

УДК 577.322

НАНОКОМПОЗИТНІ МАТЕРІАЛИ НА ОСНОВІ ГІДРОКСИПАТИТУ ТА АЛЬГІНАТУ НАТРІЮ: СИНТЕЗ І ХАРАКТЕРИСТИКА

О.О. Мартинюк^{1*}, Л.Б. Суходуб², Л.Ф. Суходуб¹

¹Сумський державний університет МОН України, вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007, Україна;

e-mail: martinyuk2010@yandex.ua

²ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України», вул. Пушкінська, 14/16, м. Харків, 61057, Україна

Надійшла до редакції 10 червня 2015 року

Прийнята 29 червня 2015 року

Дана робота присвячена розробці та оптимізації методу синтезу апатит-біополімерних наноструктурованих композитних матеріалів для медичного використання з різним співвідношенням полімерної (альгінат натрію, АН) та неорганічної (гідроксиapatит, ГА) фаз та дослідженню їх властивостей. Методами ІЧ-Фур'є спектроскопії, рентгенівської дифрактометрії та просвічуючої електронної мікроскопії (ПЕМ) охарактеризовані склад, структура та морфологія зразків. Визначені пористість, ступінь набухання та *in vitro* реакція на біоактивність у фізіологічному розчині отриманих композитів. Інструментальними методами підтверджено формування в присутності альгінату натрію фази гідроксиapatиту голчатої структури із середнім розміром кристалітів 23 нм з одночасним утворенням біополімерної матриці за рахунок взаємодії позитивно заряджених іонів кальцію (Ca^{2+}) і негативно заряджених карбоксильних груп (COO^-). Зміна рН фізіологічного розчину в присутності досліджуваних зразків свідчить про їх біоактивність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: наноккомпозити, гідроксиapatит, альгінат натрію, рентгенівська дифрактометрія, ІЧ спектроскопія, просвічуюча мікроскопія.

NANOCOMPOSITE MATERIALS BASED ON HYDROXYAPATITE AND SODIUM ALGINATE: SYNTHESIS AND CHARACTERISTICS

О.О. Martynuk^{1*}, L.F. Sukhodub¹, L.B. Sukhodub²

¹Sumy State University MES of Ukraine, Rimsky-Korsakov St., 2, Sumy, 40007, Ukraine;

²SI "Institute of Microbiology and Immunology, the Mechnikov I.I. AMS of Ukraine", Pushkinska St., 14/16, Kharkiv, 61057, Ukraine

This work is devoted to the development and optimization of the synthesis method of nanostructured biopolymer-apatite composite materials for medical applications with different ratios of polymer (sodium alginate, SA) and inorganic (hydroxyapatite, HA) phases and research their properties. Composition, structure and morphology of the samples by FTIR spectroscopy, X-ray diffraction and transmission electron microscopy (TEM) were characterized. Porosity, degree of swelling and *in vitro* response on bioactivity in physiological solution obtained composites were determined. The formation in the presence of sodium alginate hydroxyapatite phase with needle structure and average crystallite size 23 nm with simultaneous formation biopolymer matrix due to the interaction of positively charged calcium ions (Ca^{2+}) and negatively charged carboxyl groups (COO^-) by instrumental method was confirmed. The pH changing of physiological solution in the presence of samples testifies their bioacti.

KEY WORDS: nanocomposites, hydroxyapatite, sodium alginate, x-ray diffraction, infrared spectroscopy, transmission microscopy.

НАНОКОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИПАТИТА И АЛЬГИНАТ НАТРИЯ: СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИСТИКА

О.О. Мартинюк^{1*}, Л.Ф. Суходуб¹, Л.Б. Суходуб²

¹Сумской государственной университет МОН Украины, ул. Римского-Корсакова, 2, г. Сумы, 40007, Украина;

²ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України», ул. Пушкінська, 14/16, г. Харків, 61057, Украина

Данная работа посвящена разработке и оптимизации метода синтеза апатит-биополімерных наноструктурированных композитных материалов для медицинского использования с различным соотношением полимерной (альгінат натрия, АН) и неорганической (гідроксиapatит, ГА) фаз и

исследованию их свойств. Методами ИК-Фурье спектроскопии, рентгеновской дифрактометрии и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) охарактеризованы состав, структура и морфология образцов. Определены пористость, степень набухания и *in vitro* реакция на биоактивность в физиологическом растворе полученных композитов. Инструментальными методами подтверждено формирование в присутствии альгината натрия фазы гидроксиапатита игольчатой структуры со средним размером кристаллитов 23 нм с одновременным образованием биополимерной матрицы за счет взаимодействия положительно заряженных ионов кальция (Ca^{2+}) и отрицательно заряженных карбоксильных групп (COO^-). Изменение pH физиологического раствора в присутствии исследуемых образцов свидетельствует об их биоактивности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: наноккомпозиты, гидроксиапатит, альгинат натрия, рентгеновская дифрактометрия, ИК спектроскопия, просвечивающая микроскопия.

Дослідження, розробка та виробництво матеріалів для медичних імплантатів є актуальною проблемою сучасного медичного матеріалознавства впродовж останнього десятиліття. Багато наукових робіт присвячено розробці та оптимізації методик отримання кальцій-фосфатних матеріалів із заданим складом та властивостями, близькими до нативної кісткової тканини. Розробки матеріалів на основі нанокристалічних фосфатів кальцію проводять у двох напрямках: нанокристалічна кераміка та композиційні матеріали з біополімерними матрицями, армованими наночастинками фосфатів.

