

УДК 577.3, 577.3:615.32
УКПП
№ держреєстрації 0119U101458
Інв. №

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

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
д-р фіз.-мат. наук, професор

_____ А.М. Черноус

ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ
ВПРОВАДЖЕННЯ НОВИХ МЕТОДИЧНИХ ПІДХОДІВ
ДО РОЗРОБКИ ТА ВИВЧЕННЯ ГІДРИБНИХ НАНОМАТЕРІАЛІВ
МЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ
(остаточний)

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

Л.Ф. Суходуб

2023

Рукопис закінчено 21 травня 2023 р.

Результати роботи розглянуті науковою радою СумДУ, протокол від __ 2023р. № __

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 57 с., 14 рис., 8 табл., 45 джерел.

АЛЬГІНАТ, АПАТИТ-ПОЛІМЕРНИЙ, БІОМІМЕТИЧНІ ПОКРИТТЯ, ГІДРОКСИАПАТИТ, КОМПОЗИТНИЙ МАТЕРІАЛ, ФІЗИКО-БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ, ХІТОЗАН

Об'єкт дослідження: впровадження нових методичних підходів до розробки та вивчення гідрибних наноматеріалів медичного призначення; морфологічні, структурні та протимікробні особливості біорозкладних матеріалів та покриттів; кінетика вивільнення лікарських препаратів *in vitro* у модельне середовище.

Мета роботи – розробка методичних підходів до утворення апатит-полімерних біорозкладних композитних матеріалів та покриттів, модифікація їх біоактивними неорганічними речовинами та лікарськими засобами (ZnO, ZnS, фулерен C₆₀, анестезин, диклофінак натрію)

Проведено оптимізацію технології отримання біосумісних гранульованих матеріалів на основі гідроксиапатиту та природного полімеру хітозану, як систем для пролонгованої доставки лікарських засобів в зону імплантації; оптимізовано методику синтезу ZnS та ZnS-Alg наноструктурованих порошків та розроблено технологію нанесення ZnS та ZnS-Alg покриттів на модельні титанові імплантати; розроблено методику нанесення на Ti6Al4V субстрати гібридних кальцій фосфатних покриттів, легуваних іонами срібла та вуглецевими наночастинками. Досліджено сорбційно-дренажні властивості апатит-полімерного композиту. Доведено, що використання композиту з вмістом НА, хітозану та ZnO є ефективним для дренажу гнійних порожнин.

За результатами НДР у 2019-2023 році було захищено в 2021 році 1 магістерську роботу, підготовано до захисту в 2023 році 1 бакалаврську роботу, за участі студентів та аспірантів опубліковано: 5 тез доповідей на наукових конференціях, 2 статті у наукових виданнях, проіндексованих БД

Scopus; 2 статті в наукових фахових виданнях України. За матеріалами теми студентка Соболева М. отримала диплом за найкращу усну доповідь « Ag⁺ Loaded Hydroxyapatite-Chitosan Bioactive Coatings on Model Titanium Implants: Structure, Antibacterial Properties, Drug Release Abilities» на міжнародній конференції студентів та молодих вчених «Biomedical Perspectives-2019». Отримані призові місця у II Всеукраїнському турі студентських наукових робіт з галузей знань та спеціальностей (спеціальність 163 Біомедична інженерія) у 2019, 2020, 2021, 2022 роках. Отриманий грант Grants for young researchers and students in the framework of the Czech Republic Development Cooperation project: “Interuniversity cooperation as a tool for enhancement of quality of selected universities in Ukraine” 2019-2021 pp., 7,2 тис. грн.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень та скорочень	5
Передмова	6
Вступ	10
1 Розробка та оптимізація технології отримання біосумісних гранульованих матеріалів на основі гідроксиапатиту та природного полімеру хітозану, як систем для пролонгованої доставки лікарських засобів	15
2 Протимікробні властивості біоміметичних ZnS та ZnS-Alg наноструктурованих порошків та покриттів на модельних титанових імплантатах	22
3 Гібридні кальцій фосфатні покриття на Ti6Al4V субстратах, леговані іонами срібла та вуглецевими наночастинками	31
4 Модельний апатит-полімерний композит з сорбційно-дренажними властивостями	44
Висновки	50
Перелік джерел посилання	53

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

Alg – альгінат

HA – гідроксиапатит

кдHA – кальцій дефіцитний гідроксиапатит

MIK – мінімальна інгібуюча концентрація

Me – метал

XRD – рентгенівська дифракція

TEM – растрова електронна мікроскопія

CS – хітозан

PBS – фосфатний буферний розчин

SBF – модельний фізіологічний розчин

RFA – рентгено-флуоресцентний аналіз

MW – мікрохвильове випромінення

ДН – диклофенак натрію

ПЕРЕДМОВА

Скануюча електронна мікроскопія. Морфологію частинок аналізували за допомогою скануючої електронної мікроскопії SEO-SEM Inspect S50-B. Кількості Ca та P у гідроксиапатиті визначали методом EDA енергодисперсійним спектрометром AZtecOne з детектором X-MaxN20.

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

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

Розрахунок параметрів кристалічної ґратки а та с гексагональні фази проводився за наступними формулами:

$$a = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \sqrt{\frac{4}{3} (h^2 + hk + k^2) + \left(\frac{a}{c}\right)^2 l^2}$$

$$c = \frac{\lambda}{2 \sin \theta} \sqrt{\frac{4}{3} \left(\frac{c}{a}\right)^2 (h^2 + hk + k^2) + l^2}, \quad 1)$$

де λ – довжина хвилі рентгенівського випромінювання;

h, k, l – індекси Міллера [1].

У якості вихідних значень кута падіння обирали кути зі значеннями індекса Міллера, що є найбільш характерними для фази цинку сульфід. На основі значень довжини хвилі λ , інтегральної ширини дифракційного профілю β та кута падіння θ можливе визначення розмірів кристалітів за формулою:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta_m \cos \theta}, \quad (2)$$

де K – це безрозмірна константа, значення якої залежить від параметрів кристалітів. У даному випадку $K=1$.

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

Windows 98/NT/2K/XP. Рентгенограми отримували з використанням алюмінієвого фільтра протягом 120 ÷ 180 секунд.

Ступінь набрякання. Ступінь набрякання, який є одним з важливих показників при створенні біоматеріалів, визначали кількісно, вимірюючи зміну маси зразка, як функцію часу занурення зразка у буферний фосфатно-сольовий розчин (PBS) при рН = 7,33. Осмолярність та концентрація іонів PBS відповідає фізіологічному розчину людини (приблизно 300 мосм/л) [2]. Зразки з початковою масою m_1 г занурювали в PBS та витримували протягом 3 діб, періодично зважуючи після видалення поверхневої рідини на фільтрувальному папері. Ступінь набрякання (S_w) розраховували за наступним рівнянням [3].

$$S_w = m_2 - m_1 / m_1 \times 100 \quad (3)$$

де m_1 - початкова маса зразка,

m_2 - маса набряклої проби.

Пористість отриманих композитів досліджували шляхом занурення зразка масою (m_1) у певний обсяг етанолу (V_1). Через деякий час (30 хвилин) вимірювали загальний обсяг етанолу зі зразком (V_2). Зразок виймали, вимірювали його масу (m_2), а також кількість спирту, що залишився в пробірці (V_3).

Розрахунок ступеня пористості виконаний за формулою:

$$P = (m_2 - m_1) / \rho(V_2 - V_3) \times 100$$

де ρ - щільність етанолу, становить 0,789 г/мл.

Протимікробна активність. Оцінку протимікробної активності експериментальних зразків щодо Грам-негативних мікроорганізмів E.coli ATCC 25922, K1.pneumoniae, а також Грам-позитивного S. Aureus ATCC 25923, проводили диско-дифузійним методом [4]. Метод включає розміщення насичених синтезованими зразками паперових дисків діаметром 0,8 мм, в чашки Петрі на поверхню інокульованого обраними мікроорганізмами агару. В якості тестових штамів використовували суспензії добових культур обраних мікроорганізмів з концентрацією $1,5 \times 10^8$ КУО/мл. Концентрація відповідала 0,5 одиницям мутності за шкалою Мк Фарланда. Чашки Петрі зі зразками інкубували в термостаті при 37 °С протягом 24 годин. Антибактеріальні властивості оцінювали шляхом вимірювання зони пригнічення росту бактеріальних клітин (ZOI) навколо зразків.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ). Визначення кінетики вивільнення лікарських засобів із складу композитного матеріалу проводили на хроматографі Angilent 1200 з детектуванням UV-Vis Abs ($\lambda = 280$ нм) та хроматографічною колонкою C18 (Zorbax SB-C18 4.6x150 мм, 5мкм). Було використано програмне забезпечення Empower 2.

ВСТУП

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, розвиток техногенної сфери призводить до збільшення її несприятливого впливу на організм людини. При цьому одним з найбільш вразливих органів є кісткова тканина організму. На сьогодні в Україні та у світі загалом існує велика потреба у ефективних і доступних за ціною біоматеріалах для заміщення дефектів кісткової тканини та імплантатів як природного, так і штучного походження. Інженерія кісткової тканини вимагає пошуку новітніх матеріалів, які індукують формування нової кістки, запобігають росту небажаних сполучних тканин, поповнюють втрату кісткової маси, а також сприяють росту кровоносних судин та проліферації кісткових остеобластів на ранній стадії.

Статистична оцінка хірургії нещасних випадків свідчить, що близько 8 % всіх операцій спрямовано на нарощування кісток. Дефект кістки, викликаний видаленням пухлини, складним переломом, запаленням в навколопротезному просторі після імплантації протезу, повинен заповнюватися кістковим матеріалом для покращення регенерації кісткової тканини, оскільки в противному разі відбувається негативний процес заміщення кісткової тканини з'єднувальною [5]. Тому пошук універсального матеріалу для відновлення цілісності кісткової чи зубної тканини є однією з найгостріших проблем сучасної медицини. Існує цілий ряд матеріалів для лікування кістки, в тому числі кістковий матеріал тваринного походження, але при цьому є великий ризик інфекцій та імунних реакцій відторгнення. Щоб запобігти вказаним ускладненням, в якості заміників кісток найчастіше намагаються використовувати метали та синтетичні матеріали.

Основними вимогами до таких матеріалів є достатня механічна стабільність, висока біологічна сумісність та пористість для надання кістковій тканині можливості вросли в матеріал та забезпечити механічну фіксацію. Біоматеріали нового покоління повинні поєднувати біоактивність

та біорезорбцію, відтворювати природну функцію кісткової тканини, активувати *in vivo* механізми регенерації кісткової тканини. Кальцій фосфатні сполуки мають суттєве значення в галузі інженерії кісткової тканини. Це, насамперед, гідроксиapatит (НА) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, що є основним неорганічним компонентом біогенної кісткової тканини та має такі цінні властивості, як біосумісність, біоактивність, остеокондуктивність та відсутність запальних та токсичних ефектів [6].

Композитні матеріали на основі гідроксиapatиту та полімерів синтетичного або природного походження широко застосовуються в медицині, оскільки жива кісткова тканина відрізняється від них тільки тим, що вона насичена біологічними тканинами й рідинами, які об'єднані в систему [7, 8]. Властивість кристалічної решітки апатитів обмінюватися з іонами фізіологічного розчину робить їх високочутливими до іонного складу крові та міжклітинної рідини. Найчастіше зустрічаються такі варіанти обміну іонів: Заміщення іонів Ca^{2+} катіонами Na^+ , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mo^{2+} , Mg^{2+} , Pb^{2+} призводить до зміни властивостей НА, його міцності і розмірів кристалітів [9].

Нанокристалічний НА широко використовується в якості матеріалу для інженерії кісткової тканини, в системах доставки ліків, як біосенсор і для багатьох інших застосувань завдяки хімічній і біологічній подібності до мінеральної частини кістки [10]. Але у нього є й багато недоліків, а саме незначна швидкість резорбції, низька механічна міцність і ударна в'язкість, висока усадка і деформація при спіканні і, нарешті, нерегульовані біологічні властивості. З цих причин у багатьох випадках НА використовується в поєднанні з біополімерами (х як композитний матеріал. В якості полімерної складової в біоінженерії широко застосовуються Полісахариди завдяки наявності в хімічній структурі функціональних гідроксил-, алкіл-, аміно-груп, які можуть бути здатними до взаємодії з іншими компонентами реакційної системи за фізіологічних умов. Використання хітозану в якості полімерної складової обумовлене його біосумісністю та здатністю до

біодеградації. Хітозан, похідний хітину, є лінійним кристалічним полісахаридом, що складається з мономерів β -(1 \rightarrow 4) N-ацетил-D-глюкозаміну. Структурна подібність хітозану до екстраклітинного матриксу глікозаміногліканів робить його привабливим біополімером для кісткової тканини. За рахунок еластичності та пористості хітозанові матрикси легко заповнюють кісткові дефекти різної геометрії. Тим не менше, не зважаючи на збільшення остеогенезу і ангіогенної активності без утворення фіброзної тканини, хітозан не достатньо остеогенний, щоб самотійно викликати бажану швидку кісткову регенерацію на початковому етапі лікування кістки [11]. В якості мінеральної складової крім загально визнаних фосфатів кальцію в останній час великий науковий інтерес викликають неорганічні полімери - поліфосфати (ПФ), їх загальна формула — $M(n+2)P_nO(3n+1)$. Це солі поліфосфорної кислоти, які мають у розчині два типи гідроксильних груп з різною тенденцією до дисоціації: бокові групи (дві у молекулі) є слабкими кислотами, а середні гідроксильні групи, кількість яких дорівнює кількості атомів фосфору, є сильно кислотними. Неорганічні поліфосфати визнані як терапевтичний агент, який стимулює ростовий фактор фібробластів і підсилює остеогенну диференціацію стовбурових клітин, а також, будучи адсорбованим на пористій поверхні НА *in vivo*, підсилює кісткову регенерацію [12]. Прикладом низькомолекулярного неорганічного поліфосфату є триполіфосфат натрію $Na_5P_3O_{10}$ (ТПФ). Дія поліфосфатів в ролі катіонних іонообмінників базується на їх здатності обмінювати іонно приєднані катіони (Na^+ , Ca^{2+}) на катіони біомолекул у розчині. Літературні джерела свідчать, що фосфорельовані хітозанові мембрани індукують біоміметичну депозицію кальцій фосфатів *in vitro*, що надає полімер-апатитним імплантатам остеокондуктивних властивостей [13]. Композит з хітозану та поліфосфатів може застосовуватись в якості системи для іммобілізації лікарських засобів з подальшою їх доставкою в зону імплантації шляхом дифузії [14].

