобного AN, аж до 336 годин для CHX і 384 годин для AN. HA-CS-MW800 показав найвищу швидкість вивільнення для гідрофільного CHX і найнижчу для гідрофобного AN. У перші 2 год зразок HA-CS-MW800 вивільнив найменшу кількість (близько 32%) AN, у той час як інші зразки вивільнили близько 45% препарату в перші кілька годин. Вплив MW сприяє специфічному розташуванню сайтів зв'язування в комплексі та доступу молекул препарату до цих сайтів, сформованих під впливом MW. Поверхні наночастинок, сформовані під впливом MW, мають більшу здатність до адсорбції та десорбції рідин.

Вміст C60 підвищує стабільність форми гранул. HPLC дослідження показують, що CS і C60 не піддаються міжмолекулярній гідрофобній взаємодії та можуть вивільняти анестезин протягом тривалого часу, до 18 днів; варіюючи вміст C60, можна регулювати час вивільнення препарату; завдяки присутності CS і C60, профіль вивільнення анестезину за розрахованим коефіцієнтом кореляції ( $r = 0,99$ ), близький до кінетичного профілю вивільнення нульового порядку. Тест зони інгібування (ZOI) показує антимікробну ефективність комплексу, що містить 0,004 мг/мл C60, проти *S. aureus* ATCC 25923 і *E. coli* ATCC 25922 (ZOI  $16 \pm 1$  мм і  $10 \pm 2$ , відповідно). Тести на життєздатність клітин засвідчили відсутність токсичності 0,3 і 0,15 мг/мл C60-вмісних композитів.

## РОЗДІЛ 5 СИНХРОННО СИНТЕЗОВАНІ ХІТОЗАН-КАЛЬЦІЙ ФОСФАТНІ ГРАНУЛИ

Біоматеріали на основі полімерів мають можливість утворювати різноманітні структури з прийнятними механічними властивостями, топографією, геометрією та архітектурою, що вимагається для різноманітних біомедичних застосувань. Однак вони не мають біологічної активності, необхідної для формування кісток, і, отже, викликають мінімальну реакцію тканин. Таким чином, для покращення їх хімічної біоактивації необхідне введення біологічно активних наповнювачів у полімерні матриці. Кераміка з фосфату кальцію (ОФК), така як гідроксиапатит, трикальцій фосфат і двофазний фосфат кальцію (ВСР), найчастіше стає наповнювачем до полімерних матриць через її схожість з природним неорганічним компонентом кістки та завдяки остеокондуктивним властивостям.

Гібридний композит у вигляді гранул формувався *in situ*, у вигляді CS-матриці з включеними в її об'єм та однорідно розподіленими поліфазними ортофосфатами кальцію, що підтверджено картографуванням даних EDX. Колоїдну суспензію, що містить  $\text{Ca}^{2+}$ , ацетатні іони та макромолекули CS, повільно крапали у розчин  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , що містить іони  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  та  $\text{PO}_4^{3-}$ . Реакцію фосфатних іонів з  $\text{Ca}^{2+}$  та функціональними групами CS ( $\text{NH}^{3+}$ ,  $\text{OH}^-$ ) проводили за кислих ( $\text{pH} < 7$ ) умов з метою отримання октакальційфосфату (ОСР) та інших (DCPD, cdHA) ОФК. ОСР, як правило є нестабільною фазою і тому швидко трансформується в аморфний фосфат кальцію (АСР), який, в свою чергу, повільно перетворюється в більш стабільний ОФК – cdHA. В той же час, як показують наші дослідження, присутність в реакційному розчині макромолекул CS сприяє стабілізації певної кількості фази ОФК.

### 5.1 Вивчення структурно-механічних і фізико-хімічних властивостей

Реакція та умови синтезу, застосовані в даній роботі направлені, перш за все на отримання ОФК фази, однією з переваг якої є підвищена розчинність у порівнянні як зі стехіометричним НА, так і з cdНА [142]:

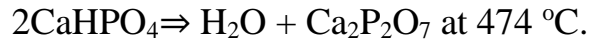


З точки зору кристалохімії ОСР можна представити набором шарів апатиту зі структурою, подібною до НА ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ ), і набором шарів зі структурою DCPD ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), що чергуються вздовж осі *a*. Три іони фосфату присутні на стику шару «вода» і шар «apatит». Фосфат-іони в шарі "води" і на стику між шарами протоновані [133].

Результати показують, що карбонат замінює  $\text{HPO}_4^{2-}$  у «водному» шарі та  $\text{PO}_4^{3-}$  у «apatитному» шарі з отриманням карбонат-заміщених аморфних фосфатів кальцію (АФК), що підсилює регуляторний вплив активності остеобластів на формування кісткової тканини [143]. Проте наявність макромолекул хітозану з різним співвідношенням  $\text{Ca}^{2+}$  та використання в синтезі MW опромінення, очевидно, певною мірою модифікувало процес зародження та утворення ОФК-фази. Загалом ці фактори впливають на вагове співвідношення ОФК-фази, що утворюється після термічної обробки зразка.

На рисунку 5.1А,В показано дифрактограми рентгенівського випромінювання, отримані із зразків порошків, синтезованих конвекційним нагріванням, під впливом MW та після відпалювання при  $750^\circ\text{C}$  протягом 1 години. XRD-спектри демонструють наявність в зразках декількох фаз ОФК, а саме НА (JCPDS 9-432), ОСР (JCPDS 01-074-1301), DCPA (JCPDS 2-1350), CPP (кальцій пірофосфат) (JCPDS 35-0002).

DCPD зазвичай утворюється шляхом змішування розчинів з іонами  $\text{Ca}^{2+}$  та  $\text{HPO}_4^{2-}$  при  $\text{pH} = 3-4,5$  у такій реакції:  $\text{Ca}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \downarrow$ . З підвищенням температури DCPD перетворюється в ДСПА з подальшою трансформацією в СРР згідно з реакцією [144]:



Виходячи із загальної площі відповідних піків на рентгенівських дифрактограмах, розраховували фазовий склад зразків (Рисунок 5.2, Таблиця 5.1). Оскільки піки ОСР і НА перекриваються при  $2\theta \sim 30^\circ$ , ці дві фази були розраховані разом. Розрахунок за формулою Шеррера [68] показує, що MW опромінення сприяє зменшенню середнього розміру кристалітів (L) (Таблиця 5.1).

Також, під впливом MW та з більшим співвідношенням Ca до CS середній вміст НА/ОСР збільшується на 5, 7, 10 мас%, а частка СРР зменшується на 13, 12 та 14% у 0,15Cs/CaP, 0,45Cs/CaP, та 0,75Cs/CaP, відповідно, до тих величин, які відповідають зразкам, синтезованим за допомогою конвекційного нагріву. Водночас дещо збільшується вміст ДСПА. Нагрівання через MW відбувається за рахунок діелектричних втрат, а деградація реакційних іонів сприяє швидкому утворенню більш стабільних ортофосфатів кальцію (НА, ОСР, DCPD), ніж АСР. Відомо, що пірофосфати можуть утворюватися шляхом конденсації після нагрівання АСР, які містять  $\text{HPO}_4^{2-}$ , від  $400$  до  $700^\circ$  [145].

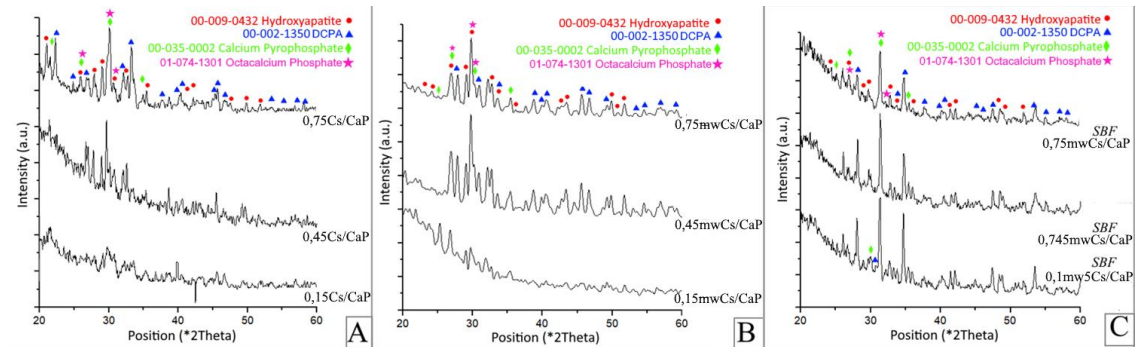


Рисунок 5.1 – Рентгенограми з відпалених при 750°C зразків, синтезованих: А - за допомогою конвекційного нагріву; В - під впливом MW; С - після перебування у SBF протягом 28 днів [146]

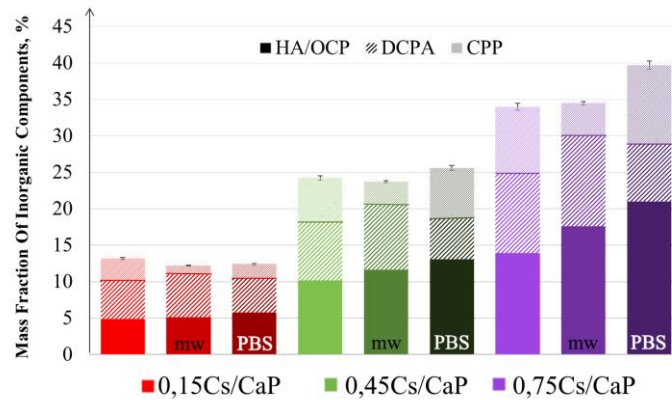


Рисунок 5.2 – Порівняльна характеристика масової частки CaP у НС, отримана при конвекційному нагріванні, та під впливом MW після перебування у SBF протягом 28 днів [146]

Оскільки частка АСР зменшується, подальше нагрівання зразків, викликане більшою потужністю MW, показує зменшення фракції CPP. Після замочування зразків у SBF (Рисунок 5.1С, Рисунок 5.2, Таблиця 5.1) у композитах загальна неорганічна фракція збільшується на 2%, а HA/ОСР збільшується на 2-7% залежно від співвідношення Ca/CS. Також спостерігається значне зниження DCPA у зразках 1C\_MW, 2C\_MW, 3C\_MW на 10, 16, 24% відповідно. Примітно, що частка CPP після витримуванні у розчині SBF близька до значень, отриманих для зразків виготовлених за допомогою конвекційного нагріву. Так,

на поверхні кульок у фізіологічному розчині при рН = 7,4 утворюється новий шар АСР, який є попередником DCPD, ОСР та сdHA фаз. Цей факт підтверджує високу біоактивність отриманих CaP/CS - композитів.

Таблиця 5.1 – Відсотковий склад ОФК фази дослідних зразків [146]

Зразок		0,15Cs/CaP			0,45Cs/CaP			0,75Cs/CaP		
Параметр	Обробка	СН	MW	MW після	СН	MW	MW після	СН	MW	MW після
		SBF			SBF			SBF		
Загальний		13,16±	10,2±	12,4±	24,26±	23,7±	25,6±	34,0±	34,5±	36,1±
неорганічний		0,58	0,42	0,44	0,98	0,95	1,02	0,87	0,95	0,98
вміст, де:										
НА/ОСР		37	42	46	42	49	51	41	51	58
ДСРА		40	48	38	33	38	22	32	36	22
СРР		23	10	16	25	13	27	27	13	29
Середній		44,24±	37,27	-	37,67±	35,94±	-	34,77	33,19±	-
розмір		0,50	±0,42		0,33	0,47		±0,32	0,45	
кристалітів										
(L), нм										

Оцінювання стабільності форми оцінювали шляхом дослідження рівня набрякання зразків у розчині PBS. Набрякання отриманих матеріалів спостерігалось протягом першої доби, а потім вага і форма залишалися постійними протягом тривалого періоду часу (3 місяці), візуального деформування чи розчинення не спостерігалось. Слід зазначити, що гібридний композит, що містить CS, має відносно низький (< 100%) ступінь набрякання, як для органічних матеріалів. Збільшення співвідношення Ca/CS та ефекту MW зменшують коефіцієнти набрякання, що свідчить про те, що синтезовані зразки мають більш щільну мікроструктуру (Рисунок 5.3).