Загальновідомо, що кісткова тканина людини (КТЛ) являє собою складний композиційний матеріал з організованою на декількох рівнях мікроструктурою, що володіє унікальними механічними властивостями. Основними складовими кісткової тканини є колаген типу I $\sim 20\%$, мінеральна фаза – кальцій дефіцитний ГА ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$) $\sim 60\%$, вода $\sim 9\%$, неколагенові білки $\sim 3\%$, залишок – полісахариди, ліпіди [1]. ГА – найбільш відповідний керамічний матеріал, який може бути використаний в якості заміни дефектних кісток і зубів завдяки його біосумісності, біоактивності, остеокондуктивності, нетоксичності [2-5].

Біологічний апатит формується за допомогою утворення зародків кристалізації на макромолекулах колагену і їх подальшого зростання за рахунок іонного транспорту та осадження з рідини організму [6]. Кристали ГА мають форму пластинок довжиною $\sim 40-60$ нм, шириною $\sim 20-30$ нм і товщиною $\sim 1,5-5$ нм та орієнтовані паралельно осі колагенової фібрили. Нанокристали ГА володіють двома найважливішими для фізіології кісткової тканини якостями: знаходяться в динамічній рівновазі з біологічним оточенням в циклі ремоделювання (резорбції / мінералізації) і виявляють високий рівень механічних властивостей [7]. Нанокристалічний ГА має підвищену здатність адсорбувати білки, необхідні для життєдіяльності клітин, володіє вибірковістю по відношенню до функцій клітин, що утворюють кісткову і фіброзну тканини [8].

Оскільки природна кісткова тканина є композиційним матеріалом, що складається з ГА, колагену та інших білків, то значні перспективи для підвищення механічних властивостей ГА-кераміки, призначеної для виготовлення кісткових імплантатів, має принцип формування композиційних структур з великою кількістю клінічних застосувань [9-11]. Таким чином, формування нанорозмірних частинок ГА у полімерному скефолді наближує за структурою отримані матеріали до КТЛ та сприяє їх більш ефективній імплантації. В якості органічної складової був обраний альгінат натрію – природний аніонний полімер, отриманий переробкою бурих морських водоростей, який володіє високою біосумісністю зі сполучною тканиною, низькою токсичністю, здатністю підсилювати регенеративні процеси при загоюванні ран, здатністю біодеградувати з утворенням сполук, що мають хемотаксисну активність до фібробластів та остеобластів [12, 13].

Композитні матеріали для медичного використання в залежності від призначення можуть бути виготовлені в різних лікарських формах (гелі, суспензії, порошки, гранули), які залежать, в тому числі, від вмісту біополімеру. Тому метою даної роботи було створення наноструктурованих апатит-біополімерних композитів з різним співвідношенням органічної та неорганічної компонент, дослідження їх властивостей і вивчення впливу полімеру на формування кристалів кальцій-фосфатної фази.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріали

Кальцій нітрат тетрагідрат ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), гідрофосфат амонію ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), гідроксид амонію (NH_4OH) класифікації «ХЧ», «Мерск»; натрію альгінат (Е401) молекулярною масою 15 кДа, Китай.

Синтез ГА/АН композитів

При синтезі були використані водні розчини 0,167 М кальцій нітрату тетрагідрату (Р1) та 0,1 М гідрофосфату амонію (Р2). Альгінат натрію розчиняли в $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в сушильній шафі при температурі 37°C протягом 1 доби (Р3). Для утворення композиту розчин Р1 додавали по краплях до суміші Р3. Реакцію синтезу проводили при температурі 80°C, значення рН=12 реакційної суміші досягали додаванням 25 % водного розчину NH_4OH . Суміш зберігали при температурі навколишнього середовища (27°C) протягом 24 годин, після чого утворений осад багаторазово промивали дистильованою водою до рН~7,4 та відділяли за допомогою центрифуги. Отримували гелеподібну субстанцію вологістю 90 %. Для подальших досліджень продукт висушували при 37°C та прожарювали при 900°C протягом 1 години з подальшим подрібненням. Було підготовлено 5 типів зразків з наступним масовим співвідношенням ГА до натрію альгінату: 4:1 (зразок №1), 3:2 (зразок №2), 1:1 (зразок №2), 2:3 (зразок №4), 4:1 (зразок №5). Розрахунок проводили виходячи із кількості теоретично утворюваного ГА в результаті реакції синтезу. Для проведення аналізу з використанням інструментальних досліджень було підготовлено по три зразка кожного типу, а результати аналізів усереднені.

Структурні дослідження

Структура отриманих зразків була визначена методом рентгенівської дифракції на автоматизованому дифрактометрі ДРОН-3 (НПП «Буревестник», Росія). Система автоматизації ДРОН заснована на мікропроцесорному контролері, який забезпечує управління гоніометром ГУР-8 та передачу даних в цифровому вигляді на ПК. При дослідженні використовувалось випромінювання $\text{CuK}\alpha$ (довжина хвилі 0,154 нм), фокус по Бреґу-Брентано- 2θ (2θ – брегівський кут). Величини струму та напруги складали 20 мА та 40 кВ відповідно. Дослідження зразків проводилося в режимі безперервної реєстрації (швидкість 4°/хв.), діапазон кутів 2θ від 10° до 60°. Результати експерименту передаються безпосередньо в програмний пакет підтримки експерименту DifWin-1 (ТОО «Эталон ПТЦ») для попередньої обробки. Ідентифікація кристалічних фаз проводилась за допомогою картотеки JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Розміри кристалітів розраховували за формулою Шеррера:

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

де L – розмір кристаліту, K – коефіцієнт форми (приймаємо $K = 1$), β_m – інтегральна ширина профілю дифракційної лінії.

