

Галузь знань «Матеріалознавство»

Шифр «МЕТАЛГІДРО»

Наукова робота на тему:

**Розробка біополімер-апатитних композитних  
матеріалів з іммобілізованими в їх структуру іонами  
металів**

2020

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	5
РОЗДІЛ 1 КРИСТАЛІЧНА СТРУКТУРА ГІДРОКСИАПАТИТУ, ОСОБЛИВОСТІ ІЗОМОРФНИХ ЗАМІЩЕНЬ .....	7
1.1 Гідроксиапатит – структура та основні властивості .....	8
1.2 Кристалічна структура гідроксиапатита .....	9
1.3 Катіонні ізоморфні заміщення .....	11
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	15
2.1 Матеріали.....	16
2.2 Методи дослідження біокомпозитів та гібридних біоматеріали для медичних застосувань .....	19
2.2.1 Методика рентгеноструктурного аналізу .....	19
2.2.2 Методика електронної растрової (скануючої мікроскопії).....	20
2.2.3 Методи синтезу та вивчення наночастинок ZnS-Alg з антибактеріальними властивостями.....	21
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ.....	23
3.1 Дослідження впливу ізоморфних заміщень на структуру та властивості гідроксиапатиту .....	23
3.2 Дослідження структури та фазового складу КДГАП і Ме-ГА .....	24
3.3. Дослідження морфології зразків за даними SEM.....	27
3.4 Дослідження наночастинок композитного матеріалу з іммобілізованими в їх структуру іонів металів, що мають антибактеріальну властивість.....	28
ВИСНОВКИ.....	31
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ //.....	32

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ**

HA (ГА, кдГА) – гідроксиапатит

КДГАП – кальцій дефіцитний гідроксиапатит

Me – метал

ПЕМ – просвічуюча електронна мікроскопія

ТЕМ – трансмісійна електронна мікроскопія

РФА – рентгенівський флуоресцентний аналіз

Cu-ГА – мідь-заміщений гідроксиапатит

Mg-ГА – магній-заміщений гідроксиапатит

Zn-ГА – цинк-заміщений гідроксиапатит

SEM – скануюча електронна мікроскопія

## ВСТУП

На сучасному етапі розвитку медицини в області хірургії та стоматології для відновлення кісткової тканини людини широко використовуються матеріали на основі фосфатів кальцію (ГА і кдГА). За даними різних досліджень відзначається необхідність у постійному поліпшенні їх фізико-хімічних і біохімічних властивостей. Однак дослідження мінерального комплексу кісткової тканини і можливостей його часткової заміни синтетичною матрицею показали нетривіальність поставленого завдання. Вивчення структурних властивостей і біологічних характеристик різноманітних матеріалів дозволило встановити, що з великого класу найкращі результати по застосуванню мають гідроксиапатит кальцію (ГА)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  і  $\beta$ -трикальцій фосфат ( $\beta$ -ТКФ). Інтерес до гідроксиапатиту кальцію  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  обумовлений тим фактом, що мінеральна складова кісткової тканини включає нанокристали ГАП, які містять в структурі велику кількість сторонніх елементів (Na, Mg, K, Fe, Zn, Cu, Ba, F, Cl, S). Концентрація домішок не перевищує 3-5%, але визначає біологічні і механічні властивості біогенного ГА. У зв'язку з цим створення матеріалів, що моделюють структуру і склад біоапатита, так само як і створення подібних синтетичних матеріалів для відновлення кістки, являють собою складні завдання, які включають основні аспекти фізики конденсованого стану. З цієї точки зору біогенні і синтетичні апатити, що містять домішкові атоми і групи атомів в позиціях структури ГА, розглядаються як тверді розчини заміщення, характеристики яких вимагають всебічного вивчення. Комплексність розглянутих завдань залежить від того, що: по-перше, біоапатит присутній в кістковому матриксі в нанокристалічному стані, по-друге через утворення домішковими елементами в гідроксиапатиті іонних комплексів і груп, що призводять до спотворення кристалічної решітки і як наслідки зміну властивостей ГА, по-третє, через можливе утворення в біогенному і синтетичному матеріалі другої фази за участю домішок.