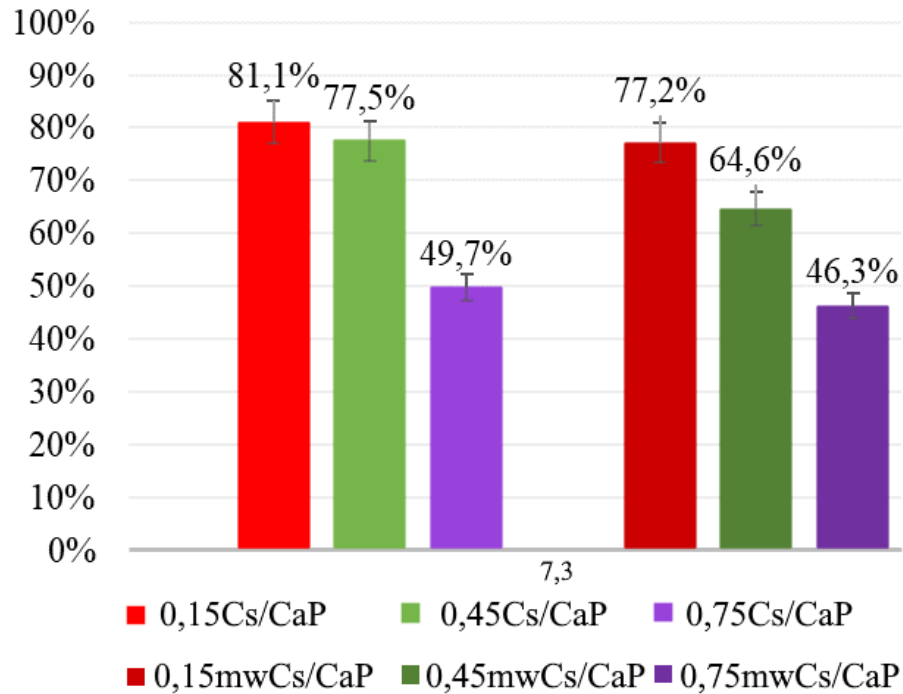


Рисунок 5.3 – Ступінь набрякання композитів в SBF [146]

SEM/EDX та *in vitro* дослідження біоактивності. SEM-мікрофотографії зразків синтезованих за СН та MW технологіями наведено на Рисунку Рисунок 5.4А-Ф. Можна відмітити, що морфологія зразків синтезованих без дії мікрохвильового опромінення є менш розвиненою, більш гладкою та містить на поверхні невеликі кристаліти ОФК. Також, було досліджено поверхню зразка 0,15Cs/CaP після перебування у SBF протягом 28 днів (Рисунок 5.4G). Можна побачити чітке зображення хвилеподібної морфології, більш гладкої ніж на попередніх зображеннях, що свідчить про часткове розмивання поверхні гранули. Також, наявні нові ОФК утворення у вигляді мікросфер на поверхні гранул.

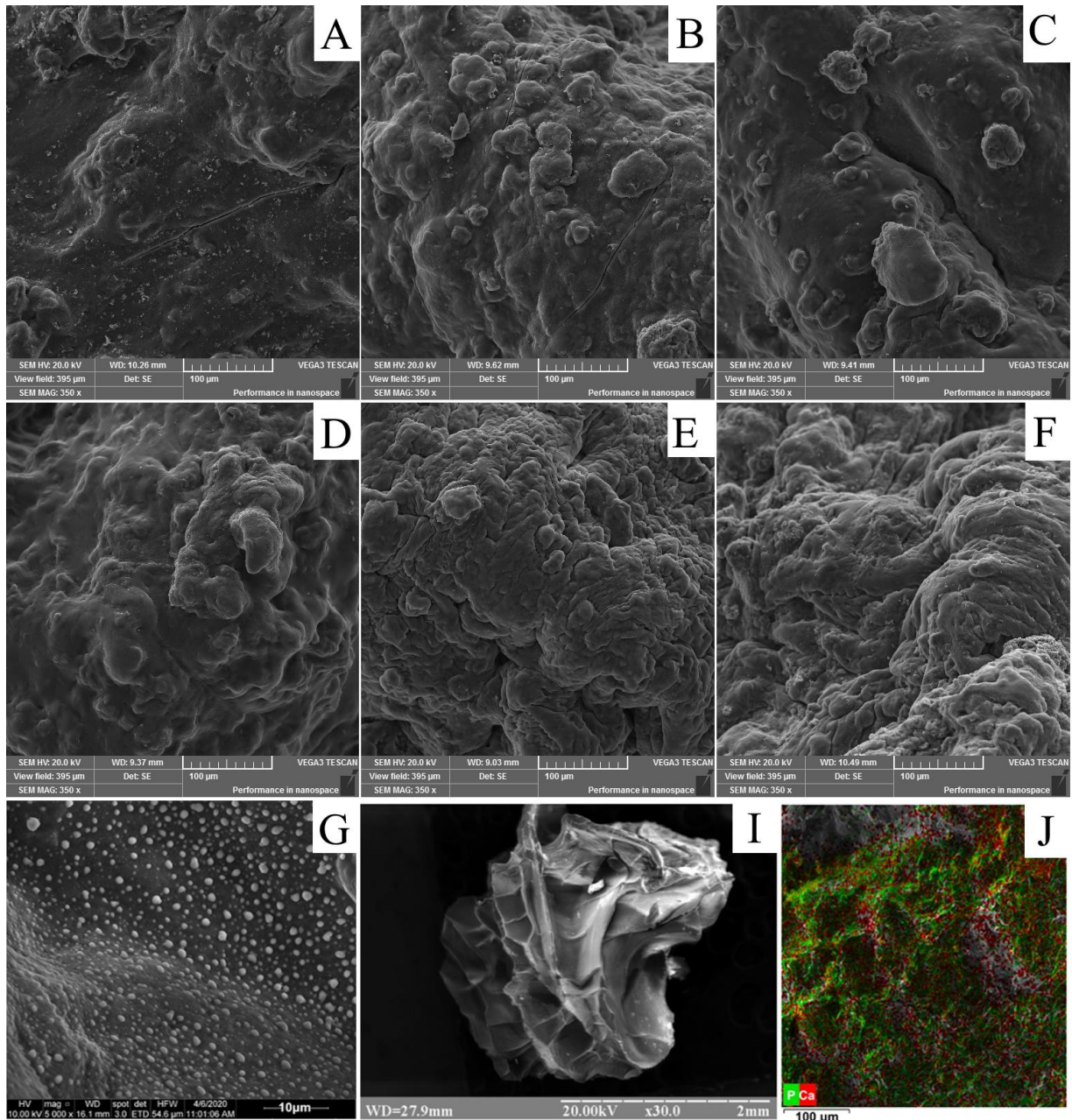


Рисунок 5.4 – SEM-зображення А,В,С – СН синтез зразків 0,15Cs/CaP, 0,45Cs/CaP, та 0,75Cs/CaP, відповідно; D,E,F – MW синтез відповідних зразків; G – зразок 0,15Cs/CaP через 28 днів перебування у SBF; I – загальний вигляд ліофілізованої гібридної намистини, дослідженої за допомогою оптичного мікроскопа Primo star (Karl Zeiss Group); J – EDX-карта розподілу кальцію та фосфору в матриці CS [146]

Елементний склад композитів, синтезованих під впливом MW до та після їх перебування у SBF (Таблиця 5.2), досліджували за допомогою EDX (Рисунок 5.4J). Матеріал включає елементи, що підтверджують присутність як полімеру (N, C), так і кальцій фосфатних сполук (Ca, P). Зі збільшенням співвідношення Ca/CS очікувано збільшується вміст кальцію, фосфору, а вміст вуглецю та азоту зменшується. У зразках 1C\_MW, 2C\_MW, 3C\_MW до їх перебування в SBF збільшується вміст натрію, асоційованого з TPP, в геометричній прогресії в 1.5,  $\approx 3$ ,  $\approx 6$  разів, відповідно. Вагове співвідношення Ca/P становить в середньому 0.12, що пояснюється значною кількістю фосфору, пов'язаною з присутністю TPP.

Цікава картина спостерігається після витримування матеріалу в SBF. Близьким є поверхневий вміст азоту та вуглецю у всіх зразках, а вміст натрію різко зменшується в 2.5, 4.6, 15.4 рази у 1C\_MW, 2C\_MW, 3C\_MW, відповідно. В той же час збагачена вказаними іонами поверхня гранул набуває від'ємного заряду та спорідненості до іонів кальцію. Спостерігається збільшення вмісту кальцію, а вагове співвідношення Ca/P у всіх зразках збільшується в 10 разів і становить 1.275, 1.136, 1.157 у зразках 1C\_MW, 2C\_MW, 3C\_MW, відповідно. Це означає, що у фізіологічному розчині на поверхні композитного матеріалу формується новий шар кальцій фосфату, який є прекурсором брушиту та гідроксиапатиту. Даний факт підтверджує високу біоактивність гібридного хітозан-кальцій фосфатного матеріалу.

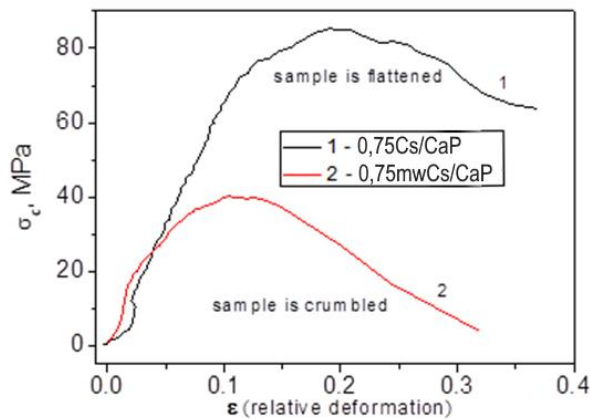
На Рисунку Рисунок 5.5 показані механічні властивості під час стискання зразків із співвідношенням Ca/CS = 0,75, синтезованих під впливом MW та конвекційного нагрівання. Інші зразки під час завантаження були утилізовані через високу крихкість. Зразок з Ca/CS = 0,75 був сплющений при стисканні навантаженням 85 МПа. Фрагментації зразка не спостерігалось, виникають відносно великі пластичні деформації ( $dest \sim 0,24$ ), що може призвести до

пластичного руйнування. Зразок синтезований під впливом MW демонстрував значно меншу міцність на стиск ( $\sim 40$  МПа) порівняно з зразком синтезованим СН.

Таблиця 5.2 – Елементний склад дослідних зразків до та після перебування в SBF [146]

Елементний склад за EDX, мас. %

Елемент	0,15mwCs/CaP		0,45mwCs/CaP		0,75mwCs/CaP	
	До SBF	Після SBF	До SBF	Після SBF	До SBF	Після SBF
Ca	0.61±0.01	1.11±0.03	0.66±0.01	1.5±0.02	1.51±0.03	2.79±0.03
P	4.5±0.04	0.87±0.02	5.21±0.05	1.32±0.03	7.92±0.06	2.41±0.03
Na	2.44±0.04	0.97±0.02	4.33±0.05	0.94±0.02	7.84±0.07	0.51±0.01
O	40.75±0.20	38.86±0.18	44.88±0.38	40.55±0.30	45.91±0.33	43.95±0.31
N	7.10±0.06	8.10±0.07	6.99±0.07	8.37±0.7	5.58±0.04	10.84±0.1
C	44.59±0.35	47.77±0.37	37.94±0.25	46.53±0.34	31.24±0.21	39.22±0.26
Cl	-	1.72±0.03	-	0.8±0.02	-	0.28±0.01
Ca/P ваг%	0.135	1.275	0.126	1.136	0.19	1.157
Ca/P атом%	0.106	1.0	0.097	0.88	0.147	0.89



Sample	Density g/cm <sup>3</sup>	Max. relative deformation $\epsilon_{distr}$	Strength $\sigma_c$ , MPa	Young's modulus $E$ , MPa
0,75 Cs/CaP	1.59	0.20 (at 85 MPa)	85	517
0,75mw Cs/CaP	1.61	0.11 (at 40 MPa)	40	780

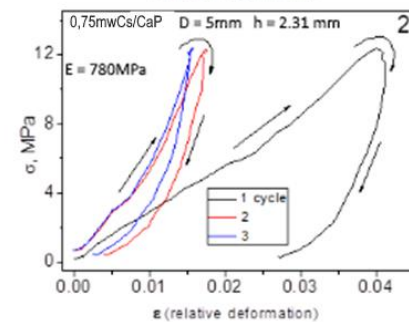
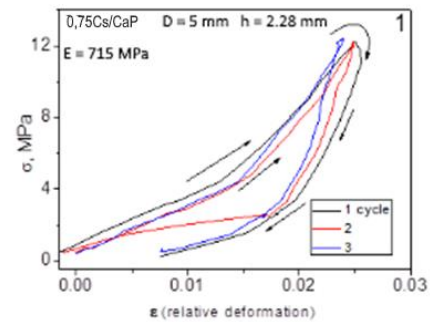


Рисунок 5.5 – Міцність зразків із співвідношенням  $Ca/CS = 0,75$ . Діаграми "навантаження-розвантаження" зразків, виміряних при одноосному стисненні протягом трьох циклів навантаження [146]

Модуль Юнга визначається як відношення величини навантаження до величини пружної деформації зразка  $E = \sigma_c / \epsilon_{elast}$ . Відносна деформація зразка при стисненні визначається як  $\epsilon = \Delta l / l_0$ , де  $l_0$  - початковий лінійний розмір зразка в напрямку дії сили,  $\Delta l$  - зміна розміру зразка при дії навантаження. Для отримання модуля Юнга проводили 3 цикли «навантаження-розвантаження» до невеликих значень навантаження ( $\sigma_c = 12 \text{ МПа}$  в нашому випадку), щоб мінімізувати пластичні (тобто незворотні) деформації зразка ( $\epsilon_{plast}$ ), які зазвичай відбуваються для композитів після першого циклу навантаження паралельно із пружними деформаціями, і  $\epsilon = \epsilon_{elast} + \epsilon_{plast}$ . При третьому циклі навантаження до тих самих значень  $\sigma_c$ , пластичні деформації практично відсутні (через певний час після зняття навантаження розмір зразка відновлюється до значень на початку 3 циклу), тобто можна вважати, що  $\epsilon \approx \epsilon_{elast}$  і визначаємо модуль Юнга як  $E \approx \sigma_c / \epsilon$ . Оцінка модуля Юнга (E) показала, що значення E для зразка з MW дорівнює 780 МПа, що набагато вище порівняно з зразком  $Ca/CS = 0,75$  без MW (517 МПа). Результати показують відсутність прямого зв'язку між модулем Юнга (що відповідає за пружні деформації зразка) і міцністю зразка: в композитних матеріалах окрім пружної деформації (яка може бути невеликою при невеликих значеннях модуля Юнга) може відбуватися і пластична деформація при стисненні і в'язко-пружне руйнування зразка при значно вищих навантаженнях незважаючи на невисокий модуль Юнга, що і спостерігалось для зразка  $0,75Cs/CaP$  – він розплющився (Рисунок 5.5, крива 1).