Рівень мікрореформацій ε вимірюється як зміна міжплощинної відстані досліджуваного зразка у порівнянні з еталоном, в якому мікрореформації відсутні. Якщо фізичне розширення дифракційних ліній відбувається лише через мікрореформації кристалічної решітки, то рівень мікрореформацій визначається за наступною формулою:

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

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

Просвічуюча електронна мікроскопія

Електронно-мікроскопічні дослідження структури і фазового складу зразків проводилось з використанням просвічуючого електронного мікроскопу ПЕМ-125К (ВАТ «Selmi», Україна) при роботі у світлопольному та мікродифракційному режимі без введеної селекторної діафрагми. Прискорююча напруга складала 90 кВ.

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

ІЧ спектроскопія

Спектри ГА/АН композитів були отримані за допомогою інфрачервоної спектроскопії (ІЧ). Дослідження проводили на інфрачервоному спектрометрі на основі Фур'є перетворення Agilent Cary 63 FTIR (компанія Agilent Technologies, США), в якому застосовується сучасний метод ідентифікації молекулярних сполук і їх кількісного аналізу. Промені від ІЧ-джерела світла проходять через зразок і падають на детектор, який вимірює поглинання світла зразком. Величина поглинання дозволяє точно ідентифікувати молекулярну структуру зразка та визначити кількість речовини в суміші. Спектри поглинання були виміряні в діапазоні $4000\text{-}500 \text{ см}^{-1}$.

In vitro дослідження

Біоактивність досліджуваних зразків визначали за зміною значення рН фізіологічного розчину (SBF), який за складом та концентрацією компонентів наближений до сировотки крові людини: Na^+ – 142 мМ, K^+ – 5 мМ, Mg^{2+} – 1,5 мМ, Ca^{2+} – 2,5 мМ, Cl^- – 148,8 мМ, HCO_3^- – 4,2 мМ, HPO_4^{2-} – 1,0 мМ, SO_4^{2-} – 0,5 мМ, рН=7,4 [14]. Зразки композитів однакової маси були занурені в розчин SBF об'ємом 5 мл та витримані в термошафі з постійною температурою 37°C протягом 7 днів. Вимірювання рН здійснювалося щоденно за допомогою рН-метра рН-150МІ.

Вимірювання пористості та набухання композитів

Для визначення пористості отриманих композитних матеріалів зразок масою m_0 поміщали в мірний циліндр з відомим об'ємом етанолу (V_1) і витримували протягом

30 хв. Об'єм етанолу з зануреним зразком відповідає V_2 . Потім зразок, в пори якого проник етанол, витягували з циліндра, зважували (m_1) і визначали об'єм спирту, що залишився (V_3).

Пористість (Π) розраховували за формулою [15]:

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

де $\rho_{ет}$ – густина етанолу.

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

Розрахунок рівноважного ступеня набухання Q проводили за формулою:

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

де m_0 – маса сухого зразку, г; m – маса зразку, що набухнув до рівноважного стану, г.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Рентгенофазовий аналіз

Рентгенограми ГА/АН композитів, висушених при 37°C, наведені на рис. 1. Рентгенівські спектри підтверджують формування кристалітів гідроксиапатиту в присутності альгінату. Всі піки на рентгенівських дифрактограмах зразків №1-4 (a-d) ідентифікуються як стехіометричний ГА № 9-432 згідно з базою даних JCPDS, окрім зразку №5 (e), в якому із-за низького ступеню кристалічності, в результаті впливу альгінату натрію, відсутня чітка ідентифікація піків і його скоріше можна віднести до аморфного кальцій фосфату.

Значення мікродеформацій та розмір кристалітів, розрахований за допомогою рівняння Шеррера, наведені в таблиці 1. Мікродеформації зразків № 1-4 майже не відрізняються між собою, окрім зразка №5, в якому вказана величина збільшується в 2 рази в площині (112). Розмір кристалітів ГА зменшується із збільшенням кількості альгінату, введеного в реакційну систему при синтезі. Крім того, у всіх зразках спостерігається зміщення базового піку високої інтенсивності (211) для чистого ГА до більш високого значення 2θ (112) тобто, від $2\theta = 31,88^\circ$ до $32,04^\circ$ для ГА у складі композиту. Це можливо через вплив стиснення полімерних матриць через міжфазні зв'язки [16]. Вказані зміни у спектрах свідчать про вплив АН на формування ГА.

Для подальшого дослідження та контролю наявності додаткових фаз зразки були прогріті при 900°C протягом 1 години, оскільки при такій температурі відбуваються процеси рекристалізації та фазового розпаду, що може призвести до утворення інших кальцій-фосфатних фаз [17]. Результати дослідження, наведені на рис. 2 та в табл. 2 показують, що єдиною фазою після прожарювання у всіх зразках був висококристалічний стехіометричний ГА (JCPDS №09-0432), але у зразку №5 ступінь кристалічності значно менший. Відпал полімеру після прожарювання призводить до збільшення середнього розміру кристалітів від 23 до 68 нм в зразках № 1-4 та від 18 до 39 нм в зразку №5. Для порівняння, після прожарювання при 900°C чистого ГА,

синтезованого без полімеру, середній розмір кристалітів складає 23 нм. Таке збільшення розмірів кристалітів свідчить про більш високий ступінь агломерації наночастинок, утворених при синтезі ГА в присутності полімеру, завдяки їх високій реакційній здатності. Середнє значення мікродеформацій у зразках, синтезованих в присутності полімеру (№1-5) складає 0,0025 та є значно меншим в порівнянні зі значенням мікродеформації чистого ГА, яке становить 1,197 [17].

