Восточно-Казахстанский государственный технический университет имени Д. Серикбаева

УДК 538.95:620.18

На правах рукописи

ТҰРЛЫБЕКҰЛЫ АМАНЖОЛ

Исследование наноструктурированных апатит-биокомпозитных материалов и покрытий

6D072300 –Техническая физика

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научные консультанты
доктор физ.-мат. наук, профессор
Плотников С.В.
доктор физ.-мат. наук, профессор
Погребняк А.А.

Республика Казахстан
Усть-Каменогорск, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ 4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ 5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ 6
ВВЕДЕНИЕ 8
1 ПОЛУЧЕНИЕ БИОКОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ПОКРЫТИЙ 14
1.1 Основные применяемые материалы в современной ортопедии 14
1.2 Фосфаты кальция, биологический апатит и костная ткань 18
1.3 Наночастицы оксида цинка 25
1.3.1 Общая характеристика ZnO 26
1.3.2. Кристаллическая структура ZnO 27
1.3.3 Антибактериальная активность и механизм токсичности наночастиц ZnO 29
1.4 Постановка цели и задач исследования 32
2 ОБОРУДОВАНИЕ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ БИОКОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА И ПОКРЫТИЙ С НАНОРАЗМЕРНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ НА ОСНОВЕ БИОАПАТИТА, АЛЬГИНАТА НАТРИЯ И МИКРОЧАСТИЦ ZnO 34
2.1 Методы получения биокомпозитных материалов на основе гидроксиапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO с наноразмерной архитектурой 34
2.1.1.Получение ГА в виде порошка и гидрогеля 34
2.1.2.Получение композита ГА-ZnO 36
2.1.3.Получение композитов ГА-Алг-ZnO и ГА-Алг 37
2.2 Методы исследования антибактериальных свойств и биосовместимости апатит – биокомпозитных материалов и покрытий 37
2.2.1 Исследования антимикробной активности 37
2.2.2 Методы определения биосовместимости и цитотоксичности материалов 38
2.3 Методы получения металлических биомиметических структур и нанесения апатит композитных покрытий 40
2.3.1 Метод получения пористых металлических подложек селективным лазерным плавлением. Получение биомиметических цифровых структур 40
2.3.2 Метод нанесения покрытий на пористые трабекулярные металлические структуры гидротермальным осаждением 44
2.3.3 Метод нанесения покрытий на пористые трабекулярные металлические структуры микроплазменным напылением 45
Выводы по разделу 2……. 47
3 ИССЛЕДОВОВАНИЕ КОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА С НАНОРАЗМЕРНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ НА ОСНОВЕ БИОАПАТИТА, АЛЬГИНАТА НАТРИЯ И МИКРОЧАСТИЦ ZnO 48
3.1 Морфология и элементный состав композитного материала с

наноразмерной архитектурой на основе биоапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO 49
3.2 Исследование фазового состава, функциональных групп композитного материала с наноразмерной архитектурой биоапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO 63
Выводы по разделу 3 70
4 НАНЕСЕНИЕ КАЛЬЦИЙ-АПАТИТНЫХ ПОКРЫТИЙ НА ПОРИСТЫЕ СТРУКТУРЫ ИЗ 316L И Ti6Al4V МЕТОДАМИ ГИДРОТЕРМАЛЬНОГО ОСАЖДЕНИЯ И МИКРОПЛАЗМЕННОГО НАПЫЛЕНИЯ 71
4.1 Био-функциональное композиционное покрытие апатита кальция и ZnO методом гидротермального осаждения на печатную пористую структуру 72
4.2 Био-функциональное покрытие апатита кальция полученное методом микроплазменного напыления на печатную пористую структуру 78
Выводы по разделу 4 83
5 АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА, ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И БИОССОВМЕСТИМОСТЬ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ С НАНОРАЗМЕРНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ ОСНОВЕ БИОАПАТИТА, АЛЬГИНАТА НАТРИЯ И МИКРОЧАСТИЦ ZnO И ИХ ПОКРЫТИЙ 84
5.1 Определение антибактериальной активности композитных материалов с наноразмерной архитектурой основе биоапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO 85
5.2 Исследование биосовместимости композитных материалов с наноразмерной архитектурой основе биоапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO 89
Выводы по разделу 5 92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 94
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 96
ПРИЛОЖЕНИЕ А 108
ПРИЛОЖЕНИЕ Б 116

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей работе использованы нормативные ссылки на данные международного центра дифракционных данных (ICDD):

ICDD 00-055-0592 – Гидроксиапатит (гексагональная сингония P63/m). Tas, A., Powder Diffraction, 16, 102, (2001)

ICDD 01-075-1526 – Оксид цинка (гексагональная сингония P63mc). Aminoff, G., Z. Kristallogr., Kristallgeom., Kristallphys., Kristallchem., 56, 495, (1921)

ICDD 01-073-8589 – Оксид цинка (кубическая сингония Fm-3m). Karzel, H., Potzel, U., Potzel, W., Moser, J., Schaefer, C., Steiner, M., Peter, M., Kratzer, A., Kalvius, G.M., Materials Science Forum, 79, 419, (1991)

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В работе используются следующие термины с соответствующими определениями:

AISI – (American Iron and Steel Institute) Стандарт Американского Института Стали и Сплавов, система обозначения легированных и нержавеющих сталей.

ASTM– (American Society for Testing and Materials) американская международная организация, разрабатывающая и издающая добровольные стандарты для материалов, продуктов, систем и услуг

ICDD – (International Centre for Diffraction Data) Международный центр дифракционных данных, некоммерческая научная организация, деятельность которой посвящена сбору, редактированию, публикации и распространению данных порошковой дифракции для использования при идентификации кристаллических материалов.

ХЧ – Классификация химических реактивов по чистоте. Классификация высшая степень чистоты реактива. Содержание основного компонента более 99 %.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

А – Ампер
Å – Ангстрем
d – межплоскостное расстояние
DC – поврежденные клетки
DMEM – модифицированная питательная среда Дульбекко
E – модуль упругости
E –энергия электронного луча
FTIR – инфракрасная Фурье спектроскопия
hkl – индексы Миллера
ICDD – международный центр дифракционных данных
ksi – килофунт на квадратный дюйм
ОА – оксиапатит
ОСР – октокальцийфосфат
psi – фунт на квадратный дюйм
U – Вольт
α-ТКФ – α-трикальцифосфат
β-ТКФ – β- трикальцифосфат
δ – допустимая деформация
θ – угол рентгеновского луча к плоскости
λ – длина волны
σYS – предел текучести
Алг – альгинат натрия
АмФК – аморфный фосфат кальция
АФК – активные формы кислорода
В – Вольт
вес.% – весовые проценты
ВЭ – вторичные электроны
ГА – гидроксиапатит
Гаг – гидрогель гидроксиапатита
ГАп – порошок гидроксиапатита
ГПа – гигапаскаль
ДКФА – дикальцийфосфат ангидрит, монотит
ДКФД – дикальцийфосфат дигидрит, брушит
ДМСО– диметилсульфоксид
К – Келвин
кВ – киловольт
кДа – килоДальтон
КДГА – кальций дефицитный гидроксиапатит
КОЕ – колоний образующие единицы
КТ – костная ткань
л– литр
мг – миллиграмм
мин – минута

мкА – микроампер
мкл – микролитр
мкм – микрометр
МКФА – монокальцийфосфат ангидрит
МКФМ – монокальцийфосфат моногидрат
мл – миллилитр
ммоль – миллимоль
МПа – мегапаскаль
МПН – микроплазменное напыление
мэВ – милиэлектронвольт
нА – наноампер
НК-ZnO – нанокристаллы ZnO
нм – нанометр
ОРЭ – обратные рассеянные электроны
ПЗС – полная замена дисфункционального сустава
ПЭМ – просвечивающая электронная микросокпия
рад – радиан
РЭМ – растровая электронная микроскопия
с– секунда
СЛП – селективное лазерное плавление
см – сантиметр
$см^{-1}$ – обратный сантиметр
ТетКФ– тетракальцийфосфат
УЗ – ультразвук
УФА – ультрафиолетовый спектр в области 315-400 нм
УФБ – ультрафиолетовый спектр в области 280-315 нм
УФ-спектр – ультрафиолетовый спектр
ФА – флюрапатит
эВ – электронвольт
ЭДС – энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена экспериментальным исследованиям структурно-фазового состояния материалов на основе гидроксиапатита (ГА) и альгината натрия (Алг) при легировании цинком, исследованию их антибактериальных свойств и биосовместимости, а также разработке технологических режимов нанесения биокомпозитных материалов на биомиметические металлические структуры, полученные методом реверс-инжиниринга. В работе применены передовые апробированные экспериментальные методы исследования, проведенные в лабораториях научно-исследовательских центров Казахстана, ближнего и дальнего зарубежья.

Актуальность работы. Костная ткань (КТ) представляет собой композиционный природный материал, который включает органический компонент (коллаген, тип I), в который встроены нанокристаллы нестехиометрического гидроксиапатита (биологического апатита) [1–3]. Эта структура является прочной как при растяжении (из-за органического компонента), так и при сжатии (из-за неорганического компонента). Биологический апатит включает ряд неорганических ионов. Установлено, что включение небольшого количества таких ионов, в частности ионов цинка, магния, меди и серебра, в структуру биоапатита оказывает существенное влияние на его свойства [4–7]. Ионы цинка способствуют увеличению плотности КТ, предотвращают потерю костной массы [8], улучшают адгезию белков и повышают антибактериальную активность [9]. Однако, данный аспект (включение неорганических ионов различных металлов) плохо изучен с точки зрения морфологии и симметрии молекулы ГА при замещении атомов кальция цинком.

Широкое использование препаратов с антимикробным действием привело к формированию устойчивости микроорганизмов к широкому спектру антибиотиков. Одним из подходов к решению этой проблемы во всем мире является активный поиск неорганических антимикробных компонентов или модификация биоматериалов неорганическими биоактивными ионами для инициирования контролируемой реакции в тканях и для обеспечения антимикробной активности [10–12]. В работах [13–21], изучались антибактериальные свойства гидроксиапатита (ГА), а также других материалов и покрытий при легировании ионами Zn, Cu, Au и др.. В последнее время высокие антибактериальные свойства композиционного материала на основе сульфида цинка с альгинатом натрия (ZnS + альгинат) были продемонстрированы в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [13, p.268]. Альгинат натрия представляет собой биосовместимый, нетоксичный природный полисахарид, состоящий из мономеров β-D-мануроновой и α-L-гулуроновой кислот, он связывает и удаляет радионуклиды из организма, снижает уровень холестерина в крови и не вызывает аллергию. Также известно, что материалы на основе ZnO

характеризуются выраженной биологической активностью, высокой прочностью на разрыв, способностью выдерживать экстремальные условия эксплуатации. Взаимодействие цинка с альгинатом и ГА обсуждается в работах [6, p.177; 21, p. 11371; 22 –24]. Исследования ZnO ведутся, в основном, как самостоятельного соединения, и как следствие, практически полностью отсутствуют результаты анализа фазового состояния оксида цинка, процессов замещения кальция цинком в апатите кальция и в альгинате натрия, влияние фазового состояния цинка на антибактериальные свойства и биосовместимость материалов. Поэтому изучение взаимодействия цинка с остальными компонентами композита, а также структурно-фазового состояния цинка в матрице Алг является актуальной задачей в настоящее время.

Одним из важных свойств имплантата является способность к остеоинтеграции. Также необходимыми свойствами являются биосовместимость и коррозионная стойкость. Современные тенденции в медицинской технике, направлены на развитие новых материалов с остеокондуктивными и антибактериальными свойствами [8, p. 403; 14, p.99387; 15, p.1701063; 16, p.82; 19, p. 02NABM08-2].

Процесс осаждения покрытий является неравновесным. Следствием этого, между субстратом и нанесённым покрытием, возникают отличия по элементному, фазовому составу, степени кристалличности и/или степени аморфизации, микроструктуры, морфологии поверхности. Данные параметры, зависят как от процесса осаждения, так и от применения или неприменения обработки до и после нанесения [25].

Данная работа посвящена комплексному исследованию свойств биомиметических композитов, близких к костной ткани и состоящих из гидроксиапатита, наноразмерных частиц ZnO и альгината натрия. Исследовано влияние полимера на однородность распределения частиц ZnO в композите, а также влияние ZnO на пористость и степень поглощения (набухания) жидкости. Образцы представлены в виде гранул и гидрогеля, обеспечивающие заполнение дефектов сложной геометрии с минимальным зазором между костью и имплантатом. Решена техническая задача получения металлических имплантатов с биомиметической архитектурой с нанесенным биоактивным покрытием из гидроксиапатита, легированного цинком.

Объект исследования. Получение наноструктурных биокомпозитных материалов на основе гидроксиапатита, альгината натрия и оксида цинка, а также процесс нанесения покрытий на основе гидроксиапатита на пористые металлические структуры, разработка биомиметической архитектуры субстрата.

Предмет исследования. Влияние включения оксида цинка и натрий альгината на фазовый и функциональный состав, антибактериальные свойства, цитотоксичность и биосовместимость апатит-композитного материала и покрытий на его основе на металлические биомиметические субстраты.

Методы исследования. При выполнении данной диссертационной работы были использованы экспериментальные методы исследования морфологии

(растровая электронная микроскопия), функционального состава (ИК-спектрометрия), структурно-фазового состояния (рентгеноструктурный анализ и просвечивающая электронная микроскопия). Разработка биомиметической архитектуры производилось оптическим 3D сканированием с последующим реверс инжинирингом. Использовался оптический 3D сканер Smarttech3D Universe (Польша), обработка полученных облаков точек проводилось программным обеспечением Geomagic Design X. Печать субстратов проводилось методом селективного лазерного плавления порошка на установке Mlab cusing R (Concept Laser, Германия). Нанесение покрытий проводилось методами гидротермального осаждения и микроплазменного напыления. Антибактериальные свойства синтезированных материалов исследовалось на колониях грамположительных и грамотрицательных бактерий, методами диффузии в «агар» и совместного инкубирования. Цитотоксичность материалов исследовали на культурах клеток мышиных остеобластов и фибробластов NIH-3T3 методом совместного культивирования (Аахенский университет прикладных наук, Германия).

Цель работы. Целью диссертационной работы является проведение комплексного исследования структуры, фазового состава композита на основе гидроксиапатита и альгината натрия легированных оксидом цинка. Разработка методик и технологий по созданию композитного биомиметического имплантата.

В соответствии с поставленной целью были сформулированы **основные задачи исследования:**

1) Модифицировать процесс синтезирования композитных материалов на основе гидроксиапатита и альгината натрия, методом химического осаждения с целью их наноструктурирования. Определение влияния оксида цинка на элементный, фазовый, функциональный состав чистого гидроксиапатита в порошковом виде (ГАп), в виде гидрогеля (ГАг) и композитов ГА-Алг, ГА-Алг-ZnO;

2) Получение опытных образцов медицинских имплантатов с трабекулярной, биомиметической архитектурой методом реверс-инжиниринга из стали 316L и медицинского сплава Ti6Al4V;

3) Разработать модифицированный метод нанесения кальций-фосфатных покрытий, с целью получения покрытия кристаллического гидроксиапатита, легированного цинком. Определить режимы и особенности нанесения композитного наноструктурного покрытия ГА - ZnO на пористые металлические печатные структуры, полученные методом селективного лазерного плавления;

4) Исследовать in vitro цитотоксичность и биосовместимость композитного материала ГА-Алг-ZnO, ГА-ZnO и покрытий ГА, ГА-ZnO на примере культуры клеток соединительной ткани (мышиные фибробласты NIH-3T3), антибактериальные свойства композитных материалов ГА-Алг-ZnO и ГА-ZnO.

Научная новизна:

– впервые был получен и исследован композитный материал на основе гидроксиапатита и альгината натрия, легированного нанокристаллами оксида цинка в двухфазном состоянии;

– впервые исследованы кальций-фосфатные покрытия, нанесенные на пористые биомиметические металлические структуры, полученные методом селективного лазерного плавления (СЛП); получен новый тип ортопедических имплантатов с искусственной трабекулярной структурой для использования в медицине;

– предложен механизм антимикробной активности нанокристаллов ZnO при его двухфазном состоянии, так наночастицы ZnO с кубической структурой имеют бо'льшую растворимость и, как следствие, бо'льший вклад в антибактериальную активность, чем наночастицы с гексагональной структурой.

Научная и практическая значимость работы

Полученные результаты экспериментальных методов исследований дают более глубокое понимание о морфологии, физике взаимодействия альгината натрия и гидроксиапатита при добавлении оксида цинка, процессах и механизмах антимикробной активности композитных материалов с добавлением оксида цинка. Доказано двухфазное состояние оксида цинка, что имеет значительное влияние на механизм антибактериальной активности. Данная работа имеет важное практическое значение, что подтверждается экспериментальными исследованиями по оценке антимикробных свойств, цитотоксичности и биосовместимости. Внедрение данного материала в медицинскую практику, окажет положительный эффект на скорости заживления дефектов и срастания кости.

Проведенные исследования создают предпосылки для создания новых материалов, которые могут быть использованы в различных направлениях медицины.

Связь работы с научно-исследовательскими проектами

Работа выполнялась в соответствии с тематическими планами НИОКР университета по следующей подпрограмме: 0005/ПЦФ-17 «Разработка технологии производства изделий медицинского назначения из тантала и ниобия» номер гос. регистрации 0117РК00047 в рамках ПЦФ «Целевая научно-техническая программа Восточно-Казахстанского государственного технического университета им. А. Серикбаева, ориентированная на разработку новых видов продукции для производства на ведущих промышленных предприятиях Восточно-Казахстанской области» на 2017-2019 годы.

Личный вклад автора

Автор выполнил анализ литературных данных по теме исследования, провел основную часть экспериментов, осуществил обработку и анализ полученных экспериментальных данных, участвовал в написании публикаций, обсуждении результатов на конференциях и выставках. Обсуждение и интерпретация результатов анализа, а также формулировка основных выводов проведены под руководством зарубежного научного консультанта профессора

А.Д. Погребняка, и отечественного научного консультанта профессора С.В. Плотникова. Оказана помощь в проведении и интерпретации исследований по определению цитотоксичности и антимикробной активности сотрудниками КазНУ им. аль-Фараби д.б.н. Савицкой И.С. и к.б.н. Кистаубаевой А.С., а также сотрудниками СумГУ, А.б.н. Суходуб Л.Б. и член.кор. НАН Украины А.ф.-м.н. Суходуб Л.Ф.

Основные положения, выносимые на защиту:

– одификация метода химического осаждения, ультразвуковым и микроволновым излучением приводит к изменению симметрию молекулы ГА, замещая атомы кальция цинком, при добавлении ZnO в ГА и композит ГА-Алг, о чем свидетельствует смещение линии O—P—O группы, а также результаты исследования ПЭМ и РЭМ;

– нанокристаллы ZnO в составе композитного материала на основе гидроксиапатита и альгината натрия имеют двухфазное состояние, с кубической и гексагональной структурой, при ассистировании ультразвукового излучения во время синтеза;

– покрытия на основе гидроксиапатита, полученные методом гидротермального осаждения, при дополнительном ассистировании электрического поля, нанесенные на металлические имплантаты с биомиметической архитектурой, разработанные и полученные методом реверс-инжиниринга, имеют лучшую кристалличность по сравнению с покрытиями, полученные микроплазменными методами.

Достоверность, полученных результатов, обеспечивается использованием независимых взаимодополняющих и хорошо апробированных экспериментальных методов исследования. Результаты исследований получены с помощью современных приборов и оборудований физического материаловедения, такими как: растровый электронный микроскоп JSM-6390LV – фирмы JEOL (Япония), электронный просвечивающий микроскоп JEOL JEM-2100 (Япония) с энергией электронов до 200 keV, рентгеновский дифрактометр PanAnalytical Xpret Pro, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (EDX) на растровом электронном микроскопе JEM-2100 (Япония), ИК спектрометр FTIR-801 Simex, а также на приборы для определения цитотоксичности и антибактериальной активности.

Полученные результаты в целом, согласуются с результатами других исследователей СНГ и дальнего зарубежья. Основные аспекты проделанной работы представлены в международных конференциях и опубликованы, в рецензируемых научных журналах дальнего зарубежья и в пределах Казахстана.

Апробация результатов исследования. Основные экспериментальные результаты диссертации докладывались и обсуждались:

− на XIII Международной научно-технической конференции «Ғылым және білім -2018», 12 апреля, ЕНУ им. Л.Н. Гумилева, г. Астана, 2018 г., Казахстан;

− на IV Международной научно-технической конференции студентов, магистрантов и молодых ученых, 13 апреля, ВКГТУ им.А.Серикбаева, г. Усть-Каменогорск, 2018 г., Казахстан;

− на 8-ой Международной конференции NAP-2018, “Nanomaterials: Applications & Properties”, 9-14 сентябрь, Затока, Украина;

− на 27-ой Международной конференции металлургии и материалов «Metal 2018», 23-25 мая 2018 г., г. Брно, Чехия а также нашли свое отражение в международных научных публикациях, в том числе в статьях, рекомендованных ВАК.

Публикации. Материалы диссертационной работы изложены в 12-ти публикациях, в том числе в 4-х научных изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК, индексируемых в базе данных «Web of Science», в 6-ти материалах международных конференций, в том числе в 2-х материалах индексируемых базой данных SCOPUS и Web of Science», в журнале, индексируемом базой данных SCOPUS, имеющий импакт-фактор – 3,057 (2017).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5-ти глав, выводов, списка литературы, содержащего 198 наименований. Основной текст изложен на 115 страницах, содержит 45 рисунков, 7 таблиц, 2 приложения.

1 ПОЛУЧЕНИЕ БИОКОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ПОКРЫТИЙ

1.1 Основные применяемые материалы в современной ортопедии

Человеческая кость, сустав сложны по структуре и химическому составу. Способны функционировать в критических условий, что является большим вызовом для врачей, а также для ученых, задействованных в разработке конкретных типов имплантатов, которые могут быть использованы в организме человека и служат определенной цели применения: ортопедические, стоматологические, офтальмологических, сердечно-сосудистые, кохлеарные и челюстно-лицевые.

Синовиальные суставы, такие как бедра, колени и плечи состоят из суставного хряща, несущей соединительной муфты ткани, покрывающие кости, участвующие в суставах, и синовиальной жидкости, выделяемой питательной жидкостью в области суставов [26–33]. Однако эти суставы чаще всего не подвержены дегенеративным и воспалительным заболеваниям, которые приводят к болезни и жесткости суставов [5, p. 87]. Помимо деградации суставного хряща из-за возраста, существуют болезни, такие как остеоартрит (воспаление кости), ревматоидный артрит (воспаление синовиальной мембраны) и хондромаляция (размягчение хряща). Значительная часть (90%) людей старше 40 лет страдают от таких дегенеративных состояний. Структура нормальной кости отчетливо отличается по сравнению с костью, которая поражена остеопорозом, при этом плотность костной клетки существенно ниже для остеопоротической кости по сравнению с нормальной костью. Основными причинами преждевременной деградации костной структуры (кости) обусловлено тремя причинами: недостаток свойств биоматериала, чрезмерные условия нагрузки и нарушение восстановительных процессов [2, p.70]. Несмотря на то, что выполняются незначительные хирургические процедуры, которые оказывают временную помощь, существует мнение, что окончательным этапом является полная замена дисфункционального сустава (ПЗС). Таким образом, поле артропластики стало популярным в хирургическом мире.

В настоящее время одним из главных достижений в области артропластики является – общая замена сустава, где весь несущий нагрузку материал (главным образом в колене, бедрах или плече) заменяется хирургическим путем керамическим, металлическим или полимерным искусственными материалами. Как отмечалось ранее, проблема в том, что не все искусственные материалы могут быть использованы для таких целей, только те, которые соответствуют определенным широким спецификациям.

Далее мы рассмотрим основные требования выставляемые к материалам, используемые в ортопедии.

Требования к современным имплантатам можно в целом классифицировать по трем взаимозначемым параметрам [7, p.403]:

– материал, используемый для изготовления протеза должен быть совместим с телом человека. В то же время допускается реакция ткани из-за введение постороннего вещества, приводящего к изменениям в механических, физических, и химических свойств в локализованной окружающей среде, но введение материала не должно приводить к вредным изменениям и оказывать системные эффекты;

– имплантат должен иметь желаемый баланс заданных необходимых механических и физических свойств. Конкретная оптимизация свойств, таких как эластичность, предел текучести, пластичность, предельная прочность, усталостная прочность, твердость, и износостойкость, зависящих от типа и функциональности конкретной части имплантата;

– имплантат должен быть легок в изготовлении, согласованный и соответствующий всем техническим и биологическим требования, поскольку в естественной среде материал имплантат находится в агрессивной среде и подвержен механическим знакопеременным нагрузкам.

Таким образом, необходимо учитывать стабильность искусственно введенного материала. Выбор самого материала имплантата является главным критерием для правильного функционирования. Учитывая тип операции и функционирование искусственного материала в теле, определяют какой материал следует использовать. Для целей ортопедии, замены суставов, крепление раздробленных частей кости, наиболее значимыми материалами являются металлические сплавы. Металлы и сплавы часто применяемые в медицине приведены в таблице 1.1.

Таблица – 1.1. Основные материалы, применяемые в ортопедических имплантатах. Данные взяты из [33, p.150]

Наименование сплавов	Обозначение материала	Международное название	ASTM Standard
Нержавеющая сталь	Fe-18Cr-14Ni-2.5Mo	316L Stainless Steel	ASTM F 138
Сплавы на основе кобальта	Co-28Cr-6Mo Co-35Ni-20Cr-10Mo	Cast CoCrMo Wrought CoNiCrMo	ASTM F 75 ASTM F 572
Сплавы на основе титана	Ti CP (grade 1 to 4) Ti-6Al-4V ELI	Commercially pure Ti Ti6Al4V	ASTM F 67 ASTM F 136
Specialty metallic alloys	Ta Ni-45Ti	Unalloyed Tantalum Nitinol	ASTM F 560 ASTM F 2063

В середине 20ого века наиболее перспективным материалом для ортопедеии, в частности артропластики, считались сплавы на основе железа с

легирующими элементами хрома, никеля, молибдена, такие как 316L, ASTM F138, 12Х18Н10 [26, p. 231; 27, p. 575; 28, p. 1806; 29, p. 337; 30, p.151; 31, p. 1664; 32, p. 45]. Применение их было ограничено временными пластинами, винты. Однако, после того как операция по ПЗС стало часто применяемым видом вмешательства, стал проявляться один из главных недостатков - высокий модуль нержавеющей стали (200 ГПа, таблица 1.2). Относительно низкая коррозионная стойкость и износостойкость, также способствовала усилению процесса поиска другого более подходящего материала.

Таблица 1.2 – Основные параметры металлов и сплавов, применяемых в ортопедии. Данные взяты из [30, p. 151]

Обозначение сплава	Микроструктура	Модуль упругости		Предел текучести		Предел прочности	
		ГПа	10^6 psi	МПа	ksi	МПа	ksi
Технически чистый Ti	α	105	15	692	100	785	115
Ti-6Al-4V	α/β	110	16	850-900	125-130	960-970	140-141
Ti-6Al-7Nb	α/β	105	15	921	135	1024	150
Ti-5Al-2.5Fe	α/β	110	16	914	130	1033	150
Ti-12Mo-6Zr-2Fe	Метастаб. β	74–85	10–12	1000–1060	145–155	1060–1100	155–160
Ti-15Mo-5Zr-3Al	Метастаб. β	75	10	870–968	125–140	882–975	130–140
	Состаренный β+ α	88–113	13–16	1087–1284	160–190	1099–1312	160–190
Ti-15Mo-2.8Nb-3Al	Метастаб. β	82	12	771	110	812	115
	Состаренный β+ α	100	14	1215	175	1310	190
Ti-13Nb-13Zr	α/β	79	11	900	130	1030	150
Ti-15Mo-3Nb-0.3O (21SRx)	Метастаб. β + силикат	82	12	1020	150	1020	150
Ti-35Nb-7Zr-5Ta	Метастаб. β	55	8	530	75	590	85
Ti-35Nb-7Zr-5Ta-0.4O	Метастаб. β	66	9	976	140	1010	145

Сплавы на основе кобальта Co-Cr-Mo казались решением для изготовления протезов и несущих элементов. Несмотря на отличную коррозионную стойкость, износостойкость и усталостную прочность, эти сплавы Co-Cr-Mo (ASTM F75 и F799) имели более высокий модуль 210 ГПа (таблица 2) и низкую биосовместимость [31, p.1663].

Биосовместимость согласно [31, p.1661] является способностью материала встраиваться в организм пациента, не вызывать побочных клинических проявлений и индуцировать клеточный или тканевой ответ, необходимый для достижения оптимального терапевтического эффекта. Наиболее биосовместимыми металлами являются Ta, Nb, Ti, Zr [30, p. 149; 32, p. 45; 33, p.7].

Сплавы на основе Ti благодаря высоким показателям биосовместимости и механическим свойствам, являются широко распространенными материалами для изготовления имплантатов реконстукционной артро- и остеопластики в ортопедии, травмотологии и нейрохирургии [26, p. 231].

Допустимость использования металла в ортопедии и травмотологии определяют два основных показателя, как и для других материалов, это – биосовместимость и биомеханическая совместимость.

Согласно исследованиям [31, p. 1662] большинство используемых сейчас материалов в производстве имплантатов содержат; V, Al, Co, Cu, Cr, Mo и Ni, которые имеют слабые, а иногда отрицательные характеиристики по биосовместимости. Так в работах [26, p.231; 27, p. 575; 28, p. 1806; 29, p. 336; 30, 150; 31, p.1662] показано, что V имеет цитотоксические свойства, а Al оказывает негативные воздействия на центральную нервную систему.

Биомеханические свойства необходимые для биоматериалов, использующихся в ортопедии, в частности для изготовления имплантатов, отлично описаны в работах [34,35]. Большое значение при разработке новых ортопедических биоматериалов является допустимая деформация (δ) - отношение предела текучести (σ_{YS}) к модулю упругости *E* [26, p. 231; 34, p. 3889; 35, p. 331]. Допустимая деформация кости составляет от 0,43% до 0,55%. Таким образом наилучшим материалом для изготовления имплантатов в ортопедии и травматологии является материал с наиближайшим показателем допустимой деформации (δ) кости.

Титановые сплавы широко применяются в ортопедии несколько десятилетий из-за их превосходных механических свойств, отличных коррозионной стойкости и благоприятной биосовместимости [26, p. 230; 27, p. 575]. Многочисленные исследования были посвящены исследованию свойств этих материалов для использования в медицине. Была доказана отличная биосовместимость титана многими авторам, как *in vitro*, так и *in vivo* [26, p. 230; 28, p. 1805; 30, p. 150]. Коммерчески чистый титан используется в некоторых ортопедических и стоматологических применениях. Тем не менее, ограниченная прочность титана (до 500 МПа) запрещает его использование в качестве материала для ортопедического эндопротеза, который представляет собой форм-фактор имплантата [26, p. 230; 27, p. 574].

Использование титана и обычных титановых сплавов, таких как Ti-6Al-4V с высоким модулем Юнга (E), является не идеальным решением в элементах несущих нагрузку, так как возникает стресс-экранирование, вызванное несоответствием жесткости имплантата с окружающей костью (около 115 ГПа для сплава Ti-6Al-4V), что значительно выше чем модуль упругости

кортикальной кости (10-30 ГПа) [26, p. 230; 36, p. 244], и как следствие возникает остеопороз, приводящий к переломам окружающей кости или ослаблению крепления имплантата. По любой из этих причин время жизни ортопедического имплантата из сплава Ti-6Al-4V обычно ограничен 15- 20 лет [26, p.230; 36, p. 244; 37, p. 407].

В работах [38–42] были исследованы вопросы уменьшения жескости имплантата за счет увеличения пористости, однако, это одновременно приводит к резкому сокращению механической прочности самого иплантата.

Из вышеперечисленных соображений возникает необходимость в создании новых сплавов на основе титана не содержащих канцерогенные, цитотоксичные компоненты и отвечающие биомеханическим требованиям к имплантату. Такими сплавами являются трех и четырех компонентные сплавы на основе титана с добавлением Nb, Ta и Zr.

В последнее время наблюдается значительный рост количества исследований, направленных на разработку новых материалов, способствующих росту биологической ткани или замене ее [22, p. 3; 43]. На сегодняшний день медицина, в частности ортопедия, перешла к малоинвазивным методам лечения, когда для восстановления кости или других частей тела проводятся оперативные мероприятия с малым вмешательством, ущербом тканей. Соответственно, уменьшается время восстановления тканей.

Гидроксиапатит ($Ca_{10}(PO_4)6(OH)2$, ГА), который имеет сходство по химическому составу с неорганической частью человеческой кости, на сегодняшний день имеет широкое применение в медицине, благодаря положительным свойствам биосовместимости, остоиндуктивным и остеокондуктивным свойствам. ГА может образовывать прямую химическую связь с прилегающей костной ткани и способствует быстрой остеинтеграции имплантатов. Ускорение процесса остеосинтеза в ортопедии имеет ключевой фактор, поскольку это ведет к уменьшению длительности лечения пациентов, а следовательно уменьшению экономических затрат на медицинское обслуживание [22, p.3; 43, p. 13773].

1.2 Фосфаты кальция, биологический апатит и костная ткань

Биологическая кость является сложным композитом на основе кальций-фосфата, состоящим из коллагена, неколлагеновых белков и минерала, который иерархически упорядочен [2, p.69; 44–47]. Костный минерал, который часто называют биологическим апатитом, заметно отличается от минерала геологического апатита. Прежде всего, костный минерал состоит из наноразмерных тромбоцитов или игл, встроенных в коллагеновые фибриллы и ориентированных с осью направления фибриллы [3, p.86; 4, p. 1169; 5, p. 2]. Также костный минерал отличает от геологического апатита кристаллическая решетка моноклинной сингонии, а не гексагональной [48,49]. Минерал кости содержит ряд ионных замещений, таких как $CO_3^{2-} \rightarrow OH^-$(А-замещение), $CO_3^{2-} \rightarrow PO_4^{3-}$ (В-замещение), или Na^+, Zn^{2+} и Mg^{2+} замещают Ca^{2+}. Апатит известен своей способностью к ионному обмену с ионами металлов в водных

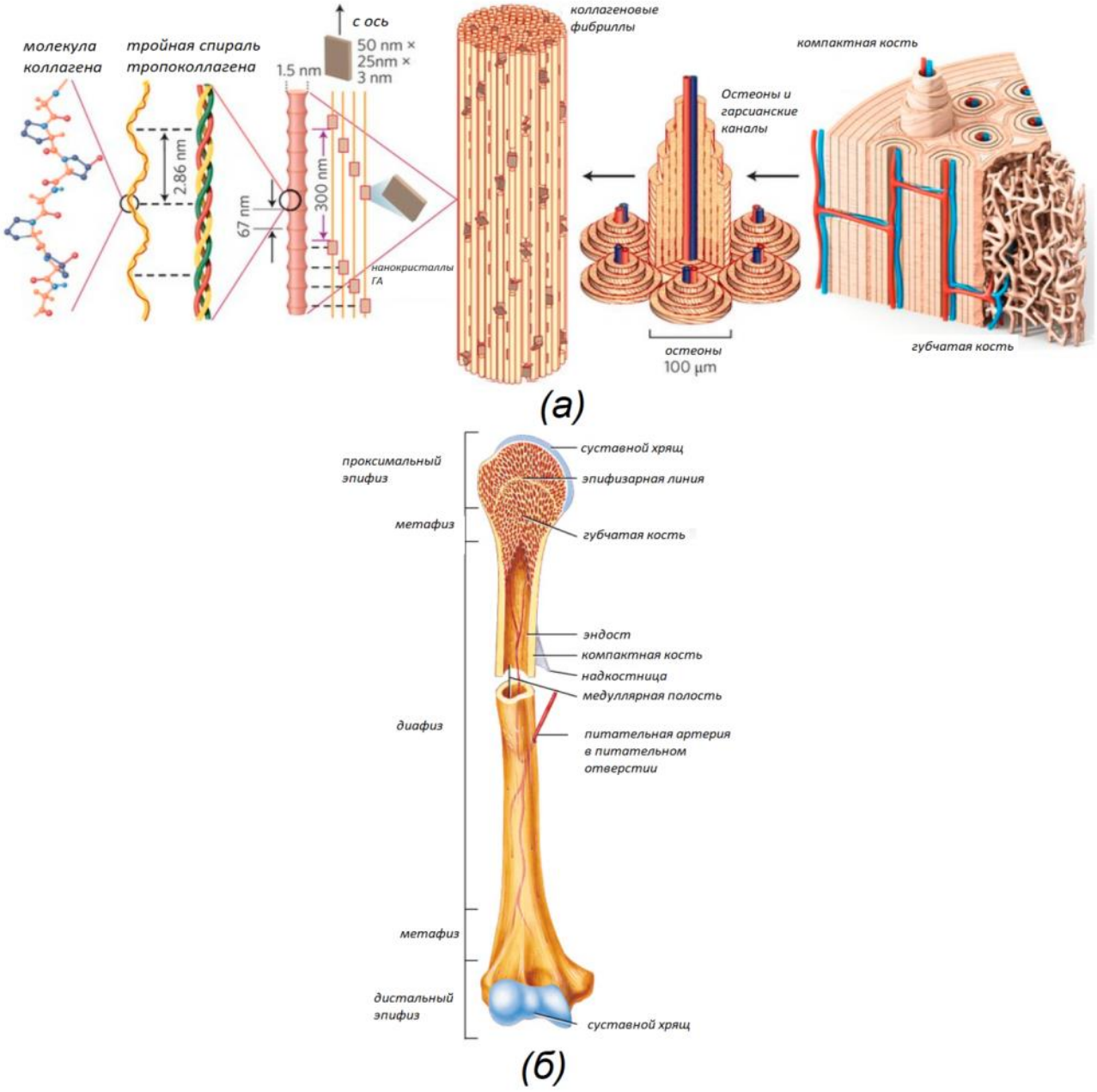
растворах [4, p.1169; 8, p.402; 9, p. 294], что объясняет высокую изменчивость минерального состава кости. Также сообщалось, что гидроксид, один из основных компонентов гидроксиапатита, отсутствует в костном минерале [50-52]. Наконец, минерал кости часто описывается как слабо кристаллический, что, вероятно, связано с небольшим размером кристаллов, а также с остаточными напряжениями в кристаллической решетке. Химический состав костного минерала значительно изменяется со временем, так PO_4^{3-} заменяется на HPO_4^{3-} у зрелого человека.

Кость является основной единицей человеческой скелетной системы. Кость обеспечивает основу и несет вес тела, защищает жизненно важные органы, поддерживает механическое движение, вмещает гемопоэтические клетки и поддерживает гомеостаз железа. Кость это иерархический, сложный, функционально градуированный материал, с внутренней губчатой и внешней кортикальной костью, рисунок 1.1. Кроме того, согласно закону Вольфа [53,54], кость здорового человека или животного будет адаптироваться к нагрузкам, под которыми она находится. Если нагрузка на кости увеличивается, она со временем будет перестраиваться, чтобы стать сильнее, сначала изменив внутреннюю архитектуру трабекул, а затем сгущая внешнюю кортикальную часть кости. Напротив, при уменьшении нагрузки, кость становится менее плотной (процесс, известный как остеопения) из-за отсутствия стимула, необходимого для продолжения ремоделирования. Это может произойти, например, после введения искусственного сустава (например, полной замены тазобедренного сустава) из-за экранирования нагрузки, которая возникает из-за более высокой жесткости (модуля упругости Юнга) металла по сравнению с костью.

Для понимания роли гидроксиапатита внутри кости, важно понять структурную взаимосвязь между различными уровнями иерархической структурной организации костной ткани. На рисунке 1.1 схематически представлено строение кости: макроструктура: (1) губчатая и кортикальная кость; (2) микроструктура и суб-микроструктура: канал, остеоны, ламеллы; (3) наноструктура: фибриллярный коллаген; и (4) суб-наноструктура: молекулярные составляющие минеральных, коллагеновых и неколлагеновых органических белков.

На макроскопическом уровне кости могут иметь различные формы в зависимости от их соответствующей функции [45, p. 1263]. Тем не менее, кости обычно подразделяются на два типа: кортикальная (или компактная) кость и губчатая (или трабекулярная) кость, рисунок 1.1 б. Кортикальная кость образует внешнюю оболочку большинства костей. Они могут достигать толщины от нескольких десятых долей миллиметра (в позвонке) до нескольких миллиметров или даже сантиметров (в середине вала длинных костей). Это довольно плотная кость с пористостью порядка 6% [45, p.1263, 55]. Соединительный каркас трабекул имеет ряд комбинаций, все следующие основные ячеистые структуры: стержень-стержень, стержнь-пластина или пластина-пластина [53, p. 175]. Трабекулярная кость имеет пористость порядка

80% [45, p. 1264; 55, p. 334]. Типичная толщина трабекул составляет около 50-300 мкм, с ориентацией, которая зависит от распределения нагрузки в кости [53, p.175]. При проведении *in vivo* исследования остеоинтеграции имплантатов с покрытием или без покрытия следует учитывать реакционную способность кости, окружающей имплантат. А именно, при диафизе нативная кость находится в тесном контакте с имплантатом (рисунок 1б). Метафиз (рисунок 1б), с другой стороны, содержит губчатую кость и более реакционноспособный (например, он обычно обеспечивает более быстрое исцеление) [56].



(а) Иерархическая структура кости; (б) Типичная структура длинной кости

Рисунок 1.1 – Структура кости [55, p. 335]

В микроструктуре кости минерализованные волокна коллагена формируются в ламели (шириной 3-7 мкм) [57]. Как видно на рисунке 1.1а, в некоторых кортикальных костях ламели обертывают концентрическими слоями (3-8 ламелей) вокруг центрального канала, образуя остеон или систему Харверса. Остеоны выглядят как цилиндры, и они примерно параллельны длинной оси кости. Другие формы кортикальной кости, в которых нет такой картины, можно назвать тканой костью [57, p.92]. С другой стороны, микроструктура трабекулярной кости имеет другое расположение. Это соответствует текстуре волокна, где все минеральные пластинки расположены параллельно общему направлению (соответствующему направлению волокна коллагена). Это общее направление имеет некоторое распределение и определяется примерно в пределах ±30°[45, p.1264].

В наноструктуре ламелей имеется минерализованная коллагеновая фибрилла диаметром около 100 нм. Это основной строительный блок костного материала. Фибриллы состоят из сборки молекул коллагена длиной 300 нм и толщиной 1,5 нм. Коллаген (тип I) является основным органическим компонентом матрицы. Молекулы коллагена секретируются остеобластами и затем самоорганизуются. Кристаллы апатита встречаются в дискретных пространствах коллагеновых фибрилл. Коллаген в фибриллах ограничивает возможный первичный рост кристаллов, заставляя их быть дискретными и прерывистыми. Кристаллы происходят через регулярные интервалы вдоль фибрилл с приблизительным расстоянием повторения 67 нм [58], что соответствует расстоянию, на котором смежные молекулы коллагена находятся в шахматном порядке. Важно отметить, что как расположение ламелей, так и коллагеновых волокон до нанометрового масштаба усиливают изотропные свойства, обнаруженные в кости, препятствуют распространению трещины и повышают ударную вязкость [59].

Образование апатита во внеклеточном пространстве коллагена называется «биоминерализацией». Важно отметить, что процесс отличается в зависимости от различных факторов, таких как стадия (например, развитие, истощение излома), область, возраст и т.А. Процесс зарождения в костях связан с взаимодействием между анионными белками и фибриллами коллагена I типа, что может обеспечить стереохимическую ориентацию отрицательно заряженных групп, достаточную для зарождения гидроксиапатита (ГА). После формирования костной матрицы характерный временной ход продолжительностью 13 дней будет происходить до того, как матрица начнет минерализоваться быстро. Этот процесс называется первичной минерализацией, и в течение нескольких дней матрица минерализует до 70%. Остаточное 30%-ое увеличение содержания минералов длится несколько лет и называется вторичной минерализацией [60].