В останні десятиліття дослідження в царині біомедицини та біоматеріалів були зосереджені на вдосконаленні особливостей будови та складу імплантатів з метою прискорити їх інтеграцію в природну кісткову тканину. Металеві матеріали, переважно титан та його сплави, широко застосовуються в медицині як імплантати для заміни твердої кісткової тканини. Однак через відсутність достатньої біоактивності та біосумісності існує велика ймовірність відторгнення, відбуваються післяопераційні запальні процеси та повільна інтеграція металевих імплантатів у навколишні тканини [5]. Взаємодія імплантату з організмом людини в першу чергу відбувається через його поверхню. Тому модифікація поверхні металевих імплантатів є одним із перспективних методів поліпшення фізико-механічних та біологічних властивостей цих матеріалів. З цією метою на поверхню металевих імплантатів наносять біоактивні покриття різного складу, зокрема, на основі фосфатів кальцію та біомолекул. Серед керамік, в основі яких лежать ортофосфати кальцію, гідроксиапатит (НА), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ є найбільш перспективним для покриття металевих імплантатів через хімічну схожість з мінералом кісток [15]. Відомо, що утворення еластичної кістки ініціюється гібридною органічно-неорганічною структурою. Тому природні полісахариди, такі як альгінати (Alg), особливо придатні в якості матричних полімерів, оскільки їх ланцюги мають велику кількість функціональних груп, які добре комплексуються з іонами металів [15].

Розвиток резистентності мікроорганізмів до антимікробних препаратів є однією з складних і багатогранних проблем, над вирішенням якої активно працюють багато лабораторій світу. З'являється все більше даних про те, що важливу роль в якості антимікробних агентів відіграють стабілізовані біополімерами наночастинки металів. В значній кількості робіт було показано, що наночастинки Ag, Au, Cu, Zn, Ti та інш. розміром від 1 нм до 100 нм можуть бути використані для пригнічення росту та розвитку умовно-патогенних штамів бактерій та грибів, таких як *E. coli*, *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus flavus* та ін. [16-19].

Враховуючи високу резистентність мікроорганізмів до протимікробних лікарських препаратів, в останній час застосовуються альтернативні неорганічні частинки, іони та наночастинки металів в якості антибактеріальних засобів. Серед них іони Zn^{2+} та частинки оксиду цинку (ZnO) є перспективними кандидатами для вирішення цієї проблеми, оскільки вони не проявляють надмірної токсичності [21]. Zn має антибактеріальні властивості і є одним з неорганічних елементів, необхідних для проліферації клітин та реконструкції позаклітинного матриксу [22]. Іони Zn^{2+} також здатні стимулювати утворення епітелію під час загоєння ран [23]. Нанесення кальцій фосфатних (CaP) покриттів підвищує біологічну сумісність поверхні [24].

Серед відносно нетоксичних нанокристалів слід відзначити сполуку ZnS , антибактеріальні властивості якої детально вивчаються та їх активність підтверджена щодо деяких бактерій та грибів [25, 26].

1 РОЗРОБКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ БІОСУМІСНИХ ГРАНУЛЬОВАНИХ МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ ГІДРОКСИПАТИТУ ТА ПРИРОДНОГО ПОЛІМЕРУ ХІТОЗАНУ, ЯК СИСТЕМ ДЛЯ ПРОЛОНГОВАНОЇ ДОСТАВКИ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

Науковою новизною представленої роботи є особливості структури створеного нанокомпозитного матеріалу, в якому молекули природного катіоніту хітозану, будучи хімічно «зшитими» триполіфосфатом натрію, утворюють матеріал гранульованої форми, на поверхневій мембрані якого присутні фосфатні групи, здатні в умовах організму іммобілізувати сигнальні біомолекули, такі, наприклад, як фактори росту. Форма матеріалу забезпечує заповнення дефектів складної геометрії з мінімальним зазором між кісткою та імплантатом, а простір між гранулами сприяє формуванню нових кісткових тканин по всьому об'єму імплантату. Введення лікарського засобу в структуру композитного матеріалу надає лікувальних властивостей. Матеріал не спричинює побічних ефектів, є доступним за ціною та простим у виконанні.

Біоматеріали на основі хітозану (CS) і гідроксиapatиту (HA) є ідеальними скафолдами для тканинної інженерії, оскільки вони забезпечують тривимірне (3-D) середовище та морфологію, подібну до позаклітинного матриксу (ECM) природних тканин. Функціональні групи полімерів, які входять до складу композиту, а саме CH_2^- , NH_3^+ , OH^- забезпечують велику спорідненість до позитивних іонів кальцію та зародження HA. Вплив мікрохвильового опромінення (MW) сприяє процесу кристалізації HA і забезпечує утворення за короткий час добре кристалізованого порошку РФ зі збільшеною питомою поверхнею, дисперсністю, високим ступенем кристалічності та виходом порівняно зі звичайними методами осадження.

У даній роботі досліджується вплив MW -випромінювань різної потужності на формування композиту CS/HA з акцентом на структурних

особливостях утворених сполук у порівнянні до синтезованих класичним методом осадження.

Доведено, що вплив MW-випромінювання значно скорочує час утворення CS-НА. Застосування MW активує дегідратацію іонів під час синтезу. Даний факт впливає на пористість та ступінь набрякання композиту.

В ході експерименту були використані наступні матеріали: хітозан (молекулярна маса 100-300 кДа), ступенем деацетилювання (СД 85%), хлорид кальцію (CaCl_2), 85% ортофосфорна кислота (H_3PO_4), 10М гідроксид натрію (NaOH), триполіфосфат натрію ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) (виробник Китай).

До 100 мл 0,1 М CaCl_2 додавали 10 М NaOH до $\text{pH} = 12$. До отриманої суміші додавали 100 мл 0,06 М H_3PO_4 , що містить 0,4 г хітозану (М.М. 150 кДа). Отриману суміш розділяли на 4 проби, три з яких піддавали мікрохвильовому опроміненню при різних рівнях потужності 300, 600 і 800 Вт відповідно протягом 5 хвилин, а утворені осади відокремлювали центрифугуванням. Зразки отримали назви MW300CS-НА, MW600CS-НА, MW800CS-НА. Четвертий контрольний зразок CS-НА був синтезований класичним методом осадження, який включав нагрівання до $80\text{ }^\circ\text{C}$ і витримку протягом 24 год.

Визначення структурних та морфологічних особливостей досліджуваних зразків. Для визначення структури отриманих зразків були проведені XRD дослідження. Розраховані за формулою Селякова-Шеррера середні розміри кристалітів НА показали, що підвищення MW потужності призводить до збільшення розміру кристалітів. Важливо, що утворення кристалів НА під впливом MW відбувається за рахунок швидкого поглинання енергії під час реакції з подальшою дегідратацією іонів, що забезпечує прискорене утворення продукту протягом 10 хв (таблиця 1.1).

Таблиця 1.1 - Особливості структури зразків HA-CS, отриманих під впливом MW та відпалених при 600°C

Зразок	Умови синтезу			Індекси Міллера	Розмір кристалітів L, нм	Параметри кристалічної ґратки HA			
	T, C	Тип впливу, MW потужність	t, хв			a, нм	c, нм	Microstrains $\epsilon \cdot 10^3$	Exponential expansion
HA-CS	80	–	24 год	(130)	21.0	0,948	–	0.589	0.626
				(002)		–	0,683		
HA-CS-MW300	60	mW 300	10	(130)	27.0	0,945	–	0.315	0.33
				(002)		–	0,684		
HA-CS-MW600	84	mW 600	10	(130)	26.5	0,946	–	0.398	0.427
				(002)		–	0,681		
HA-CS-MW800	94	mW 800	10	(130)	24.7	0,945	–	0.391	0.417
				(002)		–	0,683		

XRD спектри були отримані як від сирих (висушених при 37 °C зразків (рис.1.1), так і відпалених при 600 °C для підвищення роздільної здатності піків (рис.1.2).

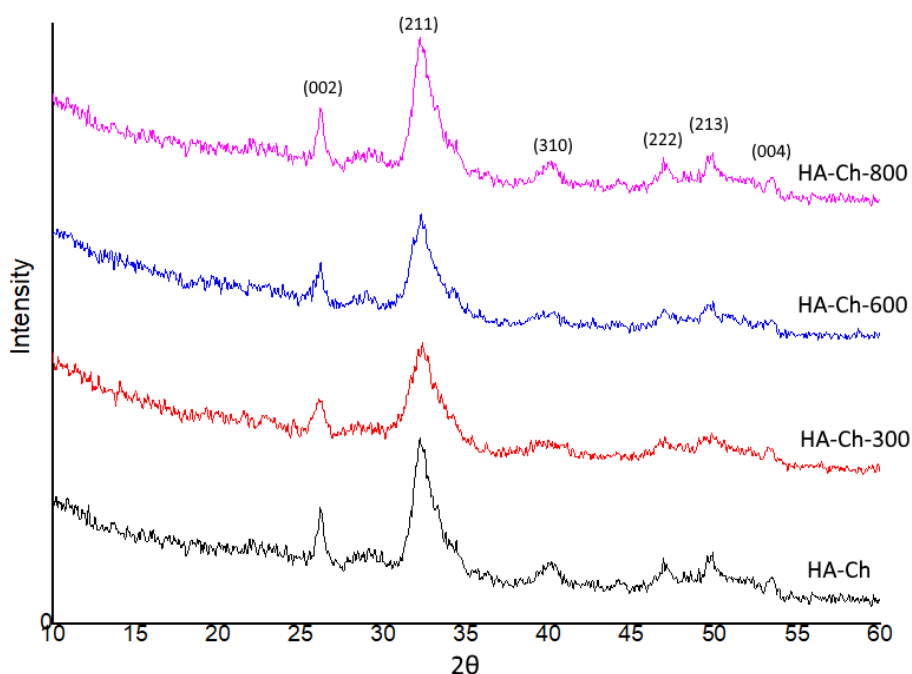


Рисунок 1.1 - XRD спектри від експериментальних зразків, синтезованих під дією мікрохвильового опромінення різної потужності та висушених при 37 °C.

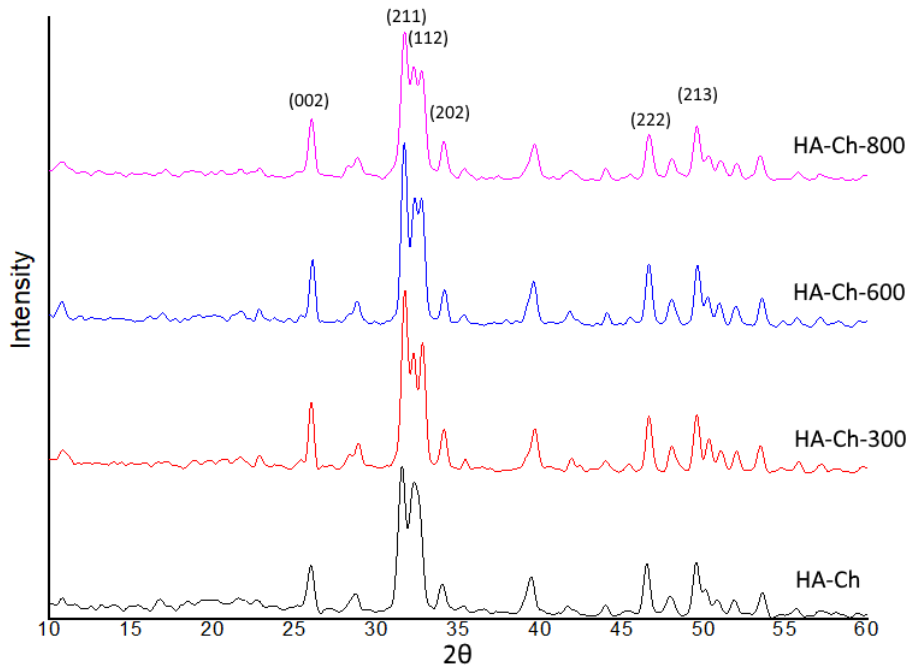


Рисунок 1.2 - XRD спектри від експериментальних зразків, синтезованих під дією мікрохвильового опромінення різної потужності та відпалених при 600 °С.

Біоактивність та набрякання

Біоактивність та ступінь набрякання є значущими вимогами для композитів біомедичного призначення. Композит має знаходитись в живому організмі в такому часовому відрізку, який забезпечує ріст та відновлення нової нативної тканини. При цьому синтетичний матеріал не має чинити тиску на оточуючі тканини внаслідок набрякання. Біоактивність синтезованих зразків аналізували шляхом визначення ступеню їх набрякання протягом 40 діб у фізіологічному розчині PBS при температурі 37 °С та постійному коливанні у шейкері ($rpm=80$). Для визначення ступеня набрякання (СН) зразки були висушені при 37°С. Слід зауважити, що впродовж зазначеного терміну часу зразки демонстрували низький ступінь набрякання як для таких, що містять полімерну складову. Дослідження довели, що збільшення потужності MW впливу призводить до підвищення ступеню набрякання зразків в результаті збільшення їх пористості в порівнянні з контрольним зразком HA-CS, синтезованим класичним методом.

Результати приведені на рисунку 3. Слід зазначити, що протягом 40 діб дослідження зразки з вмістом НА та CS, синтезовані під впливом MW, зберігали початкову форму гранул.