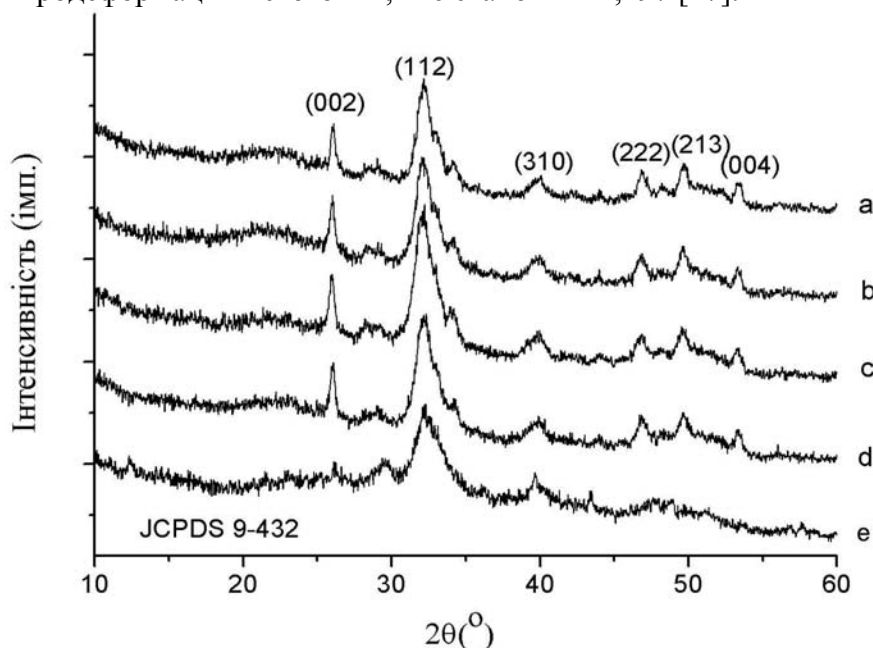


Рис. 1. Рентгенограми зразків ГА/АН 4:1 (а), ГА/АН 3:2 (b), ГА/АН 1:1 (с), ГА/АН 2:3 (d), ГА/АН 1:4 (е), висушених за температури 37 °С

Таблиця 1
Розміри кристалітів ГА в композитному матеріалі ГА/АН, висушених при 37°С

Зразок	Індекс Міллера	Розмір кристалітів за Шеррером, нм	Мікродеформації, $\cdot 10^3$
ГА/АН 4:1 (№ 1)	(002)	28	0,006
	(112)	9	0,015
ГА/АН 3:2 (№ 2)	(002)	23	0,007
	(112)	9	0,015
ГА/АН 1:1 (№ 3)	(002)	22	0,007
	(112)	12	0,011
ГА/АН 2:3 (№ 4)	(002)	25	0,007
	(112)	7	0,019
ГА/АН 1:4 (№ 5)	(002)	18	0,009
	(112)	5	0,026

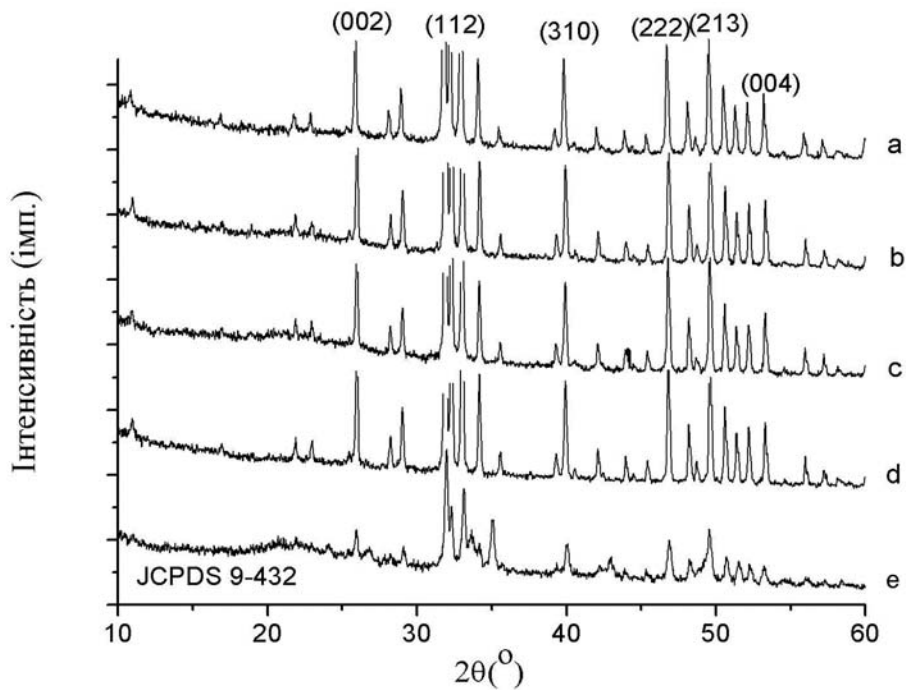


Рис. 2. Рентгенограми зразків ГА/АН 4:1 (а), ГА/АН 3:2 (b), ГА/АН 1:1 (с), ГА/АН 2:3 (d), ГА/АН 1:4 (е), після відпалу за температури 900°C

Таблиця 2

Розміри кристалітів ГА після відпалу зразків при 900°C протягом 1 години

Зразок	Індекс Міллера	Розмір кристалітів за Шеррером, нм	Мікродеформації, $\cdot 10^3$
ГА/АН 4:1 (№ 1)	(002)	68	0,0025
	(112)	51	0,0027
ГА/АН 3:2 (№ 2)	(002)	66	0,0026
	(112)	53	0,0026
ГА/АН 1:1 (№ 3)	(002)	67	0,0025
	(112)	52	0,0026
ГА/АН 2:3 (№ 4)	(002)	63	0,0027
	(112)	51	0,0027
ГА/АН 1:4 (№ 5)	(002)	39	0,0044
	(112)	34	0,004