## РОЗДІЛ 1

### КРИСТАЛІЧНА СТРУКТУРА ГІДРОКСИПАТАТИТУ, ОСОБЛИВОСТІ ІЗОМОРФНИХ ЗАМІЩЕНЬ

Вдосконалення сучасних матеріалів для біомедичних застосувань є найважливішим питанням, що кидає виклик сучасному матеріалознавству та техніці, особливо якщо мова йде про розробку матеріалів, які будуть використовуватися *in vivo*. В даний час різні біоматеріали розробляються і виготовляються з використанням полімерів, металів, кераміки або їх композитів. Оскільки виготовлення скафолдів все частіше включає в себе композитні матеріали з підвищеною біологічною активністю, то бажані механічні та сприятливі для клітин властивості, об'єднані в конструкції, що виготовлені з однієї тканини. В результаті було розроблено кілька прикладів успішних кісткових і хрящових конструкцій з клінічним перекладом, при цьому керамічні та полімерні композити, можливо, мали найбільший успіх. Щоб максимізувати остеогенез і хондрогенез в майбутньому, необхідно домогтися ще більш тісної реплікації природних механічних і біохімічних стимулів, яким піддаються клітини, на додаток до посилення васкуляризації конструкції.

Це може бути досягнуто частково завдяки результатам наукових досліджень в області біоматеріалів, технології виготовлення скафолдів і комп'ютерного моделювання. Більш ефективні методи також необхідні для оптимізації процесу виділення клітин, культивування та посіву в конструкції. В даний час це трудомісткий процес, хоча досягнення в технології біореакторів можуть підвищити ефективність.

Однак найшвидший шлях до успіху може полягати у використанні природного біореактора, що забезпечується нативною кістковою тканиною, яка має виняткову регенеративну здатність. Таким чином, регенерація кісткової і хрящової тканини *in vivo* може бути максимізована в поєднанні з усе більш біологічно активними, анатомічно складними каркасами, здатними рекрутувати клітини-господарі.

## 1.1 Гідроксиапатит – структура та основні властивості

Кісткова тканина людини являє собою складний композиційний матеріал з організованою на декількох рівнях мікроструктурою, що володіє певними механічними властивостями [1, 2, 3]. Головними складовими кісткової тканини є колаген типу I (~ 20%), мінеральна фаза (~ 60%), вода (~ 9%), неколагенові білки (~ 3%), залишок - полісахариди і ліпіди. До мінеральної компоненти відносять так званий біологічний апатит  $(Ca, Na, Mg)_{10}(PO_4, HPO_4, CO_3)_6(OH, F, Cl)_2$ , який представляє собою кальцій фосфатний гідроксиапатит (ГА) з катіонними (магній, натрій) і аніонними (карбонатні групи, хлор і фтор) заміщеннями [4, 5]. Слід зазначити, що в кістковій тканині людини гідроксиапатит присутній у вигляді гексагональної сингонії.

У таблиці 1.1 показано приблизний вміст фізіологічно важливих для життєдіяльності організму іонів в кістках людини.

Таблиця 1.1 Фізіологічний зміст іонів в кістках людини

Іон	Мас. %	Іон	Мас. %
$Ca^{2+}$	36.51	$K^+$	0.03
$PO_4^{3-}$	15.2	$CO_3^{2-}$	7.4
$Na^+$	0.90	$F^-$	0.03
$Mg^{2+}$	0.72	$Cl^-$	0.13

Склад кістки залежить від великої кількості факторів і протягом життя людина може змінюватися [6, 7]. ГА займає важливе місце у багатьох фізіологічних процесах, що відбуваються в організмі людини. Завдяки великій кількості ізоморфних заміщень, стає можливим спрямована зміна властивостей гідроксиапатиту і отримання синтетичних матеріалів з елементним складом, близьким до природної кісткової тканини людини. Оскільки кістковий матрикс людини виконує роль буферної системи для атомів різних металів, то штучні біоматеріали на основі ГА повинні мати різну концентрацію домішок для максимальної відповідності умовам ділянки кісткової тканини, що замінюється [4-9].