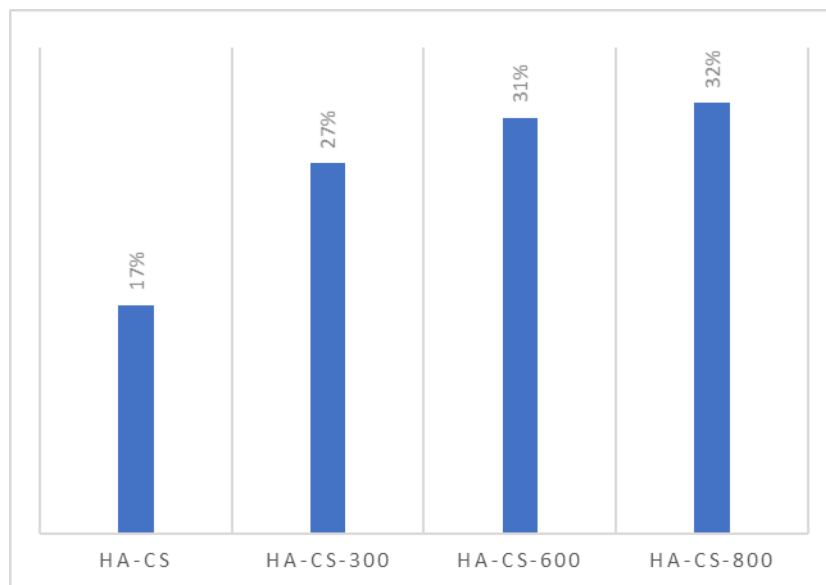


Рисунок 1.3 - Ступінь набрякання зразків з вмістом хітозану після перебування у розчині PBS протягом 40 діб.

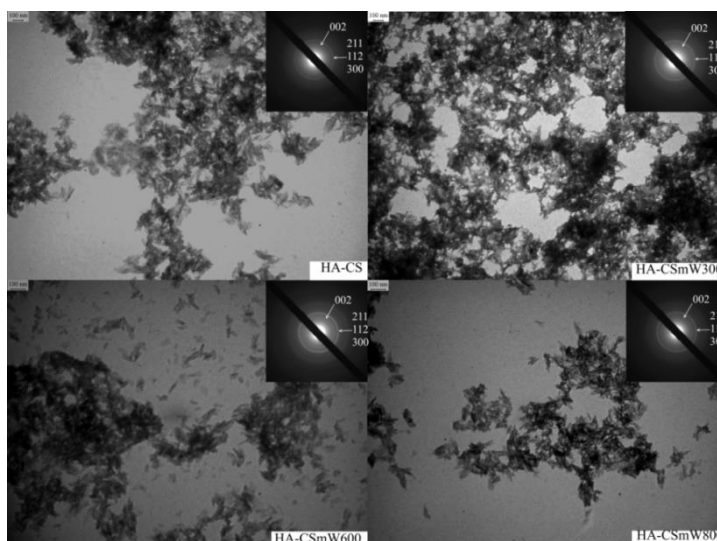


Рисунок 1.4 – ПЕМ зображення кристалітів НА у зразках HA-CS, HA-CS-300, HA-CS-600, HA-CS-800.

У контрольному зразку HA-CS та у зразку HA-CS-300 кристаліти мають округлу пластинчасту форму, в той час як зразки, синтезовані під дією MW вищої потужності демонструють утворення витягнутих вздовж осі *c* голкоподібних кристалітів, які є більш типовими для гідроксиапатиту.

Вивільнення лікарського засобу

Отримані зразки у формі гранул була досліджена щодо релізу знеболюючого лікарського засобу - анестезину. Зразки насичували спиртовим розчином анестезину з концентрацією 11,7 мг/мл протягом двох діб при температурі 37 °C. Динаміку вивільнення спостерігали протягом 30 діб з застосуванням методики високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ).

Результати дослідження довели, що підвищення потужності MW випромінювання подовжує час релізу анестезину до 384 та 600 годин зі зразків HA-CS-600 та HA-CS-800, відповідно, у порівнянні з контрольним зразком HA-CS, синтезованим без MW впливу та за впливу MW потужністю 300 W, час релізу з яких становить 336 годин (таблиця 1.2, рис.1.5).

Таблиця 1.2 – Динаміка вивільнення анестезину з часом (годин).

Зразок	4	24	48	96	144	192	240	288	336	384	480	600
HA-CS	0,41	0,459	0,542	0,586	0,62	0,69	0,72	0,74	0,82	-	-	-
HA-CS-300	0,415	0,455	0,517	0,594	0,63	0,69	0,72	0,75	0,82	-	-	-
HA-CS-600	0,433	0,498	0,559	0,621	0,66	0,735	0,76	0,8	0,87	0,9	-	-
HA-CS-800	0,41	0,476	0,596	0,689	0,73	0,8	0,84	0,87	0,95	0,974	1,01	1,03

Таким чином доведено, що застосування мікрохвильового випромінювання на стадії синтезу суттєво скорочує час формування гідроксиапатиту, а саме з 24 годин за класичним методом конвекційного нагрівання до 15 хвилин за дії MW. При цьому XRD дані свідчать про ідентичність кристалічних параметрів HA, отриманого обома видами синтезу. Зі збільшенням потужності MW середній розмір кристалітів HA, утворених у присутності хітозану, зменшується від 31 нм (300 Вт) до 24 нм (800 Вт), а ступінь набрякання збільшується від 17 до 31 %. Композити на основі HA та CS можуть виконувати роль систем доставки лікарських засобів з

продовжуваним їх вивільненням. Застосування MW потужності 800 Вт при синтезі збільшує термін вивільнення Анестезину з їх складу на 10 діб у порівнянні з конвекційним методом.

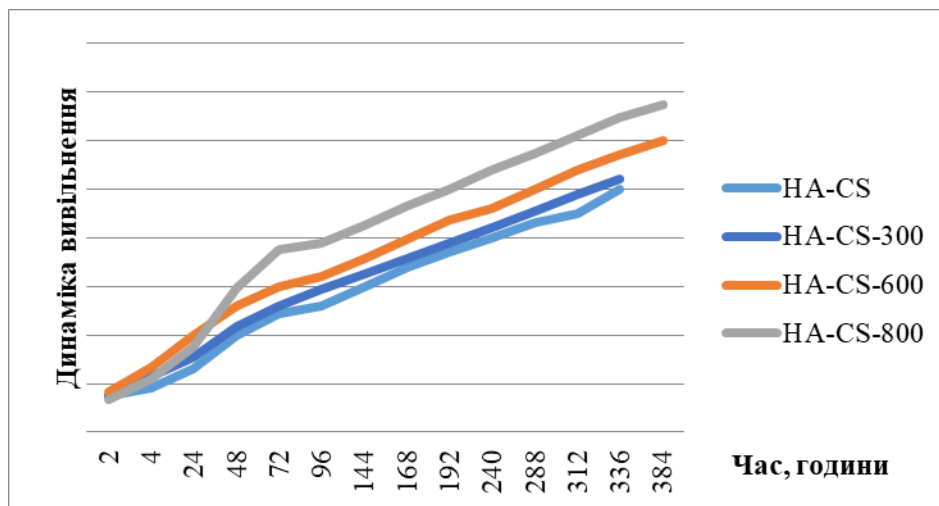


Рисунок 1.5 – Порівняння динаміки вивільнення анестезину зі складу HA-CS композитів, синтезованих за різної потужності мікрохвильового опромінення.

2 ПРОТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ БІОМІМЕТИЧНИХ ZNS ТА ZNS-ALG НАНОСТРУКТУРОВАНИХ ПОРОШКІВ ТА ПОКРИТТІВ НА МОДЕЛЬНИХ ТИТАНОВИХ ІМПЛАНТАТАХ

У зв'язку з тим, що механізми антибактеріальної дії альтернативних антибіотикам неорганічних іонів, частинок та наночастинок вивчені недостатньо, а також наявність деяких протиріч отриманих експериментальних даних, спонукають до більш детального вивчення механізмів антибактеріальної дії цих засобів [27].

В ході даної роботи було проведено дослідження неорганічної сполуки-цинку сульфід (ZnS) в якості протимікробного засобу. ZnS був синтезований як у вигляді порошків, так і тонкого шару біоактивного покриття на титанових субстратах. Було порівняно протимікробну активність ZnS та цинку сульфід, отриманого в присутності натрію альгінату (ZnS-Alg), зроблені висновки щодо механізму їх протимікробної дії.

При виконанні експерименту були використані наступні реактиви: цинку нітрат $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$, тиосечовина NH_2CSNH_2 , безводний кальцію хлорид $CaCl_2$, ортофосфорна кислота H_3PO_4 , розчин аміаку NH_4OH , натрію гідроксид NaOH (виробництво "Merk"), альгінат натрію (харчова добавка E401, виробництво Китай). Всі реагенти були аналітичного ступеню чистоти. В експерименті використовували музейні штами мікроорганізмів та чисті культури мікроорганізмів виділені з клінічного матеріалу: грам позитивні бактерії *Staphylococcus aureus* (ATCC № 25923 (F-49), *Staphylococcus epidermidis* (№ 19), *Peptostreptococcus anaerobius* (№ 239), *Streptococcus pyogenes* (№ 184) та грамнегативні мікроорганізми *Bacteroides fragilis* (№ 63), *Escherichia coli* (ATCC № 25922 (F-80), *Klebsiella pneumonia* (№ 93), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC № 27853 (F-51). Суспензію клітин готували із 24-годинної агарової бактеріальної культури в м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ).

Нанесення покриттів з цинку сульфїду (ZnS) на титанову пластину.

Застосування методу термічної депозиції з водних розчинів базується на властивості сульфїду цинку зменшувати свою розчинність та утворювати осад при підвищенні температури розчину. Утворення ZnS покриття на титанових пластинах проводили методом термічної депозиції, який полягає в осадженні шару цинку сульфїду з лужного (pH близько 11) колоїдного розчину, який містить наночастинки ZnS [28]. Колоїдний розчин ZnS наночастинок готували наступним чином: до 100 мл 0.2М водного розчину нітрату цинку $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$, додавали 100мл 0.2М розчину тіосечовини. До отриманої суміші додавали 30 мл водного 25 мас.% розчину аміаку (NH_4OH). При цьому спочатку утворювалась білого кольору суспензія $Zn(OH)_2$ з подальшим утворенням ZnS наночастинок у формі прозорого розчину. В даний розчин занурювали титанову пластину, через яку пропускали змінний електричний струм протягом 30 хвилин, в результаті чого титанова пластина нагрівалась до заданої температури 80-100°C, що сприяло осадженню на пластині покриття з ZnS наночастинок.

ZnS-Alg покриття. ZnS-Alg покриття утворювалося з колоїдного розчину, який містив альгінат натрію. Для цього до 100мл 0,2М водного розчину нітрату цинку $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$, додавали 2 мл 1% розчину альгінату натрію в 0,01М розчині NaOH. В подальшому технологія була аналогічною до зразка ZnS.

ZnS, ZnS-Alg порошки та покриття з їх вмістом.

Для отримання порошків цинку сульфїду (ZnS) та цинку сульфїду з альгінатом натрію (ZnS-Alg) було застосовано метод «мокрої хімії». Колоїдний розчин ZnS наночастинок готували наступним чином: до 100 мл 0.2М водного розчину нітрату цинку $Zn(NO_3)_2 \times 6H_2O$, додавали 100мл 0.2М розчину тіосечовини. До отриманої суміші додавали 30 мл водного 25 мас.% розчину аміаку (NH_4OH) та нагрівали при температурі 80-100°C протягом 30 хвилин. Порошок ZnS-Alg утворювався у присутності 1% розчину альгінату натрію.

Визначення антибактеріальної активності ZnS та ZnS-Alg покриттів на титанових субстратах.

Антибактеріальну активність експериментальних зразків досліджували проти грам-позитивних бактерій *S. aureus* ATCC 25923 методом визначення зони інгібування росту мікроорганізмів. Метод передбачає розміщення зразків у чашках Петрі на поверхні агару, інокульованій бактеріальною культурою *S. aureus* (ATCC 25923), яку використовували в якості тестового штаму. Це грампозитивна бактерія, визначена МОН України, як референтний штам для визначення протимікробної активності. Застосовували добову культуру з концентрацією $1,5 \times 10^8$ КУО/мл (колоніє утворюючі одиниці), що дорівнює 0,5 од. за шкалою Мк. Фарланда. Чашки Петрі з пробами інкубували в термостаті при 37°C протягом 48 годин. Антибактеріальні властивості оцінювали шляхом вимірювання зони інгібування росту мікроорганізмів. Контроль результатів проводили через 24 та 48 годин. Зона інгібування росту (у мм) відображала антимікробну сприйнятливість зразків – чим більша зона інгібування, тим більша антимікробна активність.

In vitro визначення антибактеріальної активності порошків ZnS та ZnS-Alg.

Для вивчення антибактеріальних властивостей наночастинок ZnS-Alg суспензію тест-культур наносили на поверхню щільного стандартного поживного середовища (виробник - ТОВ «Фармактив», Україна) ($15 \pm 0,1$ мл), яке містило гомогенний розчин ZnS-Alg (100 мг/мл). Результат підрахунку колоній мікроорганізмів (КУО/мл), що виростили за період добової інкубації при $t = 37 \pm 0,1$ °C на середовищі з ZnS-Alg, відповідав кількості життєздатних клітин тест-культури. Алгоритм виконання контрольних експериментів був аналогічним вказаному вище. В контрольних пробах для інкубації тест-культур використовували два поживних середовища об'ємом $15 \pm 0,1$ мл: одне з додаванням розчину ZnS (100 мг/мл), друге - Alg (100 мг/мл). Експеримент повторювали з кожною тест-культурою не менше десяти разів.

Далі проводили кількісну оцінку антибактеріальної дії нанокompозиту з урахуванням часу переходу мікроорганізмів у фази затримки росту (через 4 години). Для цього 1 мл тест-культури (10^2 КУО/мл) вносили у бактеріологічну пробірку з 9 мл стерильного поживного бульону з наночастинками ZnS-Alg та підігрітого до $37\pm 0,1^\circ\text{C}$. Для приготування контрольних проб використовували поживні середовища з ZnS та Alg (окремо). Концентрація ZnS-Alg, ZnS та Alg у середовищі складала 10 мг/мл. Інокулянт інкубували при $37\pm 0,1^\circ\text{C}$ збовтуючи кожні 15 хвилин. Після культивування протягом 4 годин визначали кількість життєздатних клітин чашковим методом Коха, який включав приготування розведень інокуляту у стерильному фізіологічному розчині, посів на щільне середовище та підрахунок колоній, що виростили через $24\pm 0,1$ год з урахуванням ступеню розведення інокуляту (КУО/мл).