Что касается формы минеральных кристаллов кости, большинство исследований описывают их как пластинчатые формы [60, p. 2115], но с довольно широким диапазоном размеров; толщина пластинок колеблется от 1,5 до 9 нм, длина от 15 до 200 нм и ширина от 10 до 120 нм [61–66]. Кристаллы

апатита обычно плоские относительно плоскости *a-c* [64, p.338]. Их ось *c* в кортикальной кости, как правило, параллельна оси кости [63, p. 46], то есть примерно параллельна длинным осям коллагеновых фибрилл [61, p.567; 62, p. 75; 63, p.46]. Размер и форма кристаллов костного апатита изменяются с видом, возрастом и болезненным состоянием.

Условия в организме человека, по-видимому, ограничивают рост ГА *in vivo*. Наиболее эффективными ингибиторами являются полианионы, в частности полифосфаты или полифосфонаты. Саливальные пептиды и белки, такие как белки, содержащие стегины и пралины, соответственно, являются мощными ингибиторами. Эти макромолекулы, по-видимому, препятствуют осаждению CaP-фаз в слюне, несмотря на перенасыщение этой секреции по отношению к ГА. Механизм ингибирования был связан с их адсорбцией на поверхности апатитовых семян [67,68]. Протеогликаны, даже при низких концентрациях, могут задерживать или предотвращать образование апатита. С другой стороны, костный коллаген считается тесно вовлеченным в зарождение костного минерала [66, p.111]. Следует также отметить, что в некоторых исследованиях обнаружены игольчатые или стержнеподобные кристаллы [62, p. 75; 63, p. 47], что привело к длительным дискуссиям о природе формы минеральных частиц. Утверждалось, что так называемая стержнеобразная или иглообразная форма обусловлена либо особым углом наблюдения кристаллов, либо превращением, вызванным термообработкой [61, p. 566; 62, p. 75; 67, p. 5031; 68, p. 1238]. Преобладающее игольчатое впечатление было связано с боковым видом частиц, который имеет самый сильный контраст поглощения в просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) [60, p. 2120]. После более дифференцированного анализа изображений также были идентифицированы тромбоциты с верхним видом [67, p. 5034]. Объяснением для пластинчатой минеральной формы может быть то, что рост кристаллов происходит через промежуточное соединение ОКФ. ОКФ имеет почти такую же кристаллическую структуру, что и ГА, но содержит дополнительный гидратированный слой, который может отвечать за наблюдаемые пластинчатые кристаллы в естественной кости [61, p. 579; 62, p. 76; 63, p. 50; 67, p. 5033; 68, p. 1238; 69–72].

Из-за нанокристаллической природы апатита в кости различные дифракционные методы еще не дали много информации о тонких структурных деталях, связанных с нанокристаллами апатита. Это связано с тем, что сборки наночастиц дают только широкие дифракционные картины, аналогичные структурам из аморфного материала [61, p. 579; 62, p. 76; 63, p. 50; 67, p. 5033; 68, p. 1238; 69, p. 1385; 70, p. 207; 71, p. 270; 72, p. 351]. Знание кристаллической структуры биологических апатитов ограничено из-за отсутствия подходящих монокристаллов для исследования [26, p.231; 27, p. 575; 28, p. 1806; 29, p. 336; 30, 150; 31, p.1662]. Тем не менее, сообщалось, что изолированные кристаллы из природных костей были слабокристаллическим апатитом, похожим на порошкообразную неповрежденную кость, из которой они были получены [73]. Для биологических апатитов были предложены две

различные кристаллографические структуры [61, p. 579; 62, p. 76; 63, p. 50; 67, p. 5033; 68, p. 1238; 69, p. 1385; 70, p. 207; 71, p. 270; 72, p. 351; 73, p. 58; 74–76] (1) **гексагональная** (не плотно упакованная) пространственная группа $P6_3/m$ с параметрами решетки a = b = 9,432 Å, c = 6,888 Å [77] и (2) **моноклинные** с параметрами решетки a = 9,421 Å, b = 2a, c = 6,881 Å,γ = 120 [78]. Эти две структуры имеют одни и те же элементы, причем стехиометрическое отношение Ca/P атомов составляет 1,67 и 2.16 весовое. Основное различие между ними - ориентация гидроксильных групп. В гексагональной решетке ГА две соседние гидроксильные группы указывают в обратном направлении, тогда как в моноклинной форме гидроксильные группы имеют одинаковое направление в той же колонке и противоположное направление между колоннами [79].

Основные виды кальций-фосфатов и их свойства, а также химический состав кости приведены в таблице 1.3. Биологические апатиты отклоняются от стехиометрического состава ГА, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ и содержат значительные количества примесей замещения ионов, таких как Na^+, Mg^{2+}, K^+, цитрат, HPO_4^{2-}, карбонат CO_3^{2-}, Cl^-, F^- и т. д. [67, p. 5033; 71, p. 270; 72, p. 351; 73, p. 58; 77, p. 274]. Поскольку ГА погружен в водную биологическую жидкость, типы и степень этих замещений меняются со временем [7, p. 5033; 71, p. 270; 72, p. 351; 73, p. 58; 77, p. 274]. Уникальный химический состав биологического апатита отражается отсутствием упреждающей гидроксильной группы и наличием HPO_4^{2-}, [7, p. 5033; 71, p. 270; 72, p. 351; 73, p. 58; 77, p. 274]. Для гидроксильной группы сообщалось, что в костях было обнаружено лишь несколько процентов от предполагаемой концентрации [60, p. 2118]. Присутствие HPO_4^{2-}, приписывается либо ионному замещению, либо гидролизу PO_4^{3-} [60, p. 2118].

Таблица 1.3 Существующие $CaPO_4$ и их основные свойства [55, p.335].

Молярное соотношение Ca/P	Соединение	формула	Растворимость при 25 ° C, -log (Ks)	Растворимость при 25 ° C, г / л	pH в водных растворах при 25 ° C
1	2	3	4	5	6
0.5	Монокальцийфосфат моногидрат (МКФМ)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	1.14	~18	0—2.0
0.5	*Монокальцийфосфат ангидрит* (МКФА)	$Ca(H_2PO_4)_2$	1.14	~17c	Стабилен свыше 100 ◦C.
1.0	*Дикальцийфосфат дигидрит* (ДКФД), брушит	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot 2H_2O$	6.59	~0.088	2.0—6.0

Продолжение таблицы 1.3

1	2	3	4	5	6
1.0	*Дикальцийфосфат ангидрит* (ДКФА), монотит	$Ca(H_2PO_4)_2$	6.90	~0.048	Стабилен свыше 100 ◦С.
1.33	октокальцийфосфат (OCP)	$Ca(H_2PO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O$	96.6	~0.0081	5.5—7.0
1.5	α-трикальцифосфат (α-ТКФ)	α-$Ca_3(PO_4)_2$	25.5	~0.0025	Эти соединения не могут осаждаться из водных растворов.
1.5	β-трикальцифосфат (β-ТКФ)	β- $Ca_3(PO_4)_2$	28.9	~0.0005	Эти соединения не могут осаждаться из водных растворов.
1.2—2.2	Аморфные фосфаты кальция (АмФК)	$Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot n H_2O$, n = 3—4.5; 15—20% H_2O	Невозможно точно измерить. Однако были найдены следующие значения: 25,7 ± 0,1 (pH = 7,40), 29,9 ± 0,1 (pH = 6,00), 32,7 ± 0,1 (pH = 5,28). Сравнительная степень растворения в кислотном буфере: АмФК>> α-ТКФ>>β-ТКФ> КДГА>>ГА> ФА.	Невозможно точно измерить. Однако были найдены следующие значения: 25,7 ± 0,1 (pH = 7,40), 29,9 ± 0,1 (pH = 6,00), 32,7 ± 0,1 (pH = 5,28). Сравнительная степень растворения в кислотном буфере: АмФК>> α-ТКФ>>β-ТКФ> КДГА>>ГА > ФА.	5—12 Всегда метастабильно.
1.5—1.67	Кальций дефицитный гидроксиапатит (КДГА)	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	~ 85	~ 0.0094	6.5—9.5

Продолжение таблицы 1.3

1	2	3	4	5	6
1.67	Гидроксиапатит (ГА)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	116.8	~ 0.0003	9.5—12
1.67	Флюрапатит (ФА)	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	120.0	~ 0.0002	7—12
1.67	Оксиапатит (ОА) / Существование ОА остается сомнительным.	$Ca_{10}(PO_4)_6O$	~ 69	~ 0.087	Эти соединения не могут осаждаться из водных растворов.
2.0	Тетракальцийфосфат (ТетКФ),	$Ca_4(PO_4)_2O$	38-44	~ 0.0007	Эти соединения не могут осаждаться из водных растворов.

1.3 Наночастицы оксида цинка

Тело человека состоит из элементов, которые можно условно разделить на макроэлементы и микроэлементы. В состав макроэлементов входят элементы, которые участвуют в формировании ковалентных связей и являются важными составляющими тканей (кислород, углерод, водород, азот и т. д.). Микроэлементы, которые часто существуют в ионном состоянии, и являются действующими, «драйверами» в функционировании живого организма за счет поддержания осмотического давления и мембранных потенциалов (калий, натрий и т. д.). На макроэлементы приходится 96% общей массы тела, а на микроэлементы приходится от 3 до 4% от общей массы тела. Дефицит макроэлементов может быть вызван нарушением питания, а их присутствие в избытке может вызвать ожирение. Недостатки или избыточное состояние микроэлементов часто приводят к аномалиям жидкости и электролита. Основными микроэлементами человеческого тела являются цинк (Zn), медь (Cu), селен (Se), хром (Cr), кобальт (Co), йод (I), марганец (Mn) и молибден (Mo). Хотя эти элементы составляют лишь 0,02% от общей массы тела, они играют значительную роль, например, в качестве активных центров ферментов или как биологически активные вещества [80].

Нанокристаллы ZnO (НК-ZnO) имеют различную морфологию и демонстрирует значительную антибактериальную активность по широкому спектру бактериальных видов, исследованных во многих работах [81–85]. Микро-нанокристаллы ZnO также исследуется как антибактериальный агент в препаратах. ZnO проявляет значительную антимикробную активность при уменьшении размера частиц до нанометрового диапазона, наноразмерный ZnO может взаимодействовать с поверхностью бактерий и/или с ядром бактерии, где он входит внутрь клетки, а затем проявляет различные бактерицидные механизмы [86]. Взаимодействие между НК-ZnO и бактериями токсичны для

последних, что уже широко применяется, например, в пищевой промышленности.

Необходимо отметить, что НК-ZnO нетоксичны для клеток человека согласно работам [86, p. 035004; 87–91], этот аспект открыл дорогу их использованию в качестве антибактериальных агентов, вредных для микроорганизмов и обладающих хорошей биосовместимостью с клетками человека [80, p. e85981; 83, p. 867; 84, p. 198; 85, p.72; 86, p. 035004; 87, p.2767; 88, p. 1369, 92–121]. Различные антибактериальные механизмы наноматериалов в основном объясняются их высокими удельными отношениями площади поверхности к объему [115, p. 1] и другими физико-химическими свойствами. Однако точные механизмы точно не известны. Исследования по использованию НК-ZnO в качестве наноматериалов с антибактериальными свойствами, будут способствовать увеличению знаний по механизмам и явлениям, связанными с антибактериальными свойствами наноструктурных материалов.

Бактериальные инфекционные заболевания представляют собой серьезную проблему, которая привлекла общественное внимание во всем мире как угрозу для здоровья человека, вызывающую экономические и социальные осложнения. Усиление вспышек и инфекций патогенных штаммов, резистентность к бактериальным антибиотикам, появление новых бактериальных мутаций, отсутствие подходящей вакцины в слаборазвитых странах и инфекции, связанные с больницами, представляют собой угрозу для здоровья человека, особенно у детей. Например, инфекции Shigella flexneri ежегодно вызывают 1,5 миллиона смертей из-за зараженных продуктов питания и напитков этими бактериями [89, p. 219; 122].

В данном подразделе подробно рассмотрены механизмы и физико-химические свойства НК-ZnO, лежащие в основе его антибактериальной активности.

1.3.1 Общая характеристика ZnO

ZnO обладает уникальными оптическими, химическими, полупроводниковыми, электропроводящими и пьезоэлектрическими свойствами [5, p. 85; 112, p. 1561]. Ширина запрещенной зоны (3,3 эВ) в ближнем УФ-спектре, высокой энергией экситонного связывания (60 мэВ) при комнатной температуре [112, p. 1562] и естественной электропроводностью n-типа [112, p. 1562]. Эти характеристики позволяют ZnO иметь замечательные приложения в различных областях. Большое значение ширины запрещённой зоны ZnO оказывает существенное влияние на его свойства, такие как электропроводность и оптическое поглощение. Экситонная эмиссия может сохраняться выше при комнатной температуре, а проводимость возрастает при легировании ZnO другими металлами [106, p. 064308; 116, p.3893; 117, p. 3321; 118, p. 26]. В дополнение к своим уникальным антибактериальным свойствам НК-ZnO обладают высокой каталитической и высокой фотохимической активностью. ZnO обладает высоким оптическим поглощением в областях УФА (315-400 нм) и УФБ (280-315 нм), которые выгодны в антибактериальном

ответе и используются в качестве защитного средства для защиты от ультрафиолетовых лучей в косметике [106, p. 064310; 123].

Наноструктуры ZnO являются предметом многих исследований благодаря их многофункциональным свойствам в различных применениях. Наноструктурный ZnO является потенциальным кандидатом на применение в датчиках, сборе энергии и многих электронных устройствах. В настоящее время идет широкое применение наноструктурного ZnO в медицинских и противовирусных областях. Это связано с его потенциальной биосовместимостью по сравнению с другими оксидами металлов, растворимостью в щелочной среде и полярными поверхностями ZnO [106, p. 064310].

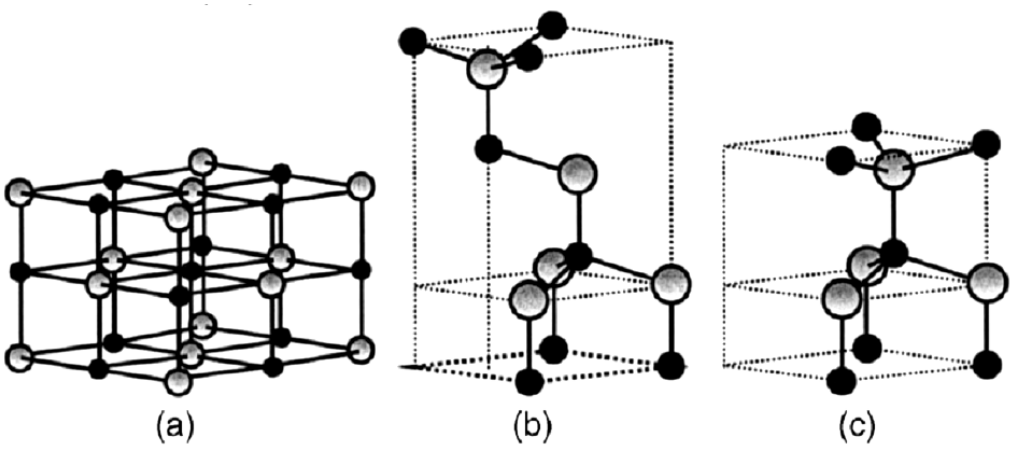
1.3.2 Кристаллическая структура ZnO

Кристаллы ZnO имеет три кристаллических фаз, рисунок 1.2:

1) структура каменной соли – NaCl, структурный тип B1, координационное число = 6, пространственная группа *Fm3m;*

2) сфалерит (также известна как цинковая обманка), структурный тип B3, координационное число = 4, пространственная группа $F\bar{4}3m$;

3) вюрцит, структурный тип B4, координационное число = 4, пространственная группа $P6_3mc$ [89, p.220; 103, c. 21; 104, p.17; 107, p. 041307].



(a) – кубическая структура хлорида натрия; (b) – кубическая структура цинковой обманки; (c) – гексагональная структура вюрцита. Серые и черные сферы обозначают атомы Zn и O, соответственно [89, p.220; 103, c. 21; 104, p.17; 107, p. 041307]

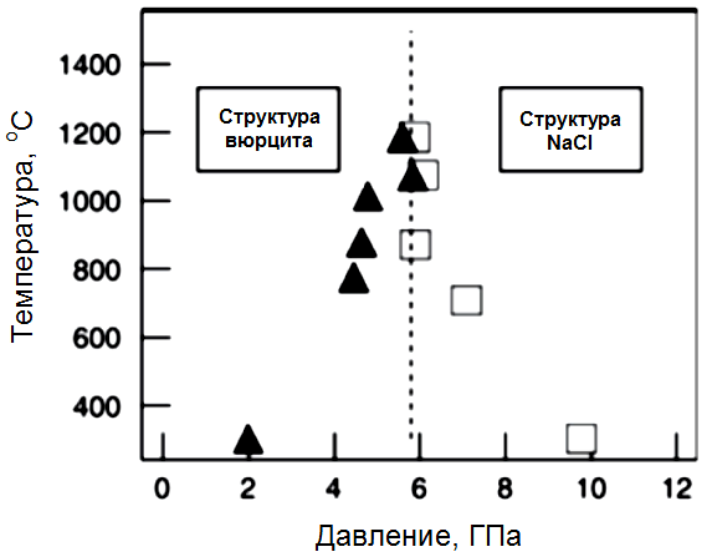
Рисунок 1.2 – Кристаллические структуры ZnO

Вюрцит обладает следующими параметрами решетки a = 0,325 нм и c = 0,521 нм. По вершинам октаэдра располагается атом кислорода, окружая атом цинка четырьмя атомами и наоборот, соотношение c/a p= 1,6, что в свою очередь очень близко к идеальному значению для гексагональной ячейки c/a = 1,633. Структура термодинамически устойчива в окружающей среде [89, p. 220;

104, p. 10] и обычно схематически иллюстрируется как ряд чередующихся плоскостей ионов Zn и O, уложенных вдоль оси c. Тетраэдрическое окружение (координационное число=4) характерно для ковалентной sp^3 связи, но необходимо отметить, что характер связей в оксиде цинка находится на границе между ионным и ковалентным [103, с. 22; 107, p. 041307]. Расчѐты из термохимических и спектроскопических данных определяют степень ионности оксида цинка как 50 – 60%, 39% [103, с. 24;], что соответствует эффективному ионному заряду от 1 до 1.2. Заряд кислорода в ZnO, рассчитанный по методу Сандерсона, составляет –0.29 [29, p. 337].

Структура сфалерита является метастабильной. Получение монокристаллов со структурой сфалерита не представляется возможным [103, p. 22; 107, p. 041307]. Сфалерит можно стабилизировать при гетероэпитаксиальном росте плѐнок ZnO на подложках с кубической структурой (ZnS, GaAs/ZnS, Pt/Ti/SiO2/Si) [103, p. 22; 107, p. 041307].

Монокристалл оксида цинка с кристаллической структурой каменной соли (параметр элементарной ячейки a = 4.271 – 4.294 Å [103, p. 22; 107, p. 041307]) выращивается при высоких давлениях, также он обретает термодинамическую устойчивость в наноструктурирной форме, также может стабилизироваться в матрице с кубической структурой (MgO, NaCl) [103, с.23]. При давлении 9.8 ГПа (300 К) происходит структурный переход «вюрцит – структура типа NaCl» (рисунок 1.3). Гистерезис перехода между двумя фазами, который наблюдается при давлении от 2 до 9.8 ГПа (300 К), зависит от температуры и исчезает при T > 1300 K [103, с.23]).



Квадраты обозначают переход вюрцит – структура типа NaCl, треугольники – обратный переход [103, с. 24].

Рисунок 1.3 – (T-P)-диаграмма оксида цинка

1.3.3 Антибактериальная активность и механизм токсичности наночастиц ZnO

Клеточная структура бактерий, характеризуются клеточной мембраной, клеточной стенкой и цитоплазмой. Клеточная стенка лежит вне клеточной мембраны и состоит в основном из однородного слоя пептидогликана (который состоит из аминокислот и сахаров). Клеточная стенка поддерживает осмотическое давление цитоплазмы, а также характерную форму клетки. Грамположительные бактерии имеют одну цитоплазматическую мембрану с многослойным пептидогликаном [89, p. 220; 100, p. a000415] и более толстую клеточную стенку (20-80 нм). В то время как грамотрицательная стенка бактерий состоит из двух клеточных мембран, наружной мембраны и плазматической мембраны с тонким слоем пептидогликана с толщиной 7-8 нм рисунок 1.4 б. Частицы с близкими размерами может легко пройти через пептидогликан и, следовательно, может оказывать бактерицидное действие.

Цитоплазма, желеобразная жидкость, заполняющая клетку, включает в себя все клеточные компоненты, за исключением ядра. Функции этой органеллы включают рост, обмен веществ и репликацию. Следовательно, цитоплазма содержит белки, углеводы, нуклеиновые кислоты, соли, ионы и воду (~80%). Эта композиция способствует электропроводности клеточной структуры. Общий заряд стенок бактериальных клеток отрицательный. На рисунке 1.4 а, показаны типичные структуры клеток бактерий [10, p.1655]. Антибактериальная активность известна, как действие, при котором бактериальный рост разрушается или ингибируется. Он также описывается как функция площади поверхности, контактирующей с микроорганизмами [89, p.231; 99, p. 1679; 100, p. a000415; 123, p. 1920]. В то время как антибактериальные агенты являются препаратами селективной концентрации, способными повредить или ингибировать рост бактерий, и они не являются вредными для хозяина. Эти соединения действуют как химиотерапевтические агенты для лечения или профилактики бактериальных инфекций. Антибактериальный агент считается бактерицидным, если он убивает бактерии или бактериостатическим, если он ингибирует их рост [100, p. a000415].

Токсичность активных форм кислорода (АФК) для бактерий объясняется их высокой реакционной способностью и окислительным свойством [96, p. 382], сообщается, что водные суспензии НК-ZnO производят увеличенный уровень АФК. Многочисленные исследования рассматривали генерацию АФК как основную причину нанотоксичности [83, p. 867; 89, p. 232; 92, p. 3529; 95, p. 2122; 96, p. 382; 97, p. 4141]. Фотокаталитическая генерация АФК была основным фактором антибактериальной активности различных оксидов металлов [120, p. 3]. В нескольких исследованиях было показано, что образование АФК является основным механизмом, ответственным за антибактериальную активность НК-ZnO [84, p. 199; 86, p. 035009; 89, p. 232; 93, p. 523; 94, p. 645; 121, p. 942]. В работах [82, p. 4024, 89, p.236] показано, что повышенная антибактериальная активность ZnO обусловлена увеличением продукции АФК из ZnO при воздействии ультрафиолетового излучения. Такие

реакционноспособные виды представляют собой супероксидный анион (O_2), перекись водорода (H_2O_2) и гидроксид (OH^-). Токсичность этих видов включает разрушение клеточных компонентов, таких как липиды, ДНК и белки, в результате их проникания в мембрану клеток бактерий. Однако роль АФК в противомикробных действиях стала проблемой среди исследователей в этой области [82, p. 4024].

Анализируя работы [80, e85983; 83, p. 867; 94, p. 645; 95, p. 2122; 104, p. 7; 107, p. 041305; 121, p.940] можно прийти к общей закономерности, что антибактериальные свойства оксида цинка обратно пропорциональны размерам частиц. В [86, p. 035007], что меньший размер 12 нм показал лучшую эффективность по сравнению с 45 нм и 2 мкм. Это объяснялось выходом АФК на поверхность НК-ZnO как при УФ, так и в видимом свете, а выпуск АФК приводил к летальному бактериальному повреждению. Объяснения образования АФК (OH^-, H_2O_2 и O_2^{2-}) на поверхности ZnO и предложили корреляцию реакции фотонов и антибактериальной активностью следующим образом:

$$ZnO + h\nu \rightarrow e^- + h^+, \quad (1.1)$$

$$h^+ + H_2O \rightarrow {}^{\blacksquare}OH + H^+, \quad (1.2)$$

$$e^- + O_2 \rightarrow {}^{\blacksquare}O_2^-, \quad (1.3)$$

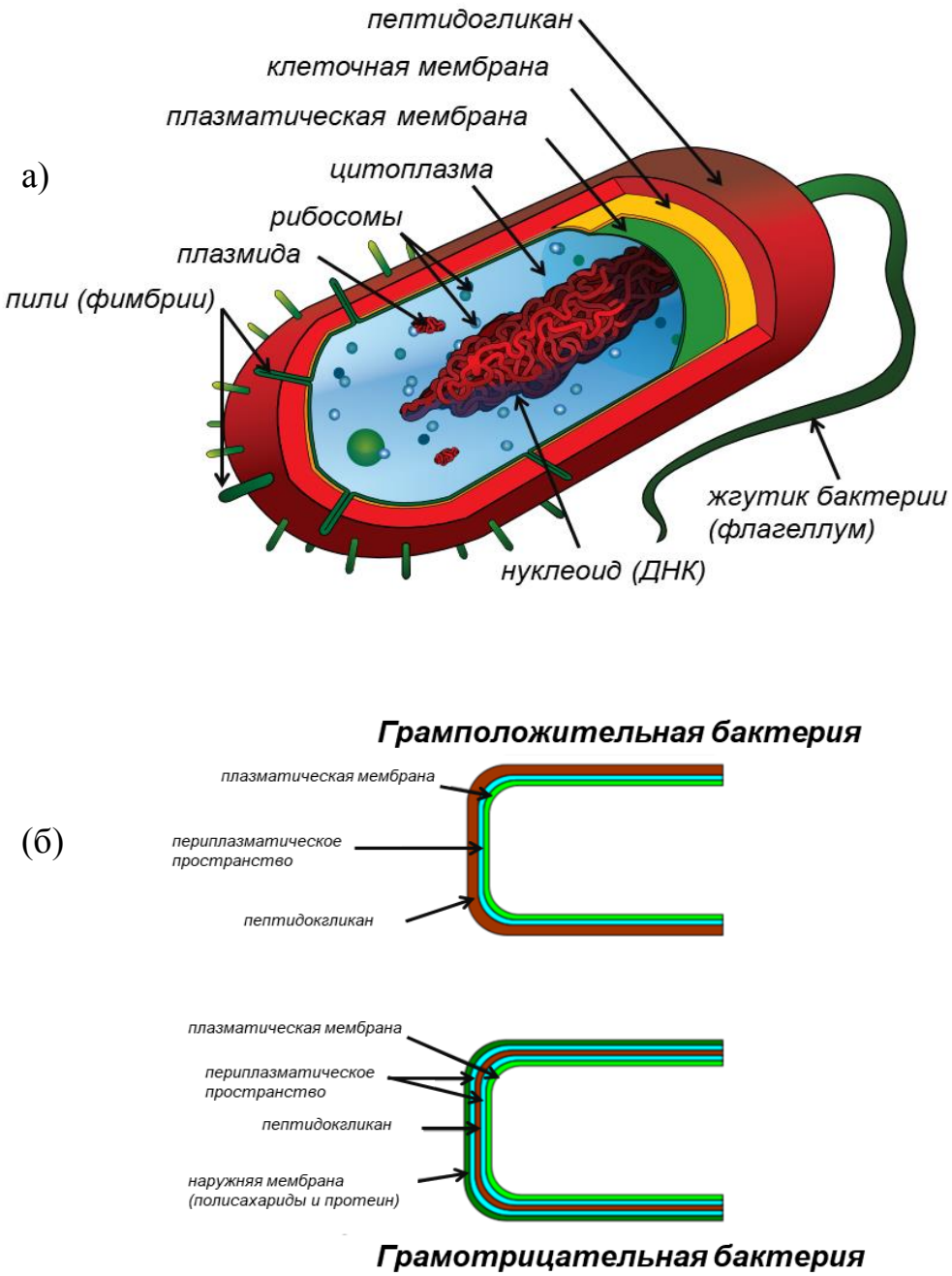
$${}^{\blacksquare}O_2^- + H^+ \rightarrow HO_2^{\blacksquare}, \quad (1.4)$$

$$HO_2^{\blacksquare} \rightarrow H^+ + e^- \rightarrow H_2O_2, \quad (1.5)$$

Электрон e^-и дырка h^+взаимодействуют с водой (H_2O) для получения: ${}^{\blacksquare}OH$ и H^+. Кроме того, молекулы O_2 (суспендированные в смеси бактерий и ZnO) дают супероксидный анион ${}^{\blacksquare}O_2^-$, который реагирует с H^+ с образованием $HO_2^{\blacksquare}$. После этого $HO_2^{\blacksquare}$ взаимодействует с электронами, образующими перекись водорода $HO_2^{\blacksquare}$; который сочетается с H^+, образовывая молекулы перекиси водорода (H_2O_2). Последние способны проникать в мембрану, где они либо повреждают, либо убивают бактерии. Генерация H_2O_2 в основном полагается на поверхность НК-ZnO для получения дополнительных активных молекул. Существует линейная пропорциональность между концентрациями H_2O_2, образующихся в суспензии ZnO, и размером частиц ZnO [124].

Супероксиды и гидроксильные радикалы не могут проникать в мембрану из-за их отрицательных зарядов [124, p. 631]. Таким образом, эти виды соединений обнаружены на внешней поверхности бактерий, в отличие от них молекулы H_2O_2 способны проходить через стенку бактериальной клетки, что впоследствии приводит к травмам и разрушению и, наконец, вызывает гибель клеток [90, p. 2327; 121, p. 941]. После того как НК-ZnO убивают или взаимодействует с клеточной мембраной, частицы, более вероятно, остаются

прочно адсорбированными на поверхности или проникают вглубь мертвых бактерий, блокирующих дальнейшую антибактериальную активность. Как только НК- ZnO находятся в ростовых средах, они будут продолжать выпускать пероксиды, покрывающие все поверхности мертвых бактерий. Поэтому это непрерывное высвобождение пероксида приводит к более высокой бактерицидной эффективности [89, p. 233].



а) строение органов бактерий, б) строение оболочки бактерий

Рисунок 1.4 – схематическое изображение клетки бактерий [98]

Еще одним из предполагаемых механизмом антибактериальных свойств НК-ZnO, является высвобождение ионов цинка в среде, содержащей НК-ZnO и бактерии [125–129]. Выпущенный Zn^{2+} оказывает значительное влияние на ингибирование активного транспорта, а также на метаболизм аминокислот и нарушение функционирования ферментной системы бактерий. В исследовательских работах [95, p. 2122; 106, p. 064310; 126, p. 1310; 130–132] предполагается, что скорость процесса вывода Zn^{2+} в ростовые среды, который ответственен за нанотоксичность ZnO, и скорость растворения НК-ZnO в Zn^{2+} имеют обратную зависимость размеру частиц. Тем самым представляется возможным регулировать токсичные свойства синтезируемого материала. В работе [133] показано, что высвобождение ионов Zn^{2+} является логической причиной токсичности ZnO по отношению к бактериям Saccharomyces cerevisiae. Согласно этой гипотезе, токсичность НК-ZnO относится к растворимости Zn^{2+} в среде, включая бактерии. Поэтому солюбилизированные низкие концентрации Zn^{2+} может вызывать сравнительно высокую толерантность к бактериям. В работе [134] был проведен эксперимент по обработке E. coli низкой концентрацией (1 мМ) раствора Zn^{2+}. Напротив, авторы работ [135] и [136] описали вклад ионов Zn^{2+} в антимикробную эффективность НК-ZnO, как незначительную из-за низких концентраций растворенных Zn видов, высвобождаемых во время растворения ZnO. Тем самым на сегодняшний точный механизм антибактериальной активности не известен.

1.4 Постановка цели и задач исследования

Проведенный анализ современного состояния работ отечественных и зарубежных авторов по изучению свойств композитных материалов на основе ГА, позволяет сделать следующие заключения.

1) Кристаллографические структуры биологического апатита являются **гексагональной** (не плотно упакованная), a = b = 9,432 Å, c = 6,888 Å и **моноклинной,** a = 9,421 Å, b = 2a, c = 6,881 Å,γ = 120 , стехиометрическое отношение Ca/P атомов составляет 1,67 и 2.16 весовое.

2) Анализ основных применяемых материалов показывает, что существует тенденция разработки новых биомиметических материалов, способствующих росту биологической ткани или замене ее: создание композитных материалов на основе ГА-полимерная матрица, создание пористых металлических структур для уменьшения модуля упругости имплантата.

3) Установлено, что антибактериальные свойства оксида цинка обратно пропорциональны размерам частиц. Основным бактерицидным механизмом НК-ZnO является активное формирование АФК (OH^-, H_2O_2 и O_2^{2-}).

4) Установлено, что в исследовательских работах микро- и нанокристаллы ZnO рассматриваются как отдельное химическое соединение, опуская взаимодействие ZnO с составляющими композитного материала, при легировании им.

Целью диссертационной работы является проведение комплексного исследования структуры, фазового состава композита на основе гидроксиапатита и альгината натрия легированных оксидом цинка. Разработка методик и технологий по созданию композитного биомиметического имплантата.

Сформулированы пошаговые задачи исследования:

1) Определение влияния оксида цинка на элементный, фазовый, функциональный состав чистого гидроксиапатита в порошковом виде (ГАп), в виде гидрогеля (ГАг) и композита ГА-Алг, оценить гидроабсорбирующие свойства ГА-Алг-ZnO;

2) Получение опытных образцов медицинских имплантатов с трабекулярной, биомиметической архитектурой методом реверс-инжиниринга из стали 316L и медицинского сплава Ti6Al4V;

3) Определение режимов и особенностей нанесения композитного наноструктурного покрытия ГА - ZnO на пористые металлические печатные структуры, полученные методом селективного лазерного плавления;

4) Исследование *in vitro* цитотоксичности и биосовместимости композитного материала ГА-Алг-ZnO, ГА-ZnO и покрытий ГА, ГА-ZnO на примере культуры клеток соединительной ткани (мышиные фибробласты NIH-3T3), антибактериальные свойства композитных материалов ГА-Алг-ZnO и ГА-ZnO.

2 ОБОРУДОВАНИЕ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ БИОКОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА И ПОКРЫТИЙ С НАНОРАЗМЕРНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ НА ОСНОВЕ БИОАПАТИТА, АЛЬГИНАТА НАТРИЯ И МИКРОЧАСТИЦ ZnO

В настоящем разделе обсуждаются объекты исследований, а также детально изложены принципы, методы получения, средства реализации испытаний и определения антибактериальных свойств, биосовместимости и цитотоксичности наноструктурных апатит-биокомпозитных материалов и покрытий.

2.1 Методы получения биокомпозитных материалов на основе гидроксиапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO с наноразмерной архитектурой

В ходе исследований был получен мелкодисперсный оксид цинка, а также полимер-апатитный композитный материал, допированный наноструктурированными частицами ZnO как в форме гидрогеля, так и в форме гранул. Схема получения композитного материала приведена на рисунке 2.1.

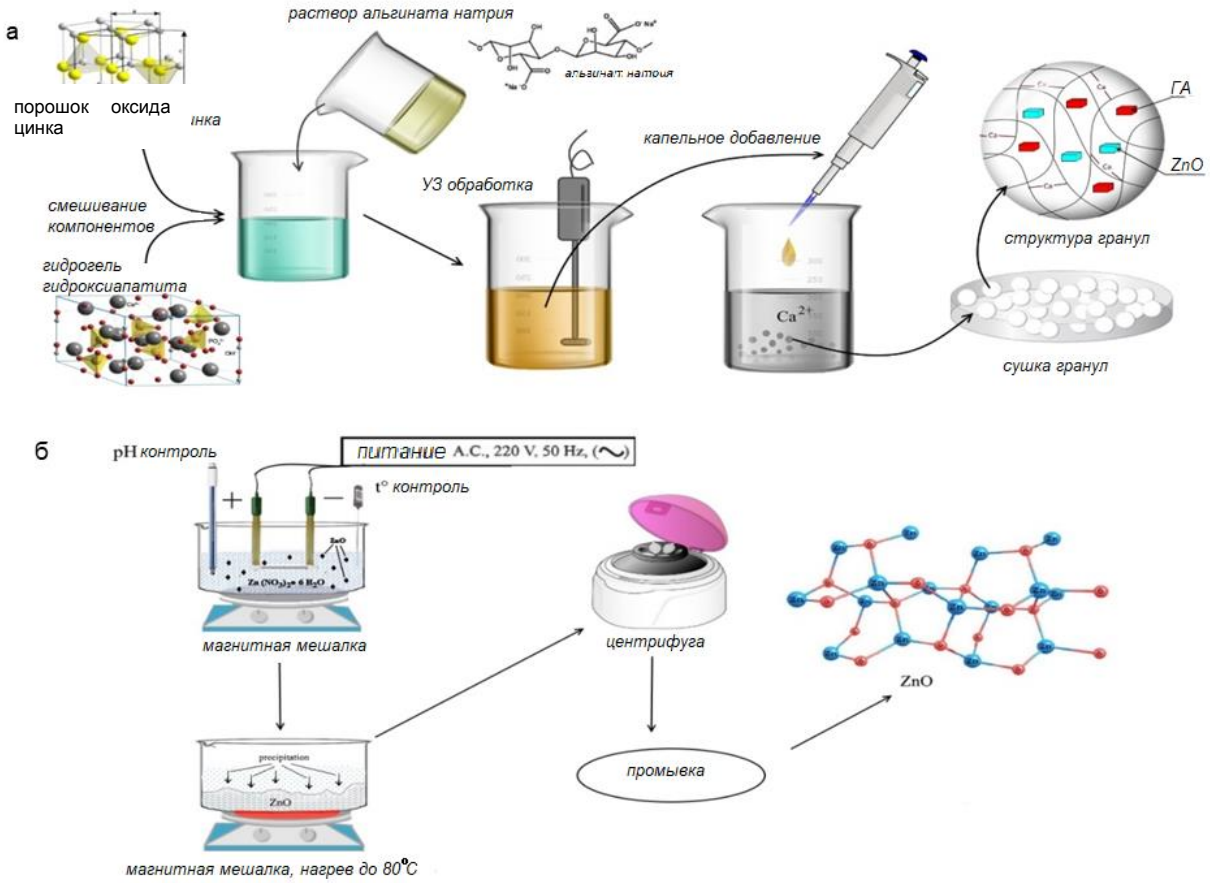
Были использованы следующие химические вещества производства фирмы «Merck»: кальций нитрат тетрагидрат ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$), гидрофосфат аммония ($(NH_4)_2HPO_4$), гидроксид амония (NH_4OH), цинк нитрат гексагидрат $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ класификации «ХЧ», кальция хлорид $CaCl_2$; натрия альгинат (Alg) (E401) с молекулярной массой 15 кДа (производитель Китай).

2.1.1 Получение ГА в виде порошка и гидрогеля

Для проведения синтеза ГА стартовые компоненты, а именно 19.7 г $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ и 6.6г $(NH_4)_2HPO_4$ взвешивали на аналитических весах и каждый растворяли в 500 мл дистилированной воды. Полученный раствор гидрофосфата аммония покапельно (1мл/мин) добавляли к раствору кальций нитрата тетрагидрата, при этом конечная концентрация кальция и фосфора составляла 0.167М и 0.1М соответственно. Величина pH =10,5 достигалась прибавлением 40 мл 25% раствора аммиака к смеси реагентов при перемешивании. Молярное соотношение Ca/P в растворе равнялось 1.67, как в случае стехиометрического ГА. Образование ГА происходило согласно следующей реакции:

$$10Ca(NO_3)_2 \; x4H_2O + 6(NH_4)_2HPO_4 + 8NH_4OH = Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 20NH_4NO_3 + 10\,H_2O$$

После перемешивания компонентов и доведения pH до заданного уровня, 400 мл реакционной суспензии было перенесено в микроволновую печь Samsung M1712NR , где было подвержено воздействию микроволновой радиации мощностью 300 Вт течение 3 минут, а затем мощностью 450 Вт в течение 5 минут.



а) схема приготовления полимер-апатитного композиционного материала в виде гранул, легированных наноструктурными частицами ZnO, и б) схема приготовления частиц ZnO

Рисунок 2.1 – Схема приготовления наноструктурных биокомпозитных материалов [137]

Во время синтеза температура реакции поддерживается близкой к физиологической (21 ° C) системой охлаждения, чтобы исключить влияния нагрева МВ излучением. Для сравнения те же образцы были синтезированы без МВ и УЗ-излучения. Важно, что образование нанокристаллитов ГА под действием МВ и УЗ-излучения происходит в одну стадию (без образования аморфной фазы CaP) из-за быстрого поглощения энергии излучения реакционной системой с мгновенной дегидратацией Ca^{2+}, PO_4^{3-} и OH^- ионов (рисунок 2.2) [137, p. 7505]. После охлаждения образец был многократно промыт дистиллированной водой до нейтральной реакции. Твердую фракцию отделяли центрифугированием. В результате был получен гидрогель гидроксиапатита влажностью около 85% (в дальнейшем образец ГАг). Для получения порошка ГА, полученный гидрогель высушивался при 37°C, 48 часов, после чего измельчался в керамической ступке. Далее порошок просеивается в вибрационном сито (60 мкм).

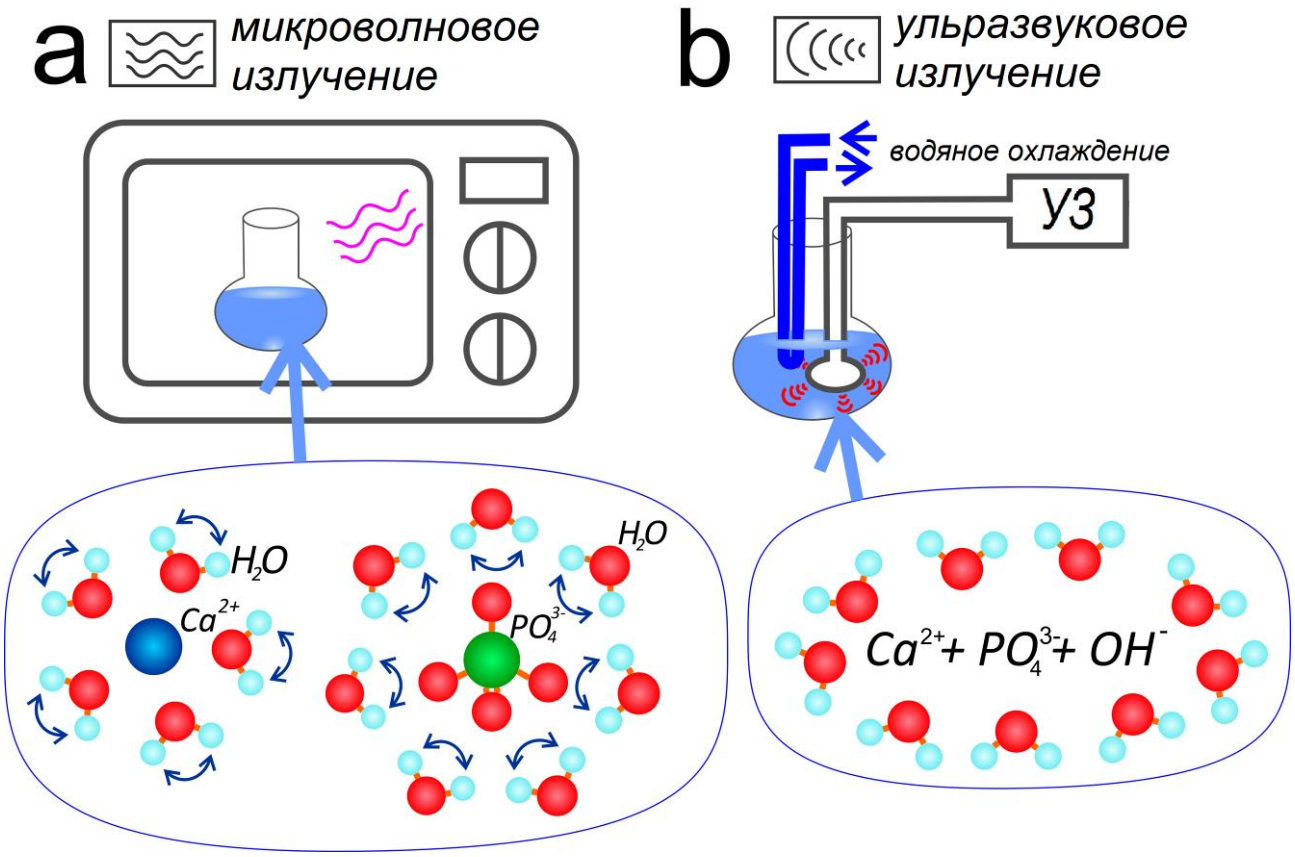


Рисунок 2.2 – Экспериментальная установка облучения реакционной суспензии МВ (а) и УЗ (б) [137, p. 7505]

2.1.2 Получение композита ГА-ZnO

К 200 мл 0,2 М раствора цинка нитрата гексагидрата было добавлено 4 мл (3 вес. %) раствора альгината натрия. Формирование ZnO соединения началось после добавления 15 мл (25 вес. %) раствора аммиака. В данном варианте синтеза в полученный раствор была опущена титановая пластина, через которую пропускали переменный ток силой 2А в течение 30 минут. При этом происходил локальный нагрев раствора и зародышеобразование оксида цинка ZnO. После этого весь объем раствора был нагрет на электрической плите до температуры 80^{o}C при перемешивании с помощью магнитной мешалки. После охлаждения образец был многократно промыт дистиллированной водой до нейтральной реакции. Выпавшую в осадок фракцию ZnO отделяли центрифугированием. Высушенный при 37^{o}C продукт был измельчен до порошка дисперсностью≤ 63 мкм. К 6,0 г суспензии ГА (влажность 85%), полученной выше описанным методом, было добавлено 0,3 г порошка ZnO (≤ 63 мкм) и перемешано. Таким образом был получен композит ГА-ZnO в форме пасты (в дальнейшем образец ГА-ZnO) [138–143].