На Рисунок 5.6 показані FTIR-спектри поглинання чистих CS та HC з різними співвідношеннями  $Ca/CS$ , синтезованих із застосуванням звичайного нагрівання.

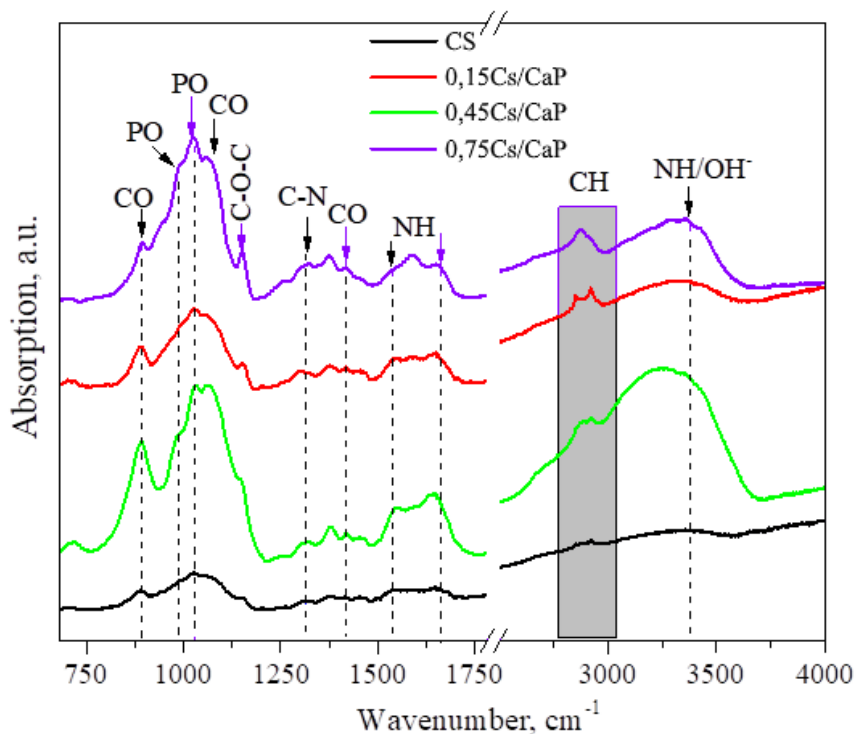


Рисунок 5.6 – FTIR-спектри поглинання порошків CS та композитів з різним співвідношенням Ca/CS, синтезованих за допомогою звичайного нагрівання [146]

Широкі смуги розтягування OH і N-H з центром  $3430\text{ cm}^{-1}$  асоціюються з чистим CS. Вони також пов'язані з водневим зв'язком у CS [147]. Характеристика вібраційної смуги CS при  $1655\text{ cm}^{-1}$ , асоційована з N-H (амідом) [148], зміщена до  $1644\text{ cm}^{-1}$  у HC. Пік деформації N-H, який зазвичай з'являється при  $1577\text{ cm}^{-1}$  [149], зміщується до  $1583\text{ cm}^{-1}$ . Смуга приблизно на  $1324\text{ cm}^{-1}$ , що відповідає вигину C-N у CS, зміщується до  $1307\text{ cm}^{-1}$  у гібридних композитах. Більш того, для зразків, синтезованих під MW (спектри не показані через незначні відмінності з наведеними вище), смуга зміщується до  $1288\text{ cm}^{-1}$ . Ці факти свідчать про взаємодію між аміногрупами CS та функціональними групами CaP. Смуги при  $980$ ,  $1025$ ,  $1059\text{ cm}^{-1}$  відповідають коливанням PO-групи  $\text{HPO}_4^{2-}$  у OCP, а також смугі при  $1025\text{ cm}^{-1}$ -у cdHA та карбонат-заміщеному cdHA [143]. Смуги з частотами  $877$ ,  $1422$  та  $1456\text{ cm}^{-1}$  належать до груп  $\text{CO}_3^{2-}$  у OCP та cdHA та

вказують на утворення карбонат-заміщених сполук типу В. У зразках, під впливом MW, смуга  $1422\text{ см}^{-1}$  є більш інтенсивною. Зміщення смуги розтягування  $\text{CH}_2$  в області  $2935\text{--}2870\text{ см}^{-1}$  може свідчити про взаємодію між ОСР та CS за допомогою водневого  $\text{OH}\cdots\text{O}$  зв'язку. Таким чином, виявлені коливання, характерні для НА та ОСР, підтверджують наявність обох фаз у отриманому гібридному композиті.

## 5.2 Фармакокінетичні та мікробіологічні дослідження

Абсорбційна здатність. Одним із показників біоактивності композиту є його здатність адсорбувати білки. Кістка складається з неорганічної частини (30%) та органічного матриксу (60%), 90% з яких базується на колагенових та неколагенових білках [150]. Серед неколагенових білків є фібронектин, до складу якого входить амінокислота триптофан Trp, яка була обрана в якості тестової моделі в нашому експерименті щодо адсорбційної здатності синтезованого гібридного композиту (Рисунок 5.7).

Для того, щоб отримати адсорбційну ємність ( $q_e$ ), кількість іонів, адсорбованих на одиницю маси, розраховували за такою формулою:

$$q_e = (C_i - C_e)V/M, \quad (5.3)$$

де  $C_i$  і  $C_e$  - початкова та експериментальна концентрації (ммоль/л), а  $M$  і  $V$  - маса адсорбенту (204,2 г/моль) та об'єм розчину. Дані адсорбції Trp були порівняні з рівняннями ізотерми Генрі, Ленгмюра, Фрейндліха та Сіпса.

Середнє відсоткове відхилення між експериментальними та прогнозованими результатами визначалося шляхом мінімізації цільової функції. Дійсність моделі перевіряється відповідними коефіцієнтами кореляції ( $r^2$ ).



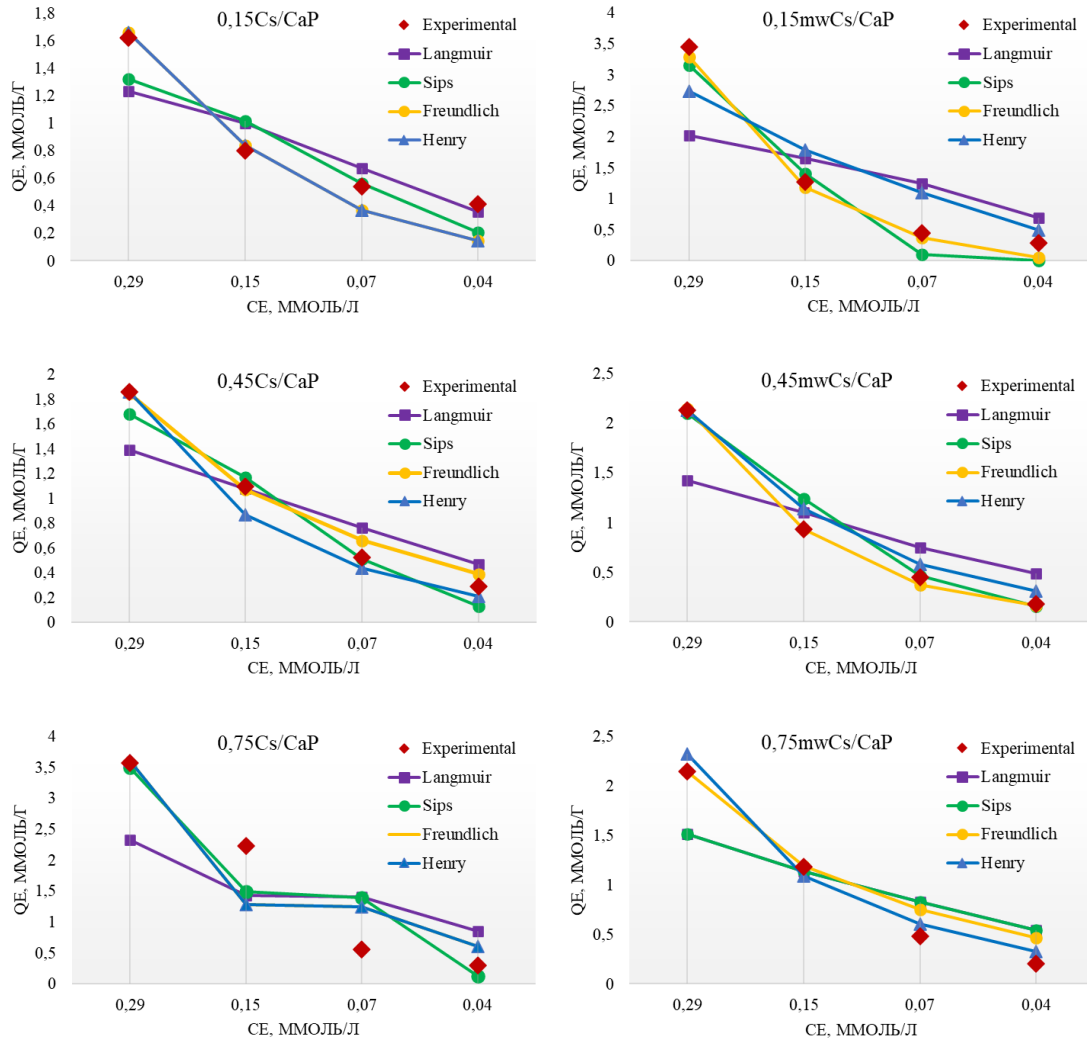


Рисунок 5.7 – Ділянки моделі адсорбції для Trp експериментальними зразками. Червоними маркерами вказуються експериментальні дані адсорбції Trp, лініями – розрахункові дані різних адсорбційних моделей [146]

Ізотерма Фрейдліха визначає неоднорідність поверхні та експоненційний розподіл енергії активних центрів.

$$q_e = K_f C_e \times 1/n, \quad (5.4)$$

де  $K_f$  - відносний показник адсорбційної ємності, тоді як безрозмірний  $1/n$  вказує на енергію або інтенсивність реакції та вказує на перевагу та ємність системи адсорбенту/адсорбату.