Для нанесення біоміметичних покриттів титанові субстрати були закріплені на мідних електродах, через які пропускали змінний електричний струм (2 А) з метою їх нагрівання.

Структурні особливості покриттів з вмістом ZnS

Структурні особливості отриманих покриттів з вмістом ZnS визначені методом рентгенівської дифракції (XRD). Отримані рентгено-структурні характеристики покриттів приведені в таблиці 2.1.

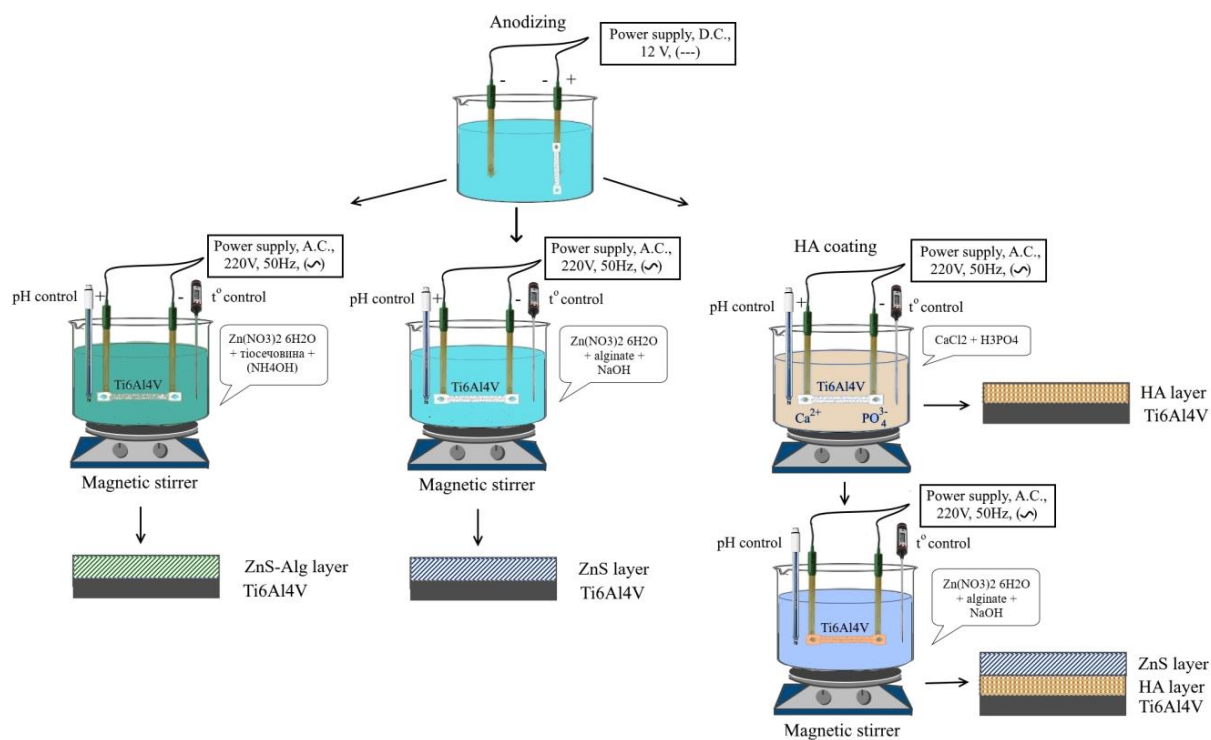


Рисунок 2.1 – Схема технологічного процесу нанесення біоактивних покриттів на модельні титанові субстрати

Таблиця 2.1 – Структурні параметри отриманих покриттів за даними XRD

Зразок	Кут 2θ	Кристаллографічна площина	Міжплощинна відстань, Å	Середній розмір кристалітів, нм	Параметри кристалічної ґратки, нм	
					a	c
ZnS	28,42	008	3,14	18,35	0,38	2,50
	47,68	110	1,90	16,72	0,38	2,48
	56,24	118	1,61	28,99	0,38	2,48
ZnS-Alg	28,42	008	3,14	14,15	0,373	2,43
	47,68	110	1,91	12,43	0,374	2,47
	56,24	118	1,64	24,15	0,371	2,40

Зразки демонструють кристалічну модифікацію сульфїду цинку - вюрцит (12-688) [29].

Рентгеноструктурним аналізом було доведено зменшення кристалітів ZnS, синтезованого в присутності альгінату натрію. Відомо, що альгінат натрію виконує роль дисперсанта в розчині при синтезі та сприяє зменшенню ступеню агрегації утворюваних частинок ZnS, а значить і їх розміру. Частинки меншого розміру мають більший радіус кривизни поверхні, а також більшу поверхневу енергію, яка визначає їх активність [30]. Подальші дослідження протимікробної активності підтверджують даний факт.

Протимікробна активність

Протимікробна активність покриттів була визначена щодо мікроорганізмів *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli*, *K. pneumoniae*. Для дослідження та порівняння протимікробної активності були взяті зразки покриттів ZnS та ZnS-Alg. Ступінь протимікробної активності визначали величиною зони затримки росту бактеріальної культури через 24 та 48 годин експозиції пластин з покриттями на інокульованому агарі. Результати дослідження приведені на рис. 6 та в таблиці 2.

Наукові джерела дають два основні механізми протимікробної дії частинок сполук цинку: а) токсичний вплив іонів цинку на клітинну мембрану бактерій; б) токсичність ROS (реактивні частинки кисню), утворені за участю ZnO та ZnS, на компоненти бактеріальної клітини. Антибактеріальна активність є результатом утворення ROS, як перекис водню (H_2O_2), аніон пероксиду (O_2^-), гідроксильні радикали (OH^\cdot). Ці частинки пошкоджують клітинні компоненти, такі як ДНК, ліпіди та білки [31]. Позитивно заряджені іони цинку також можуть безпосередньо взаємодіяти з негативно зарядженими компонентами бактеріальної стінки. Композити, що містять ZnO, порушують цілісність клітинної мембрани, що призводить до пошкодження мембранних білків і ліпідного шару [32]. Аналіз експериментальних даних показав, що більш високу антимікробну активність проявляють ZnS-Alg покриття. Відомо, що антимікробні властивості наночастинок цинкових сполук забезпечуються, по-перше, їх високою реакційною здатністю, що визначається розміром (менше 100 нм) [33]. У

нашому експерименті введення альгінату у структуру призводить до зменшення розміру кристалітів, що може впливати на ступінь протимікробної дії. Також при розчиненні ZnS утворюється сульфідний аніон, в якому атом сірки має нерозділену пару електронів. Таким чином, даний аніон може утворювати донорно-акцепторні зв'язки з функціональними групами компонентів клітинної стінки бактерій, порушуючи їх метаболізм.

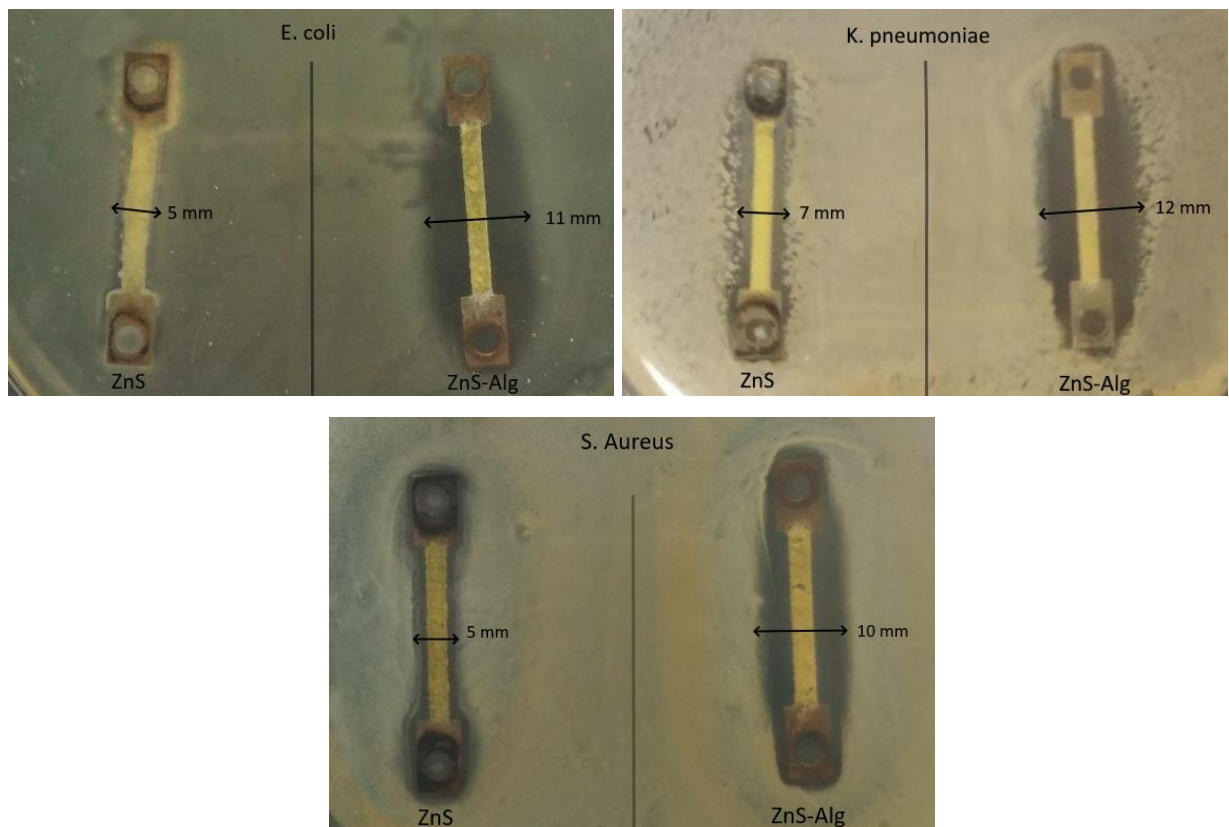


Рисунок 2.2 – Протимікробна активність ZnS та ZnS-Alg покриттів щодо *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*.

Таблиця 2.2 – Зони затримки росту бактеріальних культур під дією експериментальних покриттів

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

Дослідження порошків показало, що вибрані умови реакції для синтезу гібридних наночастинок є оптимальними для формування сферичних структур однакового розміру (рис. 2.3).

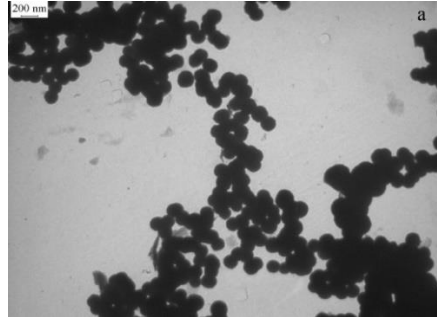


Рисунок 2.3 – TEM-зображення наночастинок ZnS-Alg

Оцінка антибактеріальних властивостей наночастинок ZnS-Alg по відношенню до тест-штамів бактерій показала високий ступінь бактерицидної активності зразка (табл.3).

Контрольна серія експериментів *in vitro* підтвердила відомий факт [34], що солі альгінової кислоти мають антибактеріальні властивості у відношенні до вибраних тест-культур. Порівняння ефекту альгінату та нанокомпозиту на ріст бактерій показав, що антибактеріальна активність Alg достовірно нижче наночастинок ZnS-Alg ($p < 0,05$). Результати також свідчать про те, що ZnS суттєво не впливає на ріст тест-культур ($p > 0,05$) (табл. 2.3).

Згідно даних табл. 2.3 наявність росту тест-культур після їх співкультивування з ZnS-Alg спостерігається для *S.aureus*, *S.epidermidis* та *P.aeruginosa*. Вказані штами були ізольовані з клінічного матеріалу за 96 годин до проведення тестування та мали експериментально доведену множинну стійкість до деяких антибіотиків: тетрацикліну, кліндаміцину, гентаміцину, еритроміцину, оксациліну.

Оцінка показників життєздатності тест-культур за результатами 4-х годинного їх культивування з ZnS-Alg та Alg показала, що при наявності в середовищі наночастинок ZnS-Alg кількість живих клітин достовірно зменшується в порівнянні з вихідною кількістю (10^2 КУО/мл). Звертає на

себе увагу той факт, що штами *Peptostreptococcus anaerobius*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* повністю припиняли свій ріст у середовищі з ZnS-Alg.

Таблиця 2.3 – Антибактеріальна активність ZnS-Alg, ZnS та Alg тестах *in vitro*

Тест-штам	Умови культивування: Поживне середовище		
	ZnS-Alg	ZnS	Alg
	Ступінь обсіменіння поживного середовища, (КУО/мл), М±m		
<i>S. aureus</i>	4,7±1,3	97±9,7	72±8,4
<i>S. epidermidis</i>	2±0,9	98±5,3	59,8±6,1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0	96±5,2	57,0±6,6
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	98±5,2	46,5±6,6
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	98±4,3	44,8±6,3
<i>Escherichia coli</i>	0	99±3,4	72,8±5,1
<i>Klebsiella pneumonia</i>	0	97±6,0	52,9±6,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,9±1,1	98±3,6	55,4±8,8

З ГІБРИДНІ КАЛЬЦІЙ ФОСФАТНІ ПОКРИТТЯ НА Тi6Al4V СУБСТРАТАХ, ЛЕГОВАНІ ІОНАМИ СРІБЛА ТА ВУГЛЕЦЕВИМИ НАНОЧАСТИНКАМИ

Метою роботи було отримання гібридних покриттів на анодованих Ti6Al4V субстратах, які містять гідроксиапатит (НА), хітозан (CS), а також домішки наночастинок фулерену C60 та срібла (Ag nano), іонів Ag⁺, а також лікарських засобів - хлоргексидину та диклофенаку натрію. До завдань відносяться дослідження структури покриттів, їх морфологічні особливості, антибактеріальні властивості та здатність до вивільнення лікарських засобів.

Функціональні медичні імплантати спрямовані на покращення процесу біоінтеграції при хірургічному оперуванні зламаних кісток. Для поліпшення біосумісності металевих імплантатів їх поверхні модифікують за допомогою функціональних покриттів, серед яких гідроксиапатит (НА) має високі біологічні властивості, та є близьким до природних апатитних кісток. Натуральний полімер CS з антибактеріальними властивостями є найкращим варіантом комбінування з неорганічним НА. У ході даної роботи модель титанового імплантату покрита методом термічної депозиції з розчину (TSD), який дає можливість отримувати біоміметичні покриття.