2.1.3 Получение композитов ГА-Алг-ZnO и ГА-Алг

Для получения композитного материала ГА-ZnO-Алг в форме гранул к композиту ГА-ZnO был добавлен 2% водный раствор альгинат натрия в весовом соотношении 1:1. Смесь была обработана ультразвуком в установке УЗДН при мощности 75 Вт в течение 12 минут до образования гомогенной массы. Путем диспергирования полученной суспензии в 0,125М растворе хлорида кальция были получены гранулы композитного материала ГА-Алг-ZnO. Время экспозиции в сшивающем растворе $CaCl_2$ составило 25 минут и 18 часов. Образовавшиеся гранулы были отфильтрованы, промыты дистиллированной водой и высушены. По выше указанной технологии были получены и ГА-Алг, но без добавления цинка оксида.

2.2 Методы исследования антибактериальных свойств и биосовместимости апатит – биокомпозитных материалов и покрытий

2.2.1 Исследования антимикробной активности

Противомикробная активность ГА-ZnO и ГА-Алг-ZnO изучалась против тест-культур *Esherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* данные бактерии использовались в качестве моделей грамотрицательных бактерий и *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* брались в качестве грамположительных бактерий. Противомикробная оценка проводилась следующими двумя способами:

1. ***Модифицированный метод «диффузии в агар».*** Питательную среду Мюллер-Хинтон после ее автоклавирования разливали в стерильные чашки Петри слоем толщиной 4 мм. Чашки оставляли при комнатной температуре для застывания. Затем готовили суспензию исследуемых микроорганизмов (инокулюм). Для этого использовали чистую суточную культуру, выросшую на плотной питательной среде. Отбирали несколько однотипных, четко изолированных колоний. Петлей переносили незначительное количество материала с верхушек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором, доводя плотность инокулюма до 0,5 по стандарту МакФарланда, что соответствует $1,5x10^8$ КОЕ (колоний образующих единиц) в 1 мл. Инокулюм наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 2 мл, равномерно распределяя по поверхности покачиванием, после чего удаляли излишки. Приоткрытые чашки подсушивали в течение 10 минут при комнатной температуре. На поверхность питательной среды раскладывали комочки материала ГА-ZnO и ГА-Алг-ZnO, смоченные в стерильной воде. После аппликации материала чашки Петри помещали в термостат, инкубировали при температуре 37°С в течение 24 часов, затем измеряли зоны задержки роста микроорганизма-мишени.

2. ***Метод «совместного инкубирования».*** Тестируемые материалы стерилизовали автоклавированием в течение 15 минут при 120 °С. Образцы материала ГА-ZnO помещали в 1 мл стерильного питательного бульона и использовали как контроль стерильности. В опытной группе материалов ГА-

ZnO и ГА-Алг-ZnO в концентрации 0,1; 0,5 и 1 мг/мл помещали в культуральную среду, инокулированную микроорганизмами-мишенями в титре 10^6 КОЕ/мл, а затем инкубировали в термостатируемом шейкере при 37 °С в течение 1-6-10-24 часов. Из каждой пробы отбирали 100 мкл бактериальной суспензии, высевали на питательный агар и культивировали при 37 °С в течение 48 часов для подсчета колониеобразующих единиц. В контрольные пробирки ничего не добавляли. Антибактериальную активность оценивали по уровню выживаемости бактерий в опытных и контрольных образцах. Выживаемость (В) определяли по формуле: В=(А-Б)/А, где А — среднее количество КОЕ/мл в контрольной суспензии, Б - среднее количество КОЕ/мл в опытном образце и выражали в процентах.

2.2.2 Методы определения биосовместимости и цитотоксичности материалов

Цитотоксичность материалов исследовали на культурах клеток мышиных остеобластов и фибробластов NIH-3T3, полученных из лаборатории биомедицинской инженерии (Аахенский университет прикладных наук, Германия).

При культивировании клеток NIH-3T3 использовалась модифицированная питательная среда Дульбекко (DMEM), обогащенная 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS), 1% L-глутамином, лактальбумином в концентрации 2 мг/л и антибиотиками (пенициллин – 100 единиц/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл). Жизнеспособность культур фибробластов и остеобластов поддерживали в CO_2-инкубаторе при температуре 37°С, в газовой смеси, содержащей 5% CO_2. Каждые 4 дня проводили замену питательной среды, пассажирование клеток. При достижении 75–85% конфлюентности монослоя клетки диссоциировали с помощью 0.25 % раствора трипсин-ЭДТА и переносили в концентрации 10^4 клеток/мл в 2мл питательной среды на лунку на предварительно простерилизованные образцы материала, закрепленные в 12-луночных планшетах.

Биосовместимость композитных материалов в условиях *in vitro* оценивали по следующим показателям: уровень жизнеспособности, адгезивные свойства, морфология, пролиферация и дифференцировка клеток [144,145].

Жизнеспособность клеток определяли через 72 и 120 часов с использованием теста на исключение красителя трипанового синего для селективного окрашивания мертвых клеток. Количество неокрашиваемых клеток подсчитывают с помощью электронного счетчика клеток BIO-RAD TC20.

Прямую цитотоксичность материалов оценивали по эффективности прикрепления к нему клеток. После 48 часового контакта культур клеток с материалом, пленки промывали натрий-фосфатным буфером для удаления неприкрепившихся клеток. Количество прикрепившихся клеток определяли методом МТТ. МТТ-тест — колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток. Клеточные оксидоредуктазные ферменты

способны восстанавливать тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в нерастворимый формазан, который имеет пурпурное окрашивание. Количество образуемого формазана, определяемого при OD=490 нм, прямо пропорционально количеству живых клеток в культуре. Для постановки эксперимента клетки засевали в 96-луночные планшеты (Falcon BD, США) в количестве 5×10^4 на лунку и инкубировали в условиях насыщенной влажности при 37 ^oC в атмосфере 3–5% CO_2 в течение 24 часов, после чего меняли питательную среду и помещали образцы материала весом 0,1 г . Через 24, 48 или 72 часа образцы вынимали, затем в каждую лунку добавляли 1 мг/мл MTT в питательной среде и инкубировали в течение 2 часов при 37 ˚C в атмосфере 3–5% CO_2. Образовавшийся в результате формазан экстрагировали в лизирующем растворе (99% ДМСО, 0.6% уксусной кислоты и 0.1 г/мл лаурилсульфат натрия). Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра (Biotek PowerWave 340, США) на длине волны 570 нм.

Адгезию, распластывание и последующую пролиферацию клеток на материалах на основе гидроксиапатита наблюдали на 3-е и 5-е сутки культивирования посредством инвертированного микроскопа (Zeiss AxioVert 25, Германия). Флуоресцентные изображения получали по истечении 5 дней культивирования. Образцы предварительно фиксировали 4 % раствором формальдегида, затем окрашивали с использованием флуоресцентных красителей. Для окрашивания актиновых нитей цитоскелета клеток MC3T3-E1 (зелёный цвет) использовали краситель фаллоидин меченый Alexa Fluor® 488 (1:20, Invitrogen, США), ядра клеток (голубой цвет) были окрашены 4-6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, Invitrogen, США). Возбуждение флуорофоров, фаллоидина меченого Alexa Fluor® 488 и DAPI, осуществлялось на длине волны 488 нм с применением 505-530 нм полосового фильтра и на длине волны 543 нм с применением 560 нм длинноволнового пропускающего фильтра, соответственно.

Определение цитотоксичности материалов исследовали с помощью LDH-теста. Активность LDH может быть определена с помощью связанной ферментативной реакции: LDH окисляет лактат до пирувата, который затем реагирует с солью тетразолия INT с образованием формазана. Увеличение количества формазана, полученного в супернатанте культуры, напрямую коррелирует с увеличением количества лизированных клеток. Формазан-краситель является водорастворимым и может быть обнаружен спектрофотометром при 500 нм. Для этого образцы исследуемых материалов помещали на монослой по достижении конфлуентности, после чего продолжали культивирование в течение 48 часов. Количество поврежденных клеток (DC) определяли как отношение активности LDH в среде к суммарной активности LDH в лизате и в ростовой среде и выражали в процентах: DC (%) = (LDHm / LDHl + LDHm) x 100.

В каждом эксперименте задействовано по 10 образцов каждого вида материала и 3 контрольных культуры. Всего проводили по пять таких

экспериментов, по результатам которых были посчитаны средние значения и 95% доверительный интервал. Достоверность полученных данных оценивалась по U-критерию.

2.3 Методы получения металлических биомиметических структур и нанесения апатит композитных покрытий

В данном подразделе описаны технологические решения получения подложки, осаждения покрытий гидротермальным методом и микроплазменным напылением. Одной из целей диссертационной работы является разработка методик и технологий по созданию имплантата, обладающего биомиметической композицией.

Известно, что размер пор, форма, а также морфология поверхности имеет прямое влияние на остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства изделия [146–149]. Тем самым задачей работ, описанных в данном подразделе является:

1) Получение опытных образцов с трабекулярной, биомиметической архитектурой методом селективного лазерного плавления из стали 316L и медицинского сплава Ti6Al4V;

2) Нанести композитное покрытие гидрокисапатита и оксида цинка методом гидротермального осаждения и микроплазменного напыления;

3) Провести исследования по биосовместимости полученных покрытий, путем совместного инкубирования материала покрытий с тестовыми культурами клеток остеобластов.

2.3.1 Метод получения пористых металлических подложек селективным лазерным плавлением. Получение биомиметических цифровых структур

Сегодня во всем мире активно развиваются технологии аддитивного производства, позволяющие за короткое время создать физический прототип объекта из компьютерной модели. Преимущества аддитивных технологий над традиционными методами создания трехмерных изделий из различных материалов - значительное сокращение времени производства и снижение стоимости готовой продукции, независимо от конфигурации продукта. Наиболее перспективной технологией аддитивного производства является селективное лазерное плавление (СЛП), а также его разновидности.

Технология сканирования костных материалов предназначена для построения трехмерной высоко текстурированной модели и позволяет создавать биомиметичские изделия медицинского назначения, в частности имплантаты для ортопедии и нейрохирургии, а также аугменты. Разрешение текстуры состовляет >40 мкм.

Использование биомиметических пористых имплантатов с высокотекстурированной структурой, полученных методом обратного инжиниринга позволяет создать условия для полноценной регенерации и органотипической перестройки костных структур до их полного функционального восстановления. Биомиметическая архитектура повышает

эффективность остеосинтеза и снижает риск развития послеоперационных осложнений.

Разрешение текстуры состовляет >40 мкм. Размер пор составляет не менее 300 мкм, что соответсвует оптимальному росту костной ткани. Квазиупругий градиент пористых биомиметических структур состовляет от 3,2 до 6,4 ГПа для сплава Ti6Al4V.

На рисунке 2.3 схематически показаны этапы процесса создания опытного образца с пористой структурой, полученного методом сканирования трабекулярной структуры кости. В соответствии со схемой, первым этапом является получение образца кости интересующей нас анатомической области (верхняя часть бедренной кости).

Исходный образец кости разрезается на пластинки толщиной до 0,2 мм, после чего каждая пластинка сканируется оптическим 3Д сканером высокого разрешения.

На рисунке 2.4 изображена 3Д-модель, полученная сканированием трабекулярной структуры кости в соответствии с технологией настоящего метода. Более подробно данная технология описана в технологическом регламенте «Технологический регламент сканирования костных материалов с последующим построением трехмерной высоко текстурированной модели» (Приложение А), а также в работе [150].

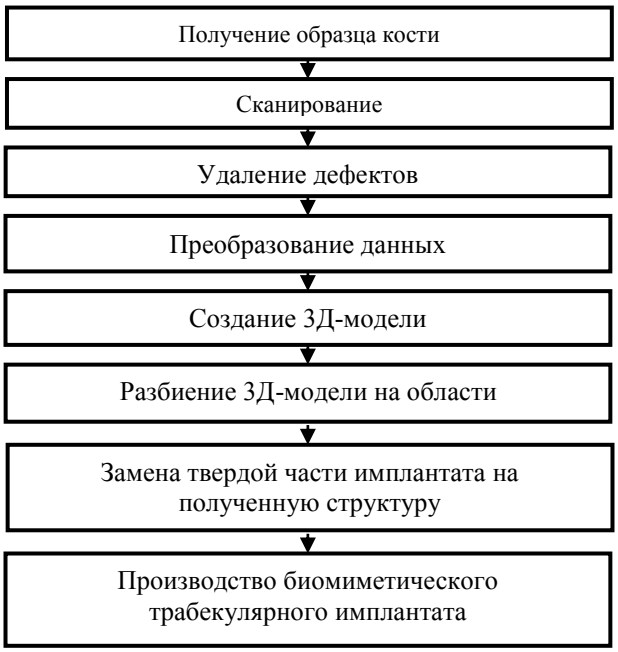


Рисунок 2.3 – Этапы производства имплантата с пористой структурой, полученной сканированием трабекулярной структуры кости

Процесс сканирования костных материалов проводился на оптическом 3D сканере Smarttech3D Universe (Польша), обработка полученных облаков точек проводилось на программном обеспечении Geomagic Design X.

После моделирования имплантата для его изготовления из данных 3Д-модели используется метод аддитивного производства. Методы аддитивного производства известны и включают в себя создание объектов из данных 3Д-модели путем соединения материалов друг с другом поэтапно.

Конечный продукт разработанной технологии является биомиметический трабуклярный имплантат, в качестве примера показан межпозвоночный имплантат (рисунок 2.6).

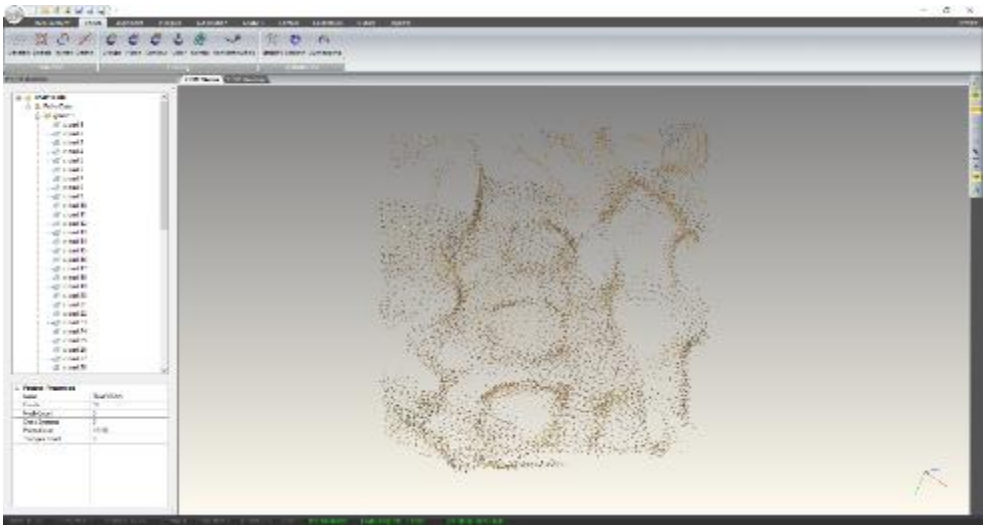


Рисунок 2.4 – Удаление дефектов в полученной модели при сканировании образца кости

На рисунке 2.5 изображена 3Д-модель, полученная сканированием трабекулярной структуры кости в соответствии с технологией настоящего метода.

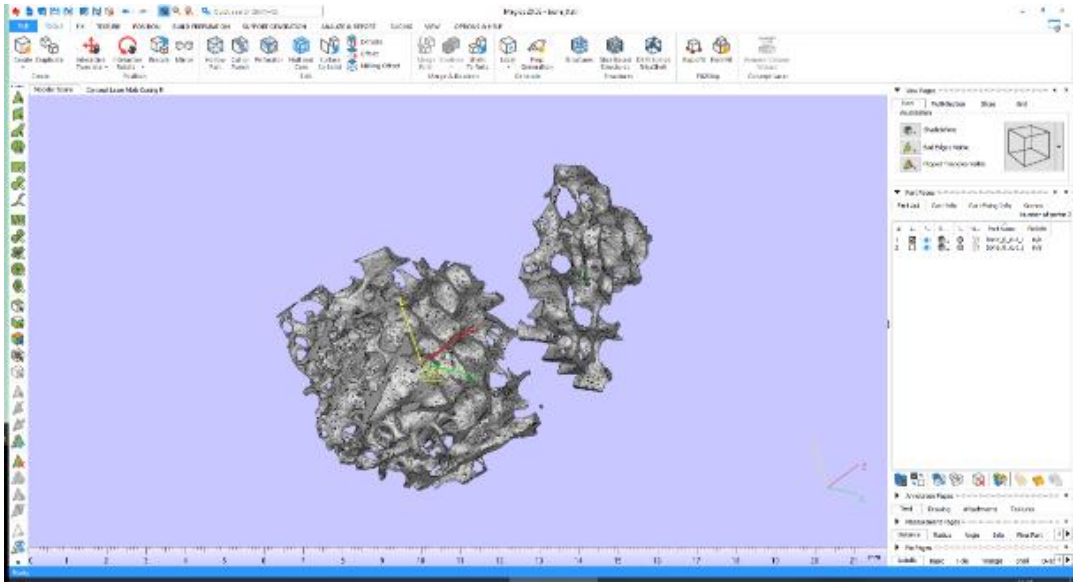


Рисунок 2.5 – Объединение полученных групп сканирования в элементарную ячейку

Процесс производства изделия проводится в машине селективного лазерного плавления. Исходным материалом выбирается сертифицированный медицинский порошковый материал для аддитивного производства, с химическим составом Ti6Al4V.

Принцип селективного лазерного плавления заключается в образовании трехмерного объекта путем последовательного плавления слоев порошкового материала лазерным лучом в соответствии с заданной программой (рисунок 2.6), более подробно описано в работе [150, с. 157]. Процесс СЛП представляет из себя следующее:

– подвижной ракель перемещаясь по горизонтали наносит тонкий слой металлического порошка толщиной 25 мкм.

– лазерный луч передвигается по определенной заданной троектории, оплавляя частицы порошка.

– подложка камеры построения опускается на 25мкм, в то время как подложка камеры загрузки порошка поднимается.

– далее процесс продолжается.

Лазерное плавление порошка проводилось на установке Mlab cusing R, изготовленной Concept Laser (Германия). Использовался волоконный лазер мощностью 90 Вт, частотой излучения 50 кГц, скорость сканирования 500 мм/с, размер пятна 100 мкм. Процесс проводили в атмосфере азота. Содержание кислорода (в соответствии с интегрированными датчиками) на всех стадиях составляло не более 0,1%.

Применяя вышеописанные методы реверс-инжиниринга (сканирование→изготовление) были получены опытные образцы с пористой биомиметической архитектурой размером 10x10x2 мм из стали 316L и сплава Ti6Al4V.

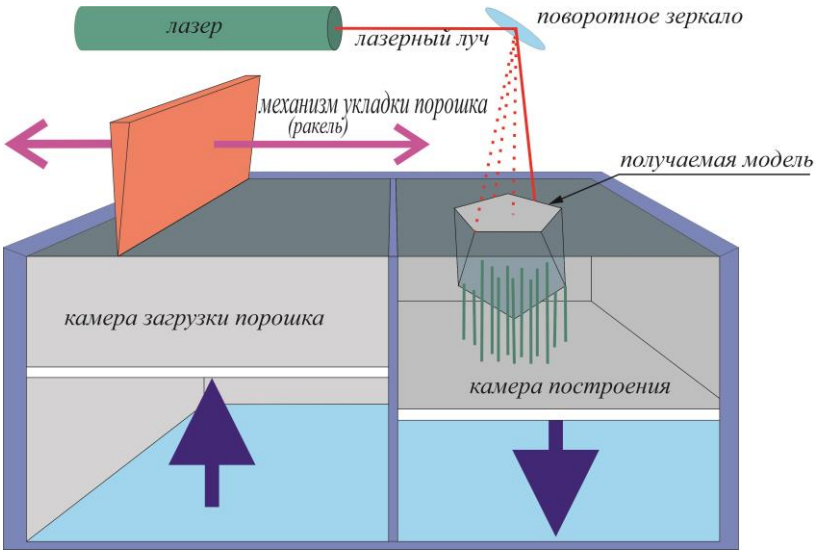


Рисунок 2.6 – Процесс аддитивного производства методом селективного лазерного плавления

2.3.2 Метод нанесения покрытий на пористые трабекулярные металлические структуры гидротермальным осаждением

Гидротермальное осаждение является простым процессом и одним из наиболее экономически эффективных методов. Гидротермическая обработка проводится при повышенных (>80 ° C) температурах в течение относительно длительного периода времени (>1,5 ч), отложения $CaPO_4$ обычно являются кристаллическими. Гидротермальный процесс используется для нанесения $CaPO_4$ как на металлические, так и на полимерные подложки. Процесс основан на образовании хелатных соединений гидрофосфата к в результате совместного растворения Ca-содержащей соли в условиях окружающей среды [25, p.274].

Пластины размером 12×10×2 мм с порами, размер которых не превышал ≤800 мкм, была получена методом селективного лазерного плавления порошка стали 316L.

Нанесения покрытий проводилось при 2-х различных режимах:

1) 5 В, 90ºС, 12 ммоль/л ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 20 ммоль/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 часа, 400ºС, 1 час;

2) 10 В, 90ºС, 6 ммоль/л ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 10 ммоль/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2 часа, 400ºС, 1 час.

Перед нанесением покрытий подложка обрабатывалась в ультразвуковой ванне при мощности 50 Вт на протяжении 20 мин., для удаления окалин и не спёкшегося порошка из пор. Затем промывались в спирте и дистиллированной водой. Процесс нанесения покрытий проводили следующим образом: подложка была прикреплена к медному электроду и погружена в раствор, содержащий $CaCl_2$ (чистота 99%) и NaH_2PO_4 (чистота 99%) с молярным отношением Ca/P = 1,67 и концентрациями 10 ммоль/л и 6 ммоль/л, соответственно. Раствор нагревали с помощью химического реактора с термо рубашкой. Температура хладагента составляла 90 °C, температура раствора составляла 86,4 °C. Время осаждения составляло 1 час при pH 6,5. Для поддержания равномерного распределения температуры по всей массе исходного раствора использовали однородное перемешивание. Субстраты были предварительно очищены, в том числе: 15 минут ультразвуковой обработки в ацетоне, 96% этанола и тройной промывки в дистиллированной воде. Легирование Zn проводилось электрохимическим методом при напряжении 5 В и 10 В, расстояние между электродами составляло 12 см. После нанесения покрытия образец отжигали в муфельной печи при 400 ° C в течение 1 часа.

Термометр был использован для контроля температуры во время процесса. Внедрение ионов цинка осуществляли с помощью блока питания (LT ECOS, 7972, Италия), применяя потенциал электрода 5-10 В при температуре 85 ° C, стабилизированной термостатической водяной баней (LR-2.ST, IKA, Германия) в течение 2 часов, во время процесса осаждения непрерывное перемешивание осуществляли магнитной мешалкой. Установка гидротермального осаждения показана на рисунке 2.7.

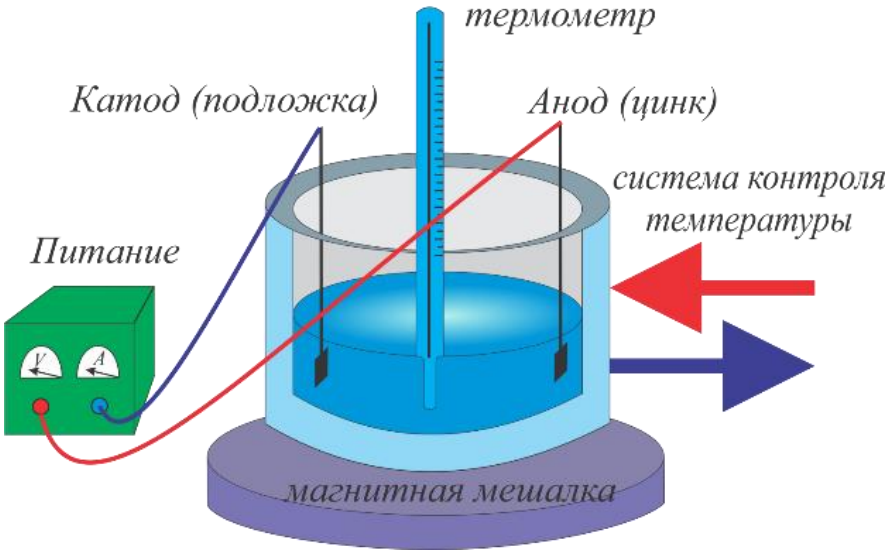


Рисунок 2.7 – Схематичное изображение установки для осаждения покрытий гидротермальным методом [150, с. 157]

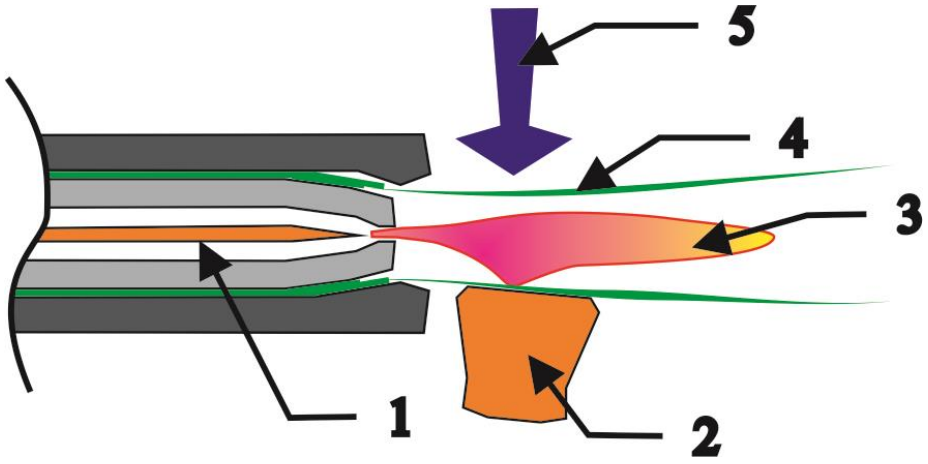
После осаждения образцы были извлечены из электролитической ванны, промыты деионизированной водой и оставлены для сушки на 24 часа на чистой скамье. Образцы с нанесенным покрытием затем спекали при 400 ° С в течение 1 часа в электрической печи, затем постепенно охлаждали до комнатной температуры внутри печи.

2.3.3 Метод нанесения покрытий на пористые трабекулярные металлические структуры микроплазменным напылением

Плазму часто называют четвертым состоянием вещества, поскольку она отличается от твердого, жидкого и газообразного состояний и не подчиняется классическим физическим и термодинамическим законам. В промышленности плазма используется во многих различных методах обработки, например, для модификации и активации различных поверхностей [142, с. 564]. Микроплазменное напыление это метод, в котором электрическая дуга постоянного тока (постоянный ток) зажигается между двумя электродами, тогда как поток газов (обычно Ar, He, N_2) проходит через эту дугу. Высоковольтный разряд между катодом и анодом внутри дуги превращает эти газы в ионизированную смесь (плазму) очень высокой (до ~ 20000 К) температуры и с высокой скоростью до ~ 400 м / с. Материал для осаждения (сырье) - обычно в виде порошка, иногда в виде жидкости, суспензии или проволоки - вводится в плазменную струю. Температура плазменной струи экспоненциально уменьшается в зависимости от расстояния, типичные температуры колеблются в пределах 2000–3000 К. Хотя впрыскиваемые частицы подвергаются воздействию очень высоких температур в течении очень короткого времени (~ 10^{-3}–10^{-4} с), большинство из них достаточно нагреты, чтобы стать расплавленными, полурасплавленными или, по крайней мере, размягченными, что важно для адгезии. За один проход плазматрона можно

получить слой толщиной примерно 5–15 ламелей. После нанесения слоя на всю подложку пистолет возвращается в исходное положение и наносится другой слой [144, p.9428]. Таким образом, плазменные напыленные отложения обычно состоят из нескольких слоев. Выбирая оптимальную связь между размерами частиц (расплавленный слой заданной толщины на большой частице занимает меньший относительный объем, чем на более мелкой), тип газа (теплосодержание плазмы и, следовательно, способность увеличивать температура частиц сильно зависит от используемого газа) и его давления, скорости плазмы (чем дольше частицы находятся в плазме, тем выше их температура) и процесса охлаждения подложек, получаются отложения с желаемым составом и кристалличностью. Типичные значения тока, которые используются для распыления ГА-покрытий, находятся в диапазоне от 350 А до 1000 А [150, с. 157].

Микроплазменное напыление образцов проводилось на установке МПН-04. Принцип работы установки МПН-04 заключается в следующем (рисунок 2.8): поток плазмообразующего инертного газа разогревается электрической дугой; катод -1 имеет иглообразную форму, а анодом служит охлаждаемый электрод -2 стоящий перед соплом; температура плазмы регулируется потоком плазмообразующего газа и силой тока электрической дуги- 3; напыляемый материал - 5 подается из вибрирующего бункера по касательной к струе плазмы и затягивается турбулентным потоком газа; для предотвращения окисления напыляемого материала используется поток защитного инертного газа- 4. Толщина покрытия регулируется временем и количеством порошка попадающегося в плазменную струю. Напыление производилось при напряжении 36 В и силе тока дуги 40 А, скорость подачи порошка 0,5 г/с.



1 - Охлождаемый катод, 2 - Охлождаемый анод, 3 - Плазменная струя, 4 - Поток защитного инертного газа, 5 -Подача напыляемого порошка

Рисунок 2.8 – Схема работы микроплазматрона МПН-04

Порошок ГА синтезированный методом, описанным в подразделе 2.1.1, был высушен при 37ºС, 24 часа, просеян через вибрационное сито фракцией до 30 мкм. Далее загружался в вибробункер. Расстояние между соплом и подложкой составляло 12 см.

Выводы по разделу 2

1) Описаны методы синтезирования композитных материалов на основе ГА и Алг, легированные ZnO. Актуальность изготовления наноструктурного композитного биоматериала заключается в том, что биологическая кость состоит из апатитовых наночастиц, заключенных в коллагеновую (полимерную) матрицу.

2) Разработан технологический регламент сканирования костных материалов с последующим построением трехмерной высоко текстурированной модели (Приложение А).

3) Разработана и описана установка гидротермального осаждения кальций-фосфатных покрытий, легированных Zn.

4) Описаны методы исследования взаимодополняющих в совокупности, позволяющих проанализировать морфологию поверхности материалов, элементного состава и его распределения на плоскости (картирование), структурно-фазовых превращений, образование новых соединений.

5) Описаны методы определения антимикробных свойств, метод со-инкубирования и погружения в агар. Определение биосовместимости и цитотоксичности синтезированных материалов, будет проводиться на культуре мышиных остеобластов.

3 ИССЛЕДОВОВАНИЕ КОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА С НАНОРАЗМЕРНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ НА ОСНОВЕ БИОАПАТИТА, АЛЬГИНАТА НАТРИЯ И МИКРОЧАСТИЦ ZnO

Обзор современной литературы, посвященный вопросу разработки биокомпозитных материалов для дальнейшего применения в ортопедии показал, что на сегодняшний день наблюдается тренд придания материалам антибактериальных свойств наряду повышения свойств биосовместимости.

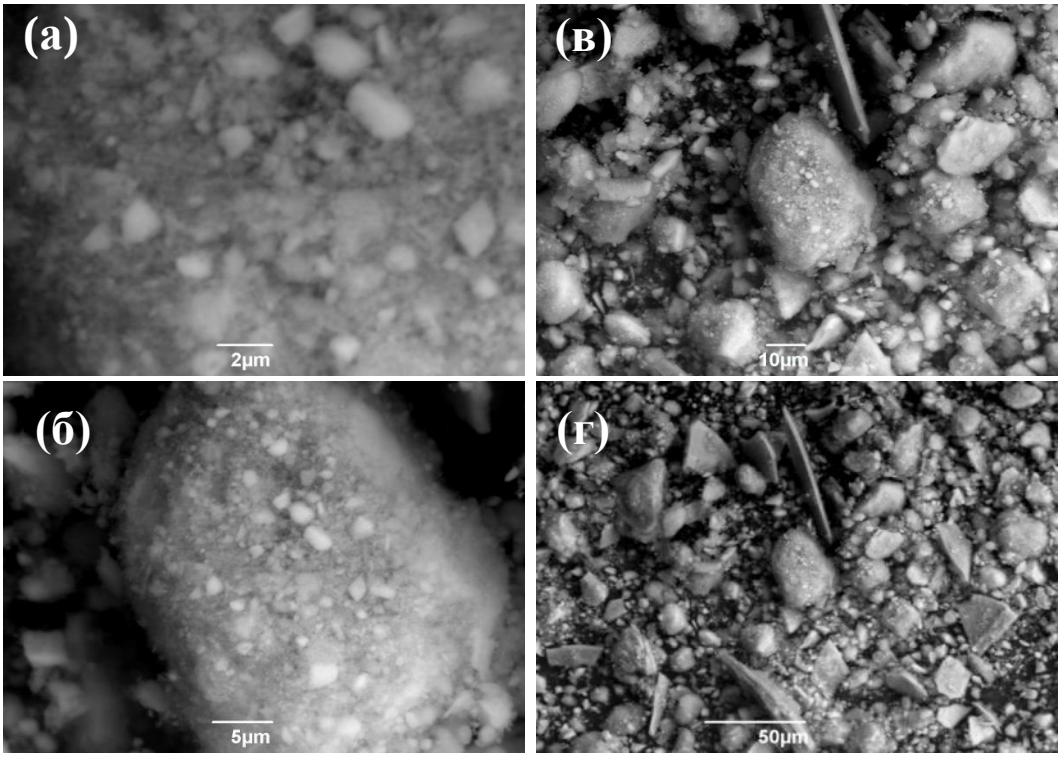
Разработка многофункциональных композитных материалов для отраслей медицины, в частности, для ортопедии и стоматологии, невозможно без понимания влияния каждого легирующего компонента на макросвойства материала. Широкое использование лекарств с антимикробным действием привело к формированию устойчивости микроорганизмов к широкому спектру антибиотиков. Одним из подходов к решению этой проблемы во всем мире является активный поиск неорганических противомикробных компонентов или модификация биоматериалов неорганическими биоактивными ионами для инициирования контролируемой реакции в тканях и обеспечения антимикробной активности [1, p. 75; 4, p. 1170; 5, p. 85]. КТ является композитным природным материалом, включающим органическую компоненту (коллаген, тип I), в которую внедрены нанокристаллы нестехиометрического гидроксиапатита (биологического апатита) [8, p. 402;151]. Подобная структура является прочной как на растяжение (за счет органической составляющей), так и на сжатие (за счет неорганической компоненты). Биологический апатит включает в себя ряд неорганических ионов, таких как Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Na^{+}, K^{+}, Fe^{3+}. Установлено, что включение небольшого количества подобных ионов, в частности, ионов цинка, магния, меди и серебра в структуру биоапатита, существенно влияет на его свойства [9, p. 294; 12, p. 34]. Так, ионы цинка способствуют повышению плотности КТ, предотвращают потерю костной массы [10, p. 1654], улучшают адгезию протеинов и повышают антибактериальную активность [11, p. 04034]. Недавно было показано [13, p. 268] проявление высоких антибактериальных свойств композитного материала на основе сульфида цинка с альгинатом натрия (ZnS + Alginate) по отношению к ряду грамположительных и грамотрицательных бактерий. Альгинат натрия – биосовместимый, нетоксичный природный полисахарид, состоящий из мономеров β-D-мануроновой и α-L-гулуроновой кислот, связывает и выводит из организма радионуклиды, понижает уровень холестерина в крови и не вызывает аллергии. Также известно, что материалы на основе ZnO характеризуются выраженной биоактивностью, антибактериальными свойствами, высоким пределом прочности, способностью выдерживать экстремальные условия эксплуатации.

Данный раздел посвящен комплексному исследованию композитного материала, имеющего свойства, близкие к костной ткани, и состоящего из следующих компонентов: гидроксиапатита, наноразмерных ZnO частиц и альгината натрия.

3.1 Морфология и элементный состав композитного материала с наноразмерной архитектурой на основе биоапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO

Морфология исследуемых образцов материала для медицины была исследована методами растровой (РЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), с применением картирования распределения элементного состава по исследуемой поверхности, а также ЭДС анализом.

Фотографии РЭМ микроструктуры образца ГАп представлена на рисунке 3.1. Анализируя изображения микроструктуры можно сделать вывод, что микрочастицы ГАп имеют осколочный характер, так как отдельные частицы порошка имеют четкие грани.

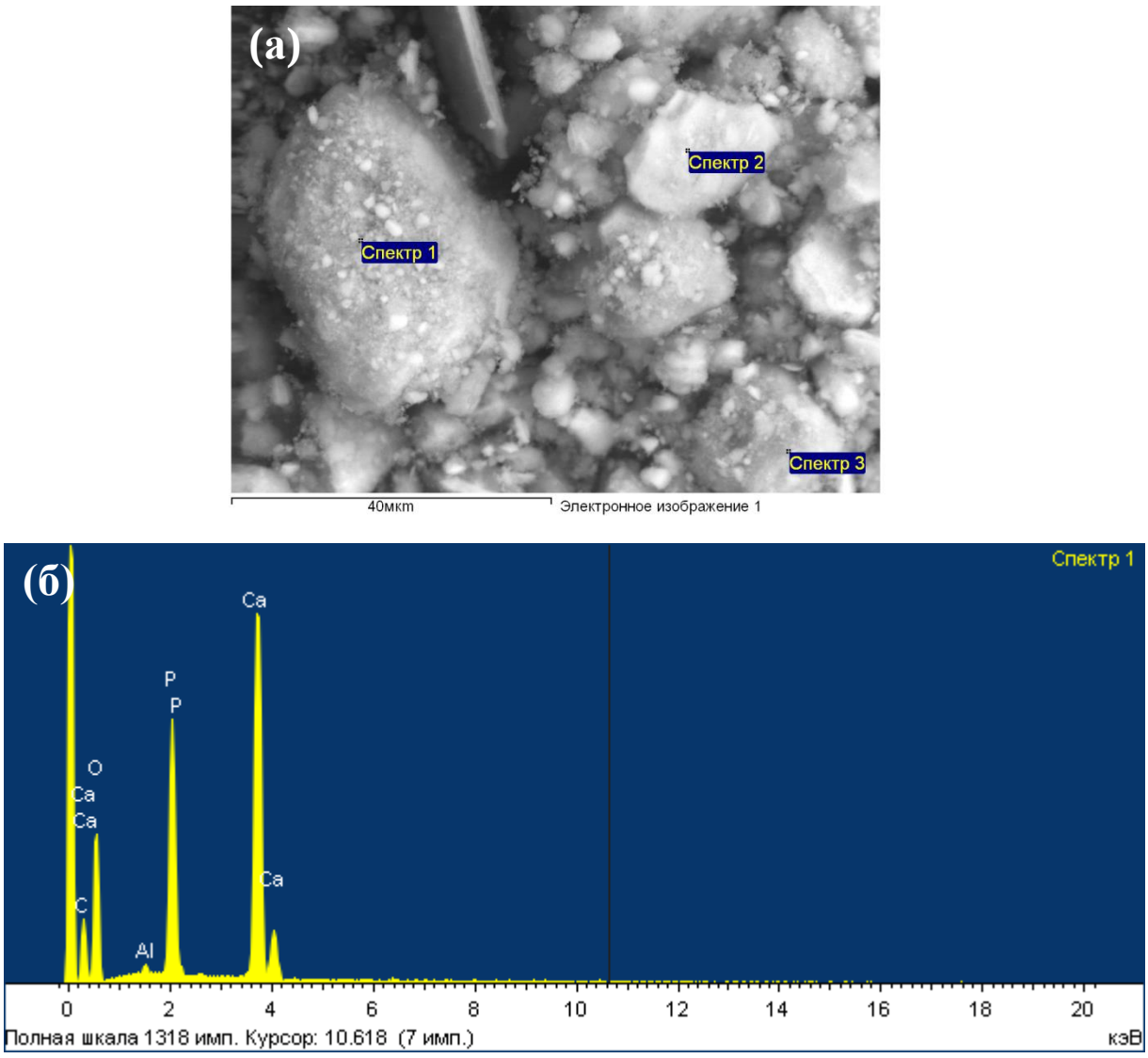


(а) ×7000, (б) ×3000, (в) ×1000, (г) ×500

Рисунок 3.1 – Изображение РЭМ микроструктуры образца ГАп при различном увеличении

Исследование химического состава ГАп проводилось методом ЭДС анализа на РЭМ, рисунок 3.2. Точками для исследования были выбраны отдельные частицы, рисунок 3.2 (а). Спектральные линии разделены и идентифицируемы рисунок 3.2 (б). Концентрация элементов, входящих в состав ГАп приведено в таблице 3.1. Анализируя данные количественного анализа можно сделать вывод, что исследуемый образец ГАп имеет относительную гомогенную структуру, так как стандартное отклонение концентрации элементов не превышает 0,94%. Соотношение Ca/P в среднем составляет 2.12,

что выше стехиометрического 1,67, однако, в пределах допустимых значений для биомедицинских материалов.



(а) область исследования с указанием точек анализа, (б) ЭДС спектр для точки исследования 1

Рисунок 3.2 – ЭДС анализ ГАп

При исследовании образца ГАп методом ПЭМ с большим увеличением, осколочная структура образца сохранялась. Продолговатые нанокристаллы ГА группируясь образуют более крупные осколки, рисунок 3.3. В отличии от образца ГАп, образец высушенного ГАг имеет более равномерную структуру. Частицы гидроксиапатита конгломерированы, образую сплошную структуру, похожую на трабекулярную структуру биологчиеской кости, рисунок 3.4.