Таблиця 5.3 – Розрахункові параметри адсорбційних моделей [146]

Зразок	Модель Генрі		Модель Ленгмюра			Модель Фрейндліха			Модель Sipsa			
	$K_h$	$r^2$	$q_m$	$K_l$	$r^2$	$n_f$	$K_f$	$r^2$	$q_m$	$n_s$	$K_s$	$r^2$
0,15CS/CaP	7,50	<b>0,88</b>	1,62	14,50	0,76	1,00	7,50	<b>0,88</b>	1,62	1,40	13,00	0,80
0,45CS/CaP	8,85	0,95	1,86	14,10	0,79	1,40	5,63	<b>0,98</b>	1,86	2,20	13,00	0,96
0,75CS/CaP	25,00	<b>0,79</b>	3,57	13,00	0,55	1,00	25,00	<b>0,79</b>	3,57	4,00	18,00	<b>0,82</b>
0,15mwCS/CaP	21,00	0,81	3,45	10,80	0,53	0,42	419,0	<b>0,99</b>	3,45	6,40	11,10	0,95
0,45mwCS/CaP	11,15	0,97	2,13	10,50	0,68	0,75	19,46	<b>1,00</b>	2,90	2,00	8,48	0,96
0,75mwCS/CaP	12,00	<b>0,97</b>	2,14	12,50	0,72	1,28	7,73	<b>0,94</b>	2,14	1,00	12,50	0,72

Коли  $1/n$  більше нуля ( $0 < 1/n < 1$ ), адсорбція сприятлива, коли  $1/n$  більше 1, процес адсорбції несприятливий, і він незворотній, коли  $1/n = 1$ . Виходячи з розрахованих значень  $r^2$ , можна сказати, що модель Фрейндліха забезпечує найкращу кореляцію даних. Дана модель описує оборотний та неідеальний процес адсорбції, де можлива багаточасова адсорбція [130], а також експоненційний розподіл активних центрів та їх енергій. Параметр  $1/n_f$  вказує на енергію або інтенсивність реакції та сприятливу ємність системи адсорбент/адсорбат. Коли  $n_f$  дорівнює 1, дана модель перетворюється в рівняння Генрі, яке описує однорідну адсорбцію. Очевидно, що адсорбція  $Tp$  більше контролюється неорганічною частиною гібридного матеріалу. Таким чином, зразки 0,75Cs/CaP та 0,75mwCs/CaP демонструють найбільшу здатність адсорбувати  $Tp$  з його більш концентрованих розчинів (60-30 ммоль/л) через збільшення частки НА/ОСР. Деяко підвищена адсорбція на 0,15mwCs/CaP та 0,45mwCs/CaP порівняно з зразками 0,15Cs/CaP та 0,45Cs/CaP спостерігається через більш інтенсивне перетворення під впливом MW утвореного АСР на НА та ОСР, та більш розвинену зовнішню поверхню гранул, що дозволяє контактувати більшій кількості молекул. Як згадувалося вище, ОСР характеризується

підвищеною здатністю порівняно з іншими СаР адсорбувати органічні молекули через існування гідратного шару апатиту.

На Рисунках 5.8 та 5.9 наведено графіки вивільнення цефтриаксону (CF) зі складу композитів. CF вводився двома різними способами. Перший, під час синтезу, шляхом додавання порошку цефтриаксону до суміші компонентів перед крапанням до фосфатного розчину і зшивання. Другий – після остаточного висихання сформованих гранул шляхом насичення у концентрованому розчині цефтриаксону. Як бачимо, графіки демонструють два кардинальні різні профілі вивільнення.

На Рисунку Рисунок 5.8 ми бачимо, що лікарський засіб введений шляхом насичення вивільняється активно протягом першої доби, що є «вибуховим» релізом. Даний ефект спостерігається у всіх раніше описаних у роботі композитах. На противагу цьому, зі зразків де введений лікарський засіб під час синтезу, протягом перших двох діб вивільняється близько 10% від загальної кількості CF. На ділянці 48-72 години відбувається стрімкий ріст вивільненого CF за рахунок руйнування матриці та вивільнення об'ємно зв'язаного CF.

Коефіцієнт кореляції має вищі значення для методу насичення, але при цьому параметри кінетичної моделі є значно вищими і відповідають дифузії, що не підпорядковується закону Фіка. В той час, як для методу внесення під час синтезу параметри зразків 0,15CS/CaP, 0,45CS/CaP та 0,15mwCS/CaP коливаються в рамках 0,5, що свідчить про дифузю Фіка.

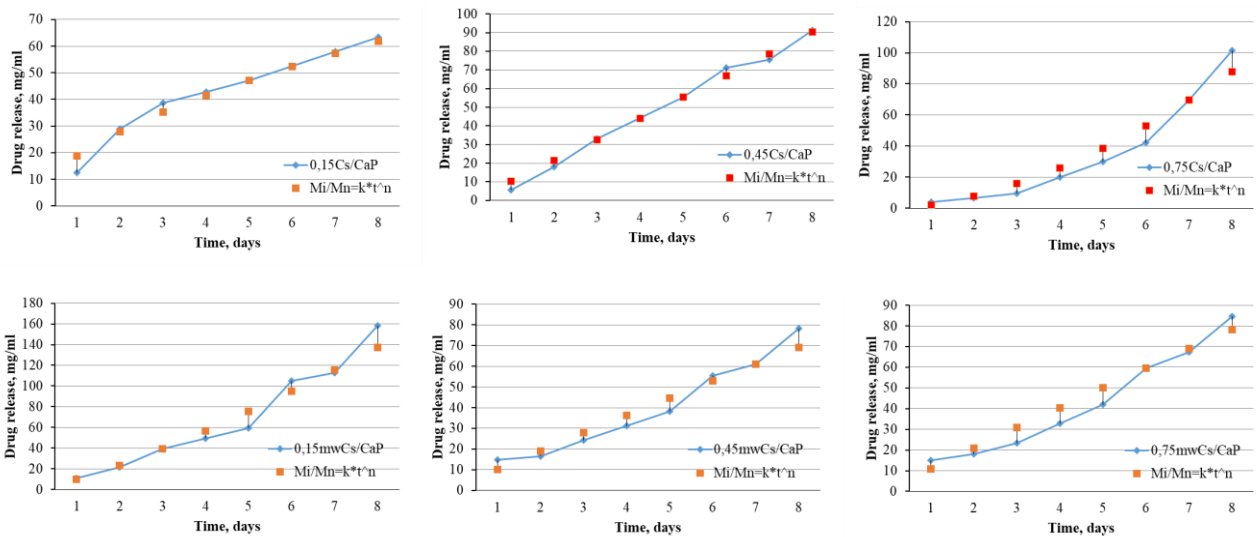
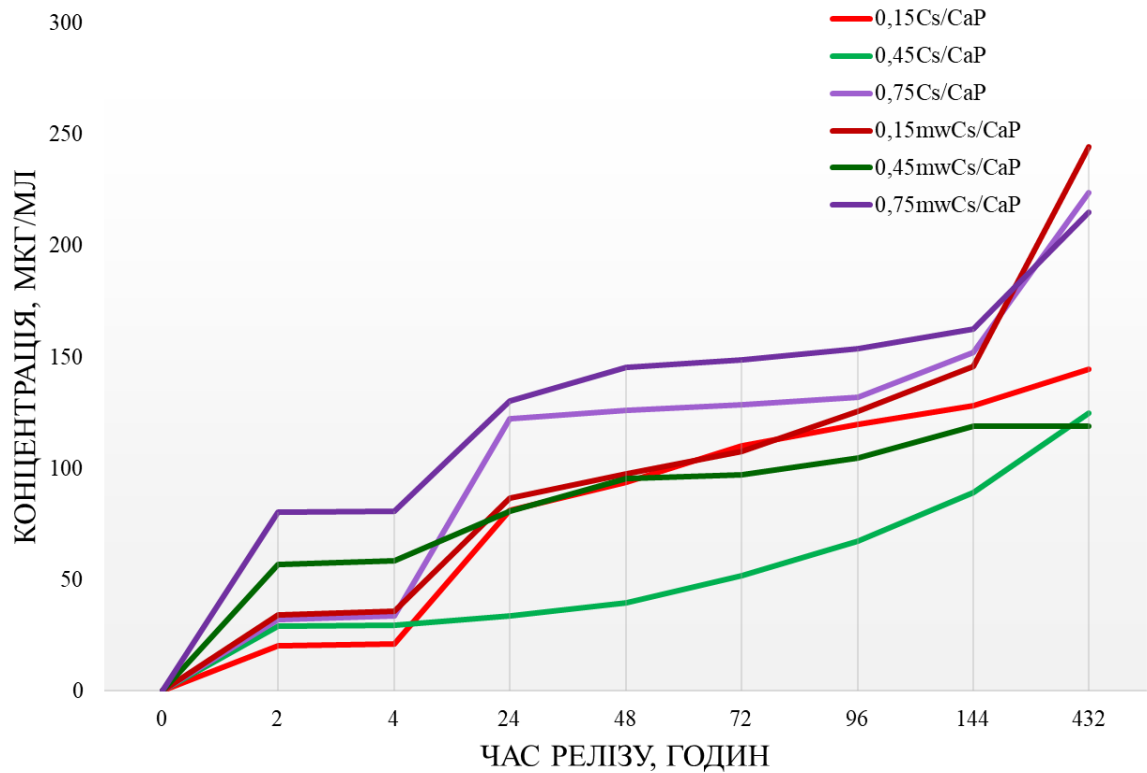


Рисунок 5.8 – Графіки вивільнення СФ, що був введений до складу композитів шляхом насичення сухих зразків. Результати розрахунку кінетичної моделі

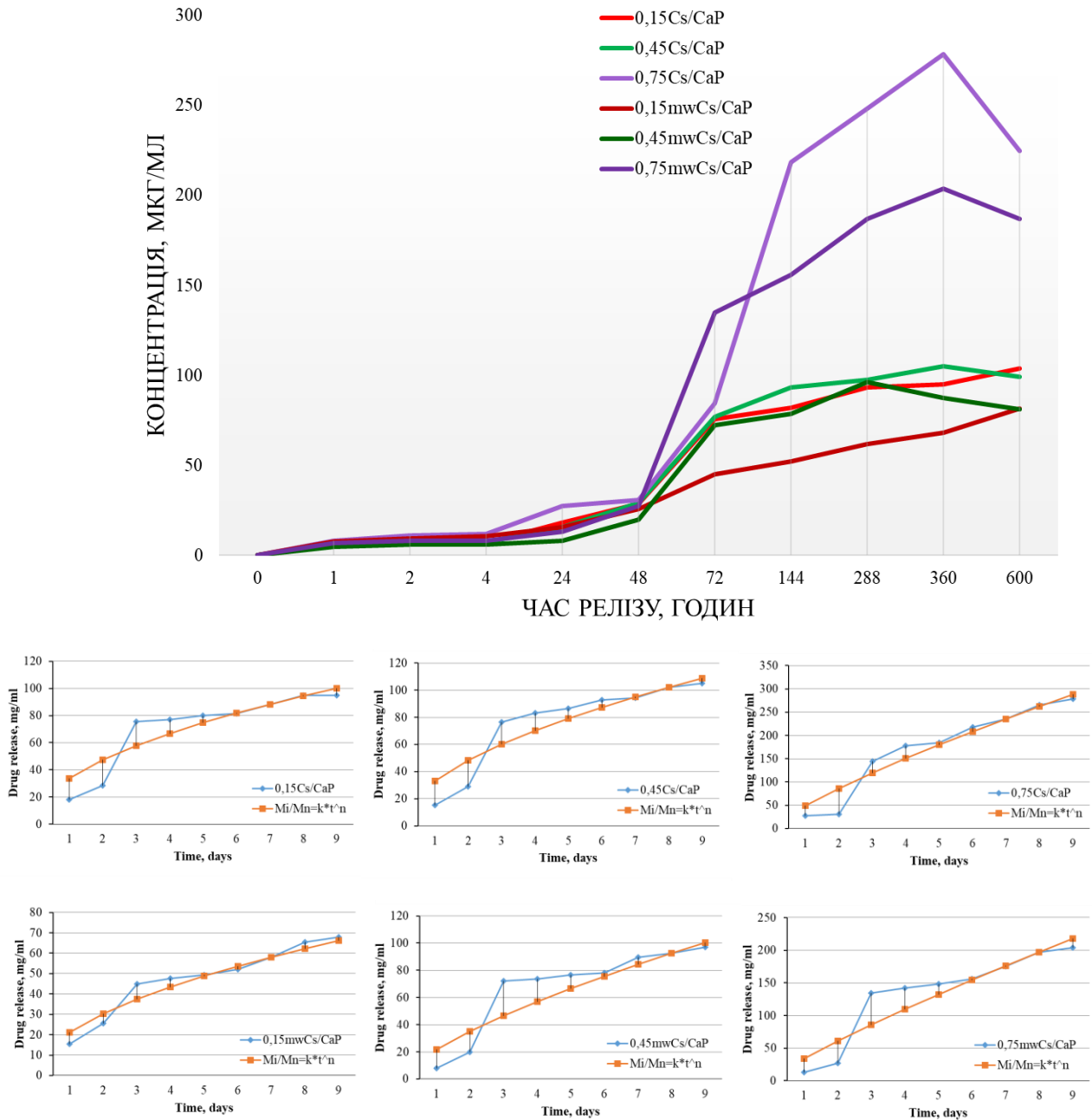


Рисунок 5.9 – Графіки вивільнення СФ, що був введений до складу композитів на етапі змішування компонентів. Результати розрахунку кінетичної моделі

Отримані НС на даний момент потребують доопрацювання для покращення властивостей вивільнення лікарських засобів. Це можливо досягти шляхом зміни форми композитів, підбору іншого модельного лікарського засобу,

або модифікації структури шляхом додавання пороутворюючих агентів, наприклад, СТАВ.