Актуальність дослідження: створення біоактивних покриттів, що мають подвійний корисний ефект: остеопрвідні властивості в поєднанні зі здатністю доставляти терапевтичні агенти, білки та фактори росту безпосередньо в зони імплантації.

Наукова новизна даної роботи полягає в тому, що вперше було отримано біоактивні апатит-полімерні покриття з вмістом фулерену C60 на титановому модельному імплантаті методом термічної депозиції.

Взаємодія імплантату з організмом людини в першу чергу відбувається через його поверхню. Тому поверхневі модифікації мають важливе значення для посилення біосумісних та остеопрвідних властивостей біоматеріалів для медичних застосувань. Розроблено численні методики для підвищення

сумісності поверхні імплантатів з кісткою. Серед них нанесення тонкого шару кальцій фосфатного (CaP) покриття виявилось ефективним підходом для забезпечення гарної біосумісності та хорошої остеопродності металічних імплантатів. CaP покриття підвищують біологічну сумісність поверхні, довготривалу стабільність імплантатів з подібними покриттями все ще є важливою проблемою. Проблема досягнення належної адгезії між покриттям та підкладкою, високі витрати, пов'язані з промисловими масштабами виробництва, є найбільш впливовими факторами в процесі інженерної обробки поверхні.

Оскільки більшість процесів осадження мають нерівноважний характер, дослідження складу нанесених покриттів, плівок та шарів є важливим завданням. Більше того, морфологія, структура і властивості поверхонь залежать від технології отримання покриттів. Тому вивчаються різні властивості, такі як ступінь кристалічності та/або аморфності, мікроструктура, морфологія поверхні, які залежать як від процесу осадження, так і від застосування методів попередньої і остаточної обробки.

Основною компонентою отриманих в ході роботи біосумісних покриттів є гідроксиапатит-хітозановий композит. В стоматології та імплантології синтетичний гідроксиапатит доволі широко використовується і грає велику роль, так само, як і в регенеративній медицині. Через нетоксичність та високу біосумісність з кістковими тканинами його застосовують, як замітник кістки. Однак із-за недостатніх механічних властивостей поєднують НА з полімерами. Одним з таких є лінійний полісахарид – хітозан. Він складається з випадково розподіленого – (1-4)-зв'язаного D-glucosamine (деацетильованого агрегату) та N-ацетил-D-глюкозаміну (ацетильованого агрегату). Завдяки деацетильованню хітину – структурного елемента клітинних стінок грибів та екзоскелета ракоподібних (наприклад, креветок та крабів), отримують хітозан, який має значно вищу розчинність. Для надання покриттям особливих заданих властивостей до складу композитного покриття було внесено частинки неорганічного

походження (фулерен, наночастинки срібла) та іони срібла, а також лікарський засіб – диклофенак натрію. Фулерен [35], є однією з кількох алотропних модифікацій карбону та має унікальну структуру, що складається з sp^2 рівнів вуглецю, які утворюють високу симетричну клітку. C₆₀ є акцептором електронів, який може прийняти до 6 електронів. C₆₀ також є окислювачем і може утворювати реактивні види кисню (ROS), зокрема, піддаючись опроміненню ультрафіолетовим випромінюванням. Його дисперсія може викликати антиоксидантні властивості в організмі, головним чином шляхом нейтралізації та/або приєднання АТФ і вільних радикалів. Водні суспензії C₆₀ проявляють відносно сильну антибактеріальну активність, яка залежить від розміру частинок: чим менший розмір тим більша антибактеріальна активність.

Іони срібла та наночастинки срібла були введені до складу покриттів з метою надання протимікробних властивостей. Їх антибактеріальні властивості загальновідомі [36].

Диклофенак натрію – це нестероїдний протизапальний засіб та знеболювальний засіб. Його властивості не пригнічують біосинтез протеогліканів у хрящовій тканині, за умови концентрацій, які еквівалентні фізіологічним розчинам.

Титанові (TiAl₆V₄) зразки були закріплені на мідних електродах за допомогою шурупів з нержавіючої сталі із силіконовими шайбами, розміщеними між мідними електродами та зразком. Через мідні електроди та зразки пропускали змінний струм (до 2 А), що призводило до нагрівання зразків. Температуру зразка вимірювали термопарою, яка контактувала з верхньою поверхнею контрольного зразка, що знаходився в референтній ємності з дистильованою водою.

Першим важливим етапом підготовки пластинок до покриття є їх анодування. Готується розчин для анодної обробки (300 мл), що складається з 32,6 мл H₂SO₄ (200 г/л) та 1,5 г NaF (0,5 %). В електрохімічній установці експериментальні титанові зразки є анодом, катодом виступає свинцева

пластина. Питома щільність струму дорівнювала 4 А/дм^2 . Оскільки загальна площа поверхні пластинки дорівнює $0,021 \text{ дм}^2$, то сила струму $0,08 \text{ А}$. Час анодування – 10-15 хвилин. Після цього пластинки промиваються під проточною водою.

З метою нанесення біоактивного НА-хітозанового покриття, зразки були занурені у ємність об'ємом 200 мл з маточним розчином наступного складу: $0,006 \text{ М Н}_3\text{РО}_4$, $0,01 \text{ М СаСл}_2$ та 3%-го хітозану. Покроковий процес приготування зображений на рис. 3.1.

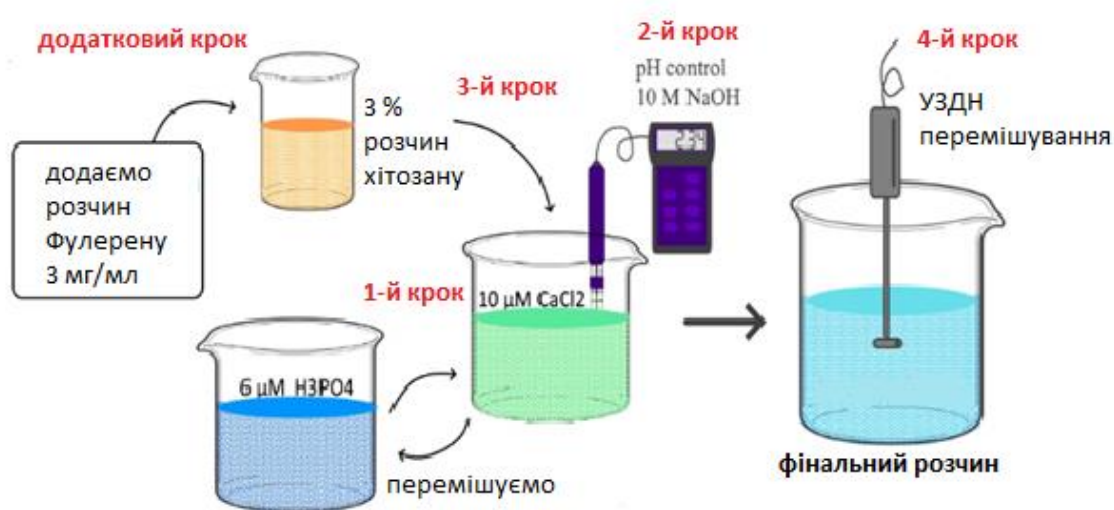


Рисунок 3.1 – Схема приготування маточного розчину

Для приготування 200 мл маточного розчину $0,22 \text{ г СаСл}_2$ розчинили в дистильованій воді та фільтрували за допомогою спеціального фільтрувального паперу. $0,082 \text{ мл}$ 85% ортофосфатної кислоти додавали до кальцію хлориду. Далі необхідно додати хітозан в розчин. Для цього, поступово розмішуючи, повільно додаємо до розчину $2,67 \text{ мл}$ 3 % хітозану ($100\text{-}300 \text{ кДа}$), попередньо приготувавши його розчиненням в 1% оцтовій кислоті при температурі 37 градусів та перемішуванні. Наступним кроком корегуємо рівень рН до заданого значення, а саме $6,43$ шляхом додавання NaOH. Дану суміш використовували для нанесення НА-CS покриття.

У випадку отримання покриття з вмістом фулерену 300 мкл C₆₀ додавали до розчину хітозану, та перемішували протягом 3 хв за допомогою ультразвукового диспергування. Вихідна концентрація фулерену складала 3 мг/мл. Подальші кроки в приготуванні розчину були аналогічними до вищеописаних.

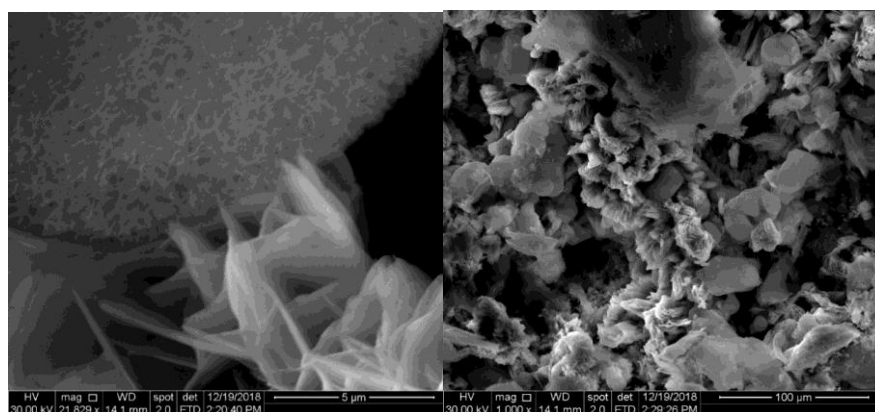
Осадження проводили протягом 32 хв при рН розчину 6,43 і температурі 100-103 °С. Температуру контролювали за амплітудою струму, і процес нанесення покриття припиняли вимкненням живлення.

Іони Ag⁺ та Ag наночастинки вводили до складу HA-CS покриттів шляхом їх насичення в 1 % водному розчині AgNO₃ та в розчині наночастинок срібла концентрацією 416 мг/л, відповідно.

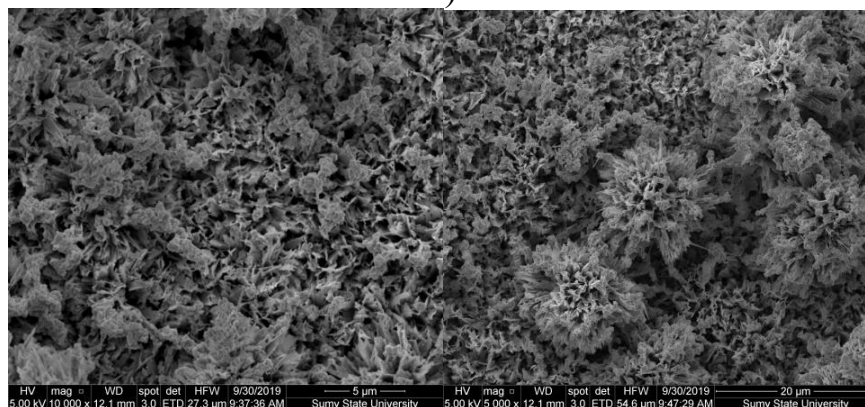
Вирішальним фактором osteointegraції біоінертних металевих імплантатів є стан їх поверхні, яка межує з кістковою тканиною пацієнта. Поверхня металічних імплантатів є біоінертною, що не стимулює інтеграцію імплантату в нативну кісткову тканину. Тому в ході даної роботи були створені та досліджені хітозан гідроксиапатитні покриття, які надають поверхні імплантату нових властивостей, а саме біосумісності та остеокондуктивності.

Осадження іонів кальцію та утворення фосфатного шару в фізіологічних умовах вважаються важливими кроками для ініціювання росту кісткоподібного апатиту на біосумісних імплантатах. Зв'язок між біоактивністю та розчинністю поверхні імплантату та утворенням апатитового шару (з концентрацією іонів, майже рівних концентрації в плазмі крові людини) часто трактується як перший показник його потенційної біоактивності *in vivo*.

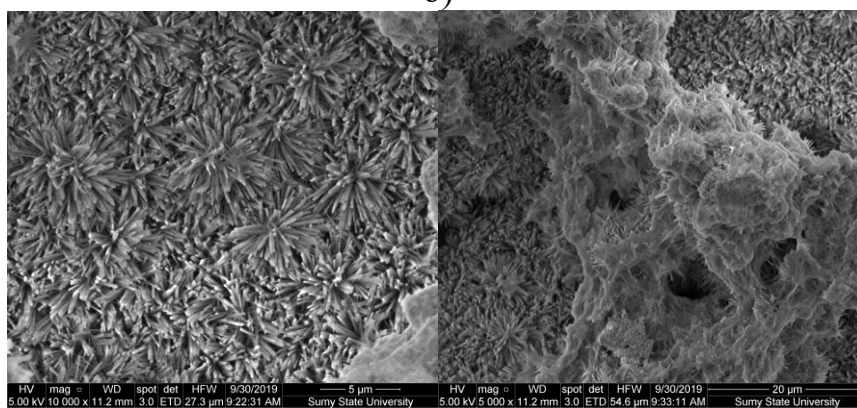
Дослідження морфології та кристалічної структури покриттів.



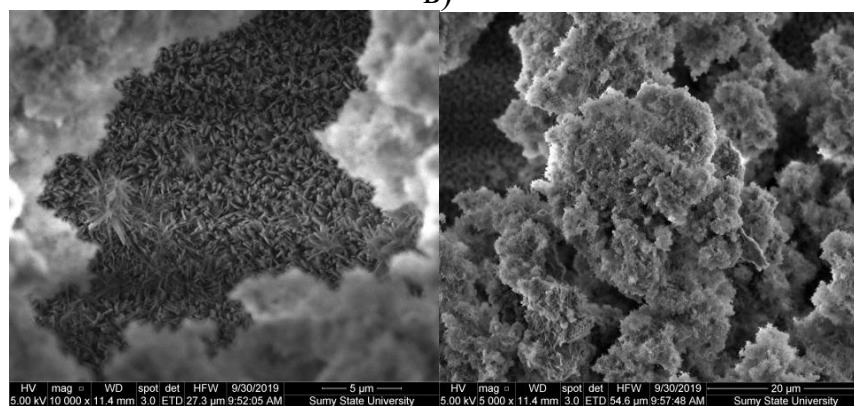
а)



б)



в)



г)

Рисунок 3.2 – Морфологія поверхні зразків під мікроскопом: а) HA-CS;

б) HA-CS-Ag⁺; в) HA-CS-nanoAg; г) HA-CS-C60

Скануюча електронна мікроскопія застосована для вивчення морфології поверхні зразків. Введення іонів срібла на щойно нанесене вологе покриття сприяє утворенню пористої структури. У присутності наночастинок срібла та фулерену C60 утворюється більш щільна комбінована структура основного покриття з менш щільними острівцевими включеннями (рис.3.2).