Таблица 3.1 – концентрация элементов, входящих в состав ГАп. Результаты ЭДС анализа в весовых %

Спектр	O	Al	P	Ca	Итог	Ca/P
Спектр 1	55.73	0.42	14.01	29.84	100.00	2.13
Спектр 2	53.97	0.24	14.49	31.30	100.00	2.16
Спектр 3	55.42	0.50	14.28	29.80	100.00	2.09
Среднее	55.04	0.38	14.26	30.31	100.00	2.12
Станд. отклонение	0.94	0.14	0.24	0.86		
Макс.	55.73	0.50	14.49	31.30		
Мин.	53.97	0.24	14.01	29.80		

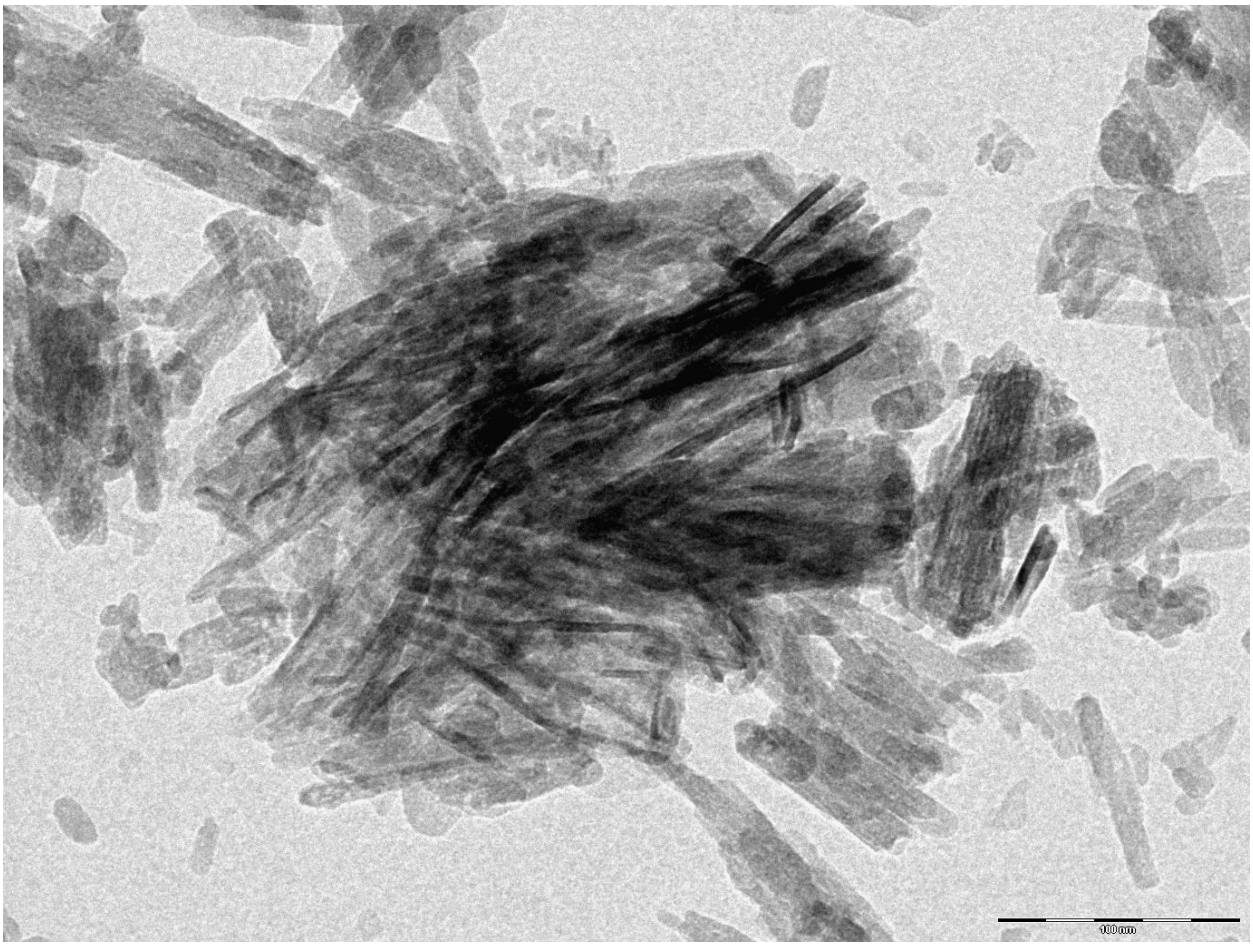
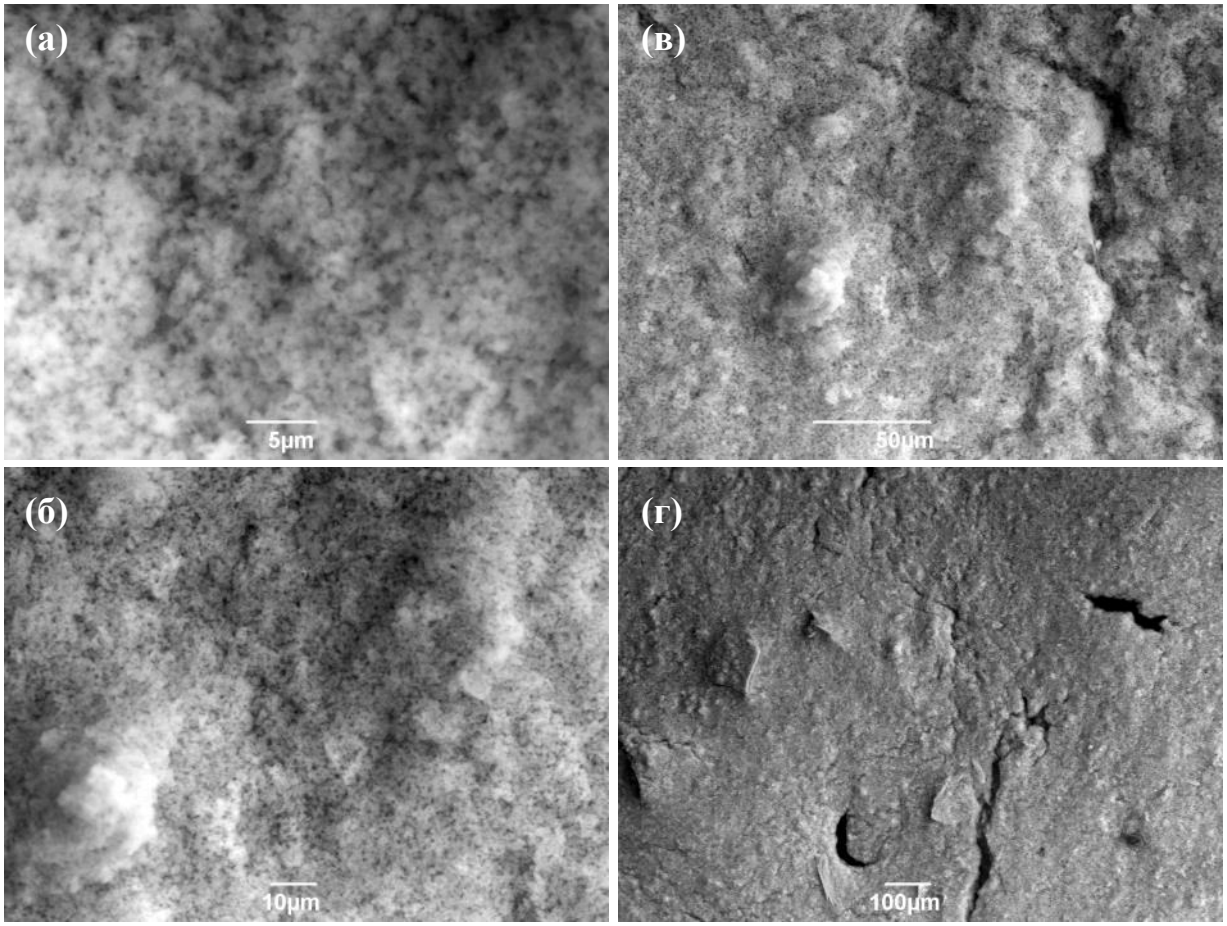


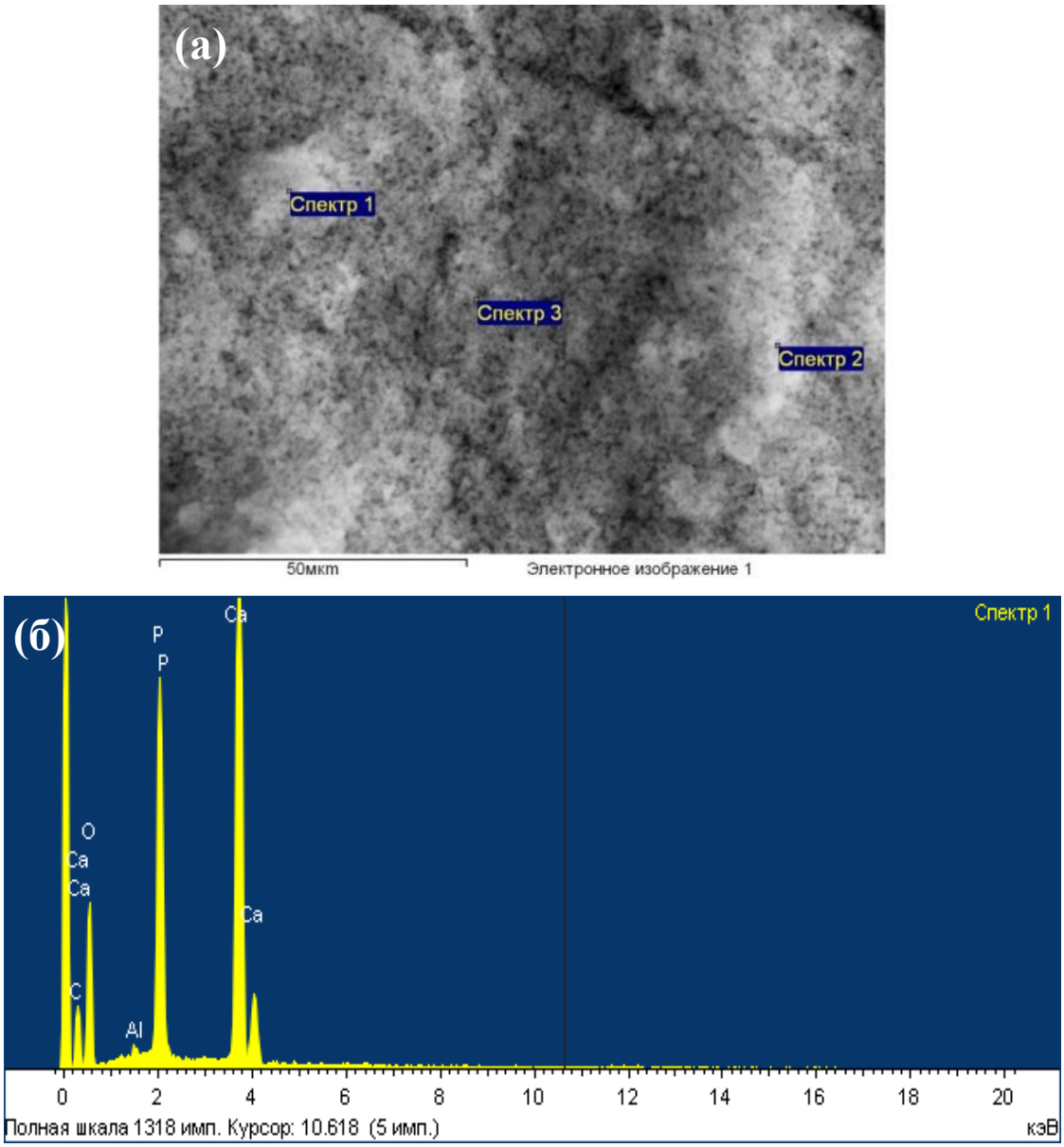
Рисунок 3.3 – Изображение ПЭМ микроструктуры образца ГАп, масштаб линейки 100 нм



(а) ×3000, (б) ×1000, (в) ×500, (г) ×100

Рисунок 3.4 – Изображение РЭМ микроструктуры образца ГАг при различном увеличении

На рисунке 3.5 (а) приведен участок образца ГАг с отмеченными местами анализа. Результаты ЭДС анализа в точках исследования (таблица 3.2) свидетельствуют, что среднее значение кислорода составляет 50,31 ат.% при разбросе 1,37 %, фосфора на поверхности находится около 15,62%±0,39%, концентрация кальция 33,69%±1,13%. Соотношение Ca/P ≈ 2,16, что несколько выше чем для гидроксиапатита в порошковом виде. Таким образом состав ГАг близок к составу, полученному другими методами [15, p. 1701063]. На рисунке 3.5 (б) представлен ЭДС спектр одного из участков, где хорошо видны пики всех элементов, находящихся в образце.



(а) СЭМ изображение участка поверхности; (б) ЭДС спектр участка №1

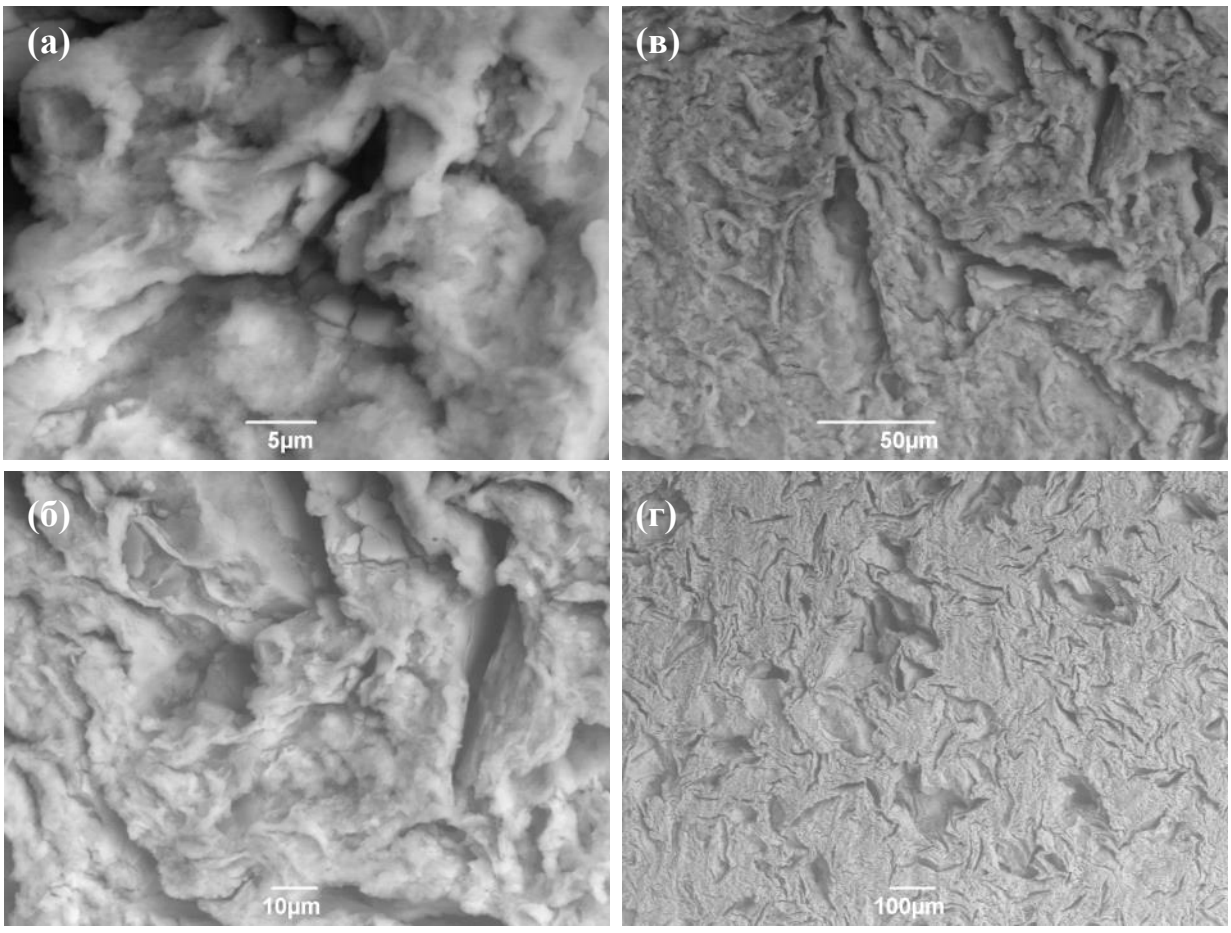
Рисунок 3.5 – Морфология поверхности образца ГА

Наибольшее изменение концентрации по сравнению с образцом ГАп замечено для кислорода, 55.04→ 50.31 вес. %, что предположительно связано с методом синтезирования.

Микроструктура образца ГА-Алг (гидроксиапатит-альгинат натрия) представлен на рисунке 3.6. Образец ГА-Алг имеет развитую пористую структуру. Композитный материал представляет из себя альгинат натриевой матрицу насыщенной гидроксиапатитом. Средний размер пор ~30 мкм, что свидетельствует о высоких остеокондуктивных свойств материала[152,153].

Таблица 3.2 – концентрация элементов, входящих в состав ГАг. Результаты ЭДС анализа в весовых %

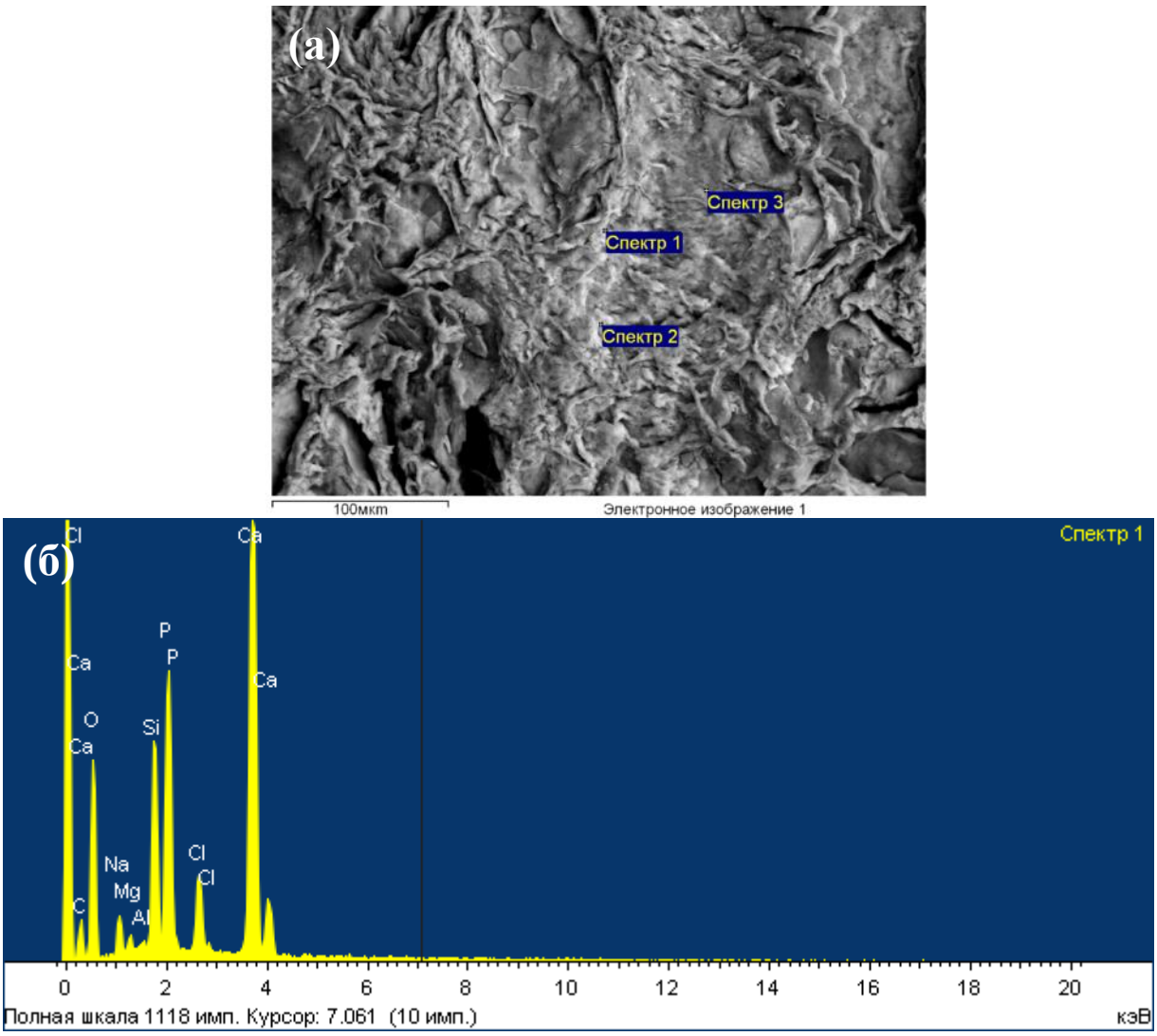
спектр	O	Al	P	Ca	Итог	Ca/P
Спектр 1	50.17	0.34	15.95	33.54	100.00	2.10
Спектр 2	51.74	0.44	15.19	32.63	100.00	2.15
Спектр 3	49.02	0.36	15.73	34.89	100.00	2.22
Среднее	50.31	0.38	15.62	33.69	100.00	2.16
Станд. отклонение	1.37	0.05	0.39	1.13		
Макс.	51.74	0.44	15.95	34.89		
Мин.	49.02	0.34	15.19	32.63		



увеличение (а) ×3000, (б) ×1000, (в) ×500, (г) ×100

Рисунок 3.6 – Изображение РЭМ микроструктуры образца ГА-Алг

Исследование распределения элементного состава было также проведено при помощи ЭДС анализа, рисунок 3.7. Из спектра ЭДС (рисунок 3.7), можно сделать вывод, что по сравнению с образцами гидроксиапатита в виде порошка и гидрогеля, в состав материала входят элементы как: хлор, углерод; кремний, магний, алюминий. Все элементы, входящие в состав являются условно биосовместимыми [154]. Спектральные линии различимы. В таблице 3.3 приведена концентрация элементов. Среднее соотношение Ca/P увеличилось незначительно до 2.27. Наибольшей концентрацией среди элементов, не образующих молекулу гидроксиапатита, обладает кремний 7.13%, который обладает высокими остеоиндуктивными свойствами, что в свою очередь, является преимуществом синтезированного материала. Как показано в работах[152, p. 780;153, p. 2219; 155], при повреждении костной ткани в организме, в зоне поражения повышается концентрация кремния и магния.



(а) РЭМ изображение участка поверхности; (б) ЭДС спектр участка №1

Рисунок 3.7 – Морфология поверхности образца ГА-Алг

Таблица 3.3 – концентрация элементов, входящих в состав ГА-Алг. Результаты ЭДС анализа в весовых %

Спектр	O	Na	Mg	Al	Si	P	Cl	Ca	Итог	Ca/P
Спектр 1	49.48	2.43	0.61	0.18	6.91	11.36	3.52	25.51	100.00	2.24
Спектр 2	51.57	2.67	0.54	0.36	8.18	10.29	3.28	23.11	100.00	2.24
Спектр 3	49.84	2.35	0.49	0.24	6.29	11.06	3.89	25.84	100.00	2.36
Среднее	50.30	2.48	0.55	0.26	7.13	10.91	3.56	24.82	100.00	2.27
Станд. отклонение	1.12	0.17	0.06	0.09	0.97	0.55	0.31	1.49		
Макс.	51.57	2.67	0.61	0.36	8.18	11.36	3.89	25.84		
Мин.	49.48	2.35	0.49	0.18	6.29	10.29	3.28	23.11		

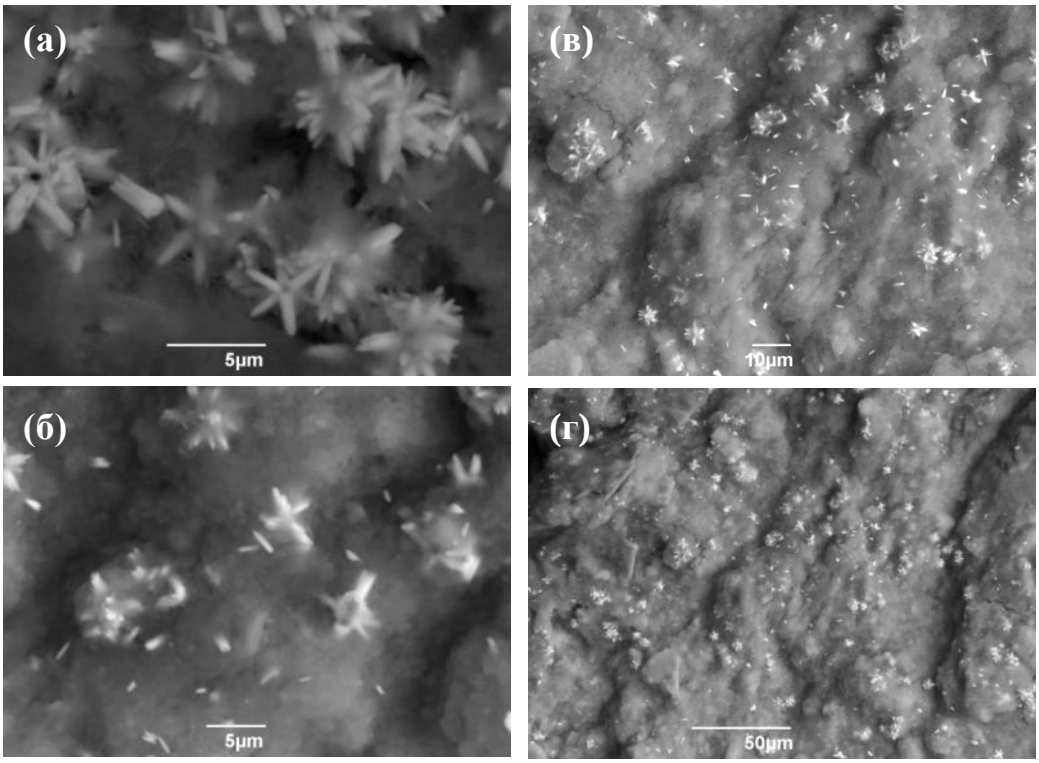
Необходимым условием для композитных материалов, обладающих антимикробными свойствами помимо биосовместимости является повышенное значение АФК (активные формы кислорода, содержащие несвязанный кислород), что достигается за счет увеличения удельной площади поверхности в виде уменьшенного размера частиц и развитости структуры, что в свою очередь приводит к повышенной реактивности поверхности частиц. На ряду повышение АФК, который приводит к слабости митохондрий, оттоку внутриклеточной жидкости повышая проницаемость мембраны и расщеплению генов за счет напряжений окисления, что в свою очередь ингибирует рост клеток и убивает бактерии, наблюдается усиление антибактериальной активности за счет к поверхностных дефектов микроструктуры кристаллов ZnO, придавая им абразивной поверхность[89, p.237; 90, p. 2327].

На рисунке 3.8 представлена микроструктура образца ГА-ZnO при различном увеличении. Данный образец был синтезирован в виде гидрогеля. Микрокристаллы ZnO имеют развитую структуры, что увеличивает удельную площадь, что свою очередь повышает бактерицидную активность.

Рисунок 3.9 (а) представляет морфологию участка образца ГА-ZnO, а рисунок 3.9 (б) - ЭДС спектр участка №1. На изображении поверхности точками (4) выделены участки элементного анализа. На изображении выделяются участки с небольшими кристаллическими включениями ZnO (в виде «снежинок») разных размеров от 13 до нескольких десятков микронов. Распределение частиц ZnO хаотично, они имеют светлый оттенок на фоне ГА. Из таблицы 3.4 и спектра ЭДС видно, что в составе композита ГА-ZnO появился Zn с различной его концентрацией в местах анализа. Например, Zn (43,28 %) в точке 1, а в точке 3 всего обнаружено 10,35 **%.** Таким образом среднее значение концентрации Zn в этом участке образца составляет 25,63%. Соотношение Ca/P составляет 1,88.

На рисунке 3.10 представлено изображение участка композита ГА-Алг-ZnO. Появились области очень темного контраста, а также кристаллиты ZnO с размерами от 15 до 0,5 мкм. Судя из таблицы 3.5 и спектра ЭДС, средняя концентрация Zn уменьшилась до 18,34 %, при этом имеются участки, где Zn содержится 23,66% и 7,08 **%** (разница почти в 3 раза). Спектр ЭДС включает

такие элементы, как Cl (от 2,52 до 1,83%), Si (около 10%), Al около (0,5%), Mg (от 0,87 до 0,72%), Na (от 4,69 до 3,99%), которые входят в состав альгтната натрия. Соотношение Ca/P составляет около =1,96. Все приведенные элементы, кроме Ca и P принадлежат альгинату натрия.

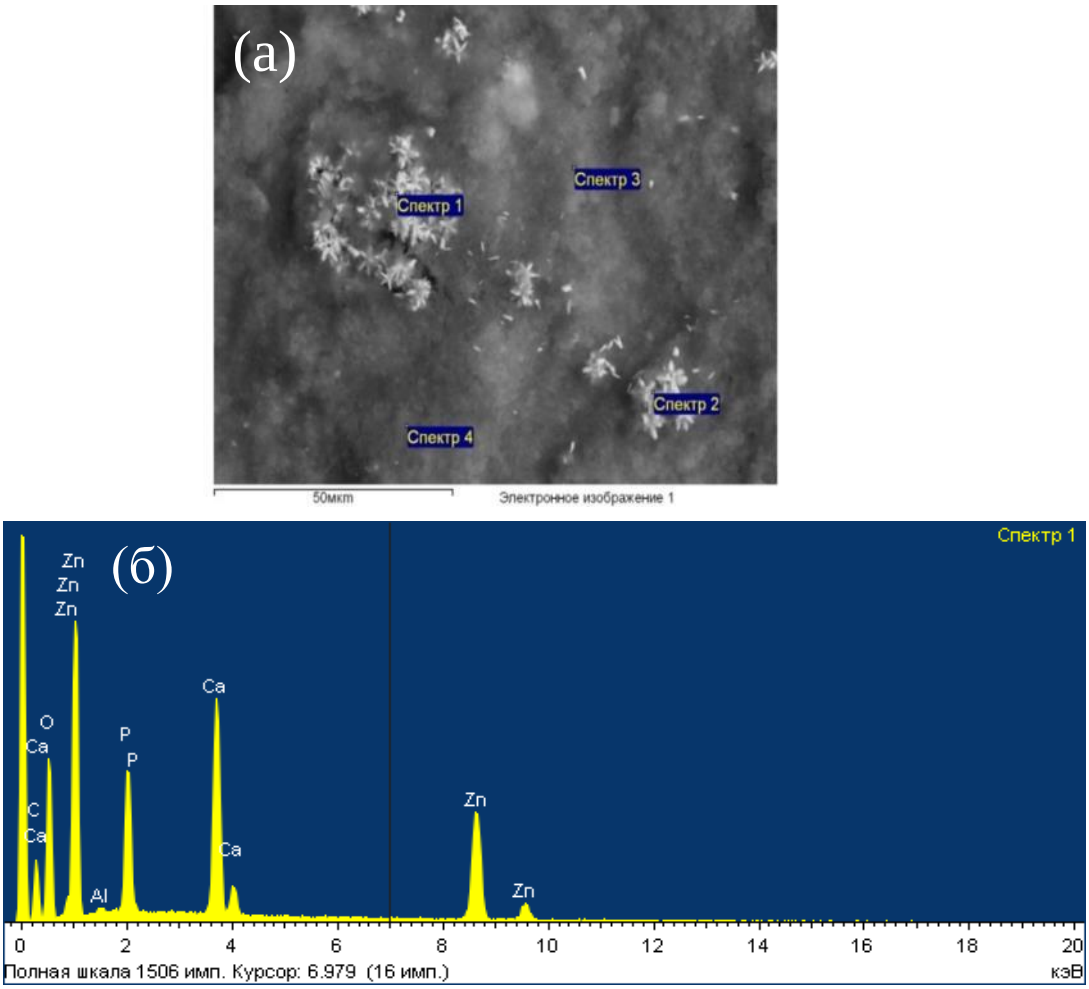


(а) ×5000, (б) ×3000, (в) ×1000, (г) ×500

Рисунок 3.8 – Изображение РЭМ микроструктуры образца ГА-ZnO при различном увеличении

Таблица 3.4 – концентрация элементов, входящих в состав ГА- ZnO. Результаты ЭДС анализа в весовых %

Спектр	O	Al	P	Ca	Zn	Итог	Ca/P
Спектр 1	34.34	0.35	8.29	13.74	43.28	100.00	1.65
Спектр 2	39.74	0.61	9.27	15.37	35.02	100.00	1.66
Спектр 3	45.23	0.23	14.78	29.41	10.35	100.00	1.98
Спектр 4	44.78	0.27	13.39	27.70	13.86	100.00	2.06
Среднее	41.02	0.36	11.43	21.55	25.63	100.00	1.88
Станд. отклонение	5.10	0.17	3.14	8.14	16.04		
Макс.	45.23	0.61	14.78	29.41	43.28		
Мин.	34.34	0.23	8.29	13.74	10.35		



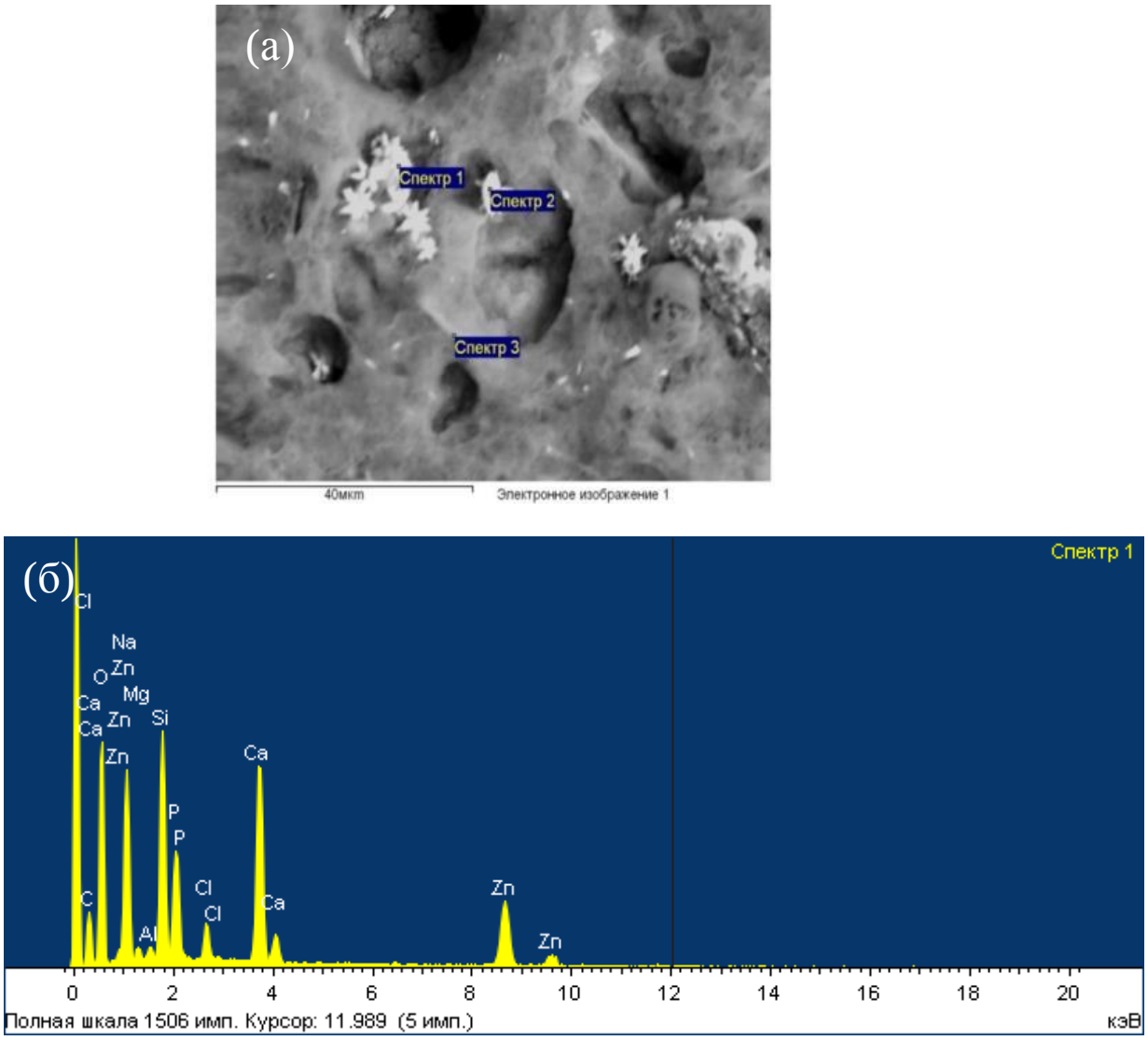
а) РЭМ изображение участка поверхности; б) ЭДС спектр участка №1
Рисунок 3.9 – Морфология поверхности композита ГА-ZnO

Таблица 3.5 – концентрация элементов, входящих в состав композита ГА-Алг-ZnO. Результаты ЭДС анализа

Спектр	O	Na	Mg	Al	Si	P	Cl	Ca	Zn	Итог	Ca/P
Спектр 1	40.69	4.69	0.85	0.49	9.98	5.95	1.91	11.78	23.66	100.00	1.96
Спектр 2	38.80	3.99	0.72	0.40	10.67	6.61	1.83	12.71	24.28	100.00	1.92
Спектр 3	48.40	4.09	0.87	0.55	11.10	8.01	2.52	17.38	7.08	100.00	2.15
Среднее	42.63	4.25	0.81	0.48	10.58	6.86	2.09	13.96	18.34	100.00	2.02
Станд. отклонение	5.08	0.38	0.08	0.08	0.56	1.05	0.38	3.00	9.76		
Макс.	48.40	4.69	0.87	0.55	11.10	8.01	2.52	17.38	24.28		
Мин.	38.80	3.99	0.72	0.40	9.98	5.95	1.83	11.78	7.08		

На рисунке 3.11 представлена карта (map) распределения элементов на участке композита ГА-Алг-ZnO, изображенном на 3.11 (а). Хорошо видно, что Zn выделен только в областях расположения ZnO кристаллитов. Все присутствующие элементы композита достаточно равномерно распределены по участку анализа образца. Результаты показывают, что добавка альгината способствует гомогенизации образца и равномерному распределению элементов по поверхности (на глубине анализа ЭДС). Элементный состав идентичный участку образца, приведенного на рисунке 3.10 - это Si, Cl, Na и Mg с разной концентрацией и совсем незначительная концентрация Al.

Соотношение Ca/P составляет 2.15, содержание кислорода - до 50,3 % (среднее значение). Все элементы хорошо выделяются на спектре ЭДС.



(а) РЭМ изображение участка поверхности; (б) ЭДС спектр участка №1

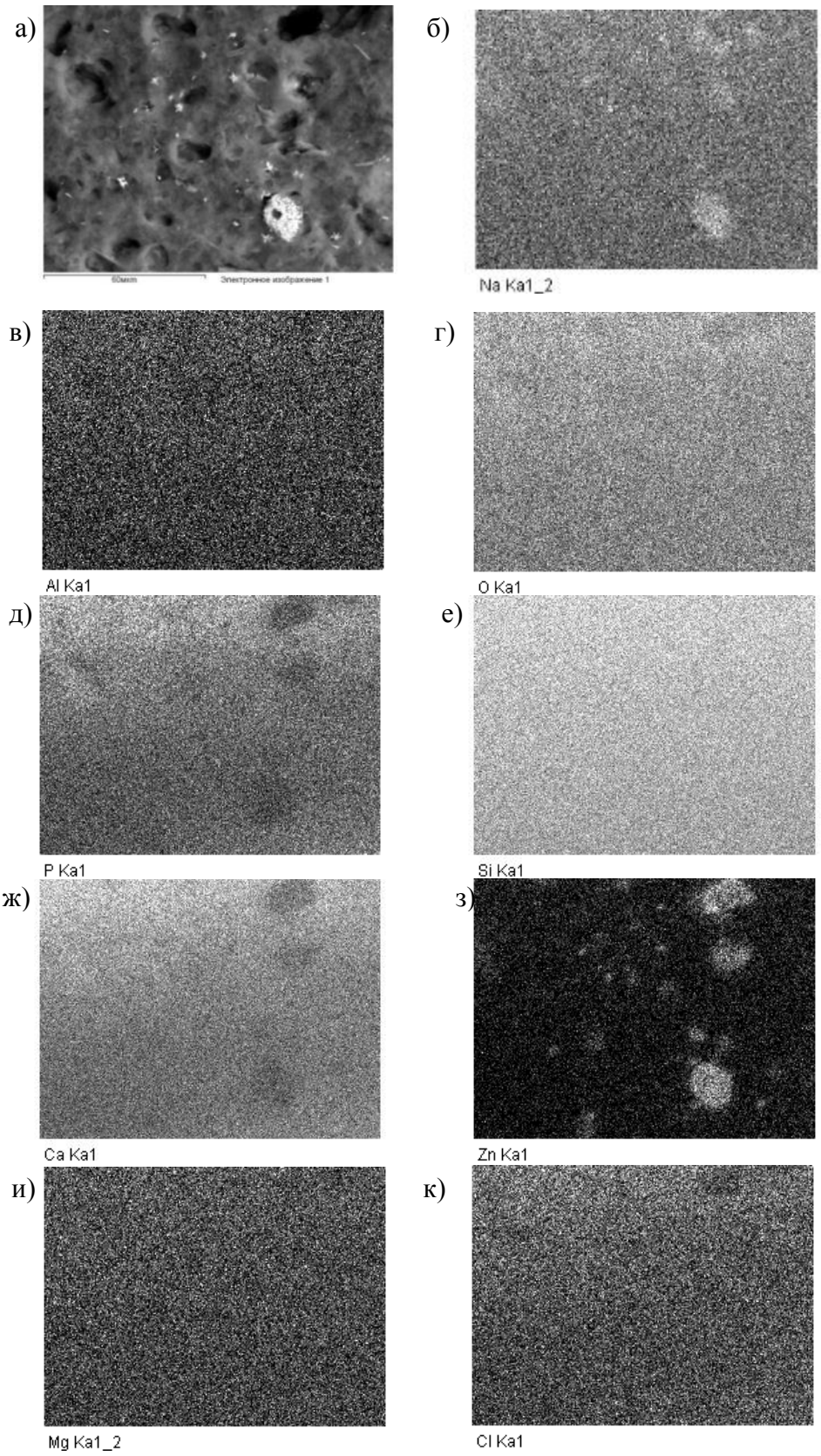
Рисунок 3.10 – Морфология поверхности композита ГА-Алг-ZnO

Микроструктура синтезированных ГА-ZnO и ГА-Алг- ZnO представляет

собой матрицу в которую введены наночастицы оксида цинка. Сами же наночастицы являются наноструктурированными конгломератами нанокристаллов оксида цинка рисунок 3.12. Для образца с композитной альгинат-гидроксиапатитной матрицей характерна закономерность, что частицы оксида цинка располагаются по стенкам пор. Объясняется это, предположительно, более сильным нагревом областей близлежащих частицам цинка при пропускании переменного тока во время синтеза.