Однозначної думки про роль іонних заміщень в фізіології кістки немає. Встановлено, що магній дестабілізує структуру ГА. Карбонові групи є важливими компонентами в біохімічних взаємодіях кісткової тканини з плазмою крові, так як сприяють утворенню ґраткових деформацій, що збільшують резорбіруемість ГА. Іони фтору, заміщаючи гідроксильні групи, навпаки знижують розчинність ГА при значеннях рН, близьких до нейтральних, внаслідок їх більш високої енергії зв'язку з кальцієм в ГА [5, 7]. Передбачається, що натрій необхідний для забезпечення оптимальної структури карбонатомісного ГА [6,7]. Основні показники фізичних властивостей ГА наведені в таблиці 1.2 [3, 6, 10].

Таблиця 1.2 Фізичні властивості синтетичного ГА

<b>Фізичні властивості</b>	<b>Значення</b>
Густина	3.00–3.219 г/см <sup>3</sup>
пористість	0.1–3 %
Параметри кристалічної ґратки	(±0.003 нм)
Постійна ґратки <i>a</i>	9.432–0.9418 нм
Постійна ґратки <i>b</i>	6.881–0.6884 нм
Індекс кристалічності	33–37

## **1.2 Кристалічна структура гідроксиапатита**

Кристалічна структура ГА і його заміщених форм була предметом численних досліджень [1, 2, 4 – 17]. Відомо, що ГА кристалізується в гексагональній сингонії з просторовою групою  $R\bar{6}_3/m$  і параметрами елементарної комірки,  $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,881 \text{ \AA}$ . ГА являє собою шаруватий кристал, що містить більше ста атомів у елементарній комірці.

Згідно [14], кристал ГА має дві структурні підсистеми (рисунок 1.1): першу утворюють Са-канали з групами  $\text{OH}^-$  всередині них, а друга - являє собою остовий каркас (ОК), в який іони  $\text{X}^-$   $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$  можуть впроваджуватися з малою вірогідністю, а такі іони, як  $\text{CO}_3^{2-}$ , можуть ізоморфно заміщати  $\text{PO}_4^{3-}$

групи. Групи  $[\text{PO}_4]$  утворюють тетраедри із середнім відстанню  $R_e(\text{P-O}) = 1,53 \pm 0,02 \text{ \AA}$ . Атоми Ca займають у структурі ГА два кристалографічно незалежних положення. Що знаходиться в положенні 2 атом Ca оточений шістьма атомами кисню, що належать групам  $\text{PO}_4^{3-}$  і  $\text{OH}$ , в той час як атом Ca, що займає положення 1, має оточення атомами кисню, близьке до октаедричного. Атоми Ca в положенні 2 утворюють трикутник в площині, перпендикулярній осі c. Трикутники повернені один відносно одного на  $60^\circ$  уздовж цієї осі. У фторапатітовій структурі атоми F розміщені в центрі таких трикутників, у разі ж ГА групи  $\text{OH}$  розташовуються трохи вище або нижче центру. Атоми P оточені чотирма атомами O і утворюють тетраедр майже правильної форми, лише з невеликим спотворенням. При досить складній координації атомів Ca в осередку ГА утворюються 75 зв'язків Ca-O (без урахування зв'язків з киснем іона гідроксилу), 24 зв'язку P-O, 6 зв'язків Ca-OH і 2 зв'язку OH. Гідроксилапатити [15] легко обмінюються з навколишнім середовищем, у результаті чого в їх складі можуть з'являтися інші іони. Найбільш часто зустрічаються такі варіанти обміну іонів:  $\text{Ca}^{2+}$  заміщається катіонами  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mo}^{2+}$ , рідше  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ . Катіони  $\text{Ca}^{2+}$  поверхневого шару кристалів можуть на короткий час заміщатися катіонами  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ; іони- $\text{PO}_4^{3-}$  обмінюються з  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ; іони-OH - заміщаються аніонами галогенів  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ . У випадку стехіометричного ГА, співвідношення Ca/P становить 10:6 (або 1,67), що є чистою стійкою фазою ГА. Коли співвідношення Ca/P знаходиться в інтервалі 1,5-1,67, утворюється кальцій-гідроксиапатит.