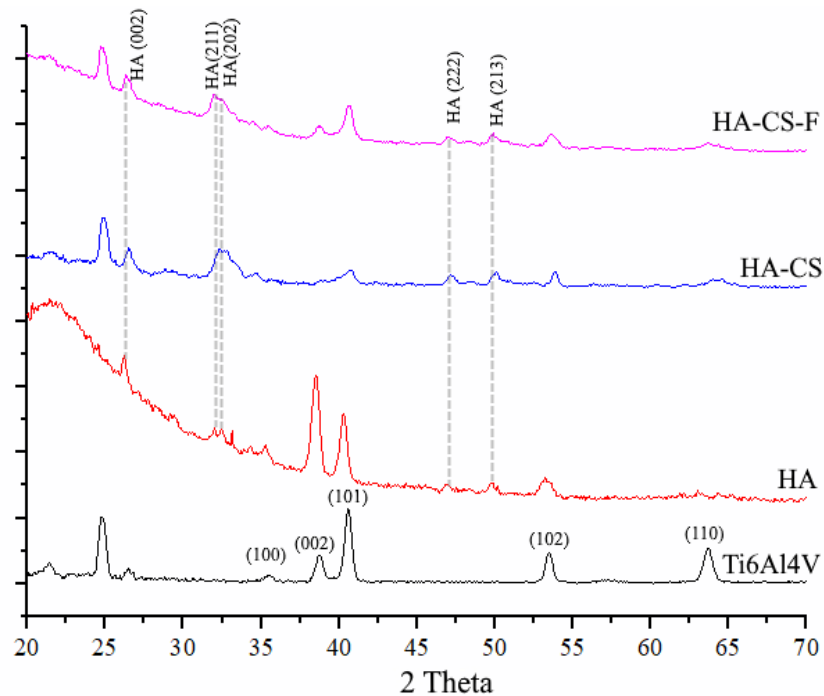


Рисунок 3.3 – Рентгенівські дифрактограми від титанової пластини без покриття та з HA, HA-CS, HA-CS-F покриттями.

Дифрактограми свідчать про утворення гідроксиапатиту на всіх досліджуваних пластинах. При цьому хітозан сприяє утворенню покриттів більшої товщини і, як результат, дифракційні піки HA мають більшу інтенсивність (рис. 3.3).

Визначення елементного складу покриттів методом рентгенофлуоресцентного аналізу (RFA)

Кількісна характеристика співвідношень та концентрацій елементів покриттів по трьом основним елементам Ca, P та Ti приведена в таблиці 3.1

Представлені значення є середніми арифметичними показниками всіх досліджуваних зразків.

Таблиця 3.2 – Елементний вміст та атомне співвідношення Ca/P в покриттях на основі гідроксиапатиту та хітозану.

Зразок	Атомне співвідношення	Концентрація, %		
	Ca/P	Ca	P	Ti
HA-CS	2,5	53,8	16,4	29,7
HA-CS-F	1,8	28,4	12,3	49,2
HA-Cs + Ag ⁺	1,3	17,2	10,6	76,7
HA-Cs + Ag nano	1,7	28,4	12,7	58,8

Результати свідчать, що підвищення концентрації фулерену в маточному розчині сприяє ефективності осадження покриття. Збільшується вміст кальцію і фосфору в осадженому шарі HA при однакових технологічних умовах. Товщина покриття у випадку вмісту фулерену в кількості 600 мкл у 200 мл маточного розчину, товщина покриття є вищою, про що свідчить зменшення процентного вмісту титану, за результатами рентгенофлюоресцентного аналізу.

Вплив технологічних умов на процес утворення HA-CS покриттів

Експериментальним шляхом було визначено, що кількісний показник компонентного складу осаджених покриттів змінюється залежно від рН розчину, температури та концентрації іонів прекурсорів. Переважаючим компонентом отриманих покриттів є кальцій дефіцитний HA (при $6,25 \leq \text{pH} \leq 6,43$). Це є оптимальне рН значення для отримання покриттів з HA. Спостерігалась пряма залежність структури та швидкості осадження покриття від рівня рН, а саме: за рівня $6,43 \leq \text{pH} \leq 6,73$ осадження відбувалось швидше, але структура поверхні ставала неоднорідною в результаті седиментації спонтанно утворених кальцій фосфатних частинок у об'ємі материнського розчину. При цьому товщина покриття зменшувалась в результаті збіднення розчину іонами кальцію та фосфору; за рівня $\text{pH} > 6,73$

седиментація і збідніння розчину відбувалось настільки швидко, що призводило до відсутності покриття. Таким чином, доведено, що при значеннях $pH > 6,43$ середня маса НА та НА-CS покриттів зменшується в 10 разів. В той же час додавання фулерену нівелює роль pH та сприяє більш ефективному осадженню НА-CS-FC60 покриття. В усіх дослідженнях виявлено, що вміст гідроксиapatиту у покриттях збільшується із збільшенням температури та часу нагрівання. При збільшенні часу при сталих показниках pH та температури було виявлено збільшення товщини покриття.

Дослідження біоактивності покриттів in vitro

Біомінералізація (біоактивність) ініціюється електростатичною взаємодією поверхневих функціональних груп з іонами кальцію та фосфатів у рідинах організму та контролюється властивостями самих покриттів CaP.

Біоактивність зразків визначали у розчині SBF (simulated body fluid). Це розчин, який за складом неорганічних компонентів імітує склад плазми крові. В даному розчині експериментальні зразки знаходились протягом 96 діб при фізіологічній температурі $37^{\circ}C$ та при постійному струшуванні у шейкері (60 об/хв). Біоактивність поверхні зразків оцінювали за їх реакцією на оточуюче середовище при pH 7,22 та 4,01. Відомо, що кістка людини перебуває в постійному процесі ремоделювання (резорбція-депозиція). Клітини остеокласти розчиняють кісткову тканину при кислому значенні pH (4,01), а клітини остеобласти будують нову кістку при нейтральному значенні pH (7,22). Можливість існування вказаних значень кислотності спонукала в даному експерименті проводити дослідження експериментальних зразків при вказаних значеннях кислотності.

Дослідження зразків до та після перебування в SBF довело їх біоактивність (рис. 3.4). В кислому середовищі маса покриття зразка НА-CS за 108 годин зменшилась на 1,2 %, в той час, як маса фулеренвмісного зразка зменшилась на 0,5 %. Зменшення маси відбулось з причини часткового розчинення гідроксиapatиту в кислому середовищі. При цьому втрата маси зразка з фулереном НА-CS-F була меншою в два рази порівняно до НА-CS.

Таким чином, фулерен зміцнює структуру покриття за рахунок міжатомних взаємодій з компонентами покриття. У випадку нейтрального середовища спостерігається збільшення маси обох досліджуваних зразків за рахунок осадження нового кальцій фосфатного шару з SBF. На поверхні фулерен-вмісного зразка HA-CS-F збільшення маси відбувається швидше, ніж для зразку HA-CS і становить 0,25% та 0,15 %, відповідно. Це означає, що фулерен C60 підвищує біоактивність поверхні покриття. Даний факт є ще одним додатковим підтвердженням вже доведеного факту позитивного впливу фулерену на осадження гідроксиапатиту на титановий субстрат.

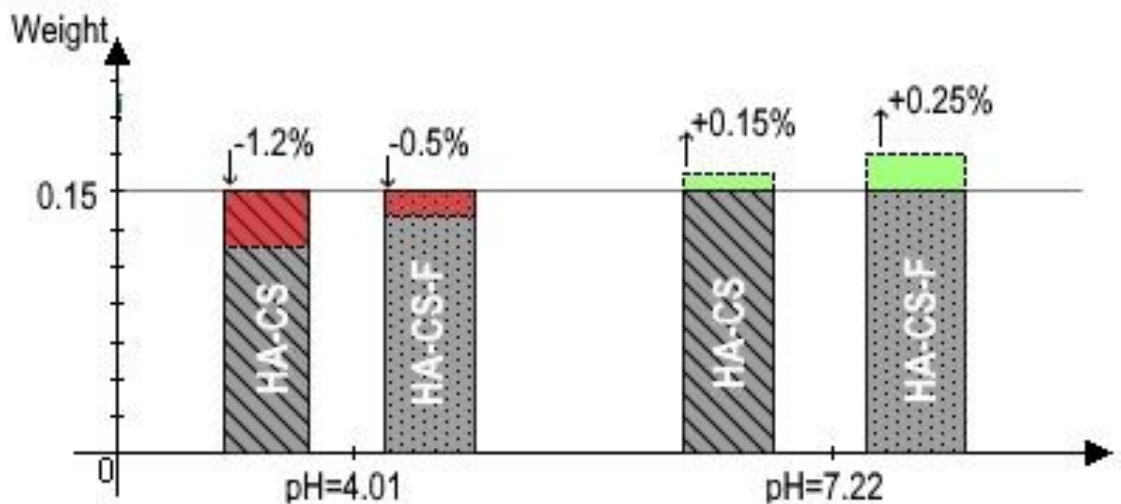


Рисунок 3.4 – Зміна біоактивності експериментальних зразків *in vitro* протягом 108 годин.

Динаміка вивільнення диклофенаку натрію з отриманих покриттів.

Дослідження вивільнення диклофенаку натрію, як модельного лікарського засобу, проводили методом ВЕРХ на зразках HA-CS (контрольний) та зразок HA-CS-F (з вмістом фулерену C60). Зразки були насичені лікарським засобом диклофенаком натрію (ДН) протягом 2 годин. Вимірювання концентрацій ДН у PBS розчині проводили через 1, 2, 3, 4, 24, 48, 72, 96 годин.

Результати дослідження показали два етапи вивільнення лікарського засобу, а саме від 0 до 4 годин та від 4 до 96 годин. Спостерігається стрімкий

реліз лікарського препарату на першому етапі дослідження: протягом перших чотирьох годин в кислому середовищі (рН 4.01) виділяється до 95 % ДН, а в нейтральному до 92 % з обох досліджуваних зразків. З огляду на невелику товщину покриття, адсорбція ДН в матеріалі покриття фактично є поверхневою. Маса адсорбованого лікарського засобу також є незначною. При цьому, за рахунок незначного розчинення гідроксиапатит-полімерної матриці в кислому середовищі дифузія ДН зі зразка в оточуючий розчин відбувається швидше, ніж в нейтральному середовищі (рН=7.22). Протягом другого етапу від 4 до 96 годин відбувається поступове вивільнення залишкового ДН, зв'язаного з компонентами покриття шляхом Н-водневих і/або Ван-дерваальсових взаємодій. Незважаючи на розведення, яке супроводжує процес відбору проби та додавання такої ж кількості свіжого PBS розчину, спостерігається збереження концентрації ДН у PBS з поступовим її зниженням. При цьому як в кислому, так і в нейтральному середовищі зменшення концентрації ДН у розчині відбувається швидше при кислих значеннях рН, ніж при нейтральних. Зі зразків з фулереном швидкість виділення лікарського засобу є меншою, в порівнянні до контрольних зразків НА-CS. Це вказує на додаткове зв'язування молекул ДН з молекулами фулерену. Таким чином, додавання фулерену сприяє пролонгованому вивільненню лікарського засобу.

Протимікробні властивості покриттів

Зважаючи на підвищену резистентність мікроорганізмів до широкого ряду антибіотиків в останнє десятиліття, вчені намагаються знайти альтернативні речовини в якості протимікробних засобів [37, 38]. Саме тому в даній роботі було застосовано частинки неорганічного походження, а саме фулерен C60, наночастинки та іони срібла в якості протимікробних агентів.

Механізм антимікробної дії C60 ще не зовсім вивчений. Літературні джерела свідчать про залежність протимікробної активності фулерену від розміру частинок, модифікації поверхні, оточуючих умов. Відомо, що молекули C60 здатні локалізуватися в багатих на ліпіди ділянках, таких як

клітинні мембрани. Відомо, що фулерен має окислювальні властивості і може утворювати реактивно здатні іони кисню (ROS). Вважається, що ROS бере участь у порушенні бактеріальної мембрани клітин та перекисному окисленні ліпідів [39]. На рис. 3.5 представлені результати протимікробної активності синтезованих в ході виконання роботи покриттів.

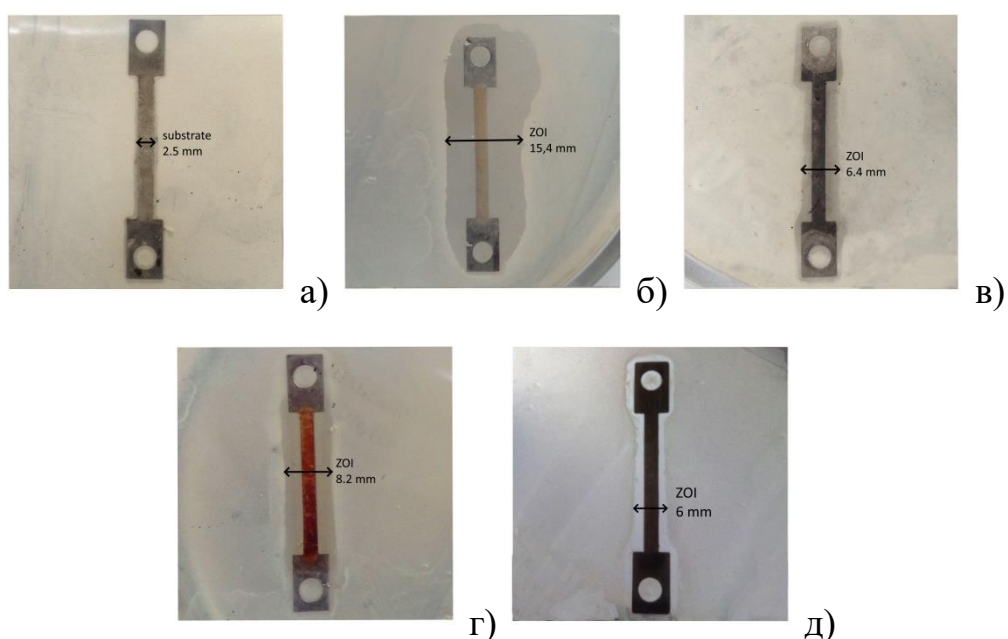


Рисунок 3.5 - Протимікробна активність зразків: а) HA-CS; б) HA-CS-CHX; в) HA-CS-Ag⁺; г) HA-CS-Agнано; д) HA-CS-F.