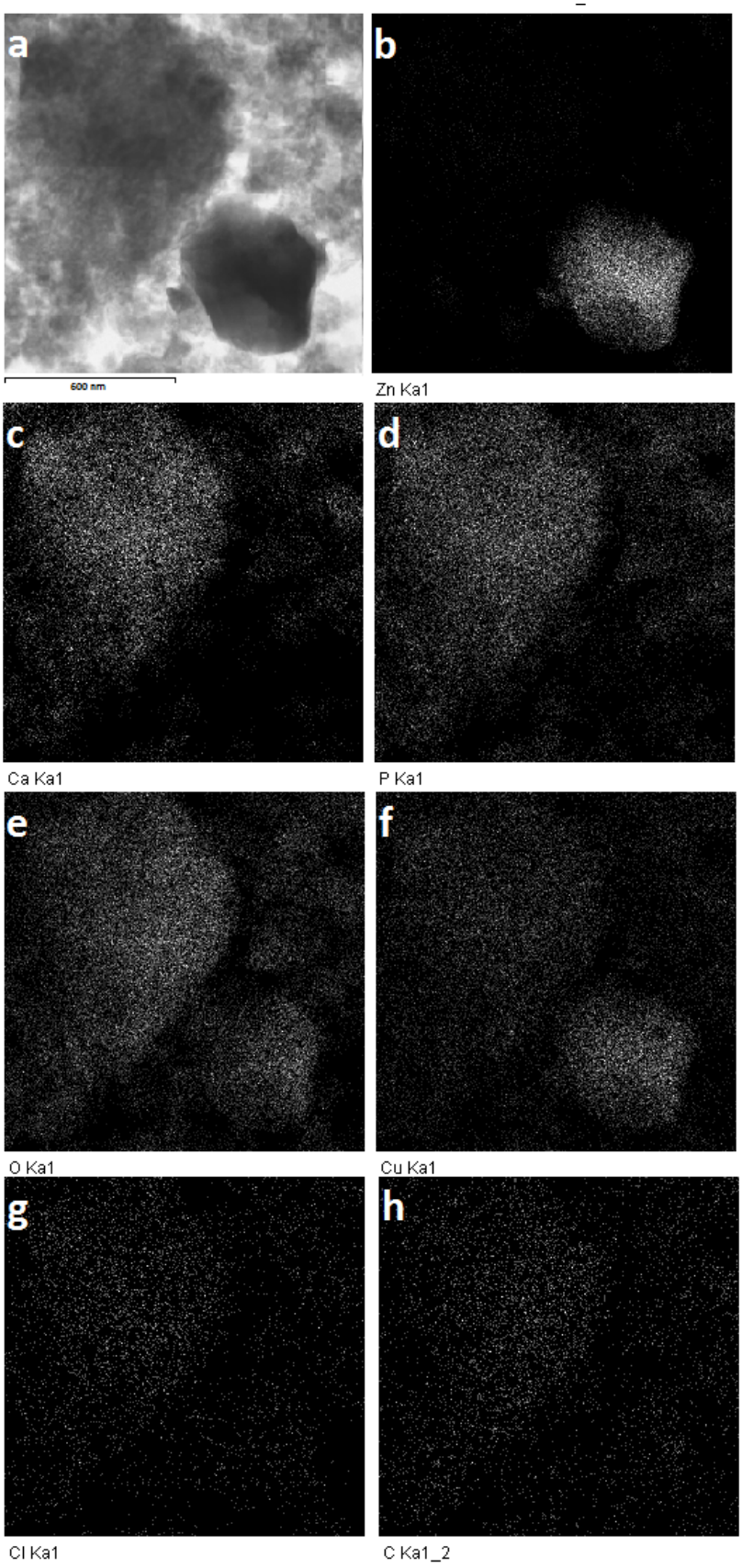
Средние значения веществ, входящих в состав, приведены в таблице 1. Соотношение Ca/P для HA-ZnO составило 1.88, а для ГА-Алг-ZnO – 2.03. Как отмечалось в разделе 2.1, приготовление гибридного комплекса ГА-Алг-ZnO включало процедуру обработки ультразвуком в УЗДН. Физические эффекты УЗ воздействия обусловлены явлением звуковой кавитации с локальным нагревом до температуры порядка 5000 К внутри пузырей [137, p. 7505], что приводит к возникновению нетипичных реакционных зон и, соответственно, наноструктурам с возможным замещением Ca^{2+} на Zn^{2+} в решетке ГА (Ca/P < 2.10). Дополнительно, изменение количества кальция не может быть связано с включением альгината натрия, с которым кальций способен образовывать прочное химическое соединения [24, p. 470;155, p. 9108; 156].

Распределение элементов также было исследованы с использованием маппинга на ПЭМ рисунок 3.12 (a-h). Согласно результатам исследования, содержание цинка наблюдается только в области микрочастицы ZnO, что свидетельствует о его локализованности. В то время как, кальций и фосфор распределены, в основном количестве, в областях частиц ГА. Однако, наблюдается некоторое их содержание в области частицы ZnO, что может свидетельствовать о частичном замещении ионов кальция ионами цинка, что, в свою очередь, согласно работам [157,158], повышает остеоиндуктивные свойства путем ускорения минерализации кости человека.



а) морфология поверхности участка анализа, а также распределение (map) для элементов: (б) - для Na, (в) – для Al,(г)– для O, (д) - для P, (е) – для Si, (ж) – для Ca, (з) – для Zn, (и) – для Mg, (к) – для Cl.

Рисунок 3.11 – Результаты (РЭМ) элементного анализа композита ГА-Алг-ZnO



a - морфология исследуемой области, масштаб 600 нм; b - h - отображения распределения соответствующих элементов

Рисунок 3.12 – Результаты ПЭМ элементного анализа композита ГА-ZnO

3.2 Исследование фазового состава, функциональных групп композитного материала с наноразмерной архитектурой биоапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO

На рисунке 3.13 приведено ПЭМ изображение образца ГА, который представлен кристаллитами иголчатой формы, что характерно для аппатита костной ткани. Дифракционная картина соответствует параметрам решетки полученных ранее ГА в других работах [159–162].

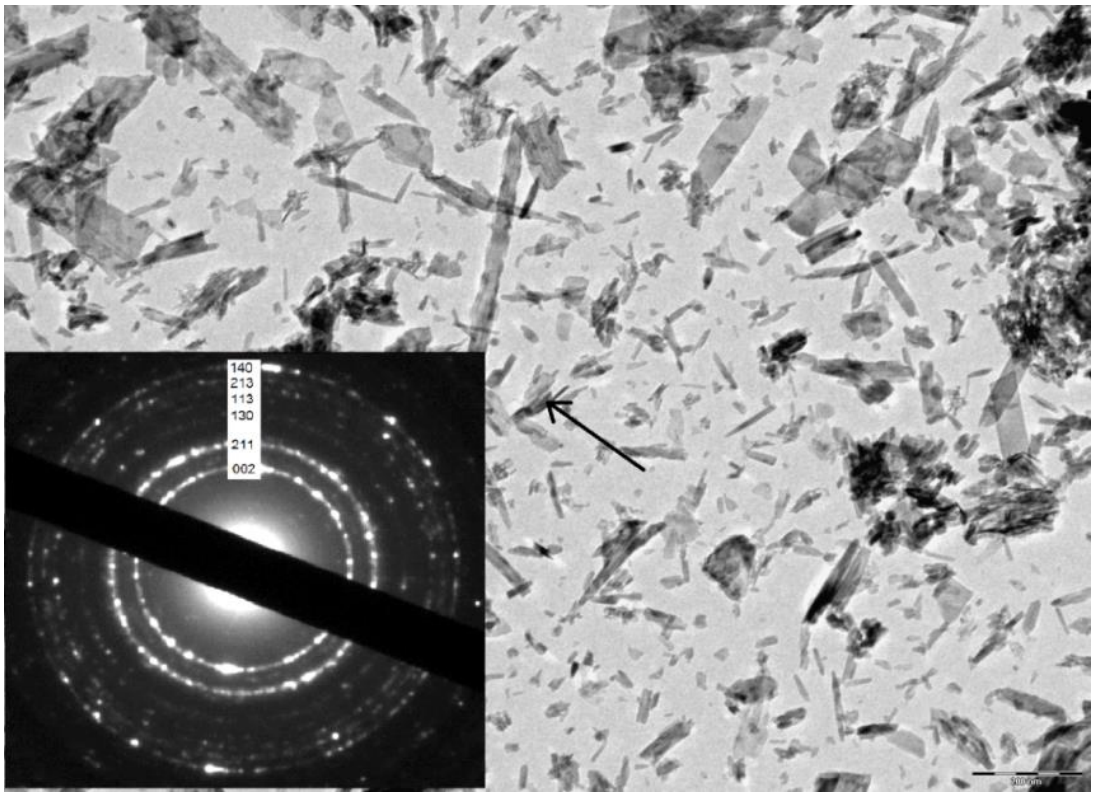
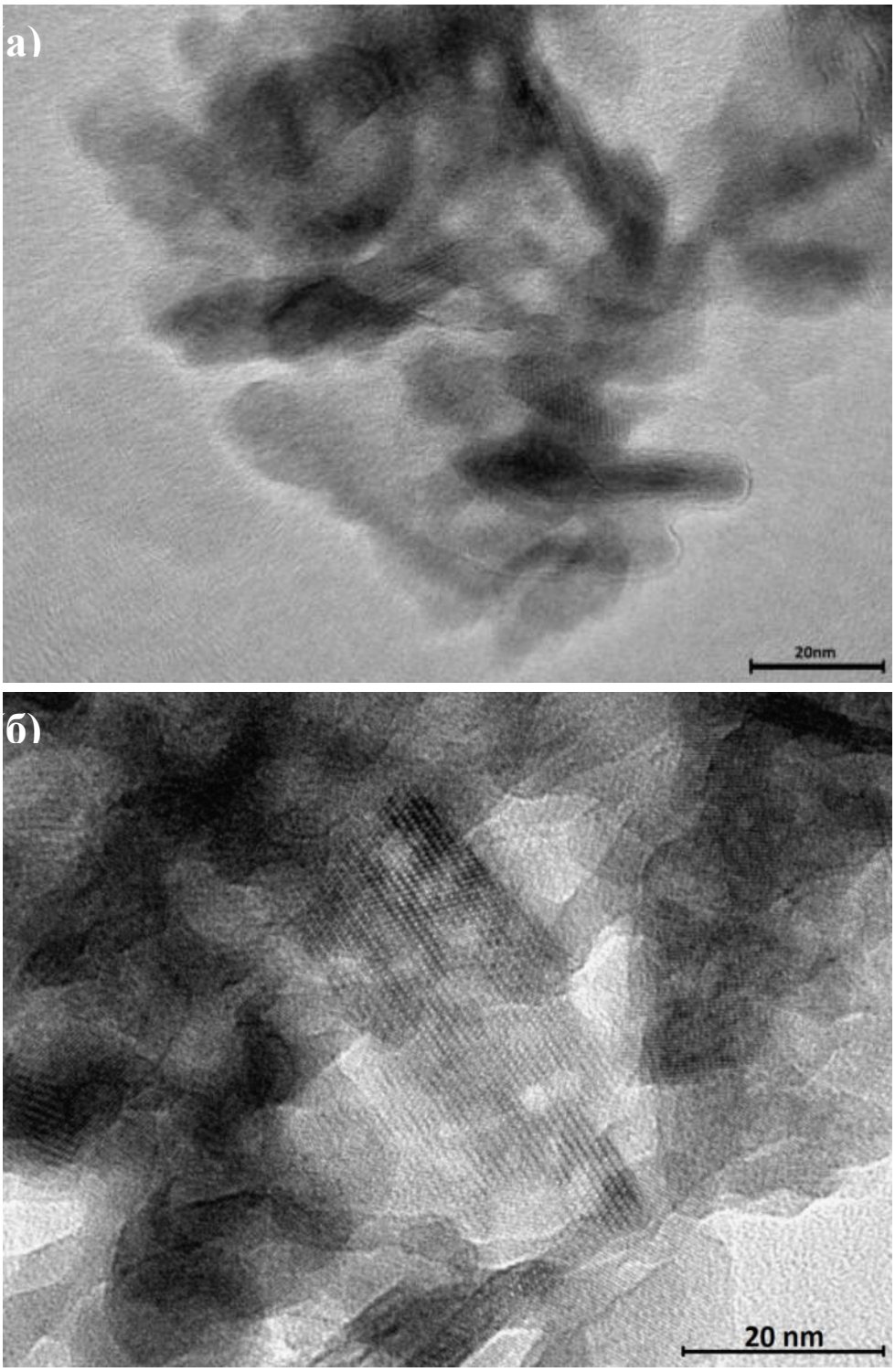


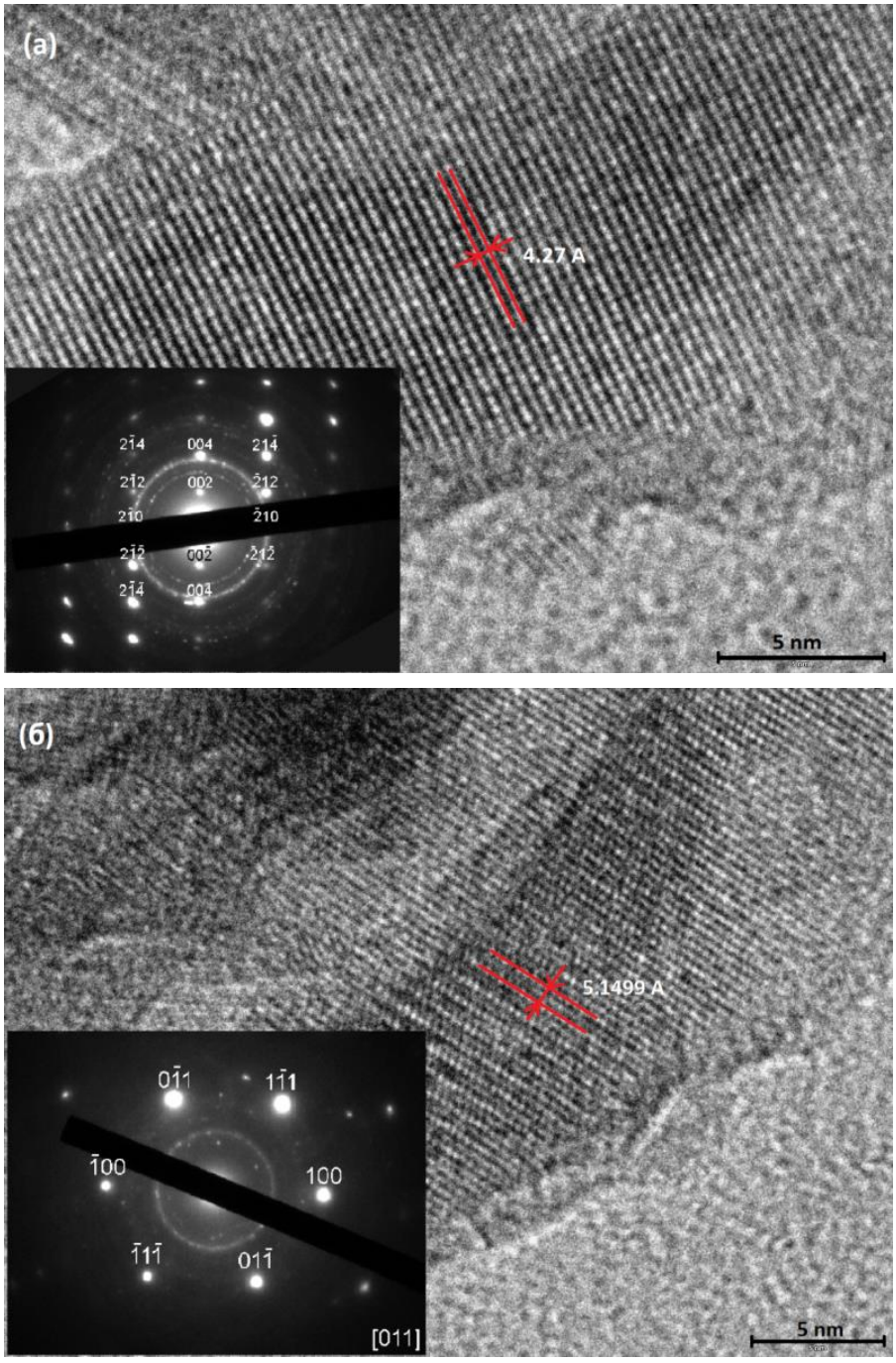
Рисунок 3.13 – ПЭМ изображение и дифракция участка ГА, масштаб линейки 200 нм

Анализ частиц ZnO с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с высоким разрешением (рисунок 3.14) показывает, что средний размер нанокристаллитов ZnO составляет до 50нм (рисунок 3.14). Малый размер зерен нанокристаллитов ZnO (до 50 нм), указывает на их наноструктурность. Электронограмма нанокристаллитов свидетельствует о том, что ZnO представлен как кубической структурой (рисунок 3.15 (а)) с параметрами решетки a=4,27, b=4,27, c=4.27, так и гексагональной (рисунок 3.15 (б)) с параметрами решетки a=3,2427, b=3,2427, c=5,1949. Данный факт объясняется особенностями получения оксида цинка. Как уже отмечалось выше, при получении ZnO зародышеобразование происходило при пропускании электрического тока, а дальнейший рост кристаллитов и осаждение продукта осуществлялось нагреванием реакционной смеси до 80°C.



(а) с кубической решеткой (шкала 5 нм), (б) с гексагональной решеткой (шкала 5 нм)

Рисунок 3.14 – ПЭМ изображения кристаллитов ZnO

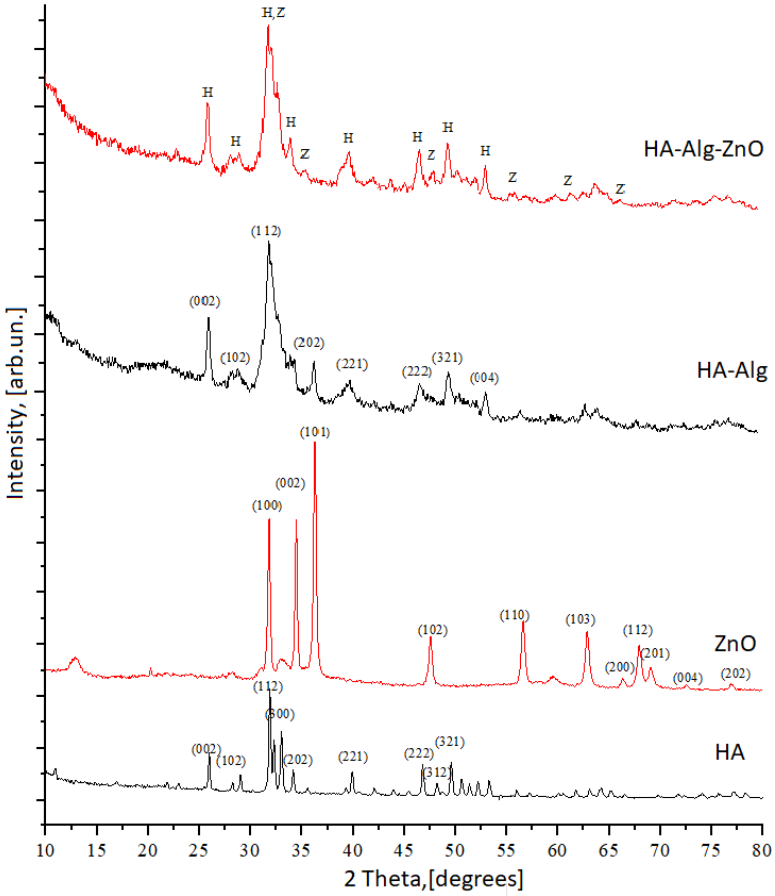


(а) с кубической решеткой (шкала 5 нм), (б) с гексагональной решеткой (шкала 5 нм)

Рисунок 3.15 – ПЭМ изображения кристаллитов и электронограммы ZnO

Проведены XRD исследования образца ГА, который является основой всех изготовленных в этой работе материалов. Результаты показали, что единственная фаза ГА относится к ICDD 00-055-0592, средний размер кристаллитов составил 39,6 нм. В то же время синтезированные частицы ZnO состояли из гексагональной фазы ZnO (a = 0,3242 нм, c = 0,517 нм, ICDD 01-075-1526, средний размер кристаллитов составлял 25,5 нм, а также кубической

структурой (параметр решетки a = 0,427 нм ICDD 01-073-8589) Рентгеновские спектры обоих образцов показаны на рисунке 3.16. Низкокристаллический ГА дает расширение пиков дифракционных картин ГА-Алг и ГА-Алг-ZnO. В Таблице 3.6. представлены структурные параметры образцов.



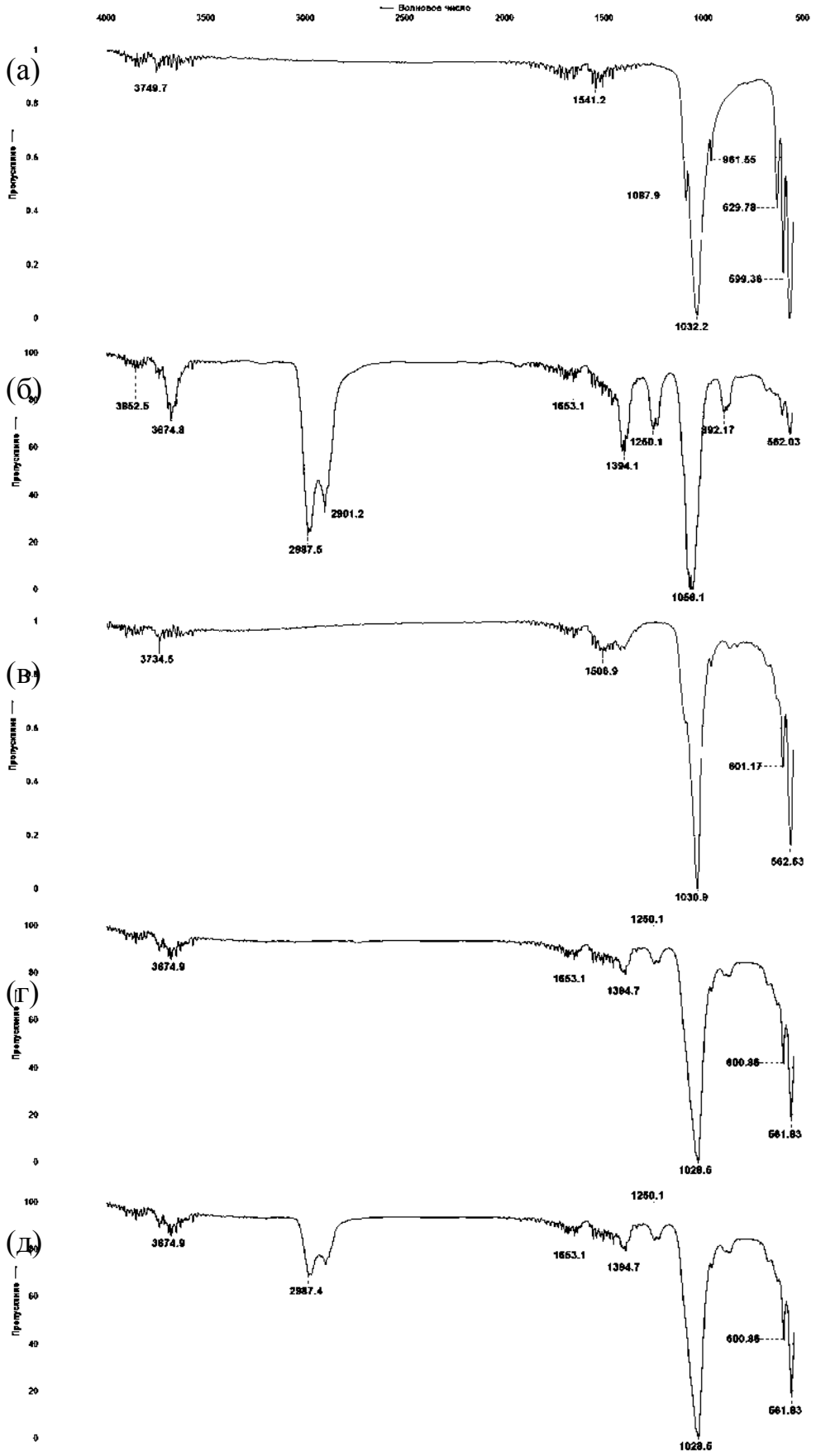
H – гидроксиапатит, Z – ZnO

Рисунок 3.16 – Рентгенограммы составных компонентов: ZnO и ГА, изготовленные под воздействием МВ и отожженные при 900 ° С, композиты ГА-Алг и ГА-Алг-ZnO

Таблица 3.6 – Структурные особенности образцов ГА и ZnO

Образец	Параметры кристаллической решетки ГА, нм		Средние размеры кристаллитов для (0 0 2) пика, нм
	a	*c*	
ГА	9.41	6.87	39.6
ZnO	3.26	5.2	25.5

С помощью ИК спектроскопии было изучено взаимодействие функциональных групп компонентов, входящих в состав композита. На рисунке 3.17 (а,б,в,г,д) представлены ИК спектры ГА-ZnO, ГА-Алг-ZnO, Гаг, ГАп, ГА-Алг образцов соответственно.



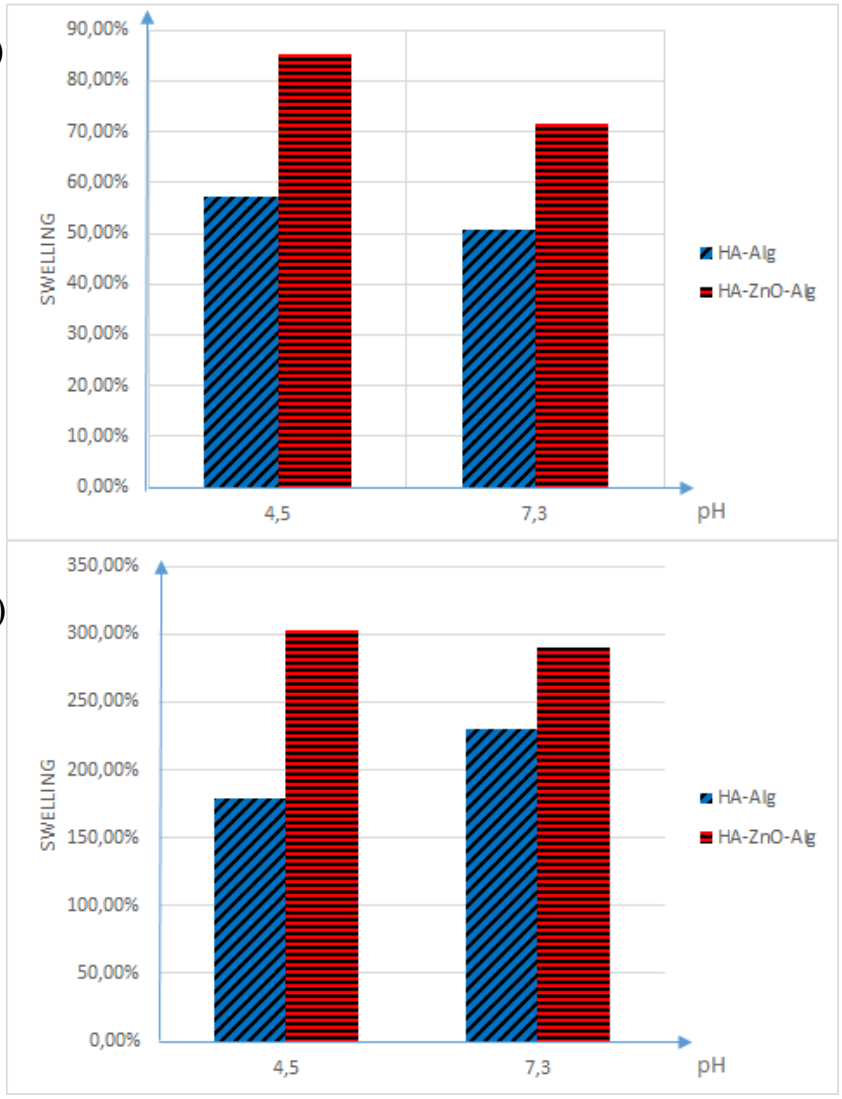
(а) ГА-ZnO, (б) ГА-Алг-ZnO, (в) Гаг, (г) ГАп, (д) ГА-Алг

Рисунок 3.17 – ИК спектры синтезированных образцов

Так, в спектре чистого ГА (рисунок 3.17 в,г), а также в композите ГА-ZnO (рисунок 3.17 а) присутствуют характерные колебания , а именно: O—P—O группам принадлежат полосы колебаний в области 562 и 602 $см^{-1}$ (валентные колебания ν4) [163,164]. Пик при 962 $см^{-1}$ соответствует симметричным валентным ν1 колебаниям фосфатных групп [24, p. 472]. Полоса колебаний с пиком при 1026 $см^{-1}$ относится к ассиметричным валентным (ν3) P—O колебаниям [165]. Колебания в области 1420 $см^{-1}$ принадлежат валентным ν_1 колебаниям группы CO_3 , что свидетельствует о формировании доли карбонат апатита под воздействием микроволнового излучения в процессе синтеза [137, p. 7510]. Полоса около 1640 $см^{-1}$ связана с растяжением H-O-H в адсорбированных молекулах воды [166]. Колебания с пиками в области 3734 $см^{-1}$ принадлежат поверхностным гидроксильным группам, а также адсорбированным молекулам воды [167], (рисунок 3.17 в,г). После добавлении микрокристаллического ZnO к водной суспензии ГАг в спектре сохраняются все характеристические пики ГА, а также происходит смещение полосы P—O колебаний с 1026,6 до 1030,9 $см^{-1}$, что может свидетельствовать о нарушении симметрии молекулы ГА. (рисунок 3.17 а). Значительные изменения ИК спектра произошли после добавления в систему альгината натрия (рисунок 3.17 б,д). Появились характерные для альгината колебания: линии 3435 $см^{-1}$ и 2987,5 — 2901,2 $см^{-1}$ объясняются растягивающими колебаниями свободных и водородных связанных OH-групп в углеродных кислотах соответственно[168]. Выращивание в приблизительно 1615 $см^{-1}$ относится к растяжению карбонила - C = O. Деформация -O-H (вторичная гидроксильная группа) в C-O-H перекрывается колебаниями P-O и представлена как интенсивный пик 1056 $см^{-1}$. Деформация OH-группы в COOH показана на пике 892 $см^{-1}$. Смещение пика с 1030 до 1056 $см^{-1}$, значительное уширение полосы колебаний после внесения альгината в состав композита, а также произошли изменения в колебаниях OH в карбоксильных группах альгината (1340, 1030, 1097, 947, 890 $см^{-1}$) и могут свидетельствовать об образовании новых химических связей при образовании композитного материала. Можно предположить, что карбоксильные группы альгината ионизируются в COO- и образуют H-связь или другое соединение во время композиционного образования Га-Алг-ZnO [141, p.55; 143, p. 77; 169]. Влияние времени экспозиции образцов в «сшивающем» $CaCl_2$ растворе при формировании гранул на способность адсорбировать жидкость была исследована в растворе PBS при различных значениях pH. Тест на набухание был проведен в течение 24 часов относительно ГА-Алг и ГА-Алг-ZnO гранул, время экспозиции которых в растворе $CaCl_2$ составило 25 минут (рисунок 3.18 а) и 18 часов (рисунок 3.18 б).

(а)

(б)



а) 5 мин.; б) 18 ч.

Рисунок 3.18 – Коэффициент набухания гранул ГА-Алг и ГА-Алг-ZnO с временем экспозиции в $CaCl_2$

Степень набухания была исследована при значениях pH 4.5 и 7.3, поскольку в условиях живого организма резорбция и образование новой костной ткани проходит под влиянием специфических клеток остеобластов и остеокластов при значениях pH от 7,5 до 4,5. Результаты показывают, что с введением ZnO в состав композита увеличивается степень набухания образцов. Увеличение времени экспозиции в сшивающем растворе приводит к уменьшению степени набухания. При этом образцы с содержанием ZnO несколько меньше подвержены набуханию в нейтральной среде при pH=7.3, чем в кислой при pH 4.5. Более высокая степень набухания композита ГА-Алг-ZnO по сравнению с ГА-Алг объясняется различием их структуры. Так, в зависимости от времени экспозиции в сшивающем растворе, пористость ГА-Алг составляет 5 - 15%, в то время, как пористость ГА-Алг-ZnO – 35 - 50%

[170]. Повышение пористости способствует увеличению поверхности для адгезии и пролифирации клеток, образующих новую костную ткань, и является одним из требований, предъявляемых к биоматериалам.

Выводы по разделу 3

В данном разделе были исследованы образцы гидроксиапатита в виде гидрогеля и порошка, образцы композитных материалов на основе гидроксиапатита и альгината натрия в виде гранул, а также композитного материала на основе гидроксиапатита с добавлением оксида цинка и альгината натрия.

Образцы чистого гидроксиапатита ГАп и ГАг имеют различную морфологию строения образующих частиц, что очевидно из-за различных методов синтезирования. Соотношение Ca/P является практически идентичным, состав функциональных групп также имеет незначительные изменения. Анализируя полученные результаты можно сделать заключение, что синтезированный материал в виде порошка и гидрогеля будет обладать равными показателями по биосовместимости и цитотоксичности. Это является преимуществом, поскольку повышается область применения данного материала за счет различий между состояниями материала (порошок или гидрогель). Синтезированный гидроксиапатит является наноразмерным материалом.

Внедрение альгината натрия для получения композитного материала ГА-Алг (гидроксиапатит в альгинатовой матрице) с улучшенными характеристиками не имеет влияния на фазовый и функциональный состав гидроксиапатита.

Впервые исследовано влияние добавления ZnO в композит ГА-Алг и ГА. Обнаружено, что включение ZnO изменяет симметрию молекулы ГА, замещая атомы кальция цинком, о чем свидетельствует смещение линии O—P—O группы, а также результаты исследования ПЭМ и РЭМ. Кристаллы ZnO являются наноструктурированными поликристаллами двух типов с гексагональной и кубической решеткой.

4 НАНЕСЕНИЕ КАЛЬЦИЙ-АПАТИТНЫХ ПОКРЫТИЙ НА ПОРИСТЫЕ СТРУКТУРЫ ИЗ 316L И Ti6Al4V МЕТОДАМИ ГИДРОТЕРМАЛЬНОГО ОСАЖДЕНИЯ И МИКРОПЛАЗМЕННОГО НАПЫЛЕНИЯ

На сегодняшний день в медицине используется большое количество различных сплавов на основе CoCr, Ti, нержавеющей стали и т.д.. Однако металлические имплантаты являются биоинертными, несмотря на развитие биоразлагаемых сплавов на основе магния. Кроме того, из-за их механических свойств лишь небольшое количество сплавов приблизилось к механическим свойствам кортикальной части человеческой кости. Эти сверхэластичные сплавы обычно основаны на системах Ti-Nb-Ta, Ti-Nb-Ta-Zr, которые имеют высокую стоимость. Целесообразно применять биоактивные покрытия, которые будут иметь наилучшее сходство с человеческой костью с точки зрения химического состава, физических свойств и биологических параметров.

Металлические имплантаты по своей природе являются биоинертными, что уменьшает продолжительность использования в организме человека. Одним из важных свойств имплантата является способность к остеоинтеграции. Помимо остеоинтеграции, необходимыми свойствами являются биосовместимость, коррозионная стойкость. Современные тенденции в медицине направлены на развитие новых материалов с остеокондуктивными и антибактериальными свойствами [8, p. 402; 14, p. 99385; 15, p.1701063; 16, p.80; 19, p. 02NABM08-2].

Придание пористости металлическим изделиям приводит к уменьшению плотности, влияя на механические свойства. Пористые металлические имплантаты, покрытые фосфатом кальция, обеспечивает необходимую пористость для роста костей, тогда как нижняя металлическая подложка несет нагрузку с полным допуском веса вскоре после операции. Основным требованием для разработки покрытий на основе гидроксиапатита на металлические имплантаты является получение стехиометрического порошкового материала (то есть отношения Ca / P около 1,67) с предпочтительными химическими и фазовыми свойствами, имеющий сродство с костной тканью и легкость осаждения на сложных формах [171]. Кристаллические ГА-покрытия показывают низкие скорости растворения in vitro, с меньшей резорбцией и более прямым контактом кости in vivo. Аморфный ГА подвергается быстрому растворению в физиологической среде. Поэтому ГА с низкой кристалличностью быстро становится слабым и может способствовать воспалительным реакциям. Поэтому желательно иметь высокую степень кристалличности в покрытиях ГА, хотя допускается наличие небольшого количества аморфного ГА [172].

Добавление ионов цинка позволяет улучшить его биологические характеристики, поскольку последние исследования [16, p.80] показывают его антибактериальные свойства.

Процесс осаждения покрытий, в основном, является неравновесным. Следствием чего, является различие между исходным материалом и нанесённым покрытием по элементному, фазовому составу, степени кристалличности и/или степени аморфизации, микроструктуры, морфологии поверхности. Данные физические свойства покрытия, зависят как от процесса осаждения, так и от применения или неприменения обработок до и после нанесения [25, p. 275].

В данном подразделе мы представляем новый тип медицинских изделий с использованием аддитивных технологий и покрытием биосовместимого композиционного материала на основе апатита кальция доппированного Zn.

4.1 Био-функциональное композиционное покрытие апатита кальция и ZnO методом гидротермального осаждения на печатную пористую структуру

Пористые пластины размером 12×10×2 мм, была получена методом селективного лазерного плавления из порошка стали AISI 316L. Размер пор не превышал ≤800 мкм.

Лазерное плавление порошка проводили с использованием машины Mlab cusing R, изготовленной Concept Laser (Германия). Параметры процесса СЛП: мощность волоконного лазера 90 Вт, частота 50 кГц, скорость сканирования 500 мм/с, размер пятна 100 мкм. Процесс проводили в атмосфере азота. Содержание кислорода (в соответствии с интегрированными датчиками) на всех стадиях составляло менее 0,1%.

Нанесения покрытий проводилось при 2-х различных режимах:

1) 5 В, 90ºС, 12 ммоль/л ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 20 ммоль/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 час, 400ºС 1 час;

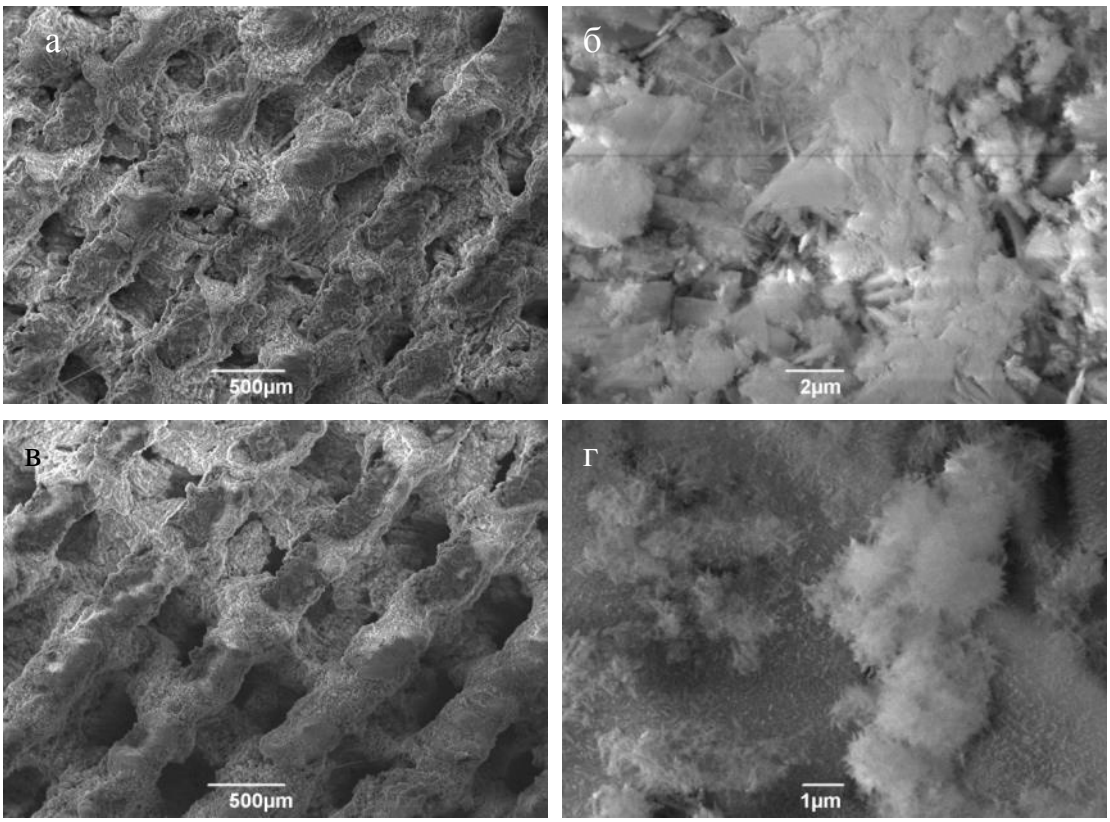
2) 10 В, 90ºС, 6 ммоль/л ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 10 ммоль/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 час, 400ºС 1 час.

Процесс нанесения покрытий проводили следующим образом: подложка была прикреплена к медному электроду и погружена в раствор, содержащий $CaCl_2$ (чистота 99%) и NaH_2PO_4 (чистота 99%) с молярным отношением Ca/P = 1,67 и концентрациями 10 ммоль/л и 6 ммоль/л, соответственно. Раствор нагревали с помощью химического реактора с термо рубашкой. Температура хладагента составляла 90 °С, температура раствора составляла 86,4 °С. Время осаждения составляло 1 час при pH 6,5. Для поддержания равномерного распределения температуры по всей массе исходного раствора использовали однородное перемешивание. Субстраты были предварительно очищены, в том числе: 15 минут ультразвуковой обработки в ацетоне, 96% этанола и тройной промывки в дистиллированной воде. Легирование Zn проводилось электрохимическим методом при напряжении 5 В и 10 В, расстояние между электродами составляло 12 см. После нанесения покрытия образец отжигали в муфельной печи при 400 ° С в течение 1 часа.

Микроструктура поверхности образцов, полученных при различных режимах осаждения, представлены на рисунке 4.1. Заметно, что ГА проник в

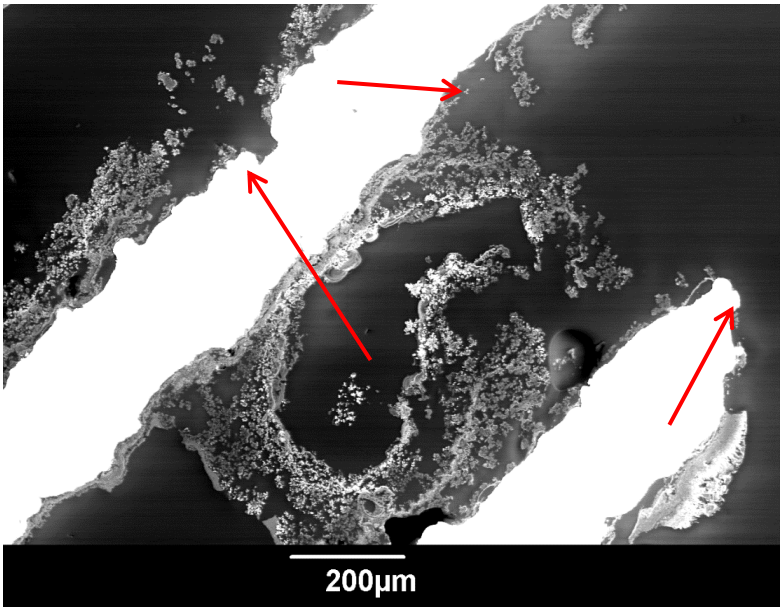
глубь металлических ячеек и образовал сложную архитектуру с порами ≤450 мкм. При более высоком увеличении становится очевидным, что нанесенное покрытие является кристаллическим ГА с размером частиц ≤1 мкм. Кристаллы ГА представляют из себя конгломераты отдельных, иглообразных кристаллов, что соответствует кристаллам биологического апатита. Участки без покрытия ГА не обнаружены. Необходимо отметить, что при более высокой концентрации (режим осаждения №1) покрытие ГА является плотным и имеет бо`льшую толщину, по сравнению с покрытием, полученного при режиме №2.

На рисунке 4.2 Микроструктура образца в поперечном разрезе, красным указаны участки бес покрытия ГА. Причиной может служить отслоение покрытия во время пробоподготовительной работы из-за слабой адгезии [150, с. 161]. Относительно слабая адгезия покрытий является главным недостатком данного метода. Преимуществом является то, что ГА имеет высокую кристаличность. Кристалличность ГА подтверждается фотографиями поверхности рисунок 4.1б и 4.1г. АКФ является менее расствоpимым в воде согласно [2, p. 74; 25, p. 231; 162, p. 21].