Дослідження точного складу ГА на основі хімічного аналізу проводилися ще в першій половині 18 століття, але лише через століття було введено сучасну концепцію наявності різних кристалічних фаз CaP [15]. Розуміння точної хімічної структури та складу ГА дозволило оптимізувати процес синтезу, під час якого покращені функціональні можливості або спеціальні властивості можуть бути відновлені до кінцевого продукту. Величезний вплив на хіміко-біологічні властивості гідроксилапатиту мають катіонні заміщення в його структурі.



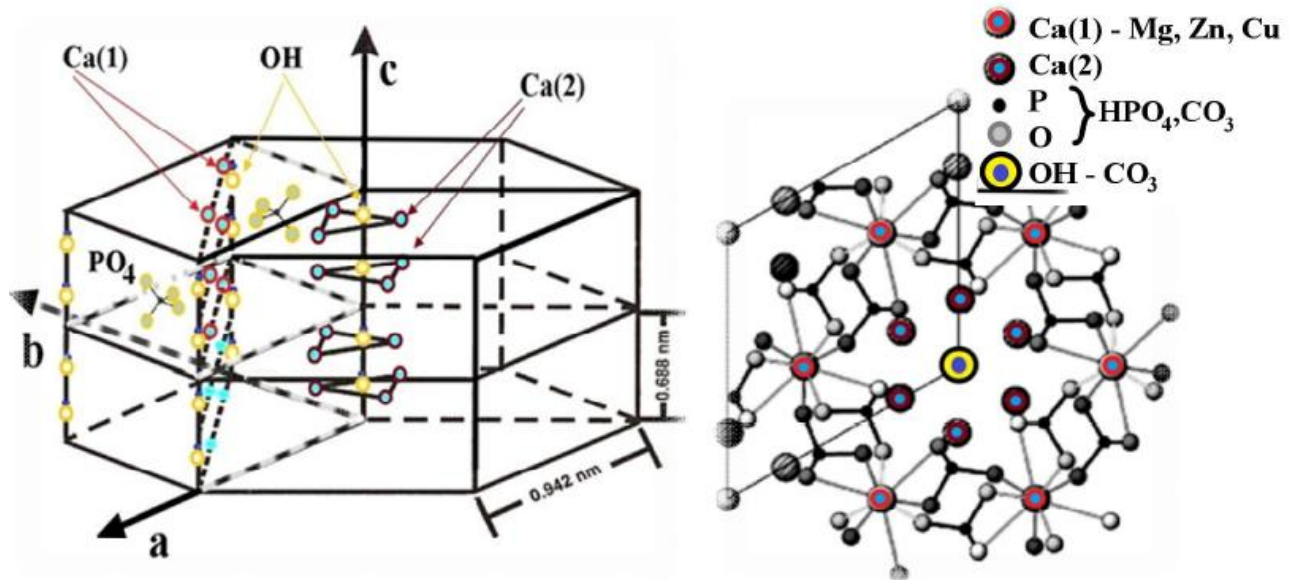


Рисунок 1.1 Об'ємне уявлення молекули гідроксиапатиту [1]