Інфрачервона спектроскопія

ІЧ спектри альгінату натрію та композитних матеріалів зображені на рис.3. Чистий альгінат представлений двома характеристичними абсорбційними смугами з вершинами при 1592 см^{-1} , що відповідає асиметричним валентним коливанням COO^- груп, та 1406 см^{-1} , що відноситься до симетричних валентних коливань COO^- груп, та

перекриваються з коливаннями С-Н зв'язків в метилових групах. С-Н коливання також спостерігаються при 2923 cm^{-1} . Адсорбційна смуга з піком 1026 cm^{-1} та невеликими «плечами» при 1082 cm^{-1} та 1128 cm^{-1} відповідає С-О-С коливанням, С-О та ОН коливанням у вторинних спиртових групах відповідно. Коливання 1298 cm^{-1} відповідає коливанням С-О карбосильних кислот. Широка смуга біля 3192 cm^{-1} належить валентним коливанням ОН груп [18].

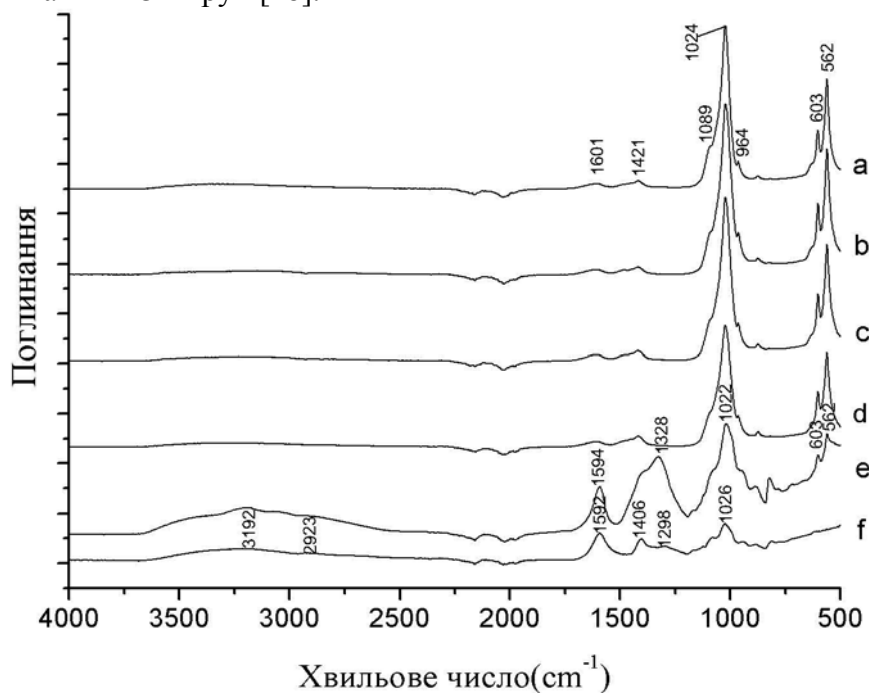


Рис. 3. ІЧ спектри ГА/АН 4:1 (а), ГА/АН 3:2 (б), ГА/АН 1:1 (с), ГА/АН 2:3 (д), ГА/АН 1:4 (е), АН (ф)

У всіх зразках синтезованого композитного матеріалу ГА/АН з'являються нові піки коливань груп PO_4^{3-} : антисиметричні коливання ν_4 при $562, 603\text{ cm}^{-1}$ [19] та симетричні коливання ν_1 при 964 cm^{-1} [20], які перекриваються з смугою С-О-С коливань альгінату та ν_3 асиметричними коливаннями Р-О ($1039\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$) [11]. Про це свідчить «плече» при 1089 cm^{-1} . Інтенсивність піків при $1022\text{-}1024\text{ cm}^{-1}$ значно зросла у всіх спектрах композиту ГА/АН порівняно зі спектром чистого альгінату, а інтенсивність коливань COO^- груп (1592 та 1406 cm^{-1}) значно знизилась зі зсувом в бік менших хвильових довжин у спектрах a,b,c,d. Коливання у спектрі зразка з найбільшим вмістом альгінату (е) є близькими до спектру чистого альгінату. Однак, коливання при 1592 cm^{-1} у спектрі чистого альгінату, які відповідають асиметричним коливанням COO^- груп, виявилися зсунутими до 1594 cm^{-1} та більш інтенсивними у спектрі композитного матеріалу. Відбувся зсув адсорбційної смуги С-О-С коливань з 1026 cm^{-1} до 1020 cm^{-1} , інтенсивність цих коливань зросла втричі. Пік 1406 cm^{-1} у чистому альгінаті є зсунутим до 1328 cm^{-1} у випадку композиту, його інтенсивність та ширина також значно збільшилися порівняно зі спектром чистого альгінату. Інтенсивність піків, які відповідають коливанням фосфатних груп $562, 603\text{ cm}^{-1}$ навпаки знизилась. Останній факт свідчить про зменшення долі кальцій фосфатної сполуки у композитному матеріалі та значний вплив альгінату на формування та ступінь росту кристалів ГА.

Зсув та збільшення інтенсивності основних коливань у спектрі композитного матеріалу свідчить про формування хімічних зв'язків між мінеральною фазою та

органічною компонентою шляхом взаємодії між позитивним зарядом іонів кальцію та негативним зарядом карбоксильних груп в альгінаті натрію [21]. Наявність міжмолекулярної взаємодії між неорганічним мінералом та хімічним ланцюгом альгінату в полімерному середовищі забезпечує контрольовану нуклеацію та ріст кристалітів неорганічної фази [22], що і підтверджується результатами аналізу методом рентгенівської дифракції.