(а, б) – образец №2, (в,г) – образец №1

Рисунок 4.1 – Микроструктура пористых печатных образцов AISI 316L с покрытием ГА, доппированного Zn



Режим осаждения: 5 В, 90ºС, 12 ммоль/л ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 20 ммоль/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 час, 15 мин 400ºС

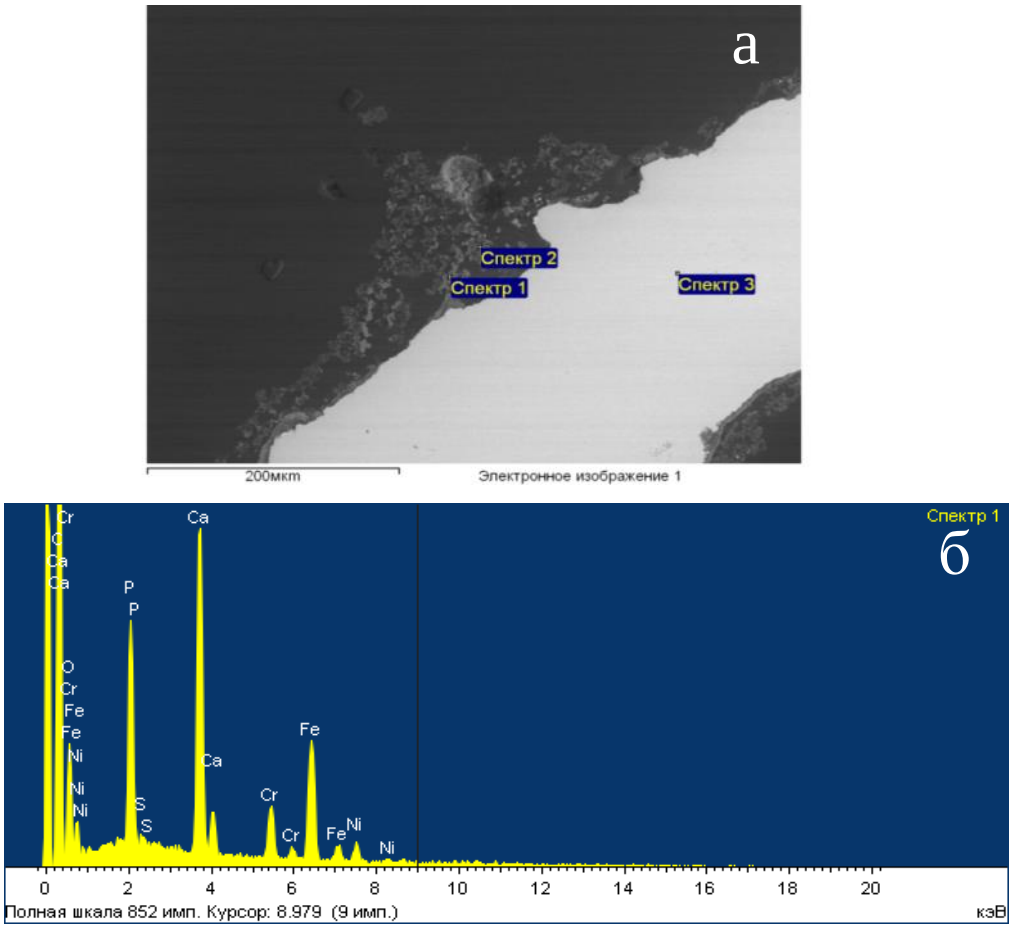
Рисунок 4.2 – Микроструктура образца №1 в поперечном разрезе

Исследование микроструктуры образца при поперечном разрезе, показало слабые адгезионные свойства покрытия, что является недостатком использованного метода осаждения покрытий, рисунок 4.2. Красным указана область отслоения покрытия, после проб подготовительных работ.

Исследование элементного состава покрытия проводилось с помощью ЭДС на РЭМ, где выбирались минимум 3 точки для анализа. Спектральные линии разделены и идентифицируемы рисунок 4.3 (б). В таблице 4.1 представлены результаты ЭДС анализа на РЭМ при режиме осаждения: 5 В, 90ºС, 12 ммоль/л ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 20 ммоль/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 час, 15 мин 400ºС. Весовое соотношение Ca/P составило 1.77, что соответствует к КДГА. Присутствие Zn в составе покрытия не обнаружено, что свидетельствует о его крайне низкой концентрации >0,01 вес%.

Таблица 4.1– элементный состав покрытия (5 В) и пористой подложки, в вес.%

Спектр	O	P	Ca	Cr	Mn	Fe	Ni	Итог	Ca/P
Спектр 1	28.23	12.94	22.94	7.48		23.39	4.43	100.0	1,77
Спектр 2	31.26	13.55	23.95	6.56		20.76	3.92	100.0	1,77
Спектр 3	5.03	1.16	1.14	17.05	1.40	61.56	12.66	100.0	-
Макс.	31.26	13.55	23.95	17.05	1.40	61.56	12.66		
Мин.	5.03	1.16	1.14	6.56	1.40	20.76	3.92		



(а) область исследования с указанием точек анализа, (б) ЭДС спектр для точки исследования 1

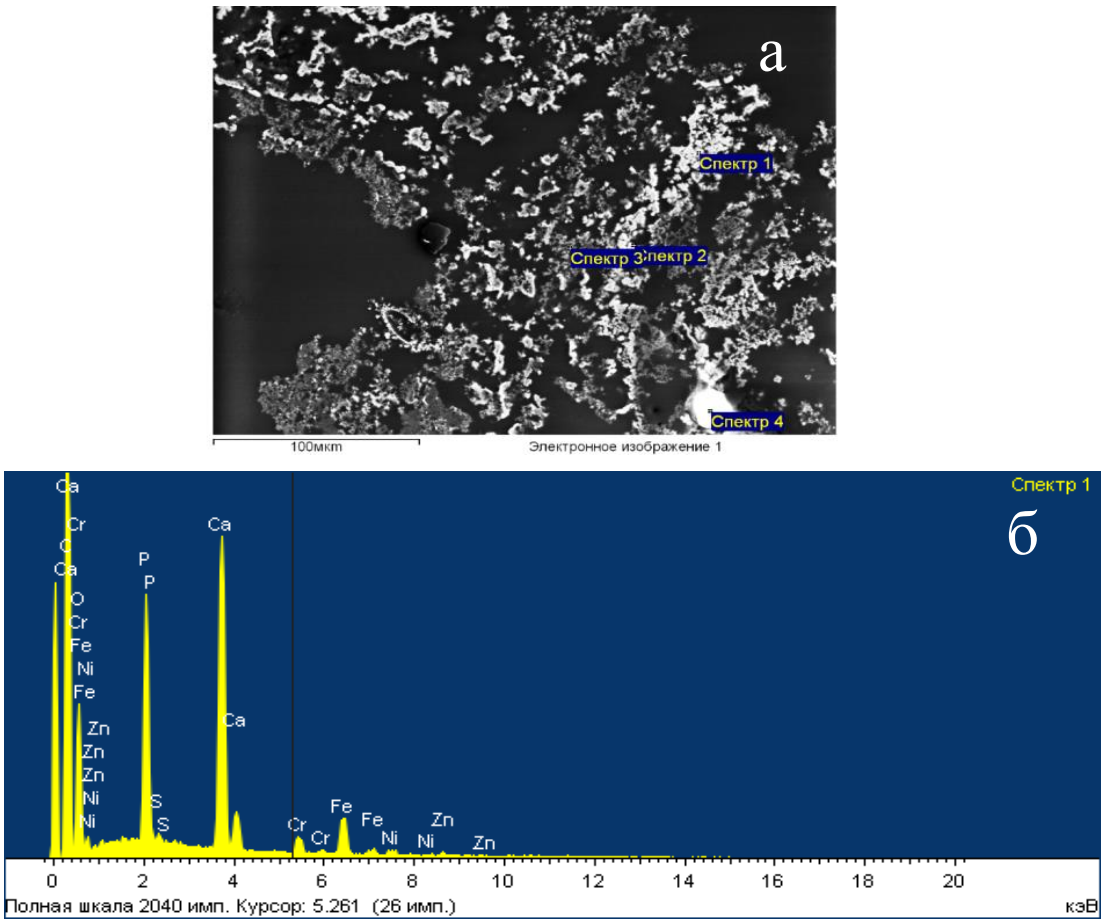
Рисунок 4.3 – Микроструктура печатного образца №1

Одним из важнейших параметров при осаждении покрытий гидротермальным методом является определение состава раствора. Таким образом было принято решение провести осаждение при уменьшении концентрации в 2 раза. Уменьшение толщины покрытия, должно повысить адгезионные свойства покрытия. Также был увеличен потенциал на электродах до 10 В.

На рисунке 4.4а представлены область исследования и спектр ЭДС образца №2. Спектральные линии разделены и идентифицируемы рисунок 4.4 (б). Подробная информация о концентрации элементов в точках анализа приведена в таблице – 4.2. Соотношение Ca/P на 18% меньше стехиометрического 2.16 для ГА. Также присутствуют обильные включения других элементов в состав покрытия, что объясняется проникание электронного луча насквозь покрытия. Концентрация Zn достигает порядка 1,5-2 вес.%.

Таблица 4.2 – элементный состав покрытия (10 В) и пористой подложки, в вес.%

Спектр	O	Si	P	S	Cl	Ca	Cr	Mn	Fe	Ni	Zn	Итог	Ca/P
Спектр 1	46.42		14.60	0.44		25.14	2.62		8.04	1.37	1.36	100.00	1,72
Спектр 2	45.86		14.18	0.38	0.42	24.35	3.04		9.36	1.33	1.07	100.00	1,72
Спектр 3	40.59		11.59			21.31	4.98		16.66	2.79	2.08	100.00	1,83
Спектр 4	9.57	0.50	1.57	0.51		2.69	14.79	1.35	56.77	12.26		100.00	-
Макс.	46.42	0.50	14.60	0.51	0.42	25.14	14.79	1.35	56.77	12.26	2.08		
Мин.	9.57	0.50	1.57	0.38	0.42	2.69	2.62	1.35	8.04	1.33	1.07		



(а) область исследования с указанием точек анализа, (б) ЭДС спектр для точки исследования 1

Рисунок 4.4 – Микроструктура печатного образца AISI 316L с ГА- покрытием, доппированного Zn 10 В, 90ºС, 6 ммоль/л ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 10 ммоль/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 час, 15 мин 400ºС

Изучение фазового состава показало, что основные пики рентгенограммы соответствуют ГА с гексагональной структурой (ICDD 01-075-1526) и к основному компоненту железа сплава AISI 316L, рисунок4.5. Параметры ячейки ГА: a-9.4172A, b-9.4172A, c-6.8799A. Структура микрокристаллов ZnO также гексагональна, параметры ячейки: a - 3,420A, b - 3,2420A, c - 5,1760A.

В спектре FTIR ГА-Zn присутствуют характерные колебания: полосы колебаний в области 562 и 602 $см^{-1}$ (изгиба ν4) относятся к группам O-P-O [27, p. 575; 28, p.1807]. Полоса с пиком при 1024,7 $см^{-1}$ относится к асимметричным колебаниям (ν3) P-O [168, p. 577]. OH-группа слабо выражена, что объясняется высокой температурой отжига, рисунке 4.6.

Анализируя данные РДА, ЭДС и FTIR анализов, можно прийти к заключению, что полученное покрытие ГА-Zn (осажденное при 10 В, 90ºС, 6 ммоль/л ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$), 10 ммоль/л $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 час, 15 мин 400ºС) относится к КДГА, когда понижение количества кальция, обусловлена замещением его другими металлами [173].

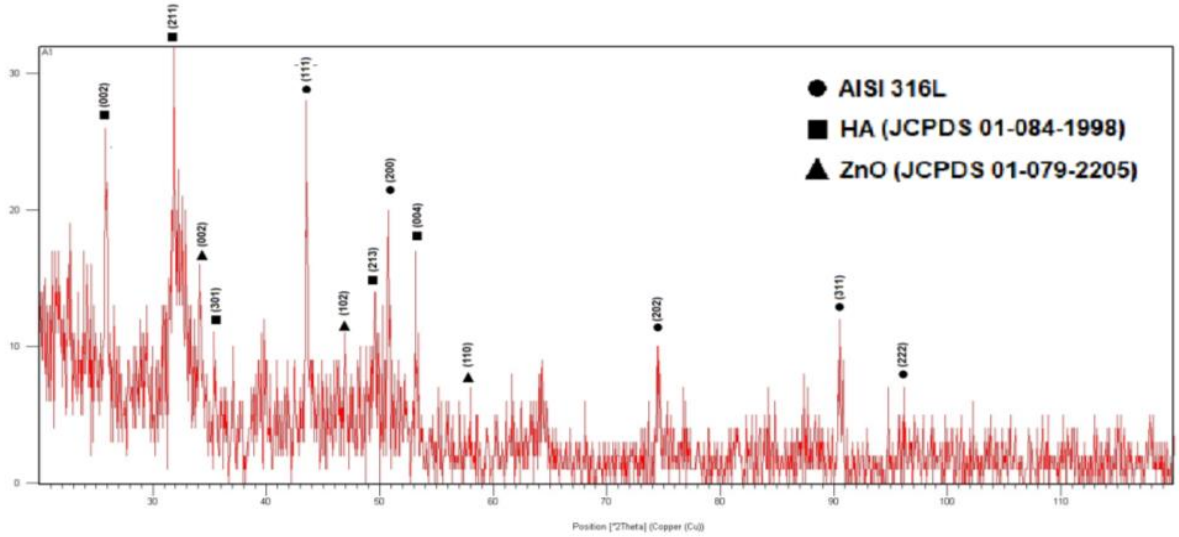


Рисунок 4.5 – Рентгенограмма пористого образца AISI 316L с покрытием ГА-Zn

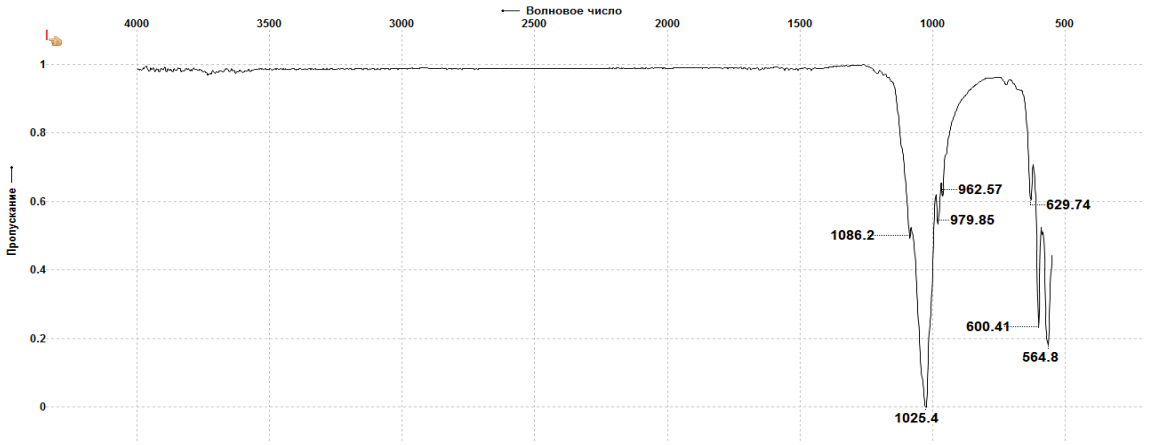


Рисунок 4.6 – ИК-спектр покрытия ГА - Zn

4.2 Био-функциональное покрытие апатита кальция полученное методом микроплазменного напыления на печатную пористую структуру

Пористая подложка Ti6Al4V была получена методом селективного лазерного плавления. Подложкой служили пластины размером 12×10×2 мм, размер пор не превышал ≤800 мкм.

Лазерное плавление порошка марки CL rematitan (Ti6Al4V) проводили с использованием машины Mlab cusing R. Параметры процесса СЛП: 100 Вт, частота 50 кГц, скорость сканирования 450 мм/с, размер пятна 100 мкм. Процесс проводили в атмосфере Ar. Содержание кислорода (в соответствии с интегрированными датчиками) на всех стадиях составляло менее 0,1% [150, с. 158; 173, p. 1276].

Процесс и технология нанесения ГА плазменными методами, в том числе методом микроплазменного напыления (МПН), хорошо изучен. Нас же интересовал вопрос нанесения ГА на пористые подложки. Сложность заключается в том, что геометрия поверхности имеет значительные колебания по уровню. МПН осуществлялось при следующем режиме: *I*=35А, *U*= 36 В, *расход* плазмообразующего газа = 12 л/с, *расход* защитного газа = 16 л/с, расстояние подложки от плазматрона = 15 см.

На рисунке 4.7 представлена фотография микроструктуры поверхности образца с нанесенным покрытием. Поверхность развитая, с большим количеством кратеров от попадания расплавленных осколков частиц порошка ГА, рисунок4.7 а- с, и обилием трещин, предположительно из-за усадки в результате быстрого охлаждения. Подобную морфологию поверхности можно объяснить следующим образом: поток плазмы является турбулентным, подача материала в плазму осуществляется дискретным способом. При попадании разогретых частиц ГА на подложку со скоростью ~ 400 м/с происходит ее деформация и разлет на субчастицы рисунок 4.7 с.

Результаты исследования элементного состава методом ЭДС анализа на РЭМ представлены в таблице 4.3 и на рисунке 4.8. Химический состав не однороден. Весовое соотношение Ca/P варьируется от 1,77 до 2,02, что может свидетельствовать о полиморфном состоянии покрытия. Причина полиморфизма покрытия связана с физикой процесса МПН и нагрева частиц. Включение других элементов не наблюдается, также как и элементы, входящие в состав подложки (Ti, Al, V). Исходя из этих данных можно сделать вывод, что толщина покрытия имеет бо`льшую толщину по сравнению с покрытия, полученного гидротермальным методом.

Температура плазменной струи быстро уменьшается в зависимости от расстояния и составляет всего 6 см от электродов, типичные температуры колеблются в пределах 2000–3000 К. Она уменьшается с увеличением расстояния. Хотя впрыскиваемые частицы подвергаются воздействию очень высоких температур в течение очень короткого времени (~ 10^{-3}–10^{-4} с), большинство из них достаточно нагреты, чтобы стать расплавленными, полурасплавленными или, по крайней мере, размягченными, что важно для адгезии.

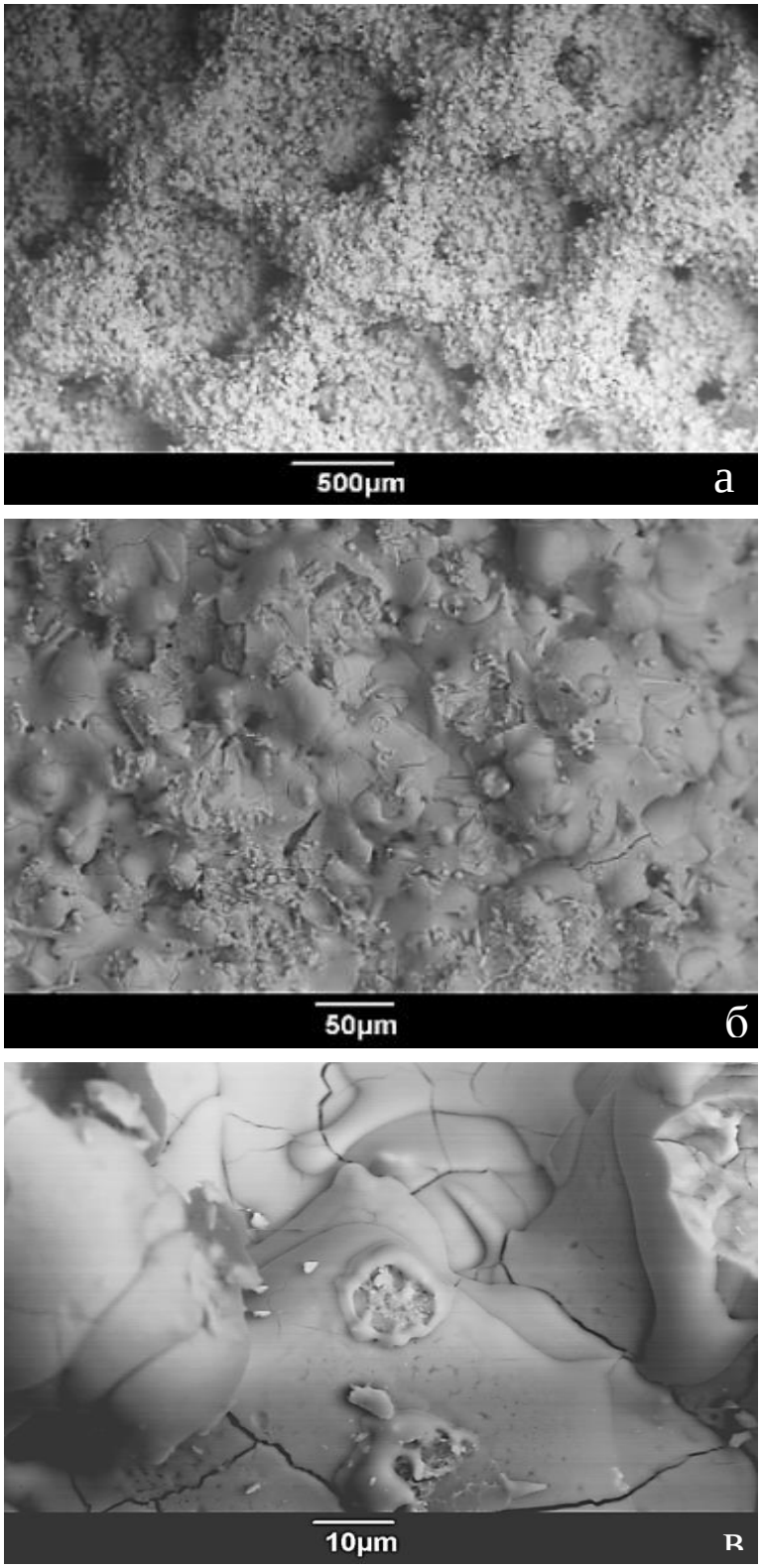
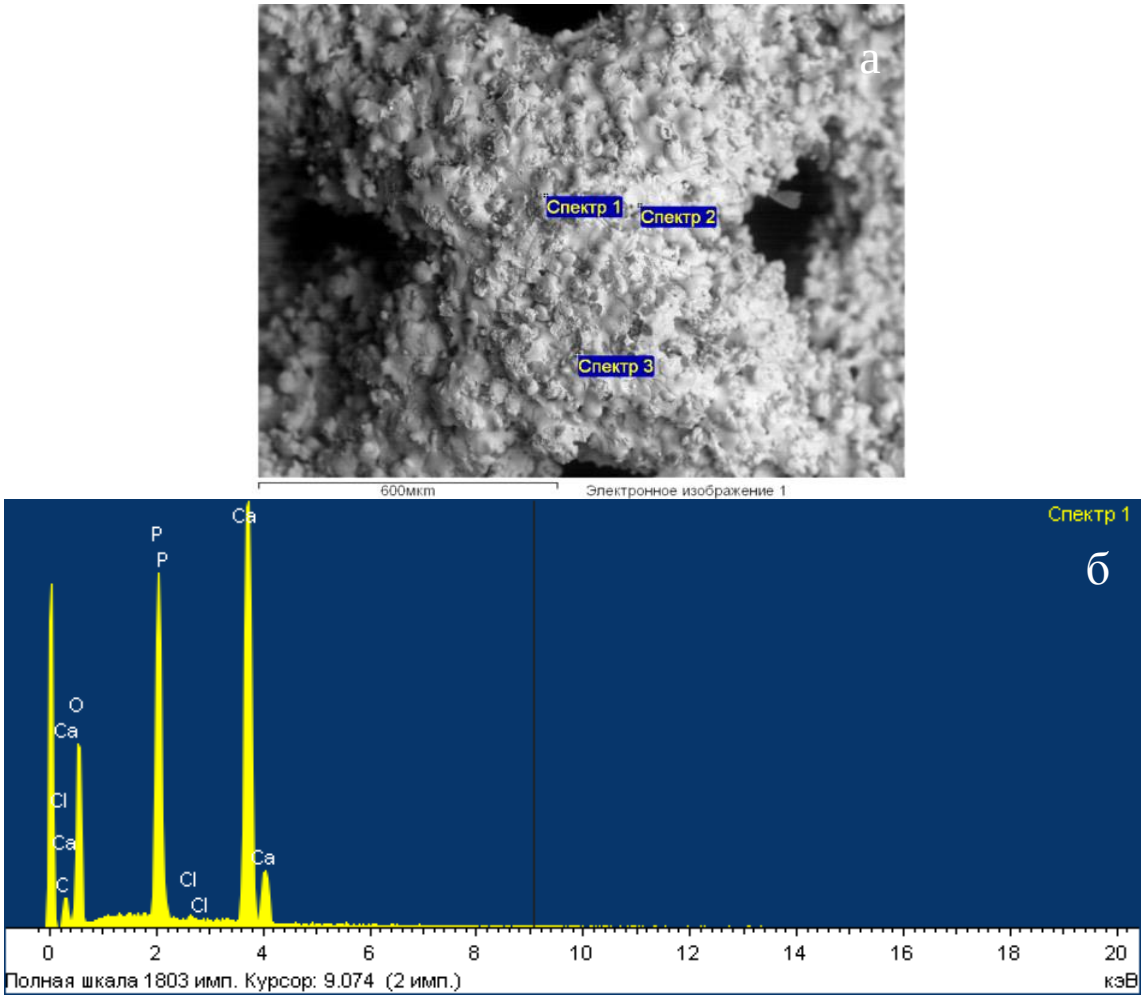


Рисунок 4.7 – Микроструктура поверхности образца с нанесенным покрытием ГА методом микроплазменного напыления

Таблица 4.3 – элементный состав покрытия и пористой подложки, в вес.%

Спектр	O	P	Cl	Ca	Итог	Ca/P
Спектр 1	55.41	15.95	0.27	28.37	100.00	1,77
Спектр 2	47.85	17.99		34.16	100.00	1,89
Спектр 3	48.66	16.17	1.37	33.80	100.00	2,09
Макс.	55.41	17.99	1.37	34.16		
Мин.	47.85	15.95	0.27	28.37		



(а) область исследования с указанием точек анализа, (б) ЭДС спектр для точки исследования 1

Рисунок 4.8 – Микроструктура пористого образца Ti6Al4V с покрытием из ГА методом микроплазменного напыления

Как известно метод МПН, уменьшает образование примесной и/или аморфной фаз, обеспечивает более высокие степени чистоты и кристалличности фаз и обеспечивает более высокую степень пористости по сравнению с другими плазменными методами, что способствует врастанию

костной ткани. Важно подчеркнуть, что среди осажденных ламелей имеются небольшие пустоты, такие как поры [25, p. 301; 174], трещины и области неполного соединения. Из-за такой неоднородной структуры покрытия могут иметь свойства, существенно отличающиеся от исходного материала [25, p. 301; 175].

Исследование фазового состава ГА до и после процесса МПН, показало, что исходный порошок ГА состоит из одной основной гексагональной фазы, рисунок 4.9а. На рисунке 4.9б представлена дифрактограмма покрытия ГА, уширение линий связано, с увеличением дефектности поверхности, что подтверждается фотографиями СЭМ микроструктуры, рисунок 4.7. Процесс МПН ГА имеет хаотичный характер (турбулентный поток, наложение слоев покрытия, разная степень проплавления порошка ГА в плазменной струе), что отражается на качестве поверхности нанесенного покрытия. Кристаллическая решетка материала покрытия принадлежит к гексагональной решетке ГА, параметрами решетки $a = 9.4232$ Å, $b = 9.4232$ Å, $c = 6.8833$ Å.

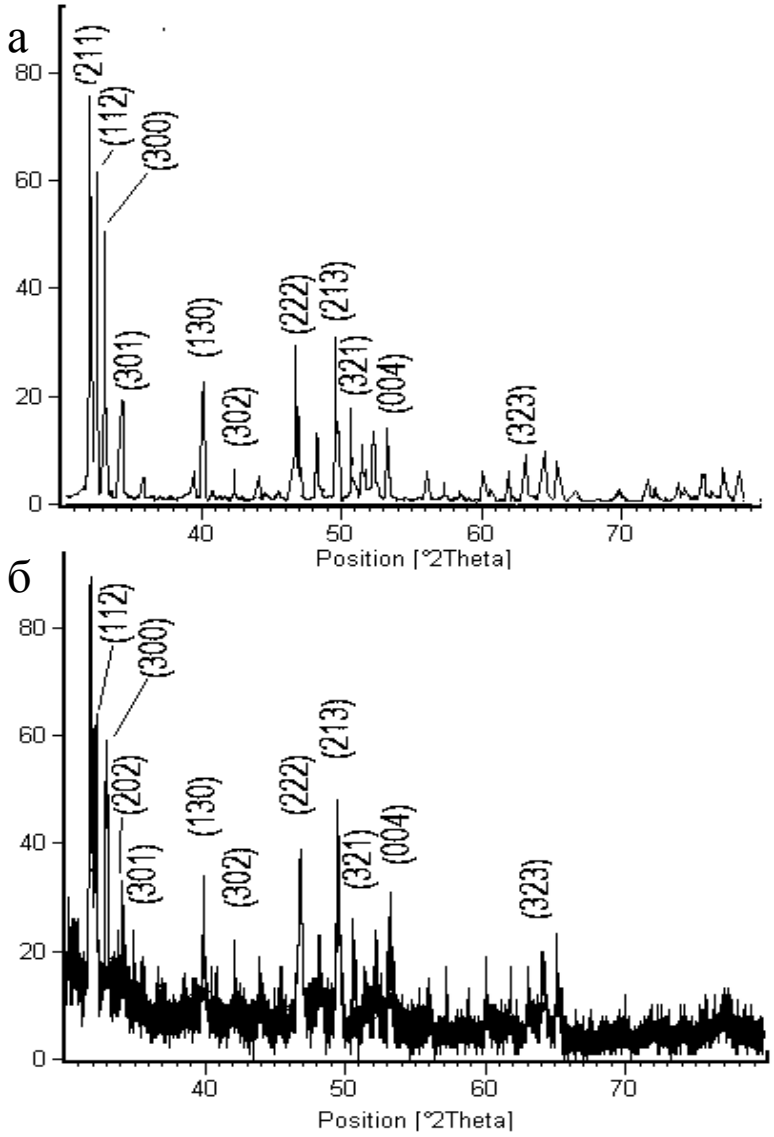


Рисунок 4.9 – Рентгенограмма ГА до (а) и после МПН (б)

Исследование функциональных групп покрытия проведено в сравнении с исходным материалом (порошок ГА), рисунок 4.10. Полосы колебаний в области 562 и 602 $см^{-1}$ (валентные колебания ν4) принадлежат O—P—O группам [163, p. 688; 164, p. 471]. Пик при 962 $см^{-1}$ соответствует симметричным валентным ν1 колебаниям фосфатных групп [24, p. 475]. Полоса колебаний с пиком при 1026 $см^{-1}$ относится к ассиметричным валентным (ν3) P—O колебаниям [165, p. 6674]. Колебания в области 1420 $см^{-1}$ принадлежат валентным ν_1 колебаниям группы CO_3 , что свидетельствует о формировании доли карбонат апатита под воздействием микроволнового излучения в процессе синтеза [137, p. 7510]. Полоса около 1640 $см^{-1}$ связана с растяжением H-O-H в адсорбированных молекулах воды [166, p. 658]. Колебания с пиками в области 3734 $см^{-1}$ принадлежат поверхностным гидроксильным группам, а также адсорбированным молекулам воды [150, с. 158; 167, p. 3294]. Наблюдается смещение полосы P—O колебаний с 1026,6 до 1030,2 $см^{-1}$, что может свидетельствовать о нарушении симметрии молекулы ГА.

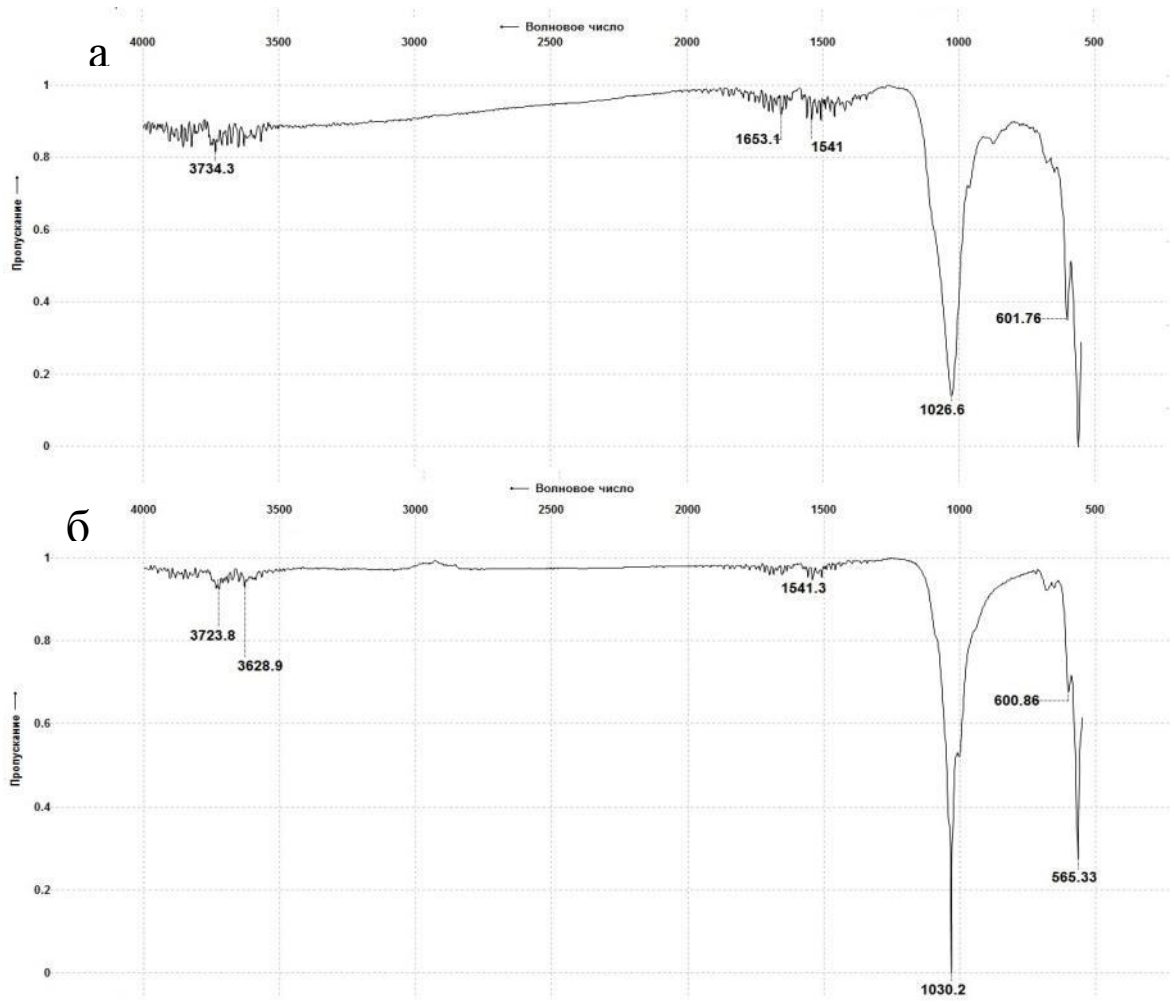


Рисунок 4.10 – Спектр FTIR порошка ГА до (а) и после МПН (б)

Выводы по разделу 4

Были проведены серии экспериментов по нанесению покрытий различными методами – гидротермальным и микроплазменным напылением. Подложкой служили металлические пористые структуры различных сплавов (316L, Ti6Al4V ELI), полученные методом селективного лазерного плавления. Выбор данных сплавов в качестве подложек, обусловлен широким применением данных материалов в медицине.

Определен режим осаждения покрытия, гидротермальным методом, при котором удовлетворяется соотношение Ca/P, а также концентрация цинка.

Исследованы морфология поверхности, элементный, фазовый и функциональный состав покрытий. Впервые исследованы кальций-фосфатные покрытия, нанесенные на пористые материалы, полученные методом СЛП. Обнаружено, что нанесение покрытий на пористые структуры имеет ряд особенностей. Для плазменных методов нанесение-это изменение дистанции из-за существования пор в подложке, следствием чего является кратерооборазование. Для гидротермального метода - это относительно высокая адгезия, по сравнению с плоскими образцами, а также возможность контроля концентрации легирующих компонентов (Zn) во время процесса осаждения покрытия.

Работа является одной из первых, направленных на получение новых типов ортопедических имплантатов с искусственной трабекулярной структурой, подобной кортикальной кости. Соотношение Ca / P полученного покрытия соответствует обычно принятым параметрам. Структура ГА характеризуется высокой степенью кристалличности. Реализована возможность контроля концентрации Zn в осаждаемом покрытии за счет повышения/уменьшения потенциала.

5 АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА, ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И БИОССОВМЕСТИМОСТЬ КОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ С НАНОРАЗМЕРНОЙ АРХИТЕКТУРОЙ ОСНОВЕ БИОАПАТИТА, АЛЬГИНАТА НАТРИЯ И МИКРОЧАСТИЦ ZnO И ИХ ПОКРЫТИЙ

Современная медицина широко использует достижения биоинженерии, одним из направлений которой является разработка и внедрение в практику различных имплантов, заменяющих поврежденные органы и ткани. Достаточно часто такие импланты успешно применяются и в ортопедии. Однако, при этом существует проблема бактериального загрязнения таких «искусственных органов». Дело в том, что бактерии, обязательно присутствующие в организме, способны адгезироваться, колонизировать и образовывать биопленки на поверхности имплантов [176]. Это приводит к развитию «имплант-ассоциированных инфекций», являющихся одним из основных осложнений ортопедических операций. Лечить такие инфекции приходится системными антибиотиками, не всегда эффективными, поскольку существует еще и другая проблема - антибиотикорезистенность микроорганизмов. Одним из способов решения обозначенных проблем является создание материалов, обладающих, наряду с биосовместимостью, еще и антибактериальными свойствами [177].

Он используется, также в качестве материала покрытия для металлических имплантатов из-за его замечательной биосовместимости и остеопроводимости [144, p. 9426]. В связи с этим введение в его структуру веществ, обладающих антибактериальной активностью открывает широкие возможности для создания материалов с антимикробными свойствами. Использование для этой цели антибиотиков может оказаться неэффективным в связи с проблемой антибиотикорезистентности микроорганизмов. Представляется, что более привлекательной выглядит идея интеграциии в материалы на основе гидроксиапатита элементов, которые наряду с выполнением важных метаболических функций в организме, обладают еще и антибактериальной активностью [144, p. 9426;145, p. 2107; 178].

Одним из таких элементов является Zn, который является кофактором многих ферментов, участвующих в биосинтезе белков и системе свертывания крови. Доказан стимулирующий эффект Zn на адгезию и пролиферацию остеобластов, а также формирование костной ткани [179].

Учитывая то обстоятельство, что 28 % всего количества цинка присутствующего в организме, содержится в костной ткани, где он способствует усиленной биоминерализации и формированию костей [158, p. 565], замещение некоторых ионов Ca ионами Zn может улучшить свойства материалов на основе гидроксиапатита [157, p. 257]. Кроме того, в целом ряде исследований установлено, что Zn эффективно ингибирует рост и развитие бактерий и дрожжевых грибов [86, p. 035005; 121, p. 940; 180,181]. В связи с этим цинк может играть важную роль в создании новых противомикробных агентов, а легированный цинком гидроксиапатит найдет применение в биомедицине.

Несмотря на то, что физические и механические свойства реставрационных композитов на основе гидроксиапатита хорошо известны, их биосовместимость детально не изучалась.

5.1 Определение антибактериальной активности композитных материалов с наноразмерной архитектурой основе биоапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO

Антибактериальная оценка, проведенная методом диффузии в агар показала, что материал ГА-ZnO проявляет лишь незначительные антибактериальные свойства. Размер зон ингибирования роста *E. coli* и *P. aeruginosa* не превышал 2-4 мм, а *S. aureus* и *S. epidermidis* колебался в диапазоне 7-14 мм (рисунок 5.1).

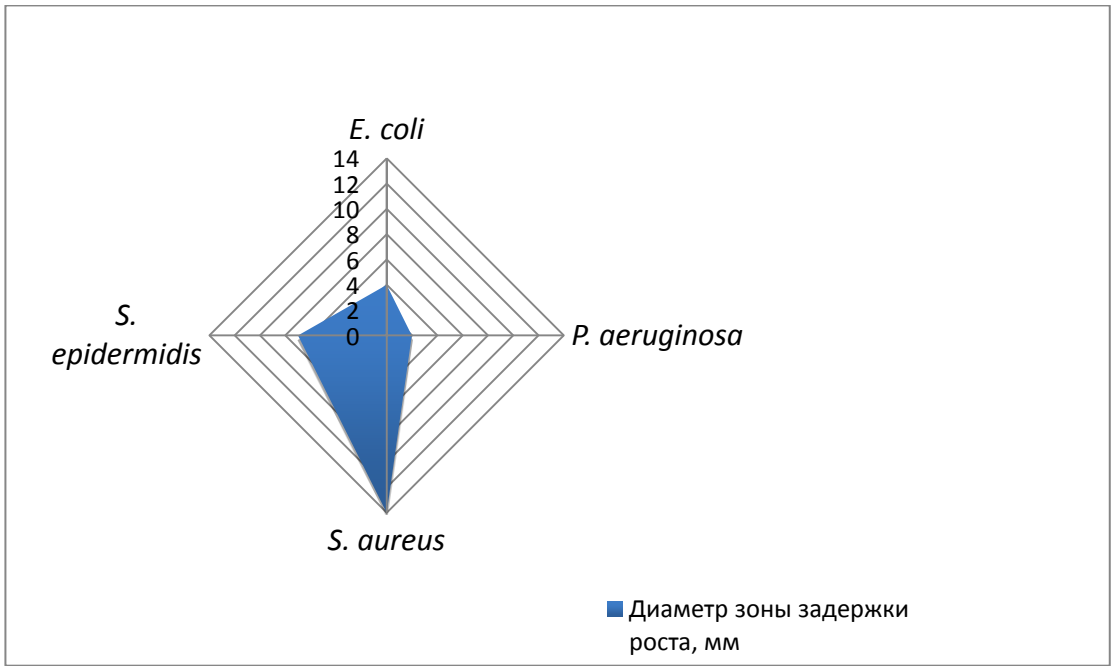
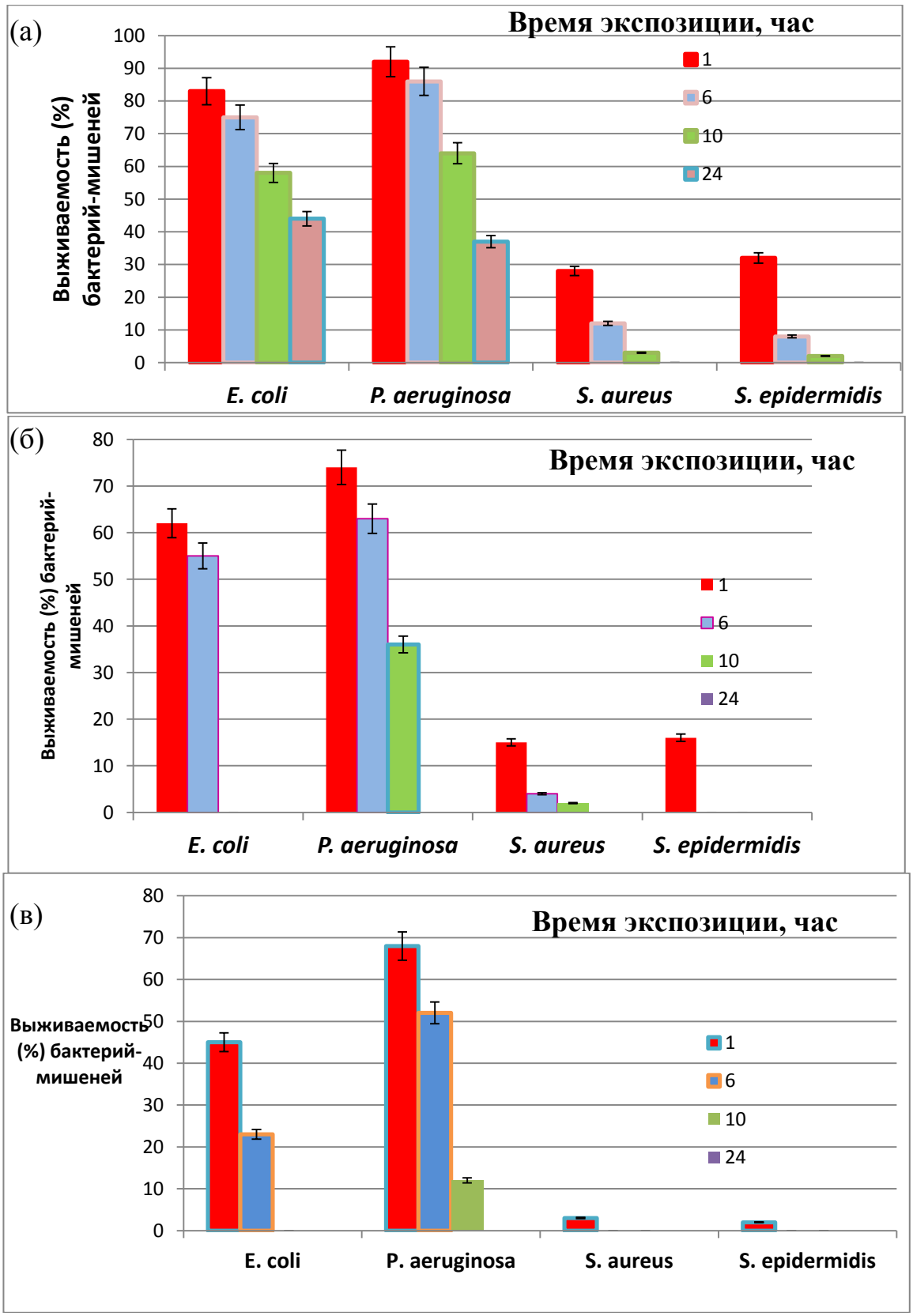


Рисунок 5.1 – Оценка антимикробной активности ГА-ZnO методом «диффузии в агар»

С другой стороны, исследуемый композиционный материал эффективно ингибировал рост бактерий в суспензионной культуре. Судя по представленным на рисунке 5.2 результатам, этот эффект зависел от концентрации материала, вносимого в бактериальную суспензию и времени его экспозиции с микроорганизмами.