### 1.3 Катіонні ізоморфні заміщення

Елементи кристалічної ґратки апатитів можуть обмінюватися з іонами розчину, що оточує кристал, і змінюватися за рахунок іонів, що знаходяться в цьому розчині. У живих системах ця властивість апатитів робить їх високочутливими до іонного складу крові і міжклітинної рідини. У свою чергу, іонний склад крові і міжклітинної рідини залежить від характеру їжі і води, що споживається. Сам процес заміщення елементів кристалічної решітки протікає в кілька етапів з різною швидкістю. Обмін іонів в кристалічній ґратці гідроксиапатита змінює його властивості, у тому числі міцність, і істотно впливає на розміри кристалів. Деякі іони ( $K^+$ ,  $Cl^-$ ) протягом декількох хвилин шляхом дифузії з навколишньої біологічної рідини заходять в гідратний шар гідроксиапатита, а потім також легко його залишають. Інші іони ( $Na^+$ ,  $F^-$ ) легко проникають в гідратну оболонку і, не затримуючись, вбудовуються в поверхневі шари кристала. Проникнення іонів  $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $F^-$  в поверхню кристалів гідроксиапатиту з гідратного шару відбувається дуже повільно, протягом декількох годин. Лише поодинокі іони ( $Ca^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $F^-$ ) вбудовуються всередину іонної ґратки. Це може тривати від кількох днів до кількох місяців. Переважним фактором, що визначає можливість заміни, є розмір атома. Схожість в зарядах має другорядне значення. Такий принцип заміни носить назву ізоморфного заміщення. Проте, в ході такого

заміщення підтримується загальний розподіл зарядів за принципом:  $\text{Ca}_{10x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6x}(\text{OH})_2$ , де  $0 < x < 1$ . Втрата  $\text{Ca}^{2+}$  частково компенсується втратою  $\text{OH}$  і частково  $\text{H}$ , приєднаних до фосфату кальцію.

Для катіонних заміщень велике значення має фактор розмірної подібності катіона, що заміщає катіон кальцію. У таблиці 1.3 наведені іонні радіуси деяких катіонів за Гольдшмідт [3].

Таблиця 1.3 – Іонні радіуси деяких катіонів

Іон	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Ag}^+$	$\text{Ag}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$
Ефективний радіус, Å	1.06	0.78	0.98	1.33	1.13	1.01	0.83

Здатність до заміщення в аніонній та катіонній підгратках ГА і мінливість структурних характеристик і фізико-хімічних властивостей, що походить з цього є предметами численних досліджень. З точки зору утворення вакансій біогенні та синтетичні апатити, які містять домішкові атоми і групи атомів в позиціях структури ГА, розглядають як тверді розчини заміщення [3, 8].

Синтетичний ГА у вигляді порошку можна отримати, використовуючи різні хімічні методи, як безводні «сухі», так і «мокрі» [1-3]. Безводні методи використовуються у твердотільних реакціях між сполуками кальцію і фосфору для отримання стехіометричних порошоків ( $\text{Ca/P} = 1,67$ ). У «мокрих» хімічних методах використовують або осадження в змішаних водних розчинах, або гідроліз фосфатів кальцію. Отримані порошки ГА характеризуються значною площею поверхні та малим розміром частинок. Кристалічність та  $\text{Ca/P}$ -відношення залежить від рН, температури, типу та концентрації реагуючих компонентів. Для синтезу осадженням джерелом кальцію є  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ , а джерелом фосфору відповідно  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$  та її натрієві або калієві солі. Синтез проходить при  $\text{pH} > 7$  з використанням водного розчину аміаку або розчину їдкого натрію з подальшим пропусканням газоподібного азоту для видалення карбонат-іонів [14]. Імпланти з покриттям ГА широко використовуються та показали свою ефективність шляхом підвищення стійкості імплантатів внаслідок кращої