Таблиця 5.4 – Параметри профілів вивільнення ліків з експериментальних зразків

Зразок	Насичення			Синтез		
	k	n	r*	k	n	r*
0,15CS/CaP	18,681	0,575	0,970	33,565	0,497	0,875
0,45CS/CaP	10,345	1,042	0,997	33,212	0,540	0,887
0,75CS/CaP	2,255	1,762	0,431	49,372	0,803	0,290
0,15mwCS/CaP	9,623	1,277	0,970	21,156	0,519	0,932
0,45mwCS/CaP	10,038	0,928	0,979	21,557	0,700	0,875
0,75mwCS/CaP	10,805	0,952	0,445	33,768	0,848	0,285

*In vivo* дослідження на модельних щурах. Попередні дослідження *in vivo* щодо біосумісності гібридних композитів показали, що вже після 30 днів імплантації матеріал був локально в зоні дефекту без міграції частинок у червоний кістковий мозок. Гранула була щільно оточена новоутвореною кістковою тканиною, яка у вигляді піків проникала в її крайові частини, замінюючи деградований композит (Рисунок 5.10А). Міцний контакт гібридного композиту з кістковою тканиною свідчить про високі остеointegraційні властивості. Неоднорідна структура композиту обумовлена просоченням тканинною рідиною та резорбцією (Рисунок 5.10В). З дослідження очевидно, що синтезований композит не має токсичних властивостей, біологічно сумісний з кістковою тканиною.

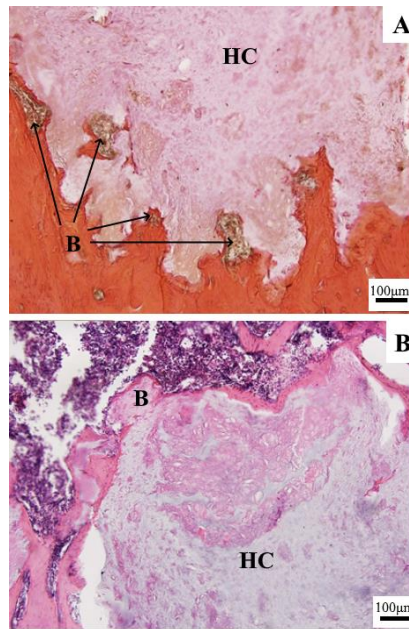


Рисунок 5.10 – Синтезований гібридний композит (НС) розташований в зоні дефекту і є густо оточеним новоутвореною кістковою тканиною - В, яка проникає в його крайові ділянки, замінюючи НС. Ван Гісон; Гематоксилін і еозин [146]

## ВИСНОВКИ ДО П'ЯТОГО РОЗДІЛУ

Був сформований *in situ* гібридний композит у вигляді гранул, представлений матрицею CS з включеними в процесі синтезу та однорідно розподіленими поліфазними ортофосфатами кальцію які є прекурсорами cдНА. Після спікання при 750 °С синтезований ОФК додатково був представлений сполуками ДСРА і СРР. Досліджено вплив співвідношення Ca/CS та MW опромінення на формування поліфазного ОФК. FTIR-дослідження показали наявність  $\text{CO}_3^{2-}$  груп в ОСР та cдНА. Під впливом MW відбувається більш інтенсивне включення карбонатних іонів, що, очевидно, покращує активність остеобластів під час формування кісткової тканини. Використовуючи MW та збільшуючи співвідношення Ca/CS, середній вміст НА/ОСР у зразках 1С\_MW,

2C\_MW, 3C\_MW зростає на 5, 7, 10 мас %, частка CPP зменшується відповідно на 13, 12 та 24%, тоді як вміст DCPA збільшується порівняно з тими зразками, що синтезовані за допомогою конвекційного нагріву. Зменшення CPP означає, що MW опромінення сприяє утворенню більш стабільних ОФК (НА, ОСР, DCPD). Після обробки SBF протягом 28 днів на поверхні композитів утворюється новий шар АСР, який є попередником DCPD, ОСР та cdHA. У SBF спостерігається спорідненість поверхні до іонів кальцію, тому співвідношення Ca/P збільшується в десятки разів. Цей факт підтверджує високу біоактивність поліфазного гібридного CaP/CS матеріалу. Композити мають відносно низький ступінь набрякання, що зменшується зі збільшенням співвідношення Ca/CS та MW. Композит з Ca/CS = 0,75, синтезований під дією MW, демонстрував значно меншу міцність на стиск (~ 40 МПа) і набагато вищий модуль Юнга (780 МПа) у порівнянні з конвекційно синтезованим (85 та 517 МПа).

Адсорбція Тгр в основному контролюється неорганічною частиною гібридного матеріалу. Отже, найбільш значну здатність адсорбувати Тгр демонструють зразки з співвідношенням Ca/CS = 0,75 через найвищий вміст НА/ОСР. Адсорбція Тгр добре корелює з моделлю ізотерми Фрейндліха, яка описує оборотний та не ідеальний процес адсорбції, де можлива багат шарова адсорбція.

Досліджено вплив методу введення лікарського засобу до складу гібридних композитів. Метод насичення висушених гранул демонструє очікуваний «вибуховий» реліз впродовж першої доби і поступове вивільнення об'ємно-адсорбованої речовини. Внесення цефтріаксону на етапі синтезу суттєво покращує динаміку вивільнення впродовж перших 5 діб. Після 72 годин вивільнення суттєво збільшується, що означає початок деградації поверхневих шарів. Найкращі параметри моделі Корсмейера-Пеппаса були отримані для композитів з середнім співвідношенням кальцію до хітозану.

## ВИСНОВКИ

У процесі виконання дисертаційної роботи цілі дослідження були досягнуті, а всі поставлені завдання - вирішені.

Основними науковими та практичними результатами є такі:

1. Досліджено вплив синтезованого кальцій фосфату без та в присутності полімерів за допомогою мікрохвильової технології. Визначено, що в процесі даного синтезу утворюється кальцій-дефіцитний гідроксиапатит з параметрами  $a = 0,938$  нм та  $c = 0,688$  нм, при цьому наявність полімеру в реакційній суміші суттєво не впливає на морфологію НА.
2. Аналіз ПЕМ вказує на утворення голчастих кристалітів НА та їх наноагломератів із середнім розміром близько 80 нм. Вплив MW сприяє зменшенню агрегації кристалітів.
3. Встановлено, що додавання вуглецевих наночастинок до складу полімер-апатитних композитів покращує їх стабільність, ступінь набрякання (з 79,5% для контрольного зразку до 39,6-38,6% для С60 модифікованих зразків, та до 72,9-75,1% для GO-модифікованих композитів), механічні властивості, здатність до адсорбції та вивільнення лікарських засобів.
4. Дослідження HPLC показало, що CS і С60 забезпечують пролонговане вивільнення анестезину до 18 днів за рахунок міжмолекулярної гідрофобної взаємодії. Зміна вмісту С60 дозволяє регулювати час вивільнення препарату. Присутність CS і С60 забезпечує профіль вивільнення анестезину, який відповідає розрахованому коефіцієнту кореляції ( $r=0,99$ ), близькому до профілю кінетичного вивільнення нульового порядку.
5. Підтверджено антибактеріальну дію модифікованих фулереном НА-полімерних матеріалів відносно *S. Aureus* та *E. Coli*. Тест зони інгібування (ZOI) показав антимікробну дію композитів, що містять 0,004 мг/мл С60,



проти *S. aureus* ATCC 25923 та *E. coli* ATCC 25922 (ZOI  $16\pm 1$  та  $10\pm 2$  мм відповідно).

6. Вперше синтезовано гібридний композитний матеріал на основі хітозану з синхронним формуванням кальцій фосфатів у гранулах в форсфорно-збагаченому розчині.
7. Доведено, що під впливом MW відбувається більш інтенсивне включення карбонат-іонів, покращуючи активність остеобластів при формуванні кісткової тканини. Використовуючи MW та підвищуючи співвідношення Ca/CS, середній вміст HA/ОСР у зразках 0,15CaP/CS, 0,45CaP/CS та 0,75CaP/CS збільшується на 5, 7, 10 мас.%, а фракція СРР зменшується на 13, 12 та 24%, відповідно, порівняно з тими зразками, що синтезовані за допомогою конвекційного нагрівання. Зменшення СРР означає, що MW опромінювання сприяє утворенню більш стабільних ОФК (HA, ОСР, DCPD). Після обробки SBF протягом 28 днів на поверхні композитів утворюється новий шар АСР, який є попередником DCPD, ОСР і cdHA.
8. Композит 0,75 CaP/CS, синтезований під дією MW, демонструє значно нижчу міцність на стиск ( $\sim 40$  МПа) і вищий модуль Юнга (780 МПа) порівняно з синтезованим із застосуванням звичайного нагрівання (85 і 517 МПа, відповідно).
9. Визначено, що адсорбція Trp в основному контролюється неорганічною частиною гібридного матеріалу. Так, найбільшу здатність адсорбувати Trp демонструють зразки із співвідношенням Ca/CS 0,75, за рахунок найвищого вмісту HA/ОСР. Адсорбція Trp добре корелює з моделлю ізотерми Фрейндліха, яка описує оборотний та неідеальний процес адсорбції, де можлива багат шарова адсорбція.

10. Доведено *in vivo* ефективність створених новітніх композитних гранул з вмістом кальцій фосфатів, полімерів, карбонових наночастинок та лікарських засобів.
11. Ґрунтуючись на отриманих наукових результатах, узагальнено оптимальні умови отримання наноструктурних композитних матеріалів для заміщення кісткової тканини. Проведено подальші дослідження щодо удосконалення та використання отриманих методик для застосування у стоматології, неврології та регенеративній медицині.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

- [1] Best TM, Hunter R, Wilcox A, Haq F. Effectiveness of Sports Massage for Recovery of Skeletal Muscle From Strenuous Exercise. *Clinical Journal of Sport Medicine* 2008;18:446–60. <https://doi.org/10.1097/JSM.0b013e31818837a1>.
- [2] Song C, Liu L, Deng Z, Lei H, Yuan F, Yang Y, et al. Research progress on the design and performance of porous titanium alloy bone implants. *Journal of Materials Research and Technology* 2023;23:2626–41. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.01.155>.
- [3] Wang B, Yu W, Fu L. Bioactive porous ZrO<sub>2</sub>-based ceramics with a hierarchical porosity for artificial bone scaffolds. *Ceram Int* 2023;49:13752–61. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.12.253>.
- [4] Hench LL, Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* (1979) 2002;295:1014–7. <https://doi.org/10.1126/science.1067404>.
- [5] Itokawa H, Hiraide T, Moriya M, Fujimoto M, Nagashima G, Suzuki R, et al. A 12 month in vivo study on the response of bone to a hydroxyapatite–polymethylmethacrylate cranioplasty composite. *Biomaterials* 2007;28:4922–7. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.001>.
- [6] Darjanki CM, Hananta JS, Prahasanti C, Ulfah N, Kusumawardani B, Wijaksana IKE, et al. Expression of VEGF and BMP-2 in Osteoblast cells exposed to a combination of polymethylmethacrylate (PMMA) and hydroxyapatite (HAp). *J Oral Biol Craniofac Res* 2023;13:243–8. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2023.02.006>.
- [7] Chandra G, Pandey A. Biodegradable bone implants in orthopedic applications: a review. *Biocybern Biomed Eng* 2020;40:596–610. <https://doi.org/10.1016/j.bbe.2020.02.003>.

- [8] Morsada Z, Hossain MM, Islam MT, Mobin MdA, Saha S. Recent progress in biodegradable and bioresorbable materials: From passive implants to active electronics. *Appl Mater Today* 2021;25:101257. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101257>.
- [9] Zhao D-W, Yu M-Z, Zhao Y-X, Hu R, Xu P-C, Sun Z-Y, et al. Improvement of bone formation by bionic hydroxyapatite nanorod via the regulation of macrophage polarization. *J Mater Sci Technol* 2023;136:109–20. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2022.07.025>.
- [10] Hiromoto S, Nozoe E, Hanada K, Yoshimura T, Shima K, Kibe T, et al. In vivo degradation and bone formation behaviors of hydroxyapatite-coated Mg alloys in rat femur. *Materials Science and Engineering: C* 2021;122:111942. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111942>.
- [11] Canillas M, Pena P, de Aza AH, Rodríguez MA. Calcium phosphates for biomedical applications. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio* 2017;56:91–112. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2017.05.001>.
- [12] Habraken W, Habibovic P, Epple M, Bohner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? *Materials Today* 2016;19:69–87. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.008>.
- [13] Hannink G, Arts JJC. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury* 2011;42:S22–5. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.008>.
- [14] Zyman ZZ. Calcium-phosphate biomaterials. Z. Z. Zyman. Kharkiv : V. N. Karazin Kharkiv National University; 2018.
- [15] Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials* 2017;10:334. <https://doi.org/10.3390/ma10040334>.