(а) концентрация ГА-ZnO - 0.1 мг/мл; (б) - концентрация ГА-ZnO - 0.5 мг/мл; (в) - концентрация ГА-ZnO 1 мг/мл

Рисунок 5.2 – Оценка антимикробной активности ГА-ZnO методом совместного инкубирования в жидкой питательной среде методом “Joint Incubation Methods”

Так, в присутствии ГА-ZnO в пробе с минимальной из используемых концентраций - 0,1 мг/мл, выживаемость бактерий составляет 92-28% уже после 1-часового контакта с ним. Увеличение времени экспозиции приводит к постепенному снижению жизнеспособности клеток в микробной культуре и к 24 часам остается только 44 % живых клеток *E. coli* и 37% *P.aeruginosa.* Бактерии из культур обоих видов стафилокков не высеваются, что свидетельствует об их 100% гибели. Увеличение концентрации материала до 0,5 и 1 мг/мл приводит к усилению его негативного действия на микробные мишени. Жизнеспособные клетки стафилококков не обнаруживаюся уже после 6-часового контакта, а к 24 часам во всех культурах отсутствуют живые микробные клетки. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном антибактериальном действии ионов Zn, присутствующего в составе композитного материала на основе гидроксиапатита.

Грамположительные бактерии, к которым относятся *S. aureus* и *S. epidermidis,* являющиеся наиболее частой этилогической причиной ортопедических инфекций [177, p.788] оказались значительно более чувствительными к тестируемому материалу, нежели грамотрицательные *E. coli* и *P.aeruginosa.* Это полностью согласуется с результатами, полученными другими исследователями и механизмом антибактериального действия цинка [182]. Он обусловлен тем, что ионы Zn могут прочно связываться с тиолом, имидазолом, амино- и карбоксильными группами белков мембраны микроорганизмов. Это приводит к изменению ее структуры и проницаемости и, как следствие, нарушению транспорта веществ в микробную клетку [86, p. 035010]. Итогом является гибель клеток [183]. Грамотрицательные бактерии имеют дополнительную внешнюю мембрану, препятствующую проникновению ионов металлов к цитоплазматической мембране клетки, поэтому они менее чувствительны к мембранотропным агентам.

Разноречивые результаты, полученные в двух тестах, используемых в данной работе, можно объяснить тем, что ионы Zn, присутствующие в составе исследуемого материала не могут свободно диффундировать в слой агара и, соответственно оказывать бактерицидного действия. На наш взгляд, это доказывает, что метод диффузии в агар не подходит для оценки его антибактериальной активности [137, p. 7510].

Совершенно другая ситуация наблюдается в суспензионной культуре . Во-первых, между частицами материала и клетками бактерий происходит электростатическое взаимодействие, обеспечивающее их адгезию на поверхности материала. На ней и осуществляется прямое взаимодействие ионов металлов с микроорганизмами. Во-вторых, в жидкой системе происходит постепенное высвобождение ионов металла в среду, что предотвращает бактериальное размножение и/или вызывает гибель бактерий [184]. Это свидетельствует о том, что метод совместного культивирования является более адекватным для определения антибактериальной активности композитных материалов на основе гидроксиапатита.

Предложенным антибактериальным механизмом композиционного

материала ГА-Алг-ZnO является высвобождение ионов цинка в среду. Высвобождаемые ионы Zn^{2+} оказывают значительное влияние на ингибирование активного транспорта, а также на метаболизм аминокислот и нарушение функционирования ферментной системы бактерий. Согласно работам [24, p. 475,185–187], этот механизм наиболее подходит для наноструктурных кристаллов ZnO, когда скорость процесса извлечения Zn^{2+} увеличивается с уменьшением размера частиц ZnO, что также оказывает непосредственное влияние на размер зоны ингибирования. Наличие зоны ингибирования указывает на то, что механизм биоцидного действия наночастиц ZnO, который включает разрушение мембраны из-за образования поверхностных форм кислорода, приводит к гибели микроорганизмов. Мы предполагаем, что наночастицы ZnO с кубической структурой (параметр решетки a = 0,427 нм) вносят бо'льший вклад в антибактериальную активность, чем наночастицы с гексагональной структурой (параметры решетки a = 0,32427 нм, b = 0,32427 нм и c = 0,51499), рисунок 5.3 [137, p. 7511; 173, p. 1279; 188]. Наночастицы ZnO с гексагональной структурой образуют химическую связь с гидроксиапатитом, который, в свою очередь является слабо растворимым в воде. Фосфаты цинка, а также кальций известны как нерастворимые в воде. Наночастицы ZnO с кубической структурой не образуют химических связей с фосфатами, поэтому они с бо'льшей вероятностью создают частицы ионов АФК и Zn^{2+}, которые могут взаимодействовать с белком и оказывать потенциальное влияние на патогенез [185, p. e111290].

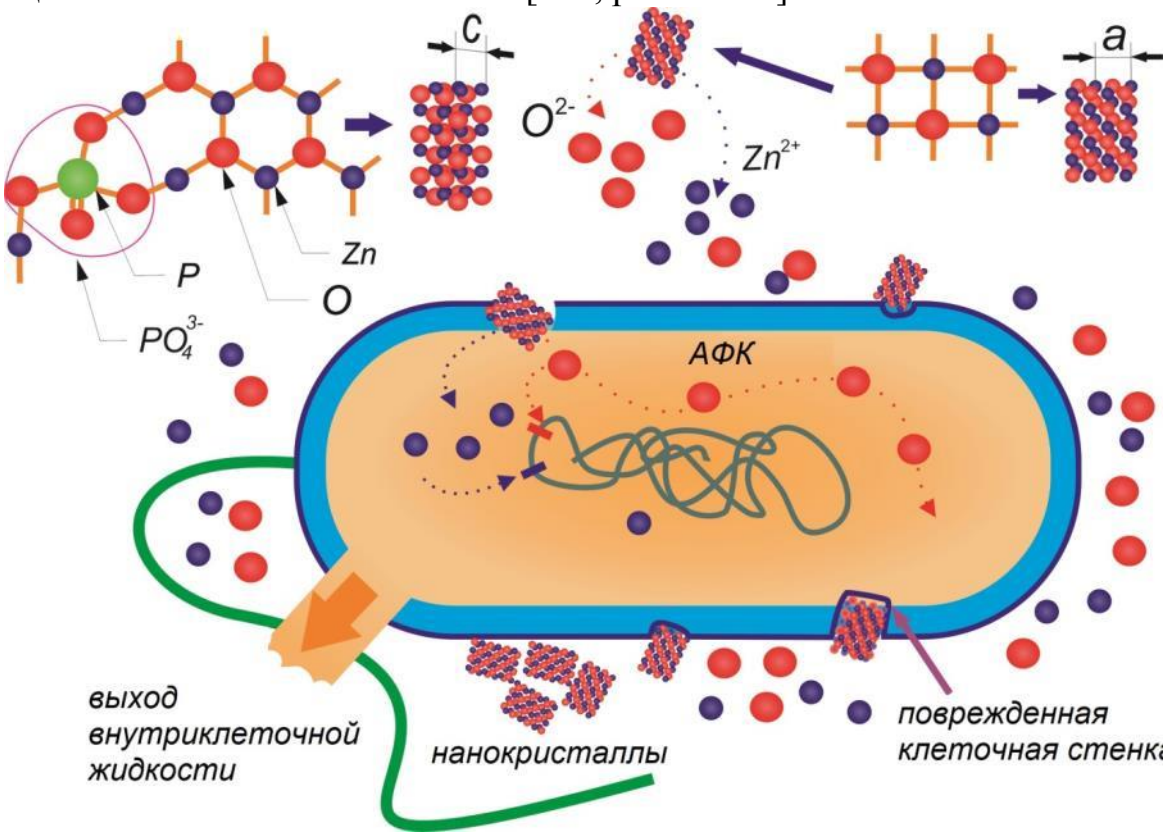


Рисунок 5.3 – Антибактериальный механизм нанокристаллов ZnO

Исследования антибактериальных свойств наночастиц ZnO проводятся, как правило, как самостоятельный материал. Структуры ZnO в композиционных материалах, что выявляет необходимость более детального изучения этого вопроса. Наночастицы ZnO связаны с разрушением мембраны путем образования поверхностных форм кислорода и приводят к гибели микроорганизмов.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о том, что гидрогель на основе гидроксиапатита с ионами ZnO (ГА-ZnO) обладает выраженной антибактериальной активностью против использованных в работе микроорганизмов мишеней.

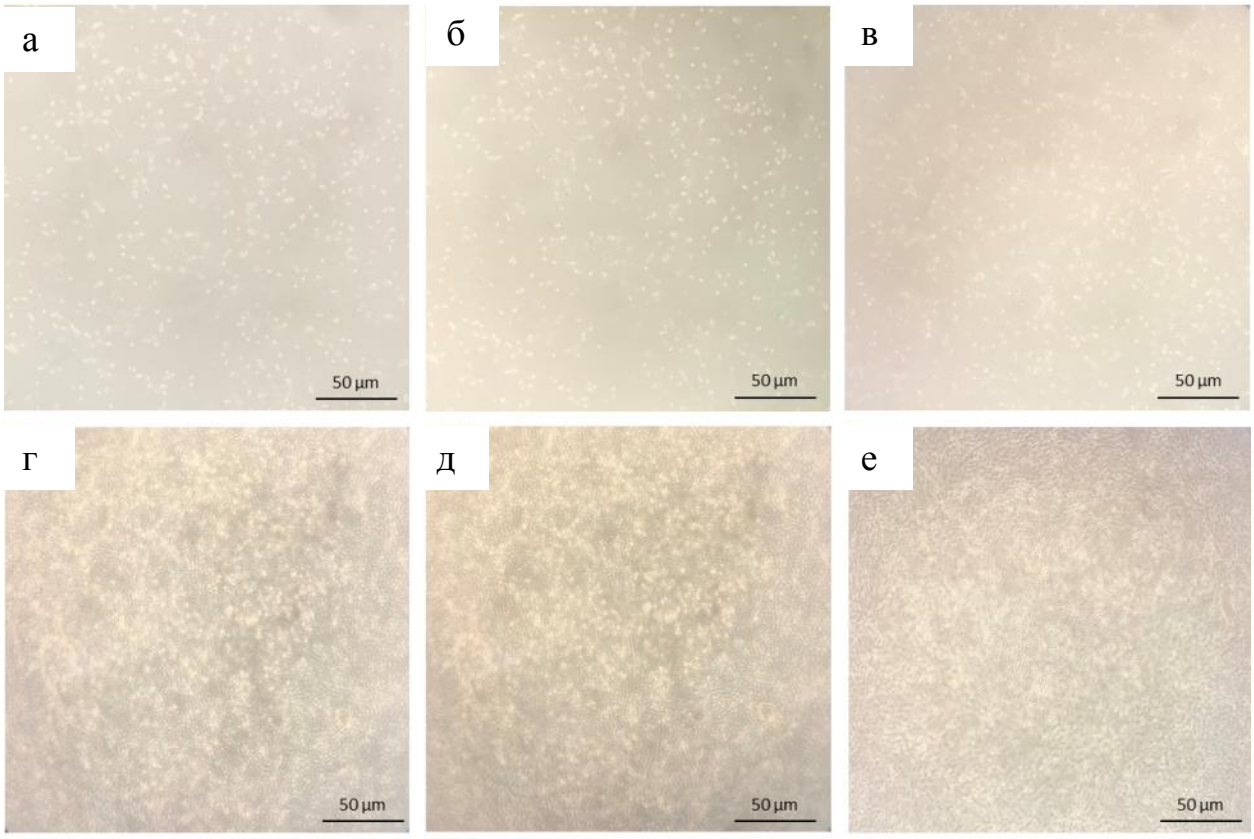
5.2 Исследование биосовместимости композитных материалов с наноразмерной архитектурой основе биоапатита, альгината натрия и микрочастиц ZnO

Цитологическое исследование культивируемых фибробластов (с образцами) на 3-й день эксперимента, клетки фибробластовых дифференцирон образуют рыхлый слой на всем протяжении 12-луночного планшета. Было отмечено значительное количество клеток с митозами. Фибробласты имели многоугольную форму - продолговатую, веретенообразную и звездчатую. Их цитоплазма имела небольшие придатки. В ядрах большинства клеток было обнаружено 2-3 ядрышка. Согласно структурному организму, тестируемые клетки относятся к молодым фибробластам (рисунок 5.4 а-в).

В некоторых областях как опытных, так и контрольных культур были отмечены клетки с пикнотическими ядрами и вакуолизированной цитоплазмой. Количественное определение было определено окрашиванием трипана синего (таблица 5.1).

Сравнение общего количества нежизнеспособных клеток in vitro на 3 -й день культивирования показывает не значительное отличие контрольной и опытных культур. Процент погибших клеток в культуре составил 3,5%, 7,2% для экспериментальной группы, культивируемой с ГА-ZnO, и 4,8% для группы ГА-Алг-ZnO. Установленное количество погибших клеток в опытных и контрольных культурах находилось в пределах нормы для первичных культур [145, p. 2109].

Значительный прирост количества клеток наблюдался дляопытных и контрольной культуры на 5-й день культивирования. Фибробласты, преимущественно продолговатой формы, полностью заполняют дно лунок (рисунок 5.4 г-е).



а -контроль, б - ГА-ZnO на 3-й день; в - ГА-АлгZnO на 3-й день, г-контроль, д - ГА-ZnO на 5-й день; е - НА-Алг-ZnO на 5 день

Рисунок 5.4 – Морфология культивирования клеток фибробластов с использованием материалов на основе гидроксиапатита

Таблица 4.1 – Количество клеток в культурах с образцами материалов с разным покрытием (n = 7)

Серии опытов	3-и сутки		5-е сутки	
	Общее количество клеток	Погибшие клетки	Общее количество клеток	Погибшие клетки
Контроль – культура остеобластов и фибробластов	$1,98x10^4$	$6,93x10^2$ 3,5 %	$3,21x10^4$	$1,96x10^3$ 6,1 %
Гидрогель ГА с ионами ZnO;	$1,59x10^4$	$1,14x10^3$ 7,2 %	$2,66x10^4$	$2,63x10^3$ 9,9 %
Гранулы ГА ZnO/полимер альгинат;	$1,46x10^4$	$7,01x10^2$ 4,8 %	$2,32x10^4$	$1,37x10^3$ 5,9 %
Гидрогель ГА;	$1,56x10^4$	$8,89 x10^2$ 5,7 %	$2,53x10^4$	$1,72x10^3$ 6,8 %
Порошок ГА	$1,95x10^4$	$1,07x10^3$ 5,5 %	$3,15x10^4$	$2,02x10^3$ 6,4 %
Гранулы ГА/полимер альгинат.	$1,81x10^4$	$1,41x10^3$ 7,8 %	$2,96x10^4$	$1,09x10^3$ 10,9 %

Различий в расположении клеток, цитологических характеристиках клеток в культурах экспериментальной и контрольной серий не отмечено. Клетки, преимущественно представленные в виде зрелых фибробластов, сохранили свой фенотип в культурах. Общее количество клеток и количество мертвых клеток существенно не отличалось от таковых в предыдущих сериях и от данных контрольной серии.

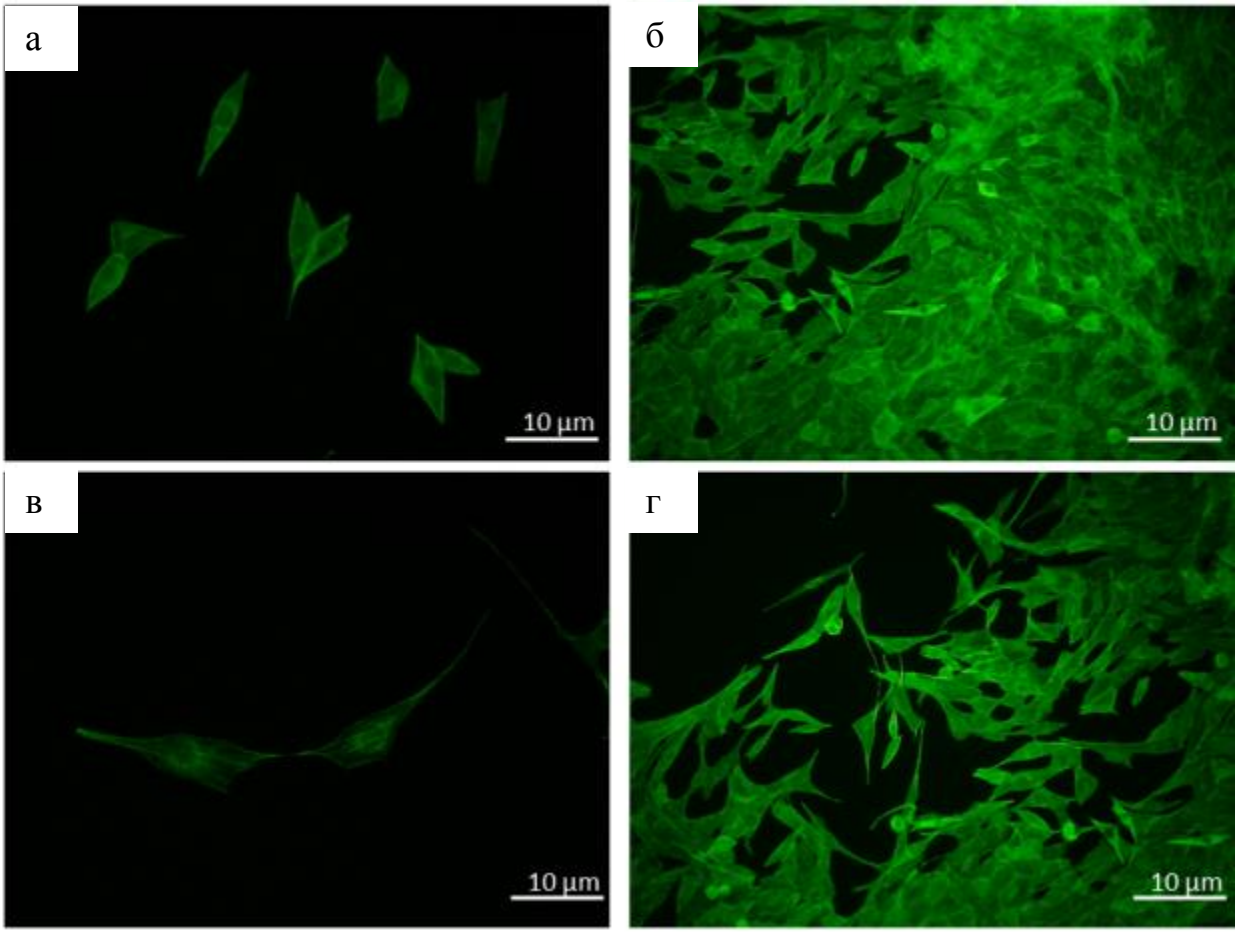
Плотность клеток была более выраженной в центре лунки в зоне компактного расположения клеток. В некоторых местах клетки расслаивались один слой на другой. На дне лунок в этот период преобладают зрелые формы фибробластов, имеющие веретенообразную форму и небольшое плотное ядро. Количество разделенных клеток уменьшилось. Количество клеток с пикнотическими ядрами увеличилось, там были обнаружены клетки с вакуолизацией и разрушением цитоплазмы. Такие клетки были отмечены не только на периферии культур. Однако данные количественного анализа свидетельствуют о том, что их количество не отличалось от контрольной культуры. Количество погибших клеток в контрольной культуре составило 6,1% (ГА), а в экспериментальных культурах - 9,9% и 5,9% для ГА-ZnO и ГА-Алг-ZnO соответственно, что не превышает допустимых норм для первичных культур,

Таким образом, цитологические характеристики фибробластов в культурах, сохранение фенотипа клеток в соответствии со временем наблюдения, рост клеток в культурах, характер их расположения, общее количество клеток в культурах и количество деструктивно измененные и мертвые клетки указывают на то, что культуры фибробластов на 5-й день культивирования находятся в стадии стабильного роста. Присутствие испытуемых материалов в питательной среде не оказывает цитотоксического действия на клетки.

Это является подтверждением того, что исследуемые образцы являются биосовместимыми. Количество погибших клеток в опытных культурах не превышало 9,9%.

Полученные результаты показывают стабильность мышиных фибробластов NIH-3T3, культивируемых в течение 5 дней с материалами на основе гидроксиапатита, и отсутствие цитотоксического эффекта на структурную организацию клеток. Их рост и пролиферативная активность доказывают биосовместимость материалов.

Адгезивные и пролиферативные свойства клеток оценивали флуоресцентной микроскопией. Для визуализации клеток их предварительно окрашивали флуорогенным красителем DHR-123, который обеспечивает зеленую флуоресценцию в метаболически активных клетках (рисунок 8 а-г).



а-г) флуоресцентные изображения клеток NIH-3T3, культивируемых с образцами ГА-ZnO (а, б) и ГА-Алг-ZnO (в, г)а,б-3 дня культивирования, в,г-5 дней культивирования

Рисунок 5.5 – Исследования биосовместимости и цитотоксичности

Клетки имели нормальную морфологию и показали хорошую адгезивную способность. Однако не было визуальных различий в структуре и морфологии клеток, культивируемых с образцами. Клетки оставались метаболически активными, о чем свидетельствует зеленая флуоресценция в них.

Материалы на основе ГА проявляют чрезвычайно низкую цитотоксичность. Введение ионов цинка в синтез ГА приводит, по-видимому, к их равномерному распределению и влияет на структуру ГА, по-разному влияя на цитотоксичность. Это, вероятно, связано с внутренней цитотоксичностью цинка, когда он высвобождается из структуры ГА.

Выводы по разделу 5

Результаты проведенного исследования позволяют сделать заключение о том, что порошки, гидрогели и гранулы материалов на основе ГА с ионами Zn в использованных концентрациях 0,1-0,5 мг/мл обладают выраженной антибактериальной активностью против использованных в работе

микроорганизмов мишеней. Наиболее чувствительным к ним является *S.aureus* – основная этиологическая причина бактериального обсеменения имплантируемых материалов, способного образовывать биопленки на их поверхности. По степени антибактериальной активности тестируемые материалы можно расположить в следующем порядке: Га-Алг-ZnO → ГА-ZnO. Полученные результаты позволяют заключить, что лигирование ГА цинком может привести к созданию мощных композитов, способных уничтожать различные бактериальные штаммы.

Исследование морфологических характеристик фибробластов, культивированных в присутствии образцов представленных материалов, показало, что на протяжении всего эксперимента грубых изменений ни в одной из опытных серий не происходило, клетки сохраняли присущий фибробластам монослойный характер роста, преимущественно веретеновидную форму с 2–4 отростками. Характерно, что все культуры дермальных фибробластов за время эксперимента проходили одинаковое количество удвоений и достигали плотности насыщения через 5 суток после посева, что говорит о хорошей пролиферативной активности клеток в присутствии тестируемых материалов.

Отсутствие морфологических изменений фибробластов и активная пролиферация, установленные в результате мультипараметрического теста, свидетельствуют об отсутствии цитотоксичности исследуемых материалов, а способность клеток к адгезии на их поверхности — об их хорошей биосовместимости.

Проведенные исследования создают предпосылки для создания новых материалов, которые могут быть использованы в различных направлениях медицины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований, полученные при выполнении диссертационной работы, позволили решить научно-техническую задачу, исследования структуры, фазового состава композита на основе гидроксиапатита и альгината натрия легированных оксидом цинка, а также разработке методик и технологий по созданию композитного биомиметического имплантата. Основные результаты диссертационной работы могут быть сформулированы следующим образом:

1) Обнаружено, что включение ZnO изменяет симметрию молекулы ГА, замещая атомы кальция цинком, о чем свидетельствует смещение линии O—P—O группы, а также результаты исследования ПЭМ и РЭМ;

2) Кристаллы ZnO являются наноструктурированными поликристаллами в двухфазном состоянии: с гексагональной и кубической решеткой;

3) Впервые исследованы кальций-фосфатные покрытия, нанесенные на пористые материалы, полученные методом СЛП. Покрытия на основе гидроксиапатита, полученные методом гидротермального осаждения, при дополнительном ассистировании электрического поля, имеют лучшую кристалличность по сравнению с покрытиями, полученные микроплазменными методами;

4) Исследования XRD и EDS показали, что полученный гидроксиапатит с массовым соотношением Ca/P = 2,15 является стехиометрическим;

5) Добавление альгината натрия приводит к гомогенизации распределения составных компонентов. Ионы кальция стабилизируют структуру нанокомпозита, снижая подвижность полимерных цепей альгината. Неорганическая фаза ГА-ZnO распределяется в полисахаридной матрице альгината, что соответствует структуре натуральных костных нанокомпозитов;

6) Введение ZnO в композит увеличивает его пористость и степень набухания в растворе PBS. Образцы, содержащие ZnO, менее чувствительны к набуханию в нейтральной среде при pH = 7,3, чем в кислой среде при pH = 4,5. Указанная концентрация ZnO в композиционном материале на основе ГА обеспечивает слабую антимикробную активность;

7) Порошки, гидрогели и гранулы материалов на основе ГА с ионами Zn в использованных концентрациях 0,1-0,5 мг/мл обладают выраженной антибактериальной активностью против использованных в работе микроорганизмов мишеней. Наиболее чувствительным к ним является *S.aureus* – основная этиологическая причина бактериального обсеменения имплантируемых материалов, способного образовывать биопленки на их поверхности. Полученные результаты позволяют заключить, что лигирование ГА цинком может привести к созданию мощных композитов, способных уничтожать различные бактериальные штаммы;

8) Исследование морфологических характеристик фибробластов, культивированных в присутствии образцов представленных материалов и покрытий показало, что на протяжении всего эксперимента грубых изменений

ни в одной из опытных серий не происходило, клетки сохраняли присущий фибробластам монослойный характер роста, преимущественно веретеновидную форму с 2–4 отростками. Характерно, что все культуры дермальных фибробластов за время эксперимента проходили одинаковое количество удвоений и достигали плотности насыщения через 5 суток после посева, что говорит о хорошей пролиферативной активности клеток в присутствии тестируемых материалов;

Проведенные исследования создают предпосылки для создания новых материалов, которые могут быть использованы в для различных биомедицинских применений.

Оценка полноты решения поставленных задач и рекомендации по использованию результатов исследований

Поставленные в диссертации задачи решены в полном объеме. Проведены все намеченные, сложные в исполнении, экспериментальные работы и сравнительный анализ полученных результатов совместно с научными консультантами и коллегами. Полученные результаты и выводы не противоречат основным положениям физики конденсированного состояния и термодинамике фазовых превращений. Они представляют собой новый шаг в решении задачи создания биомиметических композитных материалов и покрытий на основе апатита кальция, альгината натрия. Раскрыта природа взаимодействия легирующего металла с остальными компонентами композитного материала.

Оценка научного уровня диссертационной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области, приведенными в литературном обзоре. Высокий уровень выполненной работы обеспечивается тем, что результаты получены с применением хорошо апробированных взаимодополняющих методов экспериментальных исследований в специализированных лабораториях ВКГТУ им. А.Серикбаева, Казахского Национального университета им.Аль-Фараби, ВКГУ им. С.Аманжолова, Сумского государственного университета (Украина) и Аахенского университет прикладных наук (Германия). Литературный обзор по теме диссертации охватывает современные работы ведущих ученых стран мира. Полученные результаты анализируются в сравнении с известными данными. Они опубликованы в известных зарубежных журналах, входящих в базу данных Scopus, обсуждены на ряде специализированных международных конференциях, которые проходили в СНГ и в странах дальнего зарубежья.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Chernousova S., Epple M., Epple M. Bioactive bone substitution materials // Adv. Biomater. Devices Med. – 2014. – Vol. 1. – P. 74–87.

2 Habraken W. et al. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future? // Mater. Today. – 2016. – Vol. 19, № 2. – P. 69–87.

3 Okada M., Matsumoto T. Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications // Jpn. Dent. Sci. Rev. – 2015. – Vol. 51, № 4. – P. 85–95.

4 Mestres G., Le Van C., Ginebra M.–P. Silicon–stabilized α–tricalcium phosphate and its use in a calcium phosphate cement: Characterization and cell response // Acta Biomater. – 2012. – Vol. 8, № 3. – P. 1169–1179.

5 Livitska O. et al. Copper(II), zinc(II) and copper(II)/zinc(II)–containing carbonate–substituted hydroxyapatite: synthesis, characterization and thermal behaviour // Materwiss. Werksttech. – 2016. – Vol. 47, № 2–3. – P. 85–91.

6 Devanand Venkatasubbu G. et al. Nanocrystalline hydroxyapatite and zinc–doped hydroxyapatite as carrier material for controlled delivery of ciprofloxacin // 3 Biotech. – 2011. – Vol. 1, № 3. – P. 173–186.

7 Laurenti M., Cauda V. ZnO Nanostructures for Tissue Engineering Applications // Nanomaterials. – 2017. – Vol. 7, № 11. – P. 374.

8 Ito A. et al. Zinc–containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation // Curr. Appl. Phys. – 2005. – Vol. 5, № 5. – P. 402–406.

9 Tripathi A. et al. Bio–composite scaffolds containing chitosan/nano–hydroxyapatite/nano–copper–zinc for bone tissue engineering // Int. J. Biol. Macromol. – 2012. – Vol. 50, № 1. – P. 294–299.

10 Moseke C. et al. Chemical characterization of hydroxyapatite obtained by wet chemistry in the presence of V, Co, and Cu ions // Mater. Sci. Eng. C. – 2013. – Vol. 33, № 3. – P. 1654–1661.

11 Sukhodub L.B. Metal Ions Doped Chitosan Nanoparticles // J. Nano Electron. Phys. – 2014. – Vol. 6. – P. 04034–04040.

12 Sukhodub L. B., Khrystian G. E., Sukhodub L. F., Shulga N. M., Meshkov A. M., Kazmirchuk V. V., Martynov A. V. Composite materials based on zinc sulfide and zinc oxide: structural and biocidal properties // Ann. Mechnikov Inst. – 2016. № 4. – P. 34–39.

13 Mieshkov A.V. et al. Antibacterial properties of the nanoparticles with the zinc sulfide quantum dots // IFMBE Proc. – 2016. № 55. – P. 267–270.

14 Bhowmick A. et al. Development of porous and antimicrobial CTS–PEG–HAP–ZnO nano–composites for bone tissue engineering // RSC Adv. – 2015. – Vol. 5, № 120. – P. 99385–99393.

15 Kanhed S. et al. Microporous Hydroxyapatite Ceramic Composites as Tissue Engineering Scaffolds: An Experimental and Computational Study // Adv. Eng. Mater. – 2018. – Vol. 20, № 7. – P. 1701062–1701070.

16 Saxena V., Hasan A., Pandey L.M. Effect of Zn/ZnO integration with hydroxyapatite: a review // Mater. Technol. – 2018. – Vol. 33, № 2. – P. 79–92.

17 Dorozhkin S. V., Epple M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates // Angew. Chemie Int. Ed. – 2002. – Vol. 41, № 17. – P. 3130–3146.

18 Pogrebjak A.D. et al. Research of the relief and element composition of the surface coatings based on hydroxyapatite implants from titanium alloys // International Conference on Nanomaterials: Application & Properties (NAP). Zatoka: IEEE, 2016. – P. 02NABM06–1–02NABM06–6.

19 Pogrebnjak A.D. et al. Surface properties, technology of fabrication and prospects of application of medical implants from porous titanium obtained by powder metallurgy // International Conference on Nanomaterials: Application & Properties (NAP). Zatoka: IEEE, 2016. – P. 02NABM08-1–02NABM08-3.

20 Shypylenko A. et al. Effect of ion implantation on the physical and mechanical properties of Ti–Si–N multifunctional coatings for biomedical applications // Mater. Des. – 2016. – Vol. 110. – P. 821–829.

21 Costa Cuozzo R. et al. Zinc alginate–hydroxyapatite composite microspheres for bone repair // Ceram. Int. – 2014. – Vol. 40, № 7. – P. 11369–11375.

22 Dorozhkin S. V. Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates // Biomatter. – 2011. – Vol. 1, № 1. – P. 3–56.

23 Lee M. et al. Biomimetic apatite–coated alginate/chitosan microparticles as osteogenic protein carriers // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30, № 30. – P. 6094–6101.

24 Rajkumar M., Meenakshisundaram N., Rajendran V. Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: Synthesis and characterisation // Mater. Charact. – 2011. – Vol. 62, № 5. – P. 469–479.

25 Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphate deposits: Preparation, properties and biomedical applications // Mater. Sci. Eng. C. – 2015. – Vol. 55. – P. 272–326.

26 Kopova I. et al. Newly developed Ti–Nb–Zr–Ta–Si–Fe biomedical beta titanium alloys with increased strength and enhanced biocompatibility // Mater. Sci. Eng. C. – 2016. – Vol. 60. – P. 230–238.

27 Hussein A.H. et al. Biocompatibility of new Ti–Nb–Ta base alloys // Mater. Sci. Eng. C. – 2016. – Vol. 61. – P. 574–578.

28 Tang X., Ahmed T., Rack H.J. Phase transformations in Ti–Nb–Ta and Ti–Nb–Ta–Zr alloys // J. Mater. Sci. – 2000. – Vol. 35, № 7. – P. 1805–1811.

29 Biesiekierski A. et al. Investigations into Ti–(Nb,Ta)–Fe alloys for biomedical applications // Acta Biomater. Acta Materialia Inc., – 2016. – Vol. 32. – P. 336–347.

30 Oldani C., Dominguez A. Titanium as a Biomaterial for Implants. – InTech: Recent Advances in Arthroplasty., 2012. – P. 149–162.

31 Biesiekierski A. et al. A new look at biomedical Ti–based shape memory alloys // Acta Biomater. – 2012. – Vol. 8, № 5. – P. 1661–1669.

32 Turlybekuly A. et al. Preparation of a ternary alloy of the Ti–Nb–Ta system for further use in medicin // Bull. Univ. Karaganda–Physics. – 2018. – Vol. 91, № 2. – P. 45–51.

33 Nag S., Banerjee R. Materials for medical devices, fundamentals of medical implant materials // ASM Handb. – 2012. – Vol. 23. – P. 6–16.

34 Niinomi M., Nakai M., Hieda J. Development of new metallic alloys for

biomedical applications // Acta Biomater. – 2012. – Vol. 8, № 11. – P. 3888–3903.

35 Stráský J. et al. Increasing strength of a biomedical Ti–Nb–Ta–Zr alloy by alloying with Fe, Si and O // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. – 2017. – Vol. 71, № April. – P. 329–336.

36 Kuroda D. et al. Design and mechanical properties of new β type titanium alloys for implant materials // Mater. Sci. Eng. A. – 1998. – Vol. 243, № 1–2. – P. 244–249.

37 Abdel–Hady Gepreel M., Niinomi M. Biocompatibility of Ti–alloys for long–term implantation // J. Mech. Behav. Biomed. Mater. – 2013. – Vol. 20. – P. 407–415.

38 Жукова Ю.С. Получение и исследование свойств сверхупругих сплавов Ti–Nb–Ta, Ti–Nb–Zr медицинского назначения: дис. … канд. т. наук: 05.16.09 / Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС». – Москва, 2013. – 167 с. Инв.№ 04201356982.

39 Конопацкий А.С. Получение и исследование сверхупругих сплавов Ti–Nb–Zr–Ta медицинского назначения: дис. … канд. т. наук: 05.16.09 / Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС». – Москва, 2016. – 134 с. Инв.№ 04201356982.

40 Gibson L.J. Cellular Solids // MRS Bull. – 2003. – Vol. 28, № 04. – P. 270–274.

41 Wen C.E. et al. Novel titanium foam for bone tissue engineering // J. Mater. Res. – 2002. – Vol. 17, № 10. – P. 2633–2639.

42 Wen C.. et al. Processing of biocompatible porous Ti and Mg // Scr. Mater. – 2001. – Vol. 45, № 10. – P. 1147–1153.

43 Mansour S.F. et al. Physico–mechanical properties of Mg and Ag doped hydroxyapatite/chitosan biocomposites // New J. Chem. Royal Society of Chemistry. – 2017. – Vol. 41, № 22. – P. 13773–13783.

44 Reznikov N., Shahar R., Weiner S. Bone hierarchical structure in three dimensions // Acta Biomater. – 2014. – Vol. 10, № 9. – P. 3815–3826.

45 Fratzl P., Weinkamer R. Nature’s hierarchical materials // Prog. Mater. Sci. – 2007. – Vol. 52, № 8. – P. 1263–1334.

46 Weiner S., Wagner H.D. THE MATERIAL BONE: Structure–Mechanical Function Relations // Annu. Rev. Mater. Sci. – 1998. – Vol. 28, № 1. – P. 271–298.

47 Nightingale J.P., Lewis D. Pole Figures of the Orientation of Apatite in Bones // Nature. – 1971. – Vol. 232, № 5309. – P. 334–335.

48 Morgan H. et al. Preparation and characterisation of monoclinic hydroxyapatite and its precipitated carbonate apatite intermediate // Biomaterials. – 2000. – Vol. 21, № 6. – P. 617–627.

49 Espanol M. et al. Investigation of the hydroxyapatite obtained as hydrolysis product of α–tricalcium phosphate by transmission electron microscopy //

CrystEngComm. – 2010. – Vol. 12, № 10. – P. 3318.

50 Rey C. et al. Nanocrystalline apatites in biological systems: characterisation, structure and properties // Materwiss. Werksttech. – 2007. – Vol. 38, № 12. – P. 996–1002.

51 Drouet C. et al. Surface enrichment of biomimetic apatites with biologically–active ions Mg2+ and Sr2+: A preamble to the activation of bone repair materials // Mater. Sci. Eng. C. – 2008. – Vol. 28, № 8. – P. 1544–1550.

52 Wopenka B., Pasteris J.D. A mineralogical perspective on the apatite in bone // Mater. Sci. Eng. C. – 2005. – Vol. 25, № 2. – P. 131–143.

53 Frost H.M. Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians. // Angle Orthodontist. – 1994. – Vol. 64, №3. –P. 175–188.

54 Huiskes R. et al. Adaptive bone–remodeling theory applied to prosthetic–design analysis // J. Biomech. – 1987. – Vol.20, №11. – P. 1135–1150.

55 Eliaz N., Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications // Materials (Basel). – 2017. – Vol. 10, № 4. – P. 334.

56 Lakstein D. et al. Enhanced osseointegration of grit–blasted, NaOH–treated and electrochemically hydroxyapatite–coated Ti–6Al–4V implants in rabbits // Acta Biomater. – 2009. – Vol. 5, № 6. – P. 2258–2269.

57 Rho J.–Y., Kuhn–Spearing L., Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone // Med. Eng. Phys. – 1998. – Vol. 20, № 2. – P. 92–102.

58 Hassenkam T. et al. High–resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone // Bone. – 2004. – Vol. 5, №. 1. – P. 4–10.

59 Ke P. et al. From macro to micro: Structural biomimetic materials by electrospinning // RSC Advances. – 2014. – Vol. 4, №75. – P. 1–14.

60 Fratzl P. et al. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano–composite in bone // J. Mater. Chem. – 2004. – Vol. 14, № 14. – P. 2115–2123.

61 Nyman J.S., Reyes M., Wang X. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone // Micron. – 2005. – Vol. 36, №7. – P. 566–582.

62 Ferraz M.P., Monteiro F.J., Manuel C.M. Hydroxyapatite nanoparticles : A review of preparation methodologies // J. Appl. Biomater. – 2004. – Vol. 2, №2. – P. 74–80

63 Dorozhkin S. V. A review on the dissolution models of calcium apatites // Prog. Cryst. Growth Charact. Mater. – 2002. – Vol. 44, № 1. – P. 45–61.

64 Gomes P.S. et al. Evaluation of human osteoblastic cell response to plasma–sprayed silicon–substituted hydroxyapatite coatings over titanium substrates // J. Biomed. Mater. Res. – Part B Appl. Biomater. – 2010. – Vol. 94, № 2. –P. 337-341.

65 Moreno E.C., Varughese K. Crystal growth of calcium apatites from dilute solutions // J. Cryst. Growth. – 1981. – Vol. 51, № 1. –P. 20-30.

66 Blumenthal N.C., Betts F., Posner A.S. Formation and structure of Ca–deficient hydroxyapatite // Calcif. Tissue Int. – 1981. – Vol. 33, № 2. –P. 111-118.

67 Panda R.N. et al. X–ray diffractometry and X–ray photoelectron

spectroscopy investigations of nanocrytalline hydroxyapatite synthesized by a hydroxide gel technique // Japanese J. Appl. Physics. – 2001. – Vol. 40, № 1. –P. 5030–5035.

68 Danilchenko S.N. et al. Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strain from diffraction line broadening // Cryst. Res. Technol. – 2002. – Vol. 37, № 11. –P. 1234–1240.

69 Barakat N.A.M. et al. Physiochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: Extraction of biologically desirable HAp // Mater. Sci. Eng. C. – 2008. – Vol. 28, № 8. –P. 1381-1387.

70 Arsenault A.L. Crystal–collagen relationships in calcified turkey leg tendons visualized by selected–area dark field electron microscopy // Calcif Tissue Int. –1988. – Vol. 43, № 4.–P. :202–214.

71 Danilchenko S.N. et al. Thermal behavior of biogenic apatite crystals in bone: An X–ray diffraction study // Cryst. Res. Technol. – 2006. – Vol. 41, № 3..–P. 268– 275.

72 Janus A.M. et al. Chemical and microstructural characterization of natural hydroxyapatite derived from pig bones // Microchimica Acta. – 2008. – Vol. 161, № 4. –P. 349–353.

73 Kim H.M., Rey C., Glimcher M.J. X–ray diffraction, electron microscopy, and Fourier transform infrared spectroscopy of apatite crystals isolated from chicken and bovine calcified cartilage // Calcif. Tissue Int. – 1996. – Vol. 59, № 1. –P. 58–63.

74 Koutsoukos P.G., Nancollas G.H. Crystal growth of calcium phosphates – epitaxial considerations // J. Cryst. Growth. – 1981. – Vol. 53, № 1. –P. 10–19.

75 Kim H., Rey C., Glimcher M. Isolation of calcium phosphate crystals of bone by non aqueous methods at low temperature // J. bone Miner. – 1995. – Vol. 10, № 10. –P. 1589–1601.

76 Rubin M.A. et al. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone // Bone. – 2003. – Vol. 33, № 3. –P. 270–282.

77 Posner A.S., Perloff A., Diorio A.F. Refinement of the hydroxyapatite structure // Acta Crystallogr. – 1958. – Vol. 144, № 2. –P. 272–276.

78 Elliott J.C., Mackie P.E., Young R.A. Monoclinic hydroxyapatite // Science. – 1973. – Vol. 180, № 4090. –P. 1055–1062.