Протимікробна активність покриттів була визначена щодо мікроорганізму *S. aureus* (ATCC 25923). Для дослідження було взято 5 зразків. Покриття на основі гідроксиапатиту та хітозану було використано в якості контрольного; покриття HA-CS з вмістом фулерену; HA-CS покриття з вмістом іонів срібла (Ag⁺); HA-CS покриття з вмістом наночастинок срібла (Ag нано); покриття HA-CS з вмістом протимікробного лікарського засобу – хлоргексидину. Останній зразок був використаний для порівняння результатів протимікробної активності лікарського засобу та наночастинок неорганічного походження.

Результати свідчать, що найменшу протимікробну активність проявляє зразок HA-CS, який не містить додаткових протимікробних домішок.

Незначна протимікробна активність цього зразку відбувається завдяки присутності хітозану та пояснюються тим, що порушується метаболізм мікробної клітини та її загибель при приєднанні позитивно зарядженої протонованої NH_3^+ групи хітозану до її поверхні. Молекули хітозану, леговані іонами Ag^+ , мали вищий протимікробний ефект. Так, зразки НА-CS- Ag^+ та НА-CS Agnano (рис. 3.5) демонструють зони інгібування росту мікроорганізмів 6,4 мм та 8,2 мм, відповідно. Зразок з вмістом фуллерену також діє як протимікробний агент, забезпечуючи зону затримки росту мікроорганізмів 6мм. На даний момент, ведеться багато досліджень з визначення оптимальних концентрацій фуллерену для максимального антимікробного ефекту.

Найкращий показник протимікробної активності демонструє зразок з вмістом лікарського препарату хлоргексидину, зона затримки росту складає 15,4 мм. В деякій мірі це може бути пов'язано ще й з тим, що в хлоргексидин добре розчиняється в воді і його дифузія до мембрани мікробної клітини є більш інтенсивною в порівнянні до нерозчинних наночастинок фуллерену та срібла.

4 МОДЕЛЬНИЙ АПАТИТ-ПОЛІМЕРНИЙ КОМПОЗИТ З СОРБЦІЙНО- ДРЕНАЖНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

Однією з сфер застосування НА є створення на його основі адсорбуючих матеріалів для поглинання протеїнів, іонів металів, ексудатів при гнійно-запальних процесах. Загоєння ран - це біологічне явище організму, що включає послідовні біохімічні процеси, направлені на відновлення ушкодженого органу на клітинному рівні. Природні біологічно активні речовини при лікуванні ран знайшли велику увагу дослідників завдяки їх корисній природі та найменшим побічними ефектам [40].

Відомо, що реакції клітин, такі як прикріплення до поверхонь матеріалів, проліферація та фенотипові зміни, пов'язані з концентрацією, складом та конформацією шару білків, який спочатку адсорбується на синтетичних біоматеріалах [41]. До факторів, що впливають на адсорбцію білка поверхнею біоматеріалу, належать концентрація білка, його молекулярна вага, гідрофільність або гідрофобність адсорбуючого матеріалу, наявність функціональних груп, розмір кристалітів, тощо. Найважливішим параметром вихідного НА є молярне співвідношення між вмістом кальцію та фосфору Ca/P. Для стехіометричного гідроксиапатиту $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, характерне значення Ca/P становить 1,67. Було встановлено [42]. Зниження цього співвідношення (Ca/P), як правило, спричинене падінням вмісту іонів кальцію порівняно з фосфором, який зберігає нейтральний електричний заряд усієї кристалічної решітки завдяки заміні іонів. Застосовані полісахариди природного походження (Alg, CS) надають синтезованому матеріалу гідрофільності завдяки поверхневим кисневмісним групам: гідроксильній, карбонільній, карбоксильній. Висока сорбційна здатність гідроксиапатиту та полісахаридів дозволяє іммобілізувати лікарський засіб в структурі композиту. Сорбційні матеріали цікаві не тільки в ролі детоксикантів, використовуваних для видалення токсичних агентів з рідких середовищ, але і в якості носіїв для доставки в зони терапевтичного впливу

біологічно активних речовин (антибіотиків, антисептиків, цитостатиків, ферментів). Системи доставки лікарських засобів корисні для зменшення побічних ефектів ліків та максимізації дії препарату [43]. Потреби людей у загоєнні ран та комфорті під час лікування продовжують зростати разом з вимогами до ефективних дренажних матеріалів.

Дотепер недостатньо вивчені можливості місцевого використання сорбентів у лікуванні гнійних порожнин, хоча існує багато ґрунтовних досліджень стосовно їх застосування в лікуванні нагноєнь інших локалізацій. Дослідники вказують на сорбційну здатність різних медичних засобів стосовно мікробних тіл, токсинів, продуктів тканинного розпаду, котра поєднується із відсутністю побічних дій. Серед них представляється перспективним для використання у хірургічному лікуванні гнійних порожнин сорбційний біоматеріал на основі НА, який має виражену сорбційну здатність, є біосумісним та біоактивним.

Його можливо застосовувати в поєднанні з біоактивними речовинами та лікарськими препаратами, які мають антибактеріальну та протизапальну дію. Метою даної роботи є створення та дослідження сорбційного біоматеріалу на основі гідроксиапатиту, цинку та біополімерів, який має виражену сорбційну здатність, антибактеріальні властивості, є біосумісним та біоактивним. Матеріал буде застосовуватись у вигляді аплікаційного шару товщиною ≤ 2 мм на силіконових трубках, які наразі використовуються в медицині, зокрема в хірургії для лікування гнійно – некротичних вогнищ різного генезу.

Очікується, що нанесення на зовнішню поверхню робочої частини аспіраційної силіконової трубки біорезорбційного композитного матеріалу на основі НА, який відзначається високою біологічною сумісністю та сорбційними властивостями, дозволить покращити санацію гнійно-некротичних вогнищ та зменшити їх патологічний вміст. Для підвищення терапевтичної ефективності дренажних сорбентів їх дегідратаційний ефект доцільно доповнити шляхом введення речовин з антимікробною,

екролітичною та місцевою анестезуючою дією. Протимікробні властивості, надані створюваному біоматеріалу вмістом оксиду цинку та лікарського засобу Цефтріаксону активно пригнічуватимуть анаеробні та аеробні патогенні мікроорганізми та зменшуватимуть інтоксикацію.

В процесі роботи були використані такі матеріали та хімічні речовини: натрію альгінат (E401) з молекулярною масою 15,0 кДа; хітозан (Мм 300 кДа, Acros organics, США), оксид цинку ZnO (синтезований в лабораторії «Біонанокомпозит» СумДУ), кальцію нітрат тетрагідрат $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, гідрофосфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 25% водний розчин аміаку NH_4OH , глутаральдегід, хлорид кальцію CaCl_2 (виробництво Китай); комерційно доступні фармацевтичні препарати гліцерин, антибіотик Цефтріаксон; амінокислота Триптофан (компанія "Merck").

Гідрогель гідроксиапатиту отримували за описаною раніше технологією [44]. Цинку оксид (ZnO) було синтезовано за технологічних умов, які повідомлялись в роботі [45]. Висушені продукти подрібнювали і пропускали через сито для отримання дрібнодисперсного порошку HA та ZnO з розміром частинок ≤ 63 мкм. Порошкоподібну суміш синтезованого гідроксиапатиту та оксиду цинку (співвідношення 10:1, 10:1.5, 10:2) додавали до 3% розчину альгінату натрію. Отриману суспензію ретельно перемішували ультразвуком і виливали в спеціально підготовлену форму з внутрішньою синтетичною трубкою (труба в трубі). Зразки заморожували та ліофілізували при -53°C протягом 24 годин. Утворений проміжний матеріал мав форму пористого Alg-HA композиту, нанесеного на силіконову трубку. Після ліофілізації зразкам було надано структурної стабільності та механічної міцності шляхом хімічного «зшивання» (cross-linking) полімерних макромолекул Alg та CS, яке проводили в два етапи. На першому етапі проміжний Alg-HA композит був занурений в розчин хітозану (1% розчин в 1% розчині оцтової кислоти) з метою утворення механічно та структурно стабільного Alg-CS поліелектролітного комплексу. В основі вказаного хімічного процесу лежить взаємодія протонованої в кислому середовищі

аміногрупи (NH_3^+) хітозану та карбоксильної (COO^-) і гідроксильної (OH^-) функціональних груп альгінату. На другому етапі зразки були зшиті в суміші $0,1 \text{ M CaCl}_2$ та $0,5\%$ глутаральдегіду для додаткового зв'язування макромолекул Alg та CS, відповідно. Після промивки дистильованою водою зразки сушили при кімнатній температурі до повного висихання. Зразки були названі HA-Zn10, HA-Zn15, HA-Zn20 (в залежності від вмісту цинку). В якості контрольного був синтезований зразок, у якому неорганічна фаза представлена лише HA без вмісту ZnO. Цей контрольний зразок був позначений, як HA.

Біополімерна частина дренажу (композит) являє собою порожнисту трубку з внутрішнім діаметром 4 мм і зовнішнім діаметром 5 мм . Мінеральний компонент (HA, ZnO), а також застосована технологія іонотропного зшивання органічних макромолекул (Alg, CS) з іонами кальцію та молекулами глутарового альдегіду надають матеріалу механічної міцності та структурної стабільності.

Визначення оптимального співвідношення органічних та неорганічних компонентів

Визначення оптимального співвідношення органічних та неорганічних компонентів створеного біоматеріалу було проведено відпалом ряду синтезованих зразків з різним співвідношенням органічної та неорганічної складових при температурі 750°C протягом однієї години. Результати довели, що для надання матеріалу необхідної еластичності, пористості, заданого ступеню набрякання та структурної стабільності, оптимальне співвідношення [Alg+CS]:[HA+ZnO] становить 3:1, відповідно.

Оскільки синтезований матеріал може знаходитись в живому організмі до 3 діб, він має залишатись одночасно структурно стабільним та мати хороші адсорбційні властивості. Останній фактор залежить як від структури матеріалу, а саме його пористості, та і від ступеню набрякання. В ході роботи було визначено, що регулювання концентрацій зшиваючих речовин (хлорид кальцію, глутаровий альдегід), компонентного вмісту матеріалу,

застосування технології сублімації при синтезі, дозволяють впливати на ступінь набрякання та пористість матеріалу.

Аналіз отриманих даних від електронної мікроскопії та від розрахунку пористості (табл. 4.1) показує, що з додаванням ZnO структура композиту змінюється в бік зменшення пористості на 4-5% в порівнянні до контрольного (без ZnO) зразку.

Таблиця 4.1 – Пористість синтезованих матеріалів. $p \leq 0,05$

Зразок	HA_contr	HA_Zn10	HA_Zn15	HA_Zn20
Пористість,%	33,3±1,3	29,4±1,25	27,4±1,0	28,6±1,2

При цьому, додавання ZnO в кількості 10% від вмісту ГА зменшує розмір пор з одночасним збільшенням їх кількості, що, в свою чергу, дещо збільшує сумарну площу поверхні пор. Тому у даному зразку пористість дещо вища в порівнянні зі зразками, які містять 15 та 20 % ZnO. Даний факт добре корелює з розрахованим ступенем набрякання зразків в розчині PBS протягом 3 діб (табл. 4.2).

Таблиця 4.2 – Ступінь набрякання синтезованих матеріалів у розчині PBS.

Зразок	Ступінь набрякання, %				
	1 h	2 h	24 h	48 h	72 h
HA_Zn10	402	508	578	632	670
HA_Zn15	327	389	458	494	534
HA_Zn20	351	383	474	499	539
HA_contr	547	581	736	799	899

Результати свідчать, що найбільший ступінь набрякання демонструє контрольний зразок без вмісту ZnO. З одного боку, збільшення ступеню набрякання свідчить про вищу потенційну здатність зразків до адсорбції і це є позитивним моментом. З іншого боку було доведено, що додавання ZnO

покращує структурну цілісність матеріалу в умовах фізіологічного розчину. Крім того, оксид цинку володіє протимікробними властивостями і може бути альтернативою антибіотикам, до яких в останній час спостерігається резистенція ряду мікроорганізмів. Тому результати даного тесту свідчать, що найбільш оптимальним є 10% -ний вміст ZnO в композиті.

Дослідження протимікробних властивостей.

Протимікробні властивості синтезованого матеріалу визначали щодо ряду мікроорганізмів, які найбільш частіше зустрічаються в перитонеальному випоті - *E.coli* ATCC 25922, *Kl.pneumoniae*, *S. Aureus* ATCC 25923. Облік результатів визначення чутливості проводився диско-дифузійним методом EUCAST.



Рисунок 3.1 – Зони пригнічення росту мікроорганізмів а) *E.coli*;
б) *Kl.pneumoniae*; в) *S. Aureus* в присутності зразків: 1 - HA-Zn10, 2 - HA-Zn15, 3 - HA-Zn20, 4 - HA-контроль.

ВИСНОВКИ

Доведено, що застосування мікрохвильового випромінювання на стадії синтезу суттєво скорочує час формування гідроксиapatиту, а саме з 24 годин за класичним методом конвекційного нагрівання до 15 хвилин за дії MW. При цьому XRD дані свідчать про ідентичність кристалічних параметрів HA, отриманого обома видами синтезу. Зі збільшенням потужності MW середній розмір кристалітів HA, утворених у присутності хітозану, зменшується від 31 нм (300 Вт) до 24 нм (800 Вт), а ступінь набрякання збільшується від 17 до 31 %. Композити на основі HA та CS можуть виконувати роль систем доставки лікарських засобів з пролонгованим їх вивільненням. Застосування MW потужності 800 Вт при синтезі збільшує термін вивільнення Анестезину з їх складу на 10 діб у порівнянні з конвекційним методом.