- [16] Fihri A, Len C, Varma RS, Solhy A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. *Coord Chem Rev* 2017;347:48–76. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.009>.
- [17] LeGeros RZ. Biological and Synthetic Apatites. *Hydroxyapatite and Related Materials*, CRC Press; 2017, p. 3–28. <https://doi.org/10.1201/9780203751367-1>.
- [18] Hench LL, Fielder E. Biological Gel-Glasses. *Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*, Boston, MA: Springer US; 2004, p. 153–6. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-88953-5\\_21](https://doi.org/10.1007/978-0-387-88953-5_21).
- [19] Stanis M, Klapiszewski Ł, Jesionowski T. Recent advances in the fabrication and application of biopolymer-based micro- and nanostructures: A comprehensive review. *Chemical Engineering Journal* 2020;397:125409. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125409>.
- [20] Chowhan A, Giri TK. Polysaccharide as renewable responsive biopolymer for in situ gel in the delivery of drug through ocular route. *Int J Biol Macromol* 2020;150:559–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.097>.
- [21] Nakajima H, Dijkstra P, Loos K. The Recent Developments in Biobased Polymers toward General and Engineering Applications: Polymers that are Upgraded from Biodegradable Polymers, Analogous to Petroleum-Derived Polymers, and Newly Developed. *Polymers (Basel)* 2017;9:523. <https://doi.org/10.3390/polym9100523>.
- [22] Babu RP, O'Connor K, Seeram R. Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Prog Biomater* 2013;2:8. <https://doi.org/10.1186/2194-0517-2-8>.
- [23] Didem Özcimenc, Benan İnan, Ogün Morkoc, Aybüke Efe. A Review on Algal Biopolymers. *Journal of Chemical Engineering Research Updates* 2017;4:7–14. <https://doi.org/10.15377/2409-983X.2017.04.2>.

- [24] Rebelo R, Fernandes M, Fangueiro R. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. *Procedia Eng* 2017;200:236–43. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.034>.
- [25] Kashirina A, Yao Y, Liu Y, Leng J. Biopolymers as bone substitutes: a review. *Biomater Sci* 2019;7:3961–83. <https://doi.org/10.1039/C9BM00664H>.
- [26] Moradali MF, Rehm BHA. Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials. *Nat Rev Microbiol* 2020;18:195–210. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0313-3>.
- [27] Banerjee A, Ganguly S. Alginate-chitosan composite hydrogel film with macrovoids in the inner layer for biomedical applications. *J Appl Polym Sci* 2019;136:47599. <https://doi.org/10.1002/app.47599>.
- [28] Sivakanthan S, Rajendran S, Gamage A, Madhujith T, Mani S. Antioxidant and antimicrobial applications of biopolymers: A review. *Food Research International* 2020;136:109327. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109327>.
- [29] Tang X, Thankappan SK, Lee P, Fard SE, Harmon MD, Tran K, et al. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier; 2014, p. 351–71. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00022-3>.
- [30] Pramanik S, Kharche S, More N, Ranglani D, Singh G, Kapusetti G. Natural Biopolymers for Bone Tissue Engineering: A Brief Review. *Engineered Regeneration* 2023;4:193–204. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2022.12.002>.
- [31] El-Sherbiny IM, Ali IH. Biopolymer -Based Nanocomposites for Environmental Applications. *Handbook of Composites from Renewable Materials*, Wiley; 2017, p. 389–421. <https://doi.org/10.1002/9781119441632.ch162>.
- [32] Zargar V, Asghari M, Dashti A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews* 2015;2:204–26. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>.

- [33] Amenorfe LP, Agorku ES, Sarpong F, Voegborlo RB. Innovative exploration of additive incorporated biopolymer-based composites. *Sci Afr* 2022;17:e01359. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01359>.
- [34] Pokhrel S, Yadav PN, Adhikari R. Applications of Chitin and Chitosan in Industry and Medical Science: A Review. *Nepal J Sci Technol* 2016;16:99–104. <https://doi.org/10.3126/njst.v16i1.14363>.
- [35] Ngo D-H, Kim S-K. Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives, 2014, p. 15–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>.
- [36] Elieh-Ali-Komi D, Hamblin MR. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int J Adv Res (Indore)* 2016;4:411–27.
- [37] Li J, Wu Y, Zhao L. Antibacterial activity and mechanism of chitosan with ultra high molecular weight. *Carbohydr Polym* 2016;148:200–5. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.025>.
- [38] Lopez-Moya F, Lopez-Llorca L. Omics for Investigating Chitosan as an Antifungal and Gene Modulator. *Journal of Fungi* 2016;2:11. <https://doi.org/10.3390/jof2010011>.
- [39] Shih P-Y, Liao Y-T, Tseng Y-K, Deng F-S, Lin C-H. A Potential Antifungal Effect of Chitosan Against *Candida albicans* Is Mediated via the Inhibition of SAGA Complex Component Expression and the Subsequent Alteration of Cell Surface Integrity. *Front Microbiol* 2019;10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00602>.
- [40] Rehm BHA, Valla S. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997;48:281–8. <https://doi.org/10.1007/s002530051051>.

- [41] Fernando IPS, Lee W, Han EJ, Ahn G. Alginate-based nanomaterials: Fabrication techniques, properties, and applications. *Chemical Engineering Journal* 2020;391:123823. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.123823>.
- [42] Tong Z, Chen Y, Liu Y, Tong L, Chu J, Xiao K, et al. Preparation, Characterization and Properties of Alginate/Poly( $\gamma$ -glutamic acid) Composite Microparticles. *Mar Drugs* 2017;15:91. <https://doi.org/10.3390/md15040091>.
- [43] Lu F, Rodriguez-Garcia J, Van Damme I, Westwood NJ, Shaw L, Robinson JS, et al. Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Curr Opin Green Sustain Chem* 2018;14:80–8. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>.
- [44] Lalit R, Mayank P, Ankur K. Natural Fibers and Biopolymers Characterization: A Future Potential Composite Material. *Strojnícky Casopis – Journal of Mechanical Engineering* 2018;68:33–50. <https://doi.org/10.2478/scjme-2018-0004>.
- [45] Azizi-Lalabadi M, Hashemi H, Feng J, Jafari SM. Carbon nanomaterials against pathogens; the antimicrobial activity of carbon nanotubes, graphene/graphene oxide, fullerenes, and their nanocomposites. *Adv Colloid Interface Sci* 2020;284:102250. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102250>.
- [46] Jalaei MH, Civalek Ö. On dynamic instability of magnetically embedded viscoelastic porous FG nanobeam. *Int J Eng Sci* 2019;143:14–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijengsci.2019.06.013>.
- [47] Aram E, Mehdipour-Ataei S. Carbon-based nanostructured composites for tissue engineering and drug delivery. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2021;70:1167–88. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1785456>.
- [48] Lalwani G, Gopalan A, D'Agati M, Srinivas Sankaran J, Judex S, Qin Y-X, et al. Porous three-dimensional carbon nanotube scaffolds for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2015;103:3212–25. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35449>.



- [49] Szymański T, Mieloch AA, Richter M, Trzeciak T, Florek E, Rybka JD, et al. Utilization of Carbon Nanotubes in Manufacturing of 3D Cartilage and Bone Scaffolds. *Materials* 2020;13:4039. <https://doi.org/10.3390/ma13184039>.
- [50] Bikmulina PY, Kosheleva N V., Shpichka AI, Efremov YM, Yusupov VI, Timashev PS, et al. Beyond 2D: effects of photobiomodulation in 3D tissue-like systems. *J Biomed Opt* 2020;25:1. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.4.048001>.
- [51] Zhao S, Cui W, Rajendran NK, Su F, Rajan M. Investigations of gold nanoparticles-mediated carbon nanotube reinforced hydroxyapatite composite for bone regenerations. *Journal of Saudi Chemical Society* 2021;25:101261. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2021.101261>.
- [52] Ravanbakhsh H, Bao G, Latifi N, Mongeau LG. Carbon nanotube composite hydrogels for vocal fold tissue engineering: Biocompatibility, rheology, and porosity. *Materials Science and Engineering: C* 2019;103:109861. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109861>.
- [53] Lahiri D, Ghosh S, Agarwal A. Carbon nanotube reinforced hydroxyapatite composite for orthopedic application: A review. *Materials Science and Engineering: C* 2012;32:1727–58. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.05.010>.
- [54] Liu Z-L, Jia Q-Y, Li X-D, Li S-P, Shen J, Lin J, et al. Synthesis of hollow mesoporous HAp-Au/MTX and its application in drug delivery. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2020;586:124231. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124231>.
- [55] Macha IJ, Cazalbou S, Shimmon R, Ben-Nissan B, Milthorpe B. Development and dissolution studies of bisphosphonate (clodronate)-containing hydroxyapatite-poly(lactic acid) biocomposites for slow drug delivery. *J Tissue Eng Regen Med* 2017;11:1723–31. <https://doi.org/10.1002/term.2066>.

- [56] Fosca M, Rau J V., Uskoković V. Factors influencing the drug release from calcium phosphate cements. *Bioact Mater* 2022;7:341–63. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.032>.
- [57] Hwang S-J, Lee J-S, Ryu T-K, Kang R-H, Jeong K-Y, Jun D-R, et al. Alendronate-modified hydroxyapatite nanoparticles for bone-specific dual delivery of drug and bone mineral. *Macromol Res* 2016;24:623–8. <https://doi.org/10.1007/s13233-016-4094-5>.
- [58] Uskoković V, Desai TA. In Vitro Analysis of Nanoparticulate Hydroxyapatite/Chitosan Composites as Potential Drug Delivery Platforms for the Sustained Release of Antibiotics in the Treatment of Osteomyelitis. *J Pharm Sci* 2014;103:567–79. <https://doi.org/10.1002/jps.23824>.
- [59] Deshmukh K, Shaik MM, Ramanan SR, Kowshik M. Self-Activated Fluorescent Hydroxyapatite Nanoparticles: A Promising Agent for Bioimaging and Biolabeling. *ACS Biomater Sci Eng* 2016;2:1257–64. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00169>.
- [60] Wang J, Calhoun JH, Mader JT. The Application of Bioimplants in the Management of Chronic Osteomyelitis. *Orthopedics* 2002;25:1247–52. <https://doi.org/10.3928/0147-7447-20021101-15>.
- [61] Kumar GS, Govindan R, Girija EK. In situ synthesis, characterization and in vitro studies of ciprofloxacin loaded hydroxyapatite nanoparticles for the treatment of osteomyelitis. *J Mater Chem B* 2014;2:5052–60. <https://doi.org/10.1039/C4TB00339J>.
- [62] Robles-Águila MJ, Reyes-Avendaño JA, Mendoza ME. Structural analysis of metal-doped (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn) calcium hydroxyapatite synthesized by a sol-gel microwave-assisted method. *Ceram Int* 2017;43:12705–9. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.06.154>.

- [63] Safi S, Karimzadeh F, Labbaf S. Mesoporous and hollow hydroxyapatite nanostructured particles as a drug delivery vehicle for the local release of ibuprofen. *Materials Science and Engineering: C* 2018;92:712–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.004>.
- [64] Varadavenkatesan T, Vinayagam R, Pai S, Kathirvel B, Pugazhendhi A, Selvaraj R. Synthesis, biological and environmental applications of hydroxyapatite and its composites with organic and inorganic coatings. *Prog Org Coat* 2021;151:106056. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.106056>.
- [65] Mijović J, Wijaya J. Review of cure of polymers and composites by microwave energy. *Polym Compos* 1990;11. <https://doi.org/10.1002/pc.750110307>.
- [66] Thostenson ET, Chou T-W. Microwave processing: fundamentals and applications. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 1999;30. [https://doi.org/10.1016/S1359-835X\(99\)00020-2](https://doi.org/10.1016/S1359-835X(99)00020-2).
- [67] Roussy G, Pierce J. Roussy G, Pierce JA. Foundations and industrial applications of microwave and radio frequency fields. . Wiley. New York: 1995.
- [68] Stanislavov AS, Sukhodub LF, Sukhodub LB, Kuznetsov VN, Bychkov KL, Kravchenko MI. 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;42. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.011>.
- [69] Kumeda MO, Sukhodub LF. The effect of microwave irradiation on the synthesis of hydroxyapatite/biopolymer nanocomposites. *Himia, Fizika Ta Tehnologija Poverhni* 2021;12:201–15.
- [70] Moulart A, Marrett C, Colton J. Polymeric composites for use in electronic and microwave devices. *Polym Eng Sci* 2004;44:588–97. <https://doi.org/10.1002/pen.20053>.