79 Ma G., Liu X.Y. Hydroxyapatite: Hexagonal or monoclinic? // Cryst. Growth Des. – 2009. – Vol. 9, № 7. –P. 2991–2994.

80 Adams C.P. et al. Size–Dependent Antimicrobial Effects of Novel Palladium Nanoparticles // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. e85981– e85991.

81 Pasquet J. et al. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro–organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties // Int. J. Pharm. – 2014. – Vol. 460, № 1. –P. 92–100.

82 Raghupathi K.R., Koodali R.T., Manna A.C. Size–Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles // Langmuir. – 2011. – Vol. 27, № 7. – P. 4020–4028.

83 Brayner R. et al. Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium // Nano Lett. – 2006. –

Vol. 6, № 4. – P. 866–870.

84 Jalal R. et al. ZnO nanofluids: Green synthesis, characterization, and antibacterial activity // Mater. Chem. Phys. – 2010. – Vol. 121, № 1–2. – P. 198–201.

85 Jones N. et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – Vol. 279, № 1. – P. 71–76.

86 Padmavathy N., Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study // Sci. Technol. Adv. Mater. – 2008. – Vol. 9, № 3. – P. 035004–035012.

87 Webster T.J., Seil I. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature // Int. J. Nanomedicine. – 2012. – P. 2767–2779.

88 Zarrindokht Emami–Karvani. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram–positive and Gram–negative bacteria // African J. Microbiol. Res. – 2012. – Vol. 5, № 18. – P. 1368–1373.

89 Sirelkhatim A. et al. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism // Nano–Micro Lett. – 2015. – Vol. 7, № 3. – P. 219–242.

90 Xie Y. et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against Campylobacter jejuni // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, № 7. – P. 2325–2331.

91 Colon G., Ward B.C., Webster T.J. Increased osteoblast and decreased staphylococcus epidermidis functions on nanophase ZnO and TiO2 // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2006. – Vol. 78A, № 3. – P. 595–604.

92 Adams L.K., Lyon D.Y., Alvarez P.J.J. Comparative eco–toxicity of nanoscale TiO2, SiO2, and ZnO water suspensions // Water Res. – 2006. – Vol. 40, № 19. – P. 3527–3532.

93 Sawai J. et al. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry // J. Ferment. Bioeng. – 1998. – Vol. 86, № 5. – P. 521–522.

94 Yamamoto O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide // Int. J. Inorg. Mater. – 2001. – Vol. 3, № 7. – P. 643–646.

95 Xia T. et al. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties // ACS Nano. – 2008. – Vol. 2, № 10. – P. 2121–2134.

96 Zhang H. et al. P25–Graphene Composite as a High Performance Photocatalyst // ACS Nano. – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 380–386.

97 Huang Z. et al. Toxicological Effect of ZnO Nanoparticles Based on Bacteria // Langmuir. – 2008. – Vol. 24, № 8. – P. 4140–4144.

98 Gram–positive vs. Gram–negative Bacteria [Electronic resource]. https://www.diffen.com/difference/Gram–negative_Bacteria_vs_Gram–positive_Bacteria 06.10.2018.

99 Wahab R. et al. Formation of ZnO Micro–Flowers Prepared via Solution Process and their Antibacterial Activity // Nanoscale Res. Lett. – 2010. – Vol. 5, № 10. – P. 1675–1681.

100 Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. The Bacterial Cell Envelope // Cold

Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – Vol. 2, № 5. – P. a000414–a000418.

101 Duffy J.A. Ionic−Covalent Character of Metal and Nonmetal Oxides // J. Phys. Chem. A. – 2006. – Vol. 110, № 49. – P. 13245–13248.

102 Fu G., Vary P.S., Lin C.–T. Anatase TiO 2 Nanocomposites for Antimicrobial Coatings // J. Phys. Chem. B. – 2005. – Vol. 109, № 18. – P. 8889–8898.

103 Воробьева Н.А. Нанокристаллический ZnO(M) (M = Ga, In) для газовых сенсоров и прозрачных электродов: дис. … канд. х. наук: 02.00.01 / Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. – Москва, 2015. – 180 с. Инв.№ 005563558.

104 Moezzi A., McDonagh A.M., Cortie M.B. Zinc oxide particles: Synthesis, properties and applications // Chem. Eng. J. – 2012. – Vol. 185–186. – P. 1–22.

105 Solozhenko V.L. et al. Kinetics of the Wurtzite–to–Rock–Salt Phase Transformation in ZnO at High Pressure // J. Phys. Chem. A. – 2011. – Vol. 115, № 17. – P. 4354–4358.

106 Mishra Y.K. et al. Crystal growth behaviour in Au–ZnO nanocomposite under different annealing environments and photoswitchability // J. Appl. Phys. – 2012. – Vol. 112, № 6. – P. 064308–064319 .

107 Özgür Ü. et al. A comprehensive review of ZnO materials and devices // J. Appl. Phys. – 2005. – Vol. 98, № 4. – P. 041301–041312.

108 Sukkar M.H., Johnson K.H., Tuller H.L. Defects and electronic structure of interfaces in ZnO: Cluster molecular orbital calculations // Mater. Sci. Eng. B. – 1990. – Vol. 6, № 1. – P. 49–59.

109 Transparent Conductive Zinc Oxide / ed. K. Ellmer, A. Klein, B Rech. – Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2008. – 439 p.

110 Schmidt–Mende L., MacManus–Driscoll J.L. ZnO – nanostructures, defects, and devices // Mater. Today. – 2007. – Vol. 10, № 5. – P. 40–48.

111 Wang Z.L. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications // J. Phys. Condens. Matter. – 2004. – Vol. 16, № 25. – P. R829–R858.

112 Fan Z., Lu J.G. Zinc Oxide Nanostructures: Synthesis and Properties // J. Nanosci. Nanotechnol. – 2005. – Vol. 5, № 10. – P. 1561–1573.

113 Zhang Y. et al. Synthesis, Characterization, and Applications of ZnO Nanowires // J. Nanomater. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1–22.

114 Wang Z.L. Piezoelectric Nanogenerators Based on Zinc Oxide Nanowire Arrays // Science. – 2006. – Vol. 312, № 5771. – P. 242–246.

115 Seil J.T., Taylor E.N., Webster T.J. Reduced activity of Staphylococcus epidermidis in the presence of sonicated piezoelectric zinc oxide nanoparticles // 35th Annual Northeast Bioengineering Conference. – New Brunswick: IEEE, 2009. – P. 1–2.

116 Wellings J.S. et al. Growth and characterisation of electrodeposited ZnO thin films // Thin Solid Films. – 2008. – Vol. 516, № 12. – P. 3893–3898.

117 Song Z. et al. Characterization of optical properties of ZnO nanoparticles for quantitative imaging of transdermal transport // Biomed. Opt. Express. – 2011. – Vol. 2, № 12. – P. 3321- 3333.

118 Yahya N. et al. Application of ZnO Nanoparticles EM Wave Detector Prepared by Sol–Gel and Self–Combustion Techniques // J. Nano Res. – 2010. – Vol. 11. – P. 25–34.

119 Janotti A., Van de Walle C.G. Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor // Reports Prog. Phys. – 2009. – Vol. 72, № 12. – P. 126501–126508.

120 Prasad R.G.S. V. et al. Nanostructured TiO2 and TiO2–Ag Antimicrobial Thin Films // 2011 International Conference on Nanoscience, Technology and Societal Implications. IEEE, – 2011. – P. 1–6.

121 Zhang L. et al. ZnO nanofluids – A potential antibacterial agent // Prog. Nat. Sci. – 2008. – Vol. 18, № 8. – P. 939–944.

122 Kotloff K.L. et al. Global burden of Shigella infections: Implications for vaccine development and implementation of control strategies // Bull. World Health Organ. – 1999. – Vol. 77, № 8. – P. 651–717.

123 Wahab R. et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles prepared via non–hydrolytic solution route // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 87, № 5. – P. 1917–1925.

124 Sawai J. et al. Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. // J. Chem. Eng. JAPAN. – 1996. – Vol. 29, № 4. – P. 627–633.

125 Aydin Sevinç B., Hanley L. Antibacterial activity of dental composites containing zinc oxide nanoparticles // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. – 2010. – Vol. 4, № 1. – P. 22–31.

126 Heinlaan M. et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus // Chemosphere. – 2008. – Vol. 71, № 7. – P. 1308–1316.

127 Song W. et al. Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles // Toxicol. Lett. – 2010. – Vol. 199, № 3. – P. 389–397.

128 Premanathan M. et al. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram–positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation // Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. – 2011. – Vol. 7, № 2. – P. 184–192.

129 Li M., Zhu L., Lin D. Toxicity of ZnO Nanoparticles to Escherichia coli : Mechanism and the Influence of Medium Components // Environ. Sci. Technol. – 2011. – Vol. 45, № 5. – P. 1977–1983.

130 Wu B. et al. Comparative Eco–Toxicities of Nano–ZnO Particles under Aquatic and Aerosol Exposure Modes // Environ. Sci. Technol. – 2010. – Vol. 44, № 4. – P. 1484–1489.

131 Yang H. et al. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition // J. Appl. Toxicol. – 2009. – Vol. 29, № 1. – P. 69–78.

132 Wong S.W.Y. et al. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – Vol. 396, № 2. – P. 609–618.

133 Kasemets K. et al. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO2 to yeast

Saccharomyces cerevisiae // Toxicol. Vitr. – 2009. – Vol. 23, № 6. – P. 1116–1122.

134 Reddy K.M. et al. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems // Appl. Phys. Lett. – 2007. – Vol. 90, № 21. – P. 213902.

135 Sawai J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay // J. Microbiol. Methods. – 2003. – Vol. 54, № 2. – P. 177–182.

136 Jiang W., Mashayekhi H., Xing B. Bacterial toxicity comparison between nano– and micro–scaled oxide particles // Environ. Pollut. – 2009. – Vol. 157, № 5. – P. 1619–1625.

137 Pogrebnjak A. et al. Composite material with nanoscale architecture based on bioapatite, sodium alginate and ZnO microparticles // Ceram. Int. – 2019. – Vol. 45, № 6. – P. 7504–7514.

138 Тұрлыбекұлы А., Догадкин Д.С. Получение наноструктурированного биокомпозитного материала // Матер. IV междунар. науч. конф. «Творчество молодых инновационному развитию Казахстана». – Оскемен: ВКГТУ им.Д.Серикбаева, 2018. – С. 616–618.

139 Тұрлыбекұлы А., Догадкин Д.С. Получение биокомпозитного материала на основе апатита кальция, альгината натрия и оксида цинка // Матер. IV междунар. науч. конф. «Творчество молодых инновационному развитию Казахстана». – Оскемен: ВКГТУ им.Д.Серикбаева, 2018. – С. 619–623.

140 Тұрлыбекұлы А. и др. Композитный материал на основе апатита кальция с добавлением ZnO и альгината натрия // Матер. междунар. науч. конф. “Ғылым және білім –2018”.– Астана: ЕНУ им.Л.Н. Гумилева, 2018. – С. 567–570.

141 Turlybekuly A. et al. Calcium apatite and sodium alginate based composite material with ZnO microparticles doping // Bull. Univ. Karaganda–Physics. – 2018. – Vol. 92, № 4. – P. 51–56.

142 Тұрлыбекұлы А. и др. Исследование физико–химических свойств микродисперсного гидроксиапатита кальция // “Матер. междунар. науч. конф. “Ғылым және білім –2018”.– Астана: ЕНУ им.Л.Н. Гумилева, 2018. – С. 563–567.

143 Turlybekuly A. et al. Physico–chemical properties of ZnO doped nanostructured hydroxyapatite // Bull. Univ. Karaganda–Physics. – 2018. – Vol. 91, № 3. – P. 74–78.

144 Wan Y.Z. et al. Modification of medical metals by ion implantation of copper // Appl. Surf. Sci. – 2007. – Vol. 253, № 24. – P. 9426–9429.

145 Oh K.S. et al. Cytotoxicity and Antimicrobial Effect of Ag Doped Hydroxyapatite // Key Eng. Mater. – 2004. – Vol. 264–268. – P. 2107–2110.

146 Hannink G., Arts J.J.C. Bioresorbability , porosity and mechanical strength of bone substitutes : What is optimal for bone regeneration ? // Injury. – 2011. – Vol. 42. – P. S22–S25.

147 Bobbert F.S.L., Zadpoor A.A. Effects of bone substitute architecture and

surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone // Roy. Soc.of Chem. – 2017. – Vol. 5, № 31. – P. 6175–6192

148 Bobbert F.S.L. et al. Acta Biomaterialia Additively manufactured metallic porous biomaterials based on minimal surfaces : A unique combination of topological , mechanical , and mass transport properties // Acta Biomater. Acta Materialia Inc. – 2017. – Vol. 53. – P. 572–584.

149 Sabree I., Gough J.E., Derby B. Mechanical properties of porous ceramic scaffolds : In fl uence of internal dimensions. – 2015. – Vol. 41. – P. 8425–8432.

150 Тұрлыбекұлы А., Плотников С.В. Получение металлических биомиметических структур и нанесение на них апатит–композитных покрытий // Вестник ВКГТУ им. Д.Серикбаева. – 2019. – Т. 83, № 1. – С. 156–162.

151 Ito A. et al. Zinc–releasing calcium phosphate for stimulating bone formation // Mater. Sci. Eng. C. – 2002. – Vol. 22, № 1. – P. 21–25.

152 Wang Q. et al. Biocompatibility and osteogenic properties of porous tantalum // Exp. Ther. Med. – 2015. – Vol. 9, № 3. – P. 780–786.

153 Coathup M.J. et al. The osteoinductivity of silicate–substituted calcium phosphate // J. Bone Jt. Surg. – Ser. A. – 2011. – Vol. 93, № 26. – P. 2219–2226.

154 Veeranarayanan S. et al. FITC labeled silica nanoparticles as efficient cell tags: Uptake and photostability study in endothelial cells // J. Fluoresc. – 2012. – Vol. 22, № 2. – P. 537–548.

155 Han Y. et al. The calcium silicate/alginate composite: Preparation and evaluation of its behavior as bioactive injectable hydrogels // Acta Biomater. – 2013. – Vol. 9, № 11. – P. 9107–9117.

156 Sukhodub L.F. et al. Application biocomposite materials based on hydroxyapatite and alginate in medicine // J. Nano– Electron. Phys. – 2017. – Vol. 9, № 4. – P. 1–12.

157 Norhidayu D., Sopyan I., Ramesh S. Development of zinc doped hydroxyapatite for bone implant applications // Int. Conf. Constr. Build. Technol. – 2008. – Vol. 23, № 11. – P. 257–270.

158 Ovesen J. et al. The positive effects of zinc on skeletal strength in growing rats // Bone. – 2001. – Vol. 29, № 6. – P. 565–570.

159 Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphates (CaPO4): occurrence and properties // Prog. Biomater. – 2016. – Vol. 5, № 1. – P. 9–70.

160 Elliott J.C. General Chemistry of the Calcium Orthophosphates // Studies in Organic Chemistry. – 1994. – P. 1–62.

161 Elliott J.C. Calcium Phosphate Biominerals // Rev. Mineral. Geochemistry. – 2002. – Vol. 48, № 1. – P. 427–453.

162 V. Dorozhkin S. Amorphous Calcium Orthophosphates: Nature, Chemistry and Biomedical Applications // Int. J. Mater. Chem. – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 19–46.

163 Hu R., Lin C.–J., Shi H.–Y. A novel ordered nano hydroxyapatite coating electrochemically deposited on titanium substrate // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2007. – Vol. 80A, № 3. – P. 687–692.

164 Neira I.S. et al. An Effective Morphology Control of Hydroxyapatite

Crystals via Hydrothermal Synthesis // Cryst. Growth Des. – 2009. – Vol. 9, № 1. – P. 466–474.

165 Haque S., Rehman I., Darr J.A. Synthesis and Characterization of Grafted Nanohydroxyapatites Using Functionalized Surface Agents // Langmuir. – 2007. – Vol. 23, № 12. – P. 6671–6676.

166 Ślósarczyk A., Paszkiewicz Z., Paluszkiewicz C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods // J. Mol. Struct. – 2005. – Vol. 744–747. – P. 657–661.

167 Lak A. et al. Self–Assembly of Dandelion–Like Hydroxyapatite Nanostructures Via Hydrothermal Method // J. Am. Ceram. Soc. – 2008. – Vol. 91, № 10. – P. 3292–3297.

168 Kailasanathan C., Selvakumar N., Naidu V. Structure and properties of titania reinforced nano–hydroxyapatite/gelatin bio–composites for bone graft materials // Ceram. Int. – 2012. – Vol. 38, № 1. – P. 571–579.

169 Тұрлыбекұлы А. и др. Синтезирование микродисперсного гидроксиапатита кальция // Вестник ВКГТУ им. Д.Серикбаева. – 2018. –Т. 80, № 2. – P. 160–165.

170 Stanislavov A.S. et al. Structural features of hydroxyapatite and carbonated apatite formed under the influence of ultrasound and microwave radiation and their effect on the bioactivity of the nanomaterials // Ultrason. Sonochem. – 2018. – Vol. 42. – P. 84–96.

171 Eliaz N. et al. Electrochemical and electrophoretic deposition of hydroxyapatite for orthopaedic applications // Surf. Eng. – 2005. – Vol. 21, № 3. – P. 238–242.

172 Choudhury P., Agrawal D.C. Hydroxyapatite (HA) coatings for biomaterials // Nanomedicine. – 2012. – P. 84–127.

173 Turlybekuly A. et al. Bio–functional composite coating of calcium apatite and ZnO on a printed porous orthopedic implant // Inter. conf. “Metal 2018”. – Brno: Tanger, 2018. – P. 1275–1279.

174 Palard M., Champion E., Foucaud S. Synthesis of silicated hydroxyapatite Ca10(PO4)6−x(SiO4)x(OH)2−x // J. Solid State Chem. – 2008. – Vol. 181, № 8. – P. 1950–1960.

175 Fauchais P. Understanding plasma spraying // J. Phys. D. Appl. Phys. – 2004. – Vol. 37, № 9. – P. R86–R108.

176 Millar M. Microbial biofilms and clinical implants // Surfaces and Interfaces for Biomaterials. – 2005. – P. 619–636.

177 Hetrick E.M., Schoenfisch M.H. Reducing implant–related infections: active release strategies // Chem. Soc. Rev. – 2006. – Vol. 35, № 9. – P. 780–789.

178 Bogdanoviciene I. et al. Calcium hydroxyapatite, Ca10(PO4)6(OH)2 ceramics prepared by aqueous sol–gel processing // Mater. Res. Bull. – 2006. – Vol. 41, № 9. – P. 1754–1762.

179 Miao S. et al. Sol–gel preparation of Zn–doped fluoridated hydroxyapatite films // Surf. Coatings Technol. – 2005. – Vol. 198, № 1–3. – P. 223–226.

180 Phaechamud T. et al. Antimicrobial activity of ZnO–doxycycline hyclate

thermosensitive gel // ScienceAsia. – 2012. – Vol. 38, № 1. – P. 64–74.

181 Predoi D. et al. Textural, Structural and Biological Evaluation of Hydroxyapatite Doped with Zinc at Low Concentrations // Materials (Basel). – 2017. – Vol. 10, № 3. – P. 229–235.

182 Samani S. et al. In vitro antibacterial evaluation of sol–gel–derived Zn–, Ag–, and (Zn + Ag)–doped hydroxyapatite coatings against methicillin–resistant Staphylococcus aureus // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2013. – Vol. 101A, № 1. – P. 222–230.

183 Stanić V. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc–doped hydroxyapatite nanopowders // Appl. Surf. Sci. – 2010. – Vol. 256, № 20. – P. 6083–6089.

184 Li J.D. et al. Antibacterial Effect and Security Evaluation on Nano–Hydroxyapatite Bearing Cu2+ and Zn2+ // Mater. Sci. Forum. – 2006. – Vol. 510–511. – P. 890–893.

185 Dwivedi S. et al. Reactive Oxygen Species Mediated Bacterial Biofilm Inhibition via Zinc Oxide Nanoparticles and Their Statistical Determination // PLoS One / ed. Al–Ahmad A. – 2014. – Vol. 9, № 11. – P. e111289– e111300.

186 Berridge M. V., Herst P.M., Tan A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction // Biotechnology Annual Review. – 2005. – Vol. 11, – P. 127–152.

187 Berridge M. V., Tan A.S. Characterization of the Cellular Reduction of 3–(4,5–dimethylthiazol–2– yl)–2,5–diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction // Arch. Biochem. Biophys. – 1993. – Vol. 303, № 2. – P. 474–482.

188 Turlybekuly A. et al. ZnO Doped Nanosized Composite Material Based on Hydroxyapatite and Sodium Alginate Matrix // NAP–2018, 2018 IEEE 8th International Conference on “Nanomaterials: Applications & Properties.” Zatoka: IEEE, 2018. – P. 04NNLS36–1–04NNLS36–4.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Министерство образования и науки Республики Казахстан

ВОСТОЧНО-КАЗАХСТАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Д.СЕРИКБАЕВА

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по НРиИ
_____ О.Д. Гавриленко
«__» _____ 2018 г.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ
сканирования костных материалов с последующим построением трехмерной высоко текстурированной модели

РАЗРАБОТАНО

Руководитель рабочей группы, ГНС д.ф.-м.н., профессор	подпись, дата	Плотников С.В
СНС, PhD	подпись, дата	Уазырханова Г.К.
МНС, Инженер ВУК	подпись, дата	Тұрлыбекұлы А.
МНС, Инженер ВУК	подпись, дата	Жанысов С.А.
МНС, Инженер ВУК	подпись, дата	Догадкин Д.С.
МНС, Инженер ВУК	подпись, дата	Сагидуғұмар А.

Усть-Каменогорск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

А.1. Общие положения 60

А.2. Характеристики получаемой цифровой модели 60

А.3. Описание технологического процесса 60

А.4. Санитарно-гигиенические требования 66

А.5. Правила пожарной безопасной производства 68

А.1 Общие положения

Технология сканирования костных материалов предназначена для построения трехмерной высоко текстурированной модели и позволяет создавать биомиметичские изделия медицинского назначения, в частности имплантаты для ортопедии и нейрохирургии, а также аугменты. Разрешение текстуры состовляет >40 мкм.

Использование биомиметических пористых имплантатов с высокотекстурированной структурой, полученной методом обратного инжиниринга позволяет создать условия для полноценной регенерации и органотипической перестройки костных структур до их полного функционального восстановления. Биомиметическая архитектура повышает эффективность остеосинтеза и снижает риск развития послеоперационных осложнений.

А. 2. Характеристики получаемой цифровой модели

Разрешение текстуры состовляет >40 мкм. Размер пор составляет не менее 300 мкм, что соответсвует оптимальному росту костной ткани. Квазиупругийо градиент пористых биомиметических структур состовляет от 3,2 до 6,4 ГПа для сплава Ti6Al4V.

А.3. Описание технологического процесса

На рисунке А.1 схематически показаны этапы процесса создания имплантата с пористой структурой, полученной методом сканирования трабекулярной структуры кости. В соответствии со схемой, первым этапом является получение образца кости интересующей нас анатомической области (верхняя часть бедренной кости).

Исходный образец кости разрезается на пластинки толщиной до 0,2 мм, после чего каждая пластинка сканируется оптическим 3Д сканером высокого разрешения.

В зависимости от выбранного анатомического участка, который используется для получения образца кости, возможно, что в структуре кости отсканированного образца могут существовать различные неравномерности или разрывы. Когда такие дефекты присутствуют в образце отсканированной кости, может быть желательным очистить или удалить эти дефекты из облака точек, тем самым оставив только желаемую трабекулярную структуру (рисунок А.2). Несмотря на то, что известны различные способы обработки сканированных изображений (облака точек), которые могут использоваться для удаления нежелательных дефектов, в соответствии с настоящим методом участки кости из областей, имеющих желаемую структуру, могут быть вырезаны и наложены для заполнения области или областей, содержащих дефекты. В качестве основой может быть выбрана область сканирования, содержащая оптимальную трабекулярную структуру (средний диаметр пор ~400 мкм), а затем использоваться в качестве элементарной ячейки для всей пористой области создаваемой структуры.

После удаления нежелательных дефектов и соединения полученных групп сканирования выбирают область сканирования, имеющую оптимальные или желательные физические свойства трабекулярной структуры, и сканирование преобразуется в цифровой формат файла. Полученный файл для печати пористой металлической структуры с использованием метода аддитивного производства должен иметь соответствующее расширение (например, STL формат). STL-файл (или файл другого используемого формата), представляющий трабекулярную структуру, используется для создания биомиметической трабекулярной структуры путем ее генерации с использованием полученной модели в качестве элементарной ячейки. Биомиметическая структура не оказывает патологического влияния на организм экспериментальных животных и является более предпочтительным для погружных имплантатов по сравнению с литыми имплантатами.

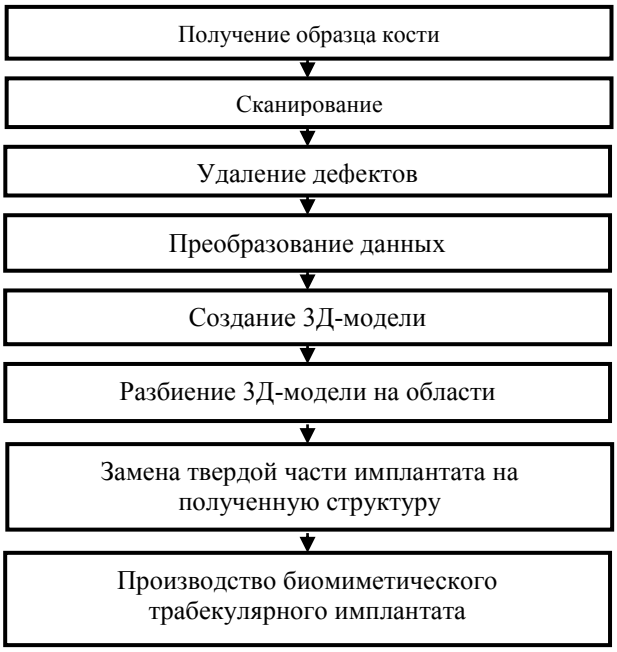


Рисунок А.1- Процесс производства имплантата с пористой структурой, полученной сканированием трабекулярной структуры кости

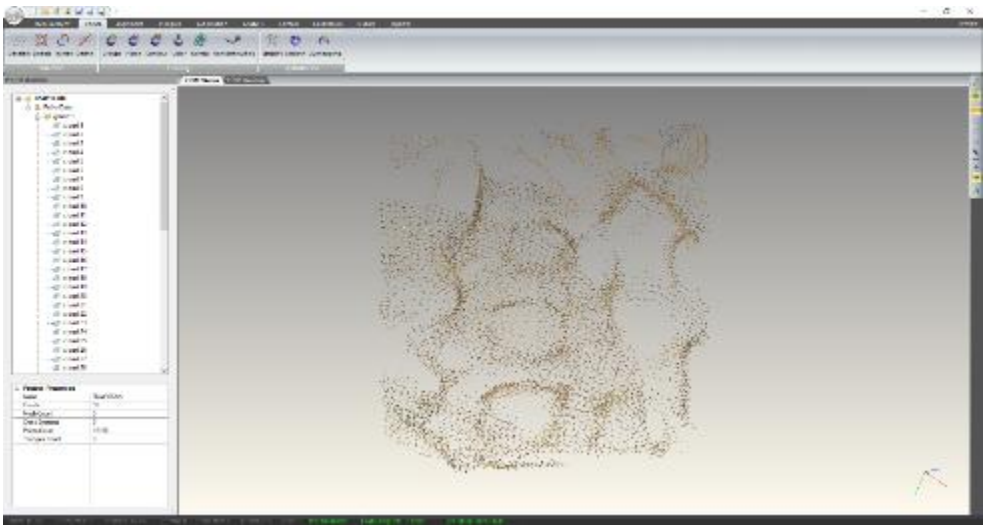


Рисунок А.2- Процесс удаления дефектов в полученном сканировании образца кости

Использование биомиметических пористых имплантатов с высокотекстурированной структурой, полученной методом обратного инжиниринга позволяет создать условия для полноценной регенерации и органотипической перестройки костных структур до их полного функционального восстановления. Биомиметическая архитектура повышает эффективность остеосинтеза и снижает риск развития послеоперационных осложнений.

Как только 3Д-модель генерируется, один или несколько трехмерных участков трабекулярной структуры могут быть удалены или вырезаны из модели, чтобы сформировать желаемые пористые или сетчатые области, которые должны быть вставлены в имплантат. Здесь следует понимать, что пористые или сетчатые участки конечных металлических структур, созданных с применением аддитивного метода, содержат трабекулярную структуру естественной кости, и поэтому элементы ячейки пористой

структуры не требуют использования математической модели. Соответственно, пористая структура металлического имплантата будет имитировать трабекулярную структуру естественной кости с конкретного целевого анатомического участка.

На рисунке А.3 изображена 3Д-модель, полученная сканированием трабекулярной структуры кости в соответствии с технологией настоящего метода.

После формирования желательных участков сетки металлической структуры к твердым частям модели имплантата затем добавляют пористые участки с использованием программного обеспечения, такого как САПР и т.п. Здесь следует понимать, что следует соблюдать осторожность, чтобы выровнять участки кости, поскольку они были первоначально выровнены в кости при применении способов настоящего метода, как описано здесь. Другими словами, разные области кости, такие как плечевая кость, имеют разные трабекулярные свойства (например, толщину, длину и т.А.) и ориентацию, которые должны быть тесно реплицированы в конструкцию сетки имплантата (рисунок А.4).

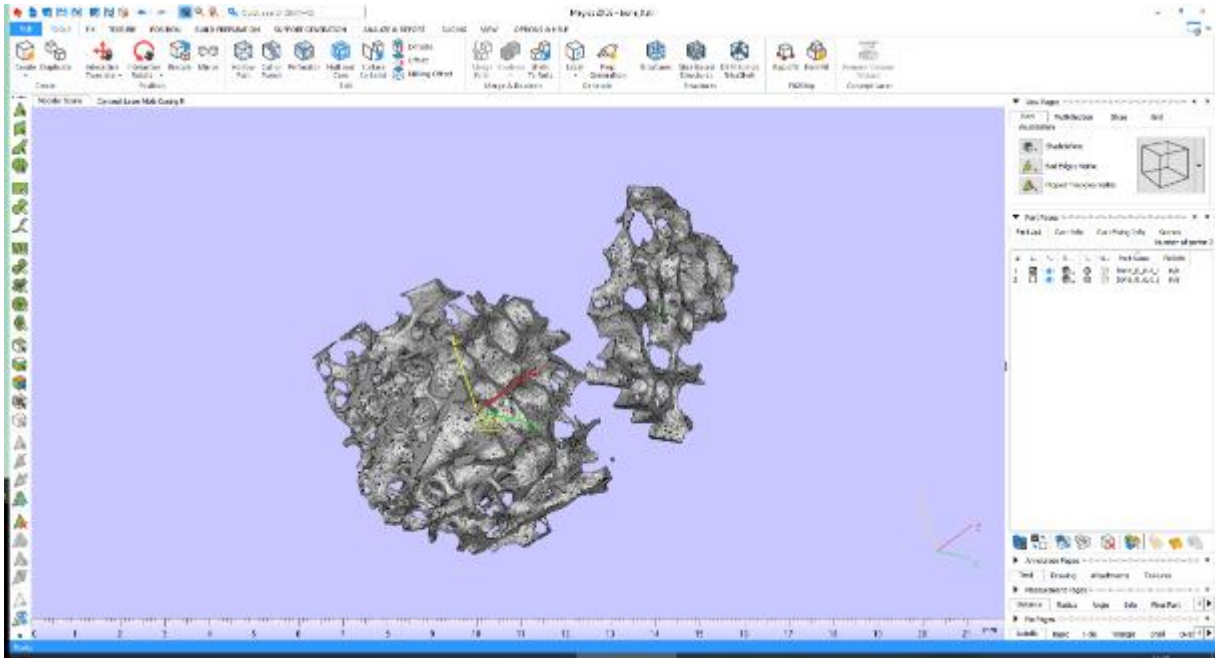


Рисунок А.3- Процесс объединения полученных групп сканирования в элементарную ячейку

После моделирования имплантата для его изготовления из данных 3Д-модели используется метод аддитивного производства. Методы аддитивного производства известны и включают в себя создание объектов из данных 3Д-модели путем соединения материалов друг с другом поэтапно. Некоторые методы аддитивного производства могут быть использованы в соответствии с принципами настоящего метода, включая, но не ограничиваясь ими, методы прямого лазерного спекания металлов (DMLS), плавление электронным пучком (EBM), селективное лазерное спекание (SLS), селективное лазерное плавление (SLM) и др.

Следует понимать, что при необходимости традиционные технологии изготовления (например, литье, формование, механическая обработка, соединение/сварка, полировка, струйная обработка и т.А.) также могут использоваться в сочетании с методами аддитивного производства. Например, в соответствии с анатомическими требованиями имплантата может быть необходимо добавить конусы, канавки и/или нити в изготовленное изделие. Если требуются такие дополнительные функции, специалисты в данной области техники могут включать дополнительные технологии изготовления в различные варианты осуществления настоящего метода.

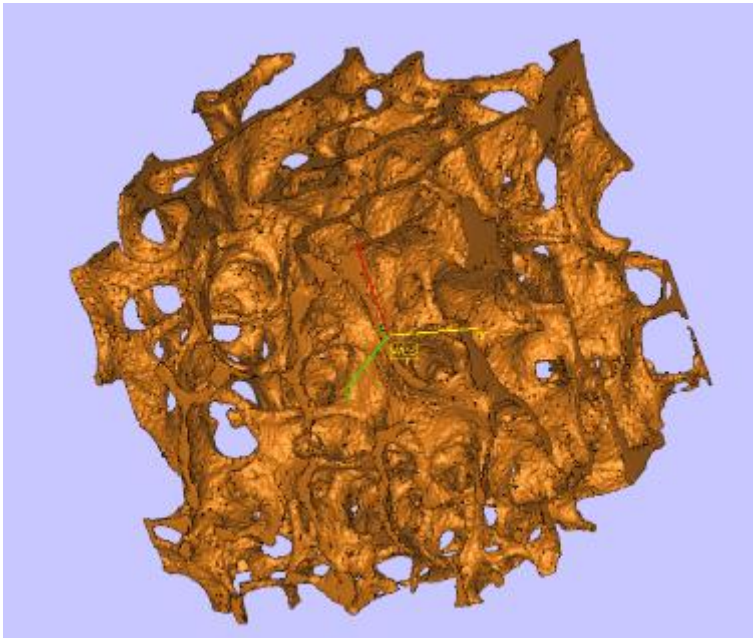


Рисунок А.4 - Элементарная ячейка костной структуры, полученная описываемым методом

Настоящий метод не ограничен данными вариантами осуществления. Приложение метода возможно для охвата любых вариантов использования или адаптации метода с использованием его общих принципов.

Конечный продукт разработанной технологии является биомиметический трабуклярный имплантат, в качестве примера показан межпозвоночный имплантат (рисунок А.5, А.6).

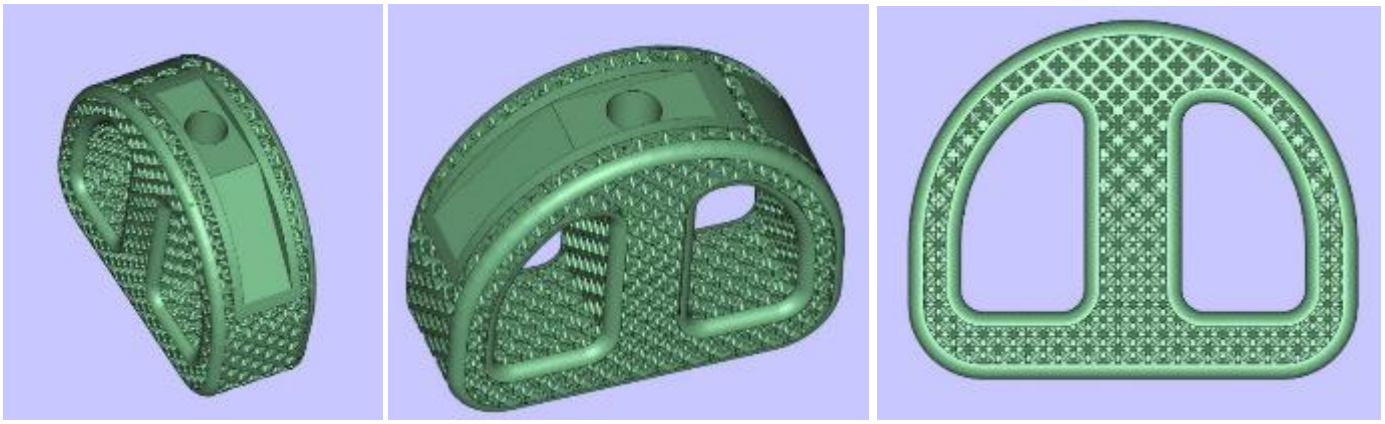


Рисунок А.5 - Трехмерная цифровая модель биомиметического трабуклярного имплантата

Процесс производства изделия проводится в машине селективного лазерного плавления. Исходным материалом выбирается сертифицированный медицинский порошковый материал для аддитивного производства, с химическим составом Ti6Al4V. На рисунке А.7 представлена реальная фотография полученного биомиметического имплантата.

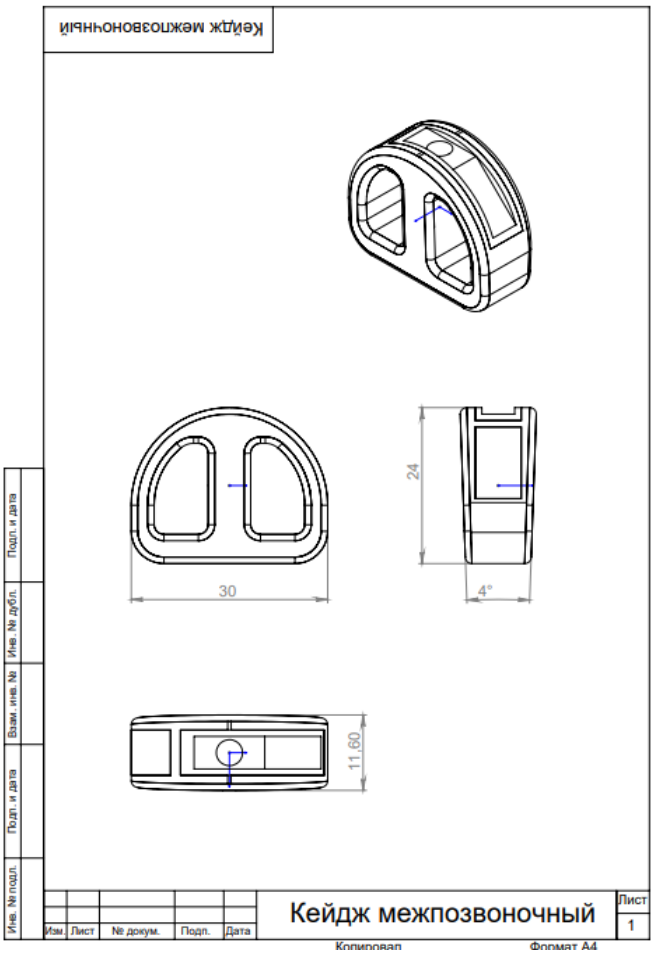


Рисунок А.6 – Чертеж биомиметического кейджа с трабекулярной структурой



Рисунок А.7 - Фотография биомиметического кейджа с трабекулярной структурой, полученного 3Д печатью

А.4. Санитарно-гигиенические требования

А.4.1 Система санитарно-гигиенических мероприятий, должна обеспечивать безопасность персонала в условиях работы с опасными компонентами, высокоактивными, летучими и токсическими веществами, исключить возможность загрязнения окружающей организацию среды.

А.4.1.1 Санитарно-гигиенические требования к аддитивному производству охватывают персонал, помещения, оборудование

А.4.1.2 Санитарно-гигиенические требования к персоналу:

-весь персонал при поступлении на работу и во время работы должен проходить регулярные медицинские обследования;

-весь персонал должен быть обучен практике личной гигиены, все занятые в производстве должны соблюдать высокий уровень личной гигиены;

-в зонах производства и лабораторных исследований не допустимы курение и приём пищи.

А.4.1.3 Условия проведения технологического процесса должны обеспечить сведение к минимуму контактов работающего персонала с сырьем и вспомогательными материалами в процессе обслуживания оборудования и при проведении производственных операций.

А.4.1.4 Чистота помещений при лабораторных испытаниях– согласно ГОСТ Р ИСО 14644-4.

При работе в лабораторных помещениях различного класса чистоты используют специальную для этих целей технологическую одежду.

А.4.2 Санитарно-гигиенические требования к помещениям:

А.4.2.1 Планировка помещений должна обеспечивать:

- полное соблюдение условий санитарно-гигиенического режима;
- поточность процесса с кратчайшими расстояниями между технологически связанными помещениями;
- исключение взаимопересечения людских и технологических потоков;
- максимальную группировку помещений с одинаковой степенью чистоты;

А.4.2.2 В условиях производства должны быть предусмотрены:

-чистые и удобные санитарно-бытовые помещения, расположенные вблизи производственных помещений;

-системы вентиляции, водопровода и канализации, удаления отходов производства и другие, необходимые для обеспечения чистоты рабочих помещений и оборудования;

-установки кондиционирования, необходимые для поддержания в помещениях температуры и относительной влажности воздуха, требуемых для создания надлежащих условий производства.

А.4.2.3 Внутренние поверхности должны быть покрыты материалами, не вступающими во взаимодействие с моющими и дезинфицирующими средствами.

А.4.2.4 Регламент выполнения санитарной обработки определяется приказом директора предприятия.

А.4.3 Контроль за санитарно-гигиеническими требованиями должен осуществляться в соответствии с «Программой производственного контроля», согласованной с местной санитарно-эпидемиологической станцией.

А.5. Правила пожарной безопасной производства

А.5.1 Пожарным следует использовать соответствующее защитное оборудование и автономные дыхательные аппараты с полностью охватывающей лицевой маской, работающие в режиме положительного давления. Применяются: защитный общевойсковой костюм Л1, Л2 в комплекте с промышленным противогазом, аэрозольным фильтром и патронами А, В, В8, БКФ; спецодежда; маслобензостойкие перчатки, перчатки из дисперсии бутилкаучука, специальная обувь.

При возгораниях – огнезащитный костюм в комплекте с самоспасателем СПИ-20.

А.5.2 Допуск к месту аварии должен производиться только по специальному пропуску.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

«Силумин-Восток» ЖШС
Қазақстан Республикасы, ШҚО, 070010,
Өскемен қ., Революционная к., 10,
БСН 010840000039, «Қазақстан Халық Банкі» АҚ
БТК HSBKKZKX, ЖТК KZ166010151000003343

СИЛУМИН-ВОСТОК
инжиниринговая компания

ТОО «Силумин-Восток»
Республика Казахстан, ВКО, 070010,
г. Усть-Каменогорск, ул. Революционная 10,
БИН 010840000039, АО «Народный банк Казахстана»
БИК банка: HSBKKZKX, ИИК KZ166010151000003343

тел./факс: +7 (7232) 76-90-98, 76-90-12
e-mail: info@silumin.kz
www.silumin.kz

От 11 марта 2019 года

АКТ
внедрения результатов диссертационной работы Тұрлыбекұлы Аманжола «Исследование наноструктурированных апатит-биокомпозитных материалов и покрытий» на ТОО «Силумин - Восток»

Мы нижеподписавшиеся, начальник департамента машиностроительный комплекс SV Зяблицкий Андрей Николаевич с одной стороны, и докторант PhD по специальности 06D072300 - «Техническая физика» ВКГТУ им.Д.Серикбаева Аманжол Тұрлыбекұлы с другой стороны, составили настоящий Акт о том, что разработанные в диссертационной работе технологические решения по получению наноструктурированных апатит-биокомпозитных материалов на основе гидроксиапатита и нанесению покрытий на пористые металлические структуры будут использоваться в перспективных проектах ТОО «Силумин - Восток».

Начальник департамента
«Машиностроительный комплекс»
ТОО «Силумин - Восток» А.Н. Зяблицкий

Докторант PhD А.Тұрлыбекұлы