Провічуюча електронна мікроскопія

Зображення ПЕМ зразків № 1-5 наведені на рис. 4.

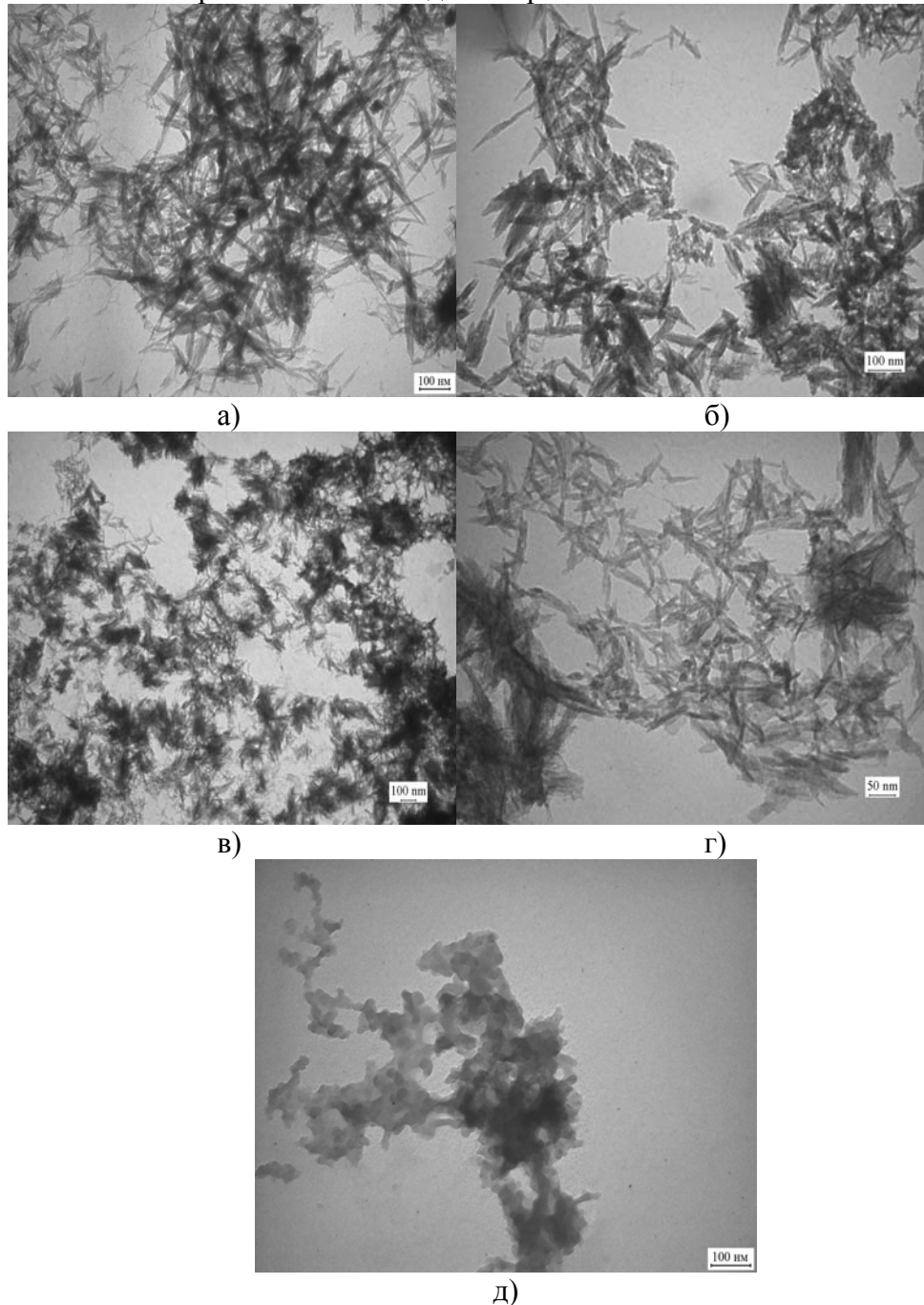


Рис. 4. ПЕМ зображення водних суспензій ГА/АН 4:1 (а), ГА/АН 3:2 (б), ГА/АН 1:1 (в), ГА/АН 2:3 (г), ГА/АН 1:4 (д)

Знімки ПЕМ демонструють голчасту структуру частинок гідроксиапатиту у складі композитного матеріалу у зразках № 1-4 (рис. 4 а-г). Збільшення кількості полімеру при синтезі (рис. 4 д) призводить до зміни форми кристалітів, утворення наночастинок ГА, оточених полімерною оболонкою. Із зображень ПЕМ видно, що зі збільшенням вмісту альгінату натрію в реакційній суміші під час синтезу композитного матеріалу відбувається зменшення розміру частинок від 120 нм (№ 1) до 50 нм (№ 4). ПЕМ зразка № 5 з найбільшим вмістом альгінату демонструє зміну форми і зменшення розмірів кристалітів ГА.

Дослідження біоактивності *in vitro*

Вивчення біоактивності *in vitro* ГА/АН композитів (рис. 5) було проведено шляхом дослідження зміни рН розчину SBF, в якому знаходились зразки біоккомпозитного матеріалу протягом 7 днів. Початкове значення рН фізіологічного розчину складало 7,46. Дослідження показали, що значення рН контрольного розчину SBF (без композитного матеріалу) залишалось сталим протягом всього періоду спостереження. У присутності експериментальних зразків протягом перших трьох діб відбувалося зниження рН розчину SBF з поступовим підвищенням цього значення з четвертої доби і до кінця спостереження. Очевидно, зниження рН відбувається в результаті формування ГА на поверхні зразка з іонів Ca^{2+} та OH^- , присутніх в розчині SBF. Після збіднення розчину на вказані іони відбувається зворотній процес розчинення утвореного кальцій-фосфату. При цьому відбувається зв'язування іонів H^+ з іонами PO_4^{3-} , що призводить до збільшення значення рН середовища [23]. Даний факт підтверджує високу біоактивність ГА/АН композитного матеріалу у фізіологічному середовищі.