- [71] Park W, Choi K, Lafdi K, Yu C. Influence of Nanomaterials in Polymer Composites on Thermal Conductivity. *J Heat Transfer* 2012;134. <https://doi.org/10.1115/1.4005201>.
- [72] Mishra RR, Sharma AK. Microwave–material interaction phenomena: Heating mechanisms, challenges and opportunities in material processing. *Compos Part A Appl Sci Manuf* 2016;81. <https://doi.org/10.1016/j.compositesa.2015.10.035>.
- [73] Arami H, Mohajerani M, Mazloumi M, Khalifehzadeh R, Lak A, Sadrnezhad SK. Rapid formation of hydroxyapatite nanostrips via microwave irradiation. *J Alloys Compd* 2009;469. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2008.01.116>.
- [74] Tolga Demirtaş T, Kaynak G, Gümüşderelioğlu M. Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation. *Materials Science and Engineering: C* 2015;49. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.01.057>.
- [75] Yu H-P, Zhu Y-J, Lu B-Q. Highly efficient and environmentally friendly microwave-assisted hydrothermal rapid synthesis of ultralong hydroxyapatite nanowires. *Ceram Int* 2018;44. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.04.022>.
- [76] Zhou H, Luchini TJF, Bhaduri SB. Microwave assisted synthesis of amorphous magnesium phosphate nanospheres. *J Mater Sci Mater Med* 2012;23:2831–7. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4743-y>.
- [77] Vandamme NS, Topoleski LDT. Control of surface morphology of carbide coating on Co-Cr-Mo implant alloy. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:647–54. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-2536-2>.
- [78] Elkady MF, Mahmoud MM, Abd-El-Rahman HM. Kinetic approach for cadmium sorption using microwave synthesized nano-hydroxyapatite. *J Non Cryst Solids* 2011;357:1118–29. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2010.10.021>.

- [79] Vani R, Raja SB, Sridevi TS, Savithri K, Devaraj SN, Girija EK, et al. Surfactant free rapid synthesis of hydroxyapatite nanorods by a microwave irradiation method for the treatment of bone infection. *Nanotechnology* 2011;22:285701. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/28/285701>.
- [80] Abutalib MM, Yahia IS. Novel and facile microwave-assisted synthesis of Mo-doped hydroxyapatite nanorods: Characterization, gamma absorption coefficient, and bioactivity. *Materials Science and Engineering: C* 2017;78. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.131>.
- [81] Alshemary AZ, Akram M, Goh Y-F, Abdul Kadir MR, Abdolahi A, Hussain R. Structural characterization, optical properties and in vitro bioactivity of mesoporous erbium-doped hydroxyapatite. *J Alloys Compd* 2015;645. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2015.05.064>.
- [82] Badran H, Yahia IS, Hamdy MS, Awwad NS. Lithium-doped hydroxyapatite nano-composites: Synthesis, characterization, gamma attenuation coefficient and dielectric properties. *Radiation Physics and Chemistry* 2017;130. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.08.001>.
- [83] Kheradmandfard M, Mahdavi K, Zargar Kharazi A, Kashani-Bozorg SF, Kim D-E. In vitro study of a novel multi-substituted hydroxyapatite nanopowder synthesized by an ultra-fast, efficient and green microwave-assisted method. *Materials Science and Engineering: C* 2020;117. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111310>.
- [84] Gopi D, Nithiya S, Shinyjoy E, Kavitha L. Spectroscopic investigation on formation and growth of mineralized nanohydroxyapatite for bone tissue engineering applications. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2012;92. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.02.069>.
- [85] Sari YW, Saputra A, Bahtiar A, Nuzulia NA. Effects of microwave processing parameters on the properties of nanohydroxyapatite: Structural, spectroscopic,

- hardness, and toxicity studies. *Ceram Int* 2021;47:30061–70. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.07.182>.
- [86] Apalangya V, Rangari V, Jeelani S, Dankyi E, Yaya A, Darko S. Rapid microwave synthesis of needle-liked hydroxyapatite nanoparticles via template directing ball-milled spindle-shaped eggshell particles. *Ceram Int* 2018;44. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.01.161>.
- [87] Pajor K, Pajchel L, Kolmas J. Hydroxyapatite and Fluorapatite in Conservative Dentistry and Oral Implantology—A Review. *Materials* 2019;12:2683. <https://doi.org/10.3390/ma12172683>.
- [88] Ong JL, Chan DCN. Hydroxyapatite and Their Use As Coatings in Dental Implants: A Review. *Crit Rev Biomed Eng* 2000;28:667–707. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v28.i56.10>.
- [89] Shao Y-F, Qing X, Peng Y, Wang H, Shao Z, Zhang K-Q. Enhancement of mechanical and biological performance on hydroxyapatite/silk fibroin scaffolds facilitated by microwave-assisted mineralization strategy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2021;197:111401. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111401>.
- [90] Ghorbani F, Zamanian A, Behnamghader A, Daliri-Joupari M. Bone-like hydroxyapatite mineralization on the bio-inspired PDA nanoparticles using microwave irradiation. *Surfaces and Interfaces* 2019;15. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2019.01.007>.
- [91] Kaynak Bayrak G, Demirtaş TT, Gümüşderelioğlu M. Microwave-induced biomimetic approach for hydroxyapatite coatings of chitosan scaffolds. *Carbohydr Polym* 2017;157. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.016>.
- [92] Beşkardeş IG, Demirtaş TT, Durukan MD, Gümüşderelioğlu M. Microwave-assisted fabrication of chitosan-hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* 2015;9. <https://doi.org/10.1002/term.1677>.

- [93] Scialla S, Palazzo B, Barca A, Carbone L, Fiore A, Monteduro AG, et al. Simplified preparation and characterization of magnetic hydroxyapatite-based nanocomposites. *Materials Science and Engineering: C* 2017;76:1166–74. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.060>.
- [94] Chen F, Li C, Zhu Y-J, Zhao X-Y, Lu B-Q, Wu J. Magnetic nanocomposite of hydroxyapatite ultrathin nanosheets/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: microwave-assisted rapid synthesis and application in pH-responsive drug release. *Biomater Sci* 2013;1:1074. <https://doi.org/10.1039/c3bm60086f>.
- [95] Barbosa MC, Messmer NR, Brazil TR, Marciano FR, Lobo AO. The effect of ultrasonic irradiation on the crystallinity of nano-hydroxyapatite produced via the wet chemical method. *Materials Science and Engineering: C* 2013;33:2620–5. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.02.027>.
- [96] Indira J, Malathi KS. Comparison of template mediated ultrasonic and microwave irradiation method on the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles for biomedical applications. *Mater Today Proc* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.028>.
- [97] Scharff P, Carta-Abelmann L, Siegmund C, Matyshevska OP, Prylutska SV, Koval TV, et al. Effect of X-Ray and UV irradiation of the C<sub>60</sub> fullerene aqueous solution on biological samples. *Carbon N Y* 2004;42:1199–201. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2003.12.055>.
- [98] Ritter U, Prylutsky YuI, Evstigneev MP, Davidenko NA, Cherepanov V V., Senenko AI, et al. Structural Features of Highly Stable Reproducible C<sub>60</sub> Fullerene Aqueous Colloid Solution Probed by Various Techniques. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* 2015;23:530–4. <https://doi.org/10.1080/1536383X.2013.870900>.
- [99] Sukhodub LB, Sukhodub LF, Kumeda MO, Prylutsky YuI, Pogorielov M V., Evstigneev MP, et al. Single-walled carbon nanotubes loaded hydroxyapatite–

alginate beads with enhanced mechanical properties and sustained drug release ability. *Prog Biomater* 2020;9:1–14. <https://doi.org/10.1007/s40204-020-00127-2>.

- [100] Sukhodub LB, Kumeda MO, Sukhodub LF. Influence of MW Irradiation on the Hydroxyapatite/Chitosan Composite Structure and Drug Release Kinetics, 2020, p. 343–8. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6\\_64](https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_64).
- [101] Sukhodub LB, Sukhodub LF, Kumeda MO, Prylutska SV, Deineka V, Prylutsky Y, et al. C60 fullerene loaded hydroxyapatite-chitosan beads as a promising system for prolonged drug release. *Carbohydr Polym* 2019;223. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115067>.
- [102] Sukhodub L, Kumeda M, Sukhodub L, Strelchuk V, Nasieka I, Vovchenko L, et al. Hybrid composite based on chitosan matrix mineralized by polyphasic calcium orthophosphates with enhanced bioactivity and protein adsorption capacity. *Mater Today Commun* 2022;31:103696. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103696>.
- [103] Momma K, Izumi F. *VESTA 3* for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data. *J Appl Crystallogr* 2011;44:1272–6. <https://doi.org/10.1107/S0021889811038970>.
- [104] Volkov Y, McIntyre J, Prina-Mello A. Graphene toxicity as a double-edged sword of risks and exploitable opportunities: a critical analysis of the most recent trends and developments. *2d Mater* 2017;4:022001. <https://doi.org/10.1088/2053-1583/aa5476>.
- [105] Sukhodub LB, Sukhodub LF, Kumeda M, Prylutsky Y, Evstigneev M, Kostjukov V, et al. The Effect of Graphene Oxide on the Properties and Release of Drugs from Apatite-Polymer Composites. *Journal of Nano- and Electronic Physics* 2020;12:04029-1-04029–7. [https://doi.org/10.21272/jnep.12\(4\).04029](https://doi.org/10.21272/jnep.12(4).04029).



- [106] Sukhodub LF, Sukhodub LB, Litsis O, Prylutsky Y. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-alginate nanostructured composites for the controlled drug release. *Mater Chem Phys* 2018;217:228–34. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2018.06.071>.
- [107] Kee CC, Ismail H, Mohd Noor AF. Effect of Synthesis Technique and Carbonate Content on the Crystallinity and Morphology of Carbonated Hydroxyapatite. *J Mater Sci Technol* 2013;29. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2013.05.016>.
- [108] Raval NC, Wadhvani CPK, Jain S, Darveau RP. The Interaction of Implant Luting Cements and Oral Bacteria Linked to Peri-Implant Disease: An In Vitro Analysis of Planktonic and Biofilm Growth - A Preliminary Study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2015;17. <https://doi.org/10.1111/cid.12235>.
- [109] Lagergren S. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. vol. 4. Band: Handlingar; 1898.
- [110] Ho YS, McKay G. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry* 1999;34:451–65. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00112-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00112-5).
- [111] Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems,. *Acta Pol Pharm* 2010;67:217–23.
- [112] Cascone S. Modeling and comparison of release profiles: Effect of the dissolution method. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017;106. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.021>.
- [113] Huang X, Brazel CS. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 2001;73. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6).
- [114] Varelas CG, Dixon DG, Steiner CA. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. *Journal of Controlled Release* 1995;34:185–92. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(94\)00085-9](https://doi.org/10.1016/0168-3659(94)00085-9).

- [115] Perrier D, Gibaldi M. General derivation of the equation for time to reach a certain fraction of steady state. *J Pharm Sci* 1982;71:474–5. <https://doi.org/10.1002/jps.2600710432>.
- [116] Mulye N V., Turco SJ. A Simple Model Based on First Order Kinetics to Explain Release of Highly Water Soluble Drugs from Porous Dicalcium Phosphate Dihydrate Matrices. *Drug Dev Ind Pharm* 1995;21:943–53. <https://doi.org/10.3109/03639049509026658>.
- [117] Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm* 1983;15. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9).
- [118] Kim H, Fassihi R. Application of a Binary Polymer System in Drug Release Rate Modulation. 1. Characterization of Release Mechanism. *J Pharm Sci* 1997;86:316–22. <https://doi.org/10.1021/js960302s>.
- [119] Babaie E, Ren Y, Bhaduri SB. Microwave sintering of fine grained MgP and Mg substitutes with amorphous tricalcium phosphate: Structural, and mechanical characterization. *J Mater Res* 2016;31. <https://doi.org/10.1557/jmr.2016.84>.
- [120] Ramesh S, Tan CY, Bhaduri SB, Teng WD, Sopyan I. Densification behaviour of nanocrystalline hydroxyapatite bioceramics. *J Mater Process Technol* 2008;206. <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2007.12.027>.
- [121] Singh DP, Herrera CE, Singh B, Singh S, Singh RK, Kumar R. Graphene oxide: An efficient material and recent approach for biotechnological and biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C* 2018;86:173–97. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.01.004>.
- [122] Kang Y, Liu J, Wu J, Yin Q, Liang H, Chen A, 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;Volume 12. <https://doi.org/10.2147/IJN.S141032>.

- [123] Epple M. Biomaterials and biomineralization. Tomsk: Wind; 2007.
- [124] Cote LJ, Kim J, Tung VC, Luo J, Kim F, Huang J. Graphene oxide as surfactant sheets. *Pure and Applied Chemistry* 2010;83:95–110. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-10-10-25>.
- [125] Grebinyk A, Grebinyk S, Prylutska S, Ritter U, Matyshevskaya O, Dandekar T, et al. C60 fullerene accumulation in human leukemic cells and perspectives of LED-mediated photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 2018;124. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.022>.
- [126] DOI K, KUBO T, TAKESHITA R, KAJIHARA S, KATO S, KAWAZOE Y, et al. Inorganic polyphosphate adsorbed onto hydroxyapatite for guided bone regeneration: An animal study. *Dent Mater J* 2014;33. <https://doi.org/10.4012/dmj.2013-275>.
- [127] Schneider H-J, Kato K, Strongin R. Chemomechanical Polymers as Sensors and Actuators for Biological and Medicinal Applications. *Sensors* 2007;7:1578–611. <https://doi.org/10.3390/s7081578>.
- [128] Piątkowski M, Janus Ł, Radwan-Pragłowska J, Bogdał D, Matysek D. Biodegradable, pH-sensitive chitosan beads obtained under microwave radiation for advanced cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018;164:324–31. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.061>.
- [129] Oliveira PM, Matos BN, Pereira PAT, Gratieri T, Faccioli LH, Cunha-Filho MSS, et al. Microparticles prepared with 50–190 kDa chitosan as promising non-toxic carriers for pulmonary delivery of isoniazid. *Carbohydr Polym* 2017;174:421–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.090>.
- [130] Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001;13:123–33. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1).