Золь-гель методом були отримані ZnS та ZnS-Alg порошки, а метод термічної депозиції був застосований для отримання ZnS та ZnS-Alg покриттів з протимікробними властивостями на модельних титанових субстратах. Метод рентгенівської дифракції довів, що застосування альгінату натрію в якості дисперсанта при синтезі порошків та утворенні покриттів сприяє зменшенню розмірів кристалітів цинку сульфіді завдяки значно більшій кількості центрів кристалізації ZnS частинок в присутності макромолекул альгінату. Доведена протимікробна активність ZnS та ZnS-Alg при застосуванні як у вигляді порошків, так і у вигляді покриттів. При чому, вищий ступінь протимікробної активності демонструють ZnS порошки та ZnS покриття з вмістом альгінату.

Основний механізм антибактеріальної дії синтезованих гібридних порошків та покриттів на основі наночастинок ZnS-Alg пов'язаний з розвитком оксидативного стресу, який зумовлений взаємодією нанокристалів ZnS з клітинами мікроорганізмів. Наявність біополімеру у структурі ZnS-Alg може забезпечити специфічні електростатичні взаємодії з компонентами

мембран, і є додатковим фактором адсорбції квантових точок на поверхні бактеріальних клітин.

Було експериментально встановлено, що підвищення концентрації фулерену в маточному розчині сприяє підвищенню ефективності осадження покриття. Рентгеноструктурним аналізом визначено елементний склад покриттів; збільшення рН впливає на швидкість осадження НА-CS покриттів. Значення $6,25 \leq \text{pH} \leq 6,42$ - є оптимальним для отримання покриттів з НА. Їх середня маса зменшується в 10 разів при значеннях рН більше ніж 6,43. В той же час додавання фулерену нівелює роль рН та сприяє більш ефективному осадженню НА-CS-F покриття; фулерен C60 підвищує біоактивність поверхні покриття. Тест у фізіологічному PBS розчині довів біоактивність всіх зразків.

Додавання фулерену стабілізує структуру покриття та сприяє пролонгованому вивільненню лікарського засобу. Додавання наночастинок фулерену C60, наночастинок та іонів срібла надає отриманим покриттям протимікробних властивостей. Найменшу протимікробну активність проявляє зразок без додавання наночастинок (НА-CS), а найбільшу – зразок з додаванням хлоргексидину;

Був досліджений дренажно-сорбційний композит, представлений шаром нанесеного сорбційного матеріалу на перфоровану силіконову трубку. Хімічний склад сорбційного матеріалу представлений неорганічними (НА, ZnO) та органічними (CS, Alg, глутаральдегід, гліцерин) компонентами. Доведено, що застосовувана технологія іонотропного зшивання та сублімації, а також хімічний склад матеріалу надають йому стійкості та дозволяють контролювати ступінь набрякання та пористості. Додаткове введення засобів з антимікробною дією (хітозан, оксид цинку) забезпечує інгібування бактеріальних клітин в умовах запущеного перитоніту. Композиційний матеріал гідрофільний. Ступінь набрякання матеріалу, що характеризує його сорбційну здатність, становить 240-380%. Додавання оксиду цинку значно

зменшує ступінь набрякання (240% порівняно з 542% для зразка, що не містить ZnO), і пористість (16,2% та 32,0% відповідно).

Доведено, що використання композиту, що містить НА, є ефективним для дренажу гнійних порожнин. Завдяки фізико-хімічним, включаючи сорбційні властивості НА та органічних компонентів, створений дренажно-сорбційний композит зменшує фазу ексудації, проявляє детоксикаційні та антибактеріальні властивості.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Миркин Л.И. Рентгеноструктурный анализ. Получение и измерение рентгенограмм: Справочное руководство. Москва: Наука, 1976. 326 с.
2. Slepshkin V. et al. Possibilities of Prevention of Insolvency Colonic Anastomosis by means of Infusion Therapy in the Preoperative Period and during the Operation (brief message). *J. New Med. Technol.* 2014. Vol. 21, № 4.3
3. Sukhodub L.B., Sukhodub L.F., Prylutsky Yu.I., Strutynska N.Yu., Vovchenko L.L., V.M. Soroca, N.S. Slobodyanik, N.G. Tsierkezos, U. Ritter Composite material based on hydroxyapatite and multi-walled carbon nanotubes filled by iron: Preparation, properties and drug release ability. *Mater. Sci. Eng. C.* 2018. Vol. 93
4. Raval N.C. et al. 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. Vol. 17, 6.
5. Эппле М. Биоматериалы и биоминерализация: [пер. с нем. под ред В.Ф.Пичугина и др.] Томск: Ветер, 2007. 165с.
6. Demirtas T., Karakecili A., Gumusderelioglu M. Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites:synthesis and in-vitro characterization. *J. Mater Sci: Mater Med.* 2008. V.19, 5. 729.
7. Zhixia Li, Masakazu Kawashita. Current progress in inorganic artificial biomaterials. *J Artif Organs.* 2011. V.14. P.163–170.
8. Chernousova S., Epple M. Bioactive bone substitution materials. *Advanced Biomaterials and devices in Medicine.* 2014. V. 1. P. 74-87.
9. Zhanga Q., Chena J., Fenga J., Caoa Y., Denga C., Zhanga X. Dissolution and mineralization behaviors of HA coatings. *Biomaterials.* 2003. V. 24. P. 4741-4748.

10. Bojar W., Kucharska M., Ciach T., Koperski Ł., Jastrzębski Z., Szałwiński M. Bone regeneration potential of the new chitosan-based alloplastic biomaterial. *J. Biomater. Appl.* 2014. V. 28. P. 1060-1068.
11. Matassi, F., Nistri, L., Paez, D. C., Innocenti, M. New biomaterials for bone regeneration. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*, 2011. Vol. 8(1), 21.
12. Doi K., Kubo T., Takeshita R., Kajihara S., Kato S., Kawazoe Y., Shiba T., Akagawa Y. Inorganic polyphosphate adsorbed onto hydroxyapatite for guided bone regeneration: An animal study. *Dental Materials Journal* 2014. V. 33(2). P.179-186.
13. Amaral, I. F., Granja, P. L. Barbosa, M. A. Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 2005. Vol. 16, №. 12. p. 1575-1593.
14. Aiedeh, K. M., Taha, M. O., Al-Hiari, Y., Bustanji, Y., and Alkhatib, H. S. / Effect of ionic crosslinking on the drug release properties of chitosan diacetate matrices / *J. Pharm. Sci.* 2007. V.96(1). P.38–43.
15. Sukhodub, L.F., Sukhodub, L.B., Simka, W., Kumeda, M. Hydroxyapatite and brushite coatings on plasma electrolytic oxidized Ti6Al4V alloys obtained by the thermal substrate deposition method. *Materials Letters*. 250, c. 163-166.
16. Sahayaraj K. Novel biosilver nanoparticles and their biological utility: an overview. *Int. J. Pharmacy*, 2014. vol. 4, pp. 26-39.
17. Gupta A., Landis R.F., Rotello V.M. Nanoparticle-based antimicrobials: Surface functionality is critical. *F1000Res.*, 2016. vol. 5, pp.364.
18. Beyth N., Houry-Haddad Y., Domb A., Khan W., Hazan R. Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, 2015. vol. 2015, pp. 246012.
19. Pelgrift R.Y., Friedman A.J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013. vol. 65, Iss. 13-14, pp.1803-1815.

20. Xie, X., Mao, C., Liu, X., Tan, L., Cui, Z., Yang, X., Wu, S. Tuning the Bandgap of Photo-Sensitive Polydopamine/Ag₃PO₄/Graphene Oxide Coating for Rapid, Noninvasive Disinfection of Implants. *ACS Central Science*, 2018. 4(6), 724–738.

21. Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl Phys Lett*. 2007. Vol. 90, 2139021–3.

22. Ronen, A., Semiat, R., Dosoretz, C.G., Antibacterial efficiency of a composite spacer containing zinc oxide nanoparticles. *Procedia Engineering*, 2012. 44581–582.

23. Yuan Li, Xiangmei Liu, Lei Tan, Zhenduo Cui, Xianjin Yang, Yufeng Zheng, Kelvin Wai Kwok Yeung, Paul K. Chu, and Shuilin Wu. Rapid Sterilization and Accelerated Wound Healing Using Zn²⁺ and Graphene Oxide Modified g-C₃N₄ under Dual Light Irradiation. *Advanced Functional Materials*, 2018. Vol. 28(30), 1800299.

24. Moore, Bailey & Asadi, Ebrahim & Lewis, Gladius. Deposition Methods for Microstructured and Nanostructured Coatings on Metallic Bone Implants: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2017. 1-9.

25. K. Singh, K. Sharma, M. Kumer et al. Red luminescent manganese-doped zinc sulphide nanocrystals and antibacterial study. *J. Mater. Chem. B*, 2014. Vol. 2, pp. 522-528.

26. Suyana P., Kumar S.N., Kumaret B.S.D. Antifungal properties of nanosized ZnS particles synthesised by sonochemical precipitation, *RSC Adv.*, 2014. Vol. 4, pp. 8439-8445.

27. Raza H., Khani O., Shamsipur M., Vatanpour V. High-performance pure and Fe₃⁺-ion doped ZnS quantum dots as green nanophotocatalysts for the removal of malachite green under UV-light irradiation. *J. Hazard. Mater.*, 2013. Vol. 250-251, pp. 370-378.

28. Sukhodub L., Panda A., Suchodub L., Kumeda M., Dyadyura K., Hydroxyapatite And Zinc Oxide Based Two-Layer Coating, Deposited On Ti6Al4v

Substrate. Modern Machinery (MM) Science Journal, 2019. Vol. 2019, p.3494-3499.

29. Selected powder diffraction data for educations training (Search manual and data cards), Published by the International Centre for diffraction data, 432 (1997).

30. Ganguly S., Ghosh B., Das S., Dastidar S.G. Experimental evaluation of antimicrobial potentiality of chemically synthesized ZnS nanoparticles. JCBPS, 2015. Section A, vol. 5, №. 2, pp. 1171-1179.

31. Pogrebnyak, A., Sukhodub, L., Sukhodub, L., Bondar, O., Kumeda, M., Shaimardanova, B., Turlybekuly, A. Composite material with nanoscale architecture based on bioapatite, sodium alginate and ZnO microparticles. Ceramics International, 2019. Vol.45(6), c. 7504-7514.

32. Padmavathy N, Vijayaraghavan N. Interaction of ZnO nanoparticles with microbes - A physio and biochemical assay. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2011. V.7 (6). P. 813-822.

33. Malarkodi, C., Annadurai, G. A novel biological approach on extracellular synthesis and characterization of semiconductor zinc sulfide nanoparticles. Applied Nanoscience, 2013. Vol. 3, 389-395.

34. X. Hu, X. Jiang, J. Gong et al. Antibacterial activity of lyase-depolymerized products of alginate. J. Appl. Phycol., 2005. Vol. 17, Iss.1, pp. 57-60.

35. Sukhodub, L. B., Sukhodub, L. F., Kumeda, M. O., Prylutska, S. V., Deineka, V., Prylutsky, Y. I., Ritter, U. C60 fullerene loaded hydroxyapatite-chitosan beads as a promising system for prolonged drug release. Carbohydrate Polymers, 2019. Vol. 223, 115067.

36. Суходуб Л. Б. Протимікробна активність наночастинок хітозану, легованих Ag^+ , Cu_2^+ , Zn_2^+ , Mg_2^+ іонами. ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України». 2015.

37. Geng, Z., Wang, R., Zhuo, X., Li, Z., Huang, Y., Ma, L., Yang, X. Incorporation of silver and strontium in hydroxyapatite coating on titanium surface

for enhanced antibacterial and biological properties. *Materials Science and Engineering*, 2017. № 71, 852–861.

38. Vranceanu, M. Parau, Anca Cotrut, Mihai Cosmin Kiss, Adrian Constantin, Lidia Braic, V., Vladescu, A. In vitro evaluation of Ag doped hydroxyapatite coatings in acellular media. *Ceramics International*, 2019. Vol. 45, 11050-11061.

39. Goodarzi, S., Da Ros, T., Conde, J., Sefat, F., Mozafari, M. Fullerene: Biomedical engineers get to revisit an old friend. *Materials Today*, 2017. Vol.20(8), 460-480.

40. Sukhodub L. Antimicrobial activity of Ag^+ , Cu_2^+ , Zn_2^+ , Mg_2^+ ions doped chitosan nanoparticles. *Ann. Mechnikov Institute*, 2015. Vol. 1. P. 39-43.

41. Fernández-Montes Moraleda B., Román J.S., Rodríguez-Lorenzo L.M. Influence of surface features of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant to bone regeneration. *J. Biomed. Mater. Resource*, 2013. Vol. 101A, № 8.

42. Skwarek E., Janusz W., Sternik D. The influence of the hydroxyapatite synthesis method on the electrochemical, surface and adsorption properties of hydroxyapatite. *Adsorpt. Sci. Technology*, 2017. Vol. 35, № 5-6.

43. Kojima C., Watanabe K. Adsorption and Desorption of Bioactive Proteins on Hydroxyapatite for Protein Delivery Systems. *J. Drug Deliv.* 2012. Vol. 2012.

44. Leonid F. Sukhodub, Liudmyla B. Sukhodub, Olena Litsis, Yuriy Prylutskyy Synthesis and characterization of hydroxyapatite-alginate nanostructured composites for the controlled drug release. *Mater. Chem. Phys.*, 2018. Vol. 217.

45. Pogrebnyak, A., Sukhodub, L., Sukhodub, L., Bondar, O., Kumeda, M., Shaimardanova, B., Turlybekuly, A. (). Composite material with nanoscale architecture based on bioapatite, sodium alginate and ZnO microparticles. *Ceramics International*, 2019. Vol. 45(6), 7504-7514.