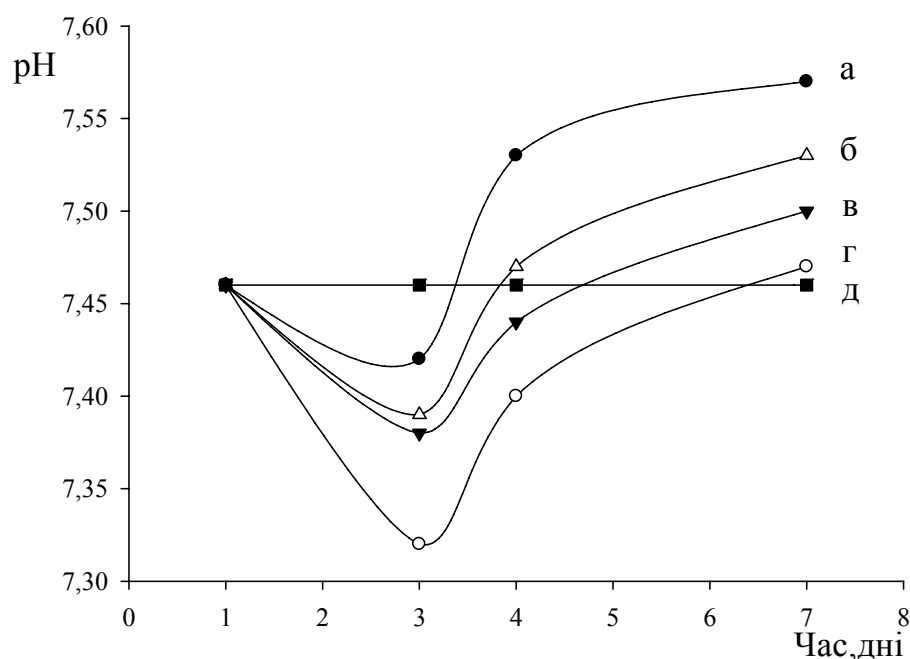


Рис. 5. Дослідження біоактивності композиційних матеріалів *in vitro*: а) зразок ГА/АН 4:1, б) зразок ГА/АН 3:2, в) зразок ГА/АН 2:3, г) зразок ГА/АН 1:1, д) розчин SBF

Пористість та набухання композитів

Було проведено вивчення ступеня набухання та пористості досліджуваних зразків № 1-4 (табл. 3). Зразок № 5 не був досліджений, оскільки знаходився у вигляді

стабільної емульсії з рівномірним розподілом дисперсної фази (наночастинки ГА) у дисперсійному середовищі. Даний факт не дозволив підготувати тверду форму зразка для дослідження вказаних характеристик.

Таблиця 3

Значення пористості та набухання синтезованих композитних матеріалів

Зразок	Пористість, %	Набухання, %
ГА/АН 4:1 (№ 1)	83±0,38*	105±0,33
ГА/АН 3:2 (№ 2)	41±0,28	117±0,42
ГА/АН 1:1 (№ 3)	38±0,36	130±0,57
ГА/АН 2:3 (№ 4)	35±0,43	221±0,39

* відмінності статистично значимі ($p \leq 0,05$).

Набухання отриманих зразків відбувається за рахунок полімеру та пористості матеріалу. Виходячи з даних таблиці можна сказати, що більшу частку в набухання зразків ГА/АН 3:2, ГА/АН 1:1, ГА/АН 2:3 вносить полімерна складова, оскільки ступінь набухання в декілька раз перевищує пористість матеріалу, окрім зразка ГА/АН 4:1, набухання якого в більшій мірі відбувається за рахунок пористості. Серед усіх досліджених зразків найвищим ступенем набухання володіє зразок ГА/АН 2:3 за рахунок найбільшого вмісту полімеру. Отриманий результат зменшення пористості у зразках зі збільшенням вмісту альгілату є прогнозований, оскільки дослідженню пористості проводилось на виготовлених у кубічній формі та висушених при 37°C зразках, а доданий полімер надає висушеному зразку більш щільної структури.

ВИСНОВКИ

В даній роботі були синтезовані апатит-біополімерні наноструктуровані композитні матеріали для медичного використання з різним співвідношенням полімерної (альгілат натрію) та неорганічної (гідроксиапатит) фаз. Рентгенські спектри підтверджують формування кристалітів гідроксиапатиту в присутності альгілату натрію, розмір яких зменшується із збільшенням кількості альгілату, введеного в реакційну систему при синтезі. Вивчення морфології синтезованих нанокompозитів показало утворення кристалітів ГА голчатої форми з розміром частинок від 50 (№ 4) до 120 (№ 1) нм. У випадку зразка № 5 відбувається утворення наночастинок ГА (розмір кристалітів < 20 нм) в полімерній оболонці, які знаходяться у вигляді стабільної емульсії. Методами рентгенівської дифракції та ІЧ спектроскопії підтверджено міжмолекулярну взаємодію між ГА і АН. Наявність міжмолекулярної взаємодії між неорганічним мінералом та хімічним ланцюгом альгілату забезпечує контрольовану нуклеацію та ріст кристалітів неорганічної фази. Про біоактивність утворених композитних матеріалів свідчить зміна рН розчину SBF із досліджуваними зразками. Дослідження пористості та ступеня набухання показує, що зі збільшенням вмісту полімерної складової пористість композитних матеріалів зменшується, а ступінь набухання збільшується. Це дослідження являє собою платформу для подальших досліджень ГА/АН композитів для біомедичних застосувань.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Materials in particulate form for tissue engineering. Applications in bone / G.A. Silva, O.P. Coutinho, P. Ducheyne, R.L. Reis // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2007. – V. 1., № 2. – P. 97–109.
2. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite / R. Murugan, S. Ramakrishna // Biomaterials. – 2004. – V. 25. – P. 3829–3835.
3. Sacrificial bonds heal bone. Nature / J. Currey // Biomaterials. – 2001. – V. 414. – P. 699–708.