- [131] Chen C-W, Oakes CS, Byrappa K, Riman RE, Brown K, TenHuisen KS, et al. Synthesis, characterization, and dispersion properties of hydroxyapatite prepared by mechanochemical–hydrothermal methods. *J Mater Chem* 2004;14. <https://doi.org/10.1039/B315095J>.
- [132] Elliott J. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. vol. 18. 1st ed. Amsterdam-London-New York-Tokyo: Elsevier Science; 1994.
- [133] Elliott JC. Calcium Phosphate Biominerals. *Rev Mineral Geochem* 2002;48. <https://doi.org/10.2138/rmg.2002.48.11>.
- [134] Tanase CE, Popa MI, Verestiuc L. Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates. *Mater Lett* 2011;65. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.02.077>.
- [135] Sukhodub L. Metal Ions Doped Chitosan Nanoparticles. *Journal of Nano- and Electronic Physics* 2014;6.
- [136] 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. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2017;107. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.027>.
- [137] Lyon DY, Adams LK, Falkner JC, Alvarez PJJ. Antibacterial Activity of Fullerene Water Suspensions: Effects of Preparation Method and Particle Size. *Environ Sci Technol* 2006;40:4360–6. <https://doi.org/10.1021/es0603655>.
- [138] Qi H, Rath U, Wang D, Xu Y-Z, Ding Y, Zhang W, et al. Megator, an Essential Coiled-Coil Protein that Localizes to the Putative Spindle Matrix during Mitosis in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 2004;15. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0579>.
- [139] Rabea EI, Badawy ME-T, Stevens C V., Smaghe G, Steurbaut W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules* 2003;4. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>.

- [140] Oberdörster E. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C<sub>60</sub>) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass. *Environ Health Perspect* 2004;112. <https://doi.org/10.1289/ehp.7021>.
- [141] Goodarzi S, Da Ros T, Conde J, Sefat F, Mozafari M. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend. *Materials Today* 2017;20. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.03.017>.
- [142] Yang X, Gao X, Gan Y, Gao C, Zhang X, Ting K, et al. Facile Synthesis of Octacalcium Phosphate Nanobelts: Growth Mechanism and Surface Adsorption Properties. *The Journal of Physical Chemistry C* 2010;114:6265–71. <https://doi.org/10.1021/jp911576f>.
- [143] Shen D, Horiuchi N, Nozaki S, Miyashin M, Yamashita K, Nagai A. Synthesis and enhanced bone regeneration of carbonate substituted octacalcium phosphate. *Biomed Mater Eng* 2017;28:9–21. <https://doi.org/10.3233/BME-171651>.
- [144] Anastasiou AD, Thomson CL, Hussain SA, Edwards TJ, Strafford S, Malinowski M, et al. Sintering of calcium phosphates with a femtosecond pulsed laser for hard tissue engineering. *Mater Des* 2016;101. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2016.03.159>.
- [145] Bian J-J, Kim D-W, Hong K-S. Phase transformation and sintering behavior of Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. *Mater Lett* 2004;58:347–51. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(03\)00498-1](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(03)00498-1).
- [146] Sukhodub L, Kumeda M, Sukhodub L, Strelchuk V, Nasioka I, Vovchenko L, et al. Hybrid composite based on chitosan matrix mineralized by polyphasic calcium orthophosphates with enhanced bioactivity and protein adsorption capacity. *Mater Today Commun* 2022;31:103696. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103696>.

- [147] Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang K-H, Kim S-K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *Int J Biol Macromol* 2015;72:269–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>.
- [148] Zima A. Hydroxyapatite-chitosan based bioactive hybrid biomaterials with improved mechanical strength. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2018;193:175–84. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.008>.
- [149] Kyzas GZ, Bikiaris DN, Lazaridis NK. Low-Swelling Chitosan Derivatives as Biosorbents for Basic Dyes. *Langmuir* 2008;24. <https://doi.org/10.1021/la7039064>.
- [150] Deftos LJ. Bone protein and peptide assays in the diagnosis and management of skeletal disease 1991;37.

## ДОДАТОК А

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях України

1. **Kumeda MO**, Sukhodub LF. The effect of microwave irradiation on the synthesis of hydroxyapatite/biopolymer nanocomposites. *Himia Fiz Tehnol Poverhni* 2021;12(3):201-215. (Дисертанту належить проведення літературного пошуку, написання статті та узагальнення результатів).

2. Sukhodub LF, Sukhodub LB, **Kumeda MO**. Physical and chemical factors affecting the porosity of apatite-biopolymer composites. *Himia Fiz Tehnol Poverhni* 2022;13(3):301-310. (Дисертанту належить проведення літературного пошуку, узагальнення результатів).

Статті в наукових періодичних виданнях, які індексуються міжнародними базами даних

3. Sukhodub L, **Kumeda M**, Sukhodub L, Strelchuk V, Nasieka I, Vovchenko L, et al. Hybrid composite based on chitosan matrix mineralized by polyphasic calcium orthophosphates with enhanced bioactivity and protein adsorption capacity. *Mater Today Commun* 2022;31. (Scopus, WoS) (Дисертанту належить синтез, проведення хроматографічного експерименту та узагальнення отриманих результатів).

4. Sukhodub LB, **Kumeda M**, Bielai V, Sukhodub LF. Hydroxyapatite-biopolymers-ZnO composite with sustained Ceftriaxone release as a drainage system for treatment of purulent cavities. *Carbohydr Polym* 2021;266. (Scopus, WoS) (Дисертанту належить проведення хроматографічного експерименту, оформлення та аналіз отриманих результатів).

5. Sukhodub L, Sukhodub LB, **Kumeda M**, Panda A, Baron P. ZnO coatings on Ti6Al4V substrate: Structural and antibacterial properties in literature review and research. *Manag Syst Prod Eng* 2020;28(4):318-324. (Scopus, WoS) (Дисертанту належить проведення антимікробного експерименту та узагальнення отриманих результатів).

6. Sukhodub LB, Sukhodub LF, **Kumeda MO**, Prylutskyu YI, Pogorielov MV, Evstigneev MP, et al. Single-walled carbon nanotubes loaded hydroxyapatite–alginate beads with enhanced mechanical properties and sustained drug release ability. *Prog Biomater* 2020;9(1-2). (Scopus) (Дисертанту належить проведення біологічних та хроматографічних експериментів та узагальнення отриманих результатів).

7. Sukhodub LB, Sukhodub LF, **Kumeda M**, Prylutskyu Y, Evstigneev M, Kostjukov V, et al. The effect of graphene oxide on the properties and release of drugs from apatite-polymer composites. *J Nano Electron Phys* 2020;12(4). (Scopus) (Дисертанту належить проведення біологічних та хроматографічних експериментів та узагальнення отриманих результатів).

8. Sukhodub LF, Sukhodub LB, **Kumeda MO**, Denysenko AP, Kravchenko MI. Bioactive polymer-apatite coatings with antimicrobial properties on model titanium implants. *J Nano Electron Phys* 2020;12(3). (Scopus) (Дисертанту належить проведення антимікробного експерименту та узагальнення отриманих результатів).

9. Sukhodub L, Panda A, Sukhodub L, **Kumeda M**, Dyadyura K, Pandova I. Hydroxyapatite and zinc oxide based two-layer coating, deposited on Ti6Al4V substrate. *MM Sci J* 2019:3494-3499. (Scopus, WoS) (Дисертанту належить проведення експерименту та узагальнення отриманих результатів).

10. Sukhodub LB, Sukhodub LF, **Kumeda MO**, Prylutska SV, Deineka V, Prylutskyu YI, et al. C60 fullerene loaded hydroxyapatite-chitosan beads as a promising system for prolonged drug release. *Carbohydr Polym* 2019;223. (Scopus, WoS) (Дисертанту належить проведення хроматографічного експерименту, розрахунок кінетичних моделей та узагальнення отриманих результатів).

#### Частини монографій видані міжнародними видавництвами

11. **Kumeda M**, Korenkov A, Sukhodub LB, Sukhodub LF, Chapter 3. Medico-Biological Aspects of Hydroxyapatite Application and Its Bioactive Coatings. In: Wythers MC, editor. *Advances in Materials Science Research. Volume 53*. New York: Nova; 2022. P. 95–123. (Дисертанту належить проведення літературного пошуку).

12. **Kumeda M**, Sukhodub LB, Sukhodub LF, Chapter 2. Influence of Microwave Sintering on Hydroxyapatite Modified Materials. In: Wythers MC, editor. *Advances in Materials Science Research. Volume 53*. New York: Nova; 2022. P. 63-94. (Дисертанту належить проведення літературного пошуку, написання роботи).

#### Апробація матеріалів дисертації

13. **Kumeda M**, Sukhodub LF, Prylutskyu Yu, Sukhodub L. Fullerene C60-containing Hydroxyapatite/polymer Polyelectrolyte Composite for Dental Applications. In: *Nanomaterials: Applications & Properties (NAP-2019): 9th International Conference*; Odesa, Ukraine; 2019. P. 02BA05-1–02BA05-4. (Scopus)

14. Sukhodub LB, **Kumeda MO**, Sukhodub LF. Influence of MW irradiation on the hydroxyapatite/chitosan composite structure and drug release kinetics. In: *4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, 2020 IFMBE*; Chisinau, Moldova; 2019. P. 343–348. (Scopus)

15. Sukhodub LB, Sukhodub LF, **Kumeda MA**. Influence of Synthesis Technique on the Bioactivity of Chitosan-Hydroxyapatite Nanocomposites. In: *International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2020)*; 2020. P. 243.

16. Dubņika A, Sukhodub L, **Kumeda M**, Sukhodub L. The effect of biopolymer matrix on the drug release from hydroxyapatite based hybrid scaffolds. In: *International*



research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2020); 2020. P. 255.

17. **Kumeda M**, Sukhodub LB, Bielai V, Sukhodub LF, Zhdanov S. Sorption composite based on hydroxyapatite and biopolymers for drainage of purulent cavities. In: IEEE International Conference on “Nanomaterials: Applications&Properties” (NAP 2020); Odesa, Ukraine; 2020. 9309711. (Scopus)

18. Бєлай ВС, **Кумєда МО**, Остольський ВВ, Суходуб ЛБ, Суходуб ЛФ. In Vivo дослідження композитних дренажних систем на основі гідроксиапатиту. In: IV Міжнародна науково-практична конференція Priority Directions Of Science And Technology Development; Київ, Україна; 2020. P. 95.

19. **Kumeda M.**, Sukhodub LB, Sukhodub LF, Potapov O, Tsyndrenko O, Kmyta O. Biodegradable Nanostructured Nerve Conductors: Electrical Properties And Adsorption Kinetic Model. In: 2021 IEEE 11th International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties” (NAP-2021); Odesa, Ukraine; 2021. 176891. (Scopus)

20. **Kumeda MO**, Sukhodub LB, Sukhodub LF. The Zero-order kinetic of Ceftriaxone release from microwave-induced Octacalcium phosphate–Chitosan hybrid composite. In: International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2021); 2021.

21. **Kumeda MO**, Sukhodub LB, Sukhodub LF. Drug release kinetics from apatite-biopolymer scaffolds: HPLC study. In: 7th International Conference «NANOBIOPHYSICS: Fundamental and Applied Aspects»; Kharkiv, Ukraine; 2021. P. 60.

22. **Kumeda M**, Bielai V, Sukhodub LF, Sukhodub LB, Dudka A. Hydroxyapatite-polymer sorption-aspiration drainage system. In: 2ND MULTIDISCIPLINARY CONFERENCE FOR YOUNG RESEARCHERS Sustainable Development Trends and Challenges under COVID-19; Sumy, Ukraine; 2021. P. 53.

23. **Kumeda M**, Sukhodub LB, Shevel A, Sukhodub LF, Derevianko V. Investigation of novel polymer wound healing material. In: Science, innovations and education: problems and prospects. Proceedings of the 6th International scientific and practical conference; CPN Publishing Group; Tokyo, Japan; 2022. P. 226-230.

24. Sukhodub LF, **Kumeda MO**, Derevianko VG, Sukhodub LB. Antimicrobial Properties of Nanocomposite Biomaterial for the Treatment of Purulent Wounds and Infected Ulcers. In: International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2022); 2022. P. 280.

25. **Kumeda M**, Sukhodub LB, Sukhodub LF, Krmela J, Krmelová V. Dependence of Nerve Conduits Structure on Chemical Parameters and Composition. In: MACHINE MODELLING AND SIMULATIONS 2022; Rydzyna, Poland; 2022. P. 76.