4. Reassessment of long-term use of dense HA as dental implant: case report / M. Ogiso // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1998. – V. 43, № 3. – P. 318–320.
5. Biomimetically synthesized polymer-hydroxyapatite sheet like nano-composite / S. Nayar, A.K. Pramanick, B.K. Sharma, G. Das, B. Ravi Kumar, A. Sinha // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2008. – V. 19, № 1. – P. 301–304.
6. Relationships between polyphosphate chemistry, biochemistry and apatite biomineralization / S.J. Omelon, M.D. Grynypas // *Chem. Rev.* – 2008. – V. 108. – P. 4694–4715.
7. Hydroxyapatite / bioactive glass films produced by a sol–gel method: in vitro behavior / N.C. Koseoglu, A. Buyukaksoy, A.Y. Oral, M.H. Aslan // *Adv. Eng. Mater.* – 2009. – V. 11, № 11. – P. B194– B199.
8. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools / H. Liu, T.J. Webster // *Biomaterials*. – 2007. – V. 28, № 2. – P. 354– 369.
9. Development of nano-sized hydroxyapatite reinforced composites for tissue engineering scaffolds / J. Huang, Y. Wan Lin, X. Wei Fu, S.M. Best [et al.] // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2007. – V. 18. – P. 2151–2157.
10. Performance of adhesive bone cement containing hydroxyapatite particles / S. Morita, K. Furuya, K. Ishihara, N. Nakabayashi // *Biomaterials*. – 1998. – V. 19. – P. 1601–1606.
11. Synthesis and characterization of grafted nanohydroxyapatites using functionalized surface agents / S. Haque, I. Rehman, J.A. Darr // *Langmuir*. – 2007. – V. 23. – P. 6671–6676.
12. Hydroxyapatite-alginate biocomposite promotes bone mineralization in different length scales in vivo / F.L. DePaula, I.C. Barreto, M.H. Rocha-Leao [et al.] // *Frontiers of Materials Science in China*. – 2009. – V. 3. – P. 145–153.
13. Synthesis and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite / collagen / alginate composite / S.M. Zhang, F.Z. Cui, S.S. Liao, Y. Zhu, L. Han // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2003. – V. 14. – P. 641–645.
14. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W / T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1990. – V. 24. – P. 721-734.
15. Chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite (HAp)-poly (ethylene co vinyl alcohol) (EVA) nanocomposite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications / N. Pramanik, S. Mohapatra, P. Bhargava [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C*. – 2009. – V. 29. – P. 228–236.
16. Development of nanocomposites based on hydroxyapatite/sodium alginate: synthesis and characterization / M. Rajkumar, N. Meenakshisundaram, V. Rajendran // *Materials Characterization*. – 2011. – V. 62, N 5. – P. 469–479.
17. Структурні та субструктурні особливості апатит-біополімерних композитів: порівняння даних рентгенівської дифракції та просвічуючої електронної мікроскопії з електронною дифракцією / В.М. Кузнецов, Л.Б. Суходуб, Л.Ф. Суходуб // *Журнал нано- та електронної фізики*. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 04039-1-04039-6. / Strukturni ta substrukturni osoblivosti apatit-biopolimernih kompozitiv: porivnjannja danih rentgeniv's'koї difrakcii ta prosvichujuchoї elektronnoї mikroskopii z elektronnoju difrakcieju / V.M. Kuznecov, L.B. Suhodub, L.F. Suhodub // *Zhurnal nano- ta elektronnoї fiziki*. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 04039-1-04039-6.
18. Mineralization of Chitosan scaffolds with nano-apatite by double diffusion technique / I. Manjubala, S. Sheler, Jorg Bossert, Klaus D. Jandt // *Acta biomaterialia*. – 2006. – V. 2, № 1. – P. 75-84.
19. A novel ordered nanohydroxyapatite coating electrochemically deposited on titanium substrate / R. Hu, C.J. Lin, H.Y. Shi // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2007. – V. 80. – P. 687–692.
20. An alternative chemical route for the synthesis and thermal stability of chemically enriched hydroxyapatite / D. Choi, P.N. Kumta // *J. Am. Ceram. Soc.* – 2006. – V. 89. – P. 444–449.
21. In situ processing and properties of nanostructured hydroxyapatite/alginate composite / L. Wang, Y. Li, C. Li // *J. Nanopart. Res.* – 2009. – V. 11. – P. 691–699.
22. The crystallization of hydroxyapatite in the presence of sodium alginate / P. Malkaj, E. Pierri, E. Dalas // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2005. – V. 16. – P. 733–737.
23. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/b-tricalcium phosphate nanocomposites using microwave irradiation / A. Farzadi, M. Solati-Hashjin, F. Bakhshi, A. Aminian // *Ceramics International*. – 2011. – V. 37. – P. 65 – 71.