остеопровідності та інтеграції імплантату з кістковою тканиною [7, 12]. Незважаючи на свої сприятливі властивості регенерації кістки, обмеження на використання чистої кераміки ГА існують через її низькі механічних властивостей (в тому числі низької міцності і міцності на розрив, а також низькою зносостійкості) в умовах високого навантаження. Хімічний склад і кінцева структура ГА можуть бути адаптовані за допомогою коригування хімічних складів та попередників реакції осадження ГА. Можливість включення сторонніх іонів у хімічну структуру гідроксиапатиту може пояснити, чому кістки також функціонують як високоефективна зона зберігання іонів.

Коли ГА стикається з фізіологічними рідинами, відбувається ряд хімічних реакцій, що призводять до утворення нових кісток, що також називається остеопровідним процесом. Біоактивний ГА запускає низку процесів реформації на поверхні матеріалу, під час яких взаємодія ГА з кісткою та наступні реакції, що призводять до осадження іонів та утворення природних та біологічно еквівалентних кісток. Як один із помітних ефектів ГА, він здатний поліпшити формування кісток між проміжками навколо імплантату, а також здатний перетворювати індуковану рухом фіброзну мембрану в кісткове кріплення. Встановлено, що ГА може ініціювати нову генерацію кісток за допомогою механізму остеокондукції без наявності запалення, системної токсичності або реакції чужорідного тіла. Після імплантації матеріалу на основі ГА, волокниста тканина, що складається з газованого апатиту, матеріалізується на поверхні і встановлює зв'язок між імплантатом і природною кісткою. Це призводить до фіксації та стабілізації імплантату в тканинному середовищі.

## *Висновки*

1. Отримання ортофосфатів кальцію певної модифікації викликано близькістю структури штучних матеріалів і природних твердих тканин людини. Одним з головних завдань в дослідженні таких питань є вивчення активності одержуваних матеріалів, зокрема, іонного обміну синтезованих зразків в живих тканинах. У сучасному біоматеріалознавстві гідроксиapatит кальцію  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  – є матеріалом, який виявляє найкращі остеокондуктивні властивості за рахунок особливостей будови та морфології. Катіонні заміщення в структурі ГА здатні викликати зміни в параметрах кристалічної ґратки і ступень кристалічності, який, як відомо, істотно впливає на розчинність ГА в фізіологічних умовах.

2. Аналіз зазначених у літературному огляді джерел показує досить широке коло як фундаментальних, так і прикладних робіт з дослідження ГА. Ряд дослідників припускає, що навмисне введення іонів металів в решітку синтетичних зразків гідроксиapatиту може призводити не тільки до поліпшення біосумісності, а й до зміни структурно обумовлених властивостей даних матеріалів. Однак питання, пов'язані з властивостями та структурою, що виникають при заміщенні ГА певним видом металів (Zn, Cu, Mg) у процесі хімічного осадження з розчину, залишаються відкритими. Не виконані точні вимірювання параметрів решітки, у повному обсязі відсутні систематизовані дані про зміну фізико-хімічних властивостей гідроксиapatиту кальцію при включенні у структуру іонів металів та антибактеріальні властивості їх наночастинок.

На підставі викладеного, метою цієї роботи є: встановлення закономірностей зміни структури, елементного складу гідроксиapatиту при заміщенні в його кристалічній ґратці атомів кальцію атомами металів Zn, Cu, Mg у процесі його осадження з рідкої фази, а також дослідження антибактеріальних властивостей наночастинок ZnS-Alg з використанням чистих культур мікроорганізмів.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для отримання зразків кальцій-дефіцитного та метал-заміщеного гідроксиapatиту кальцію і встановлення залежності фізико-хімічних властивостей даних матеріалів від ступеня заміщення атомів кальцію атомами різних металів, перш за все, були розглянуті роботи [4 – 6], в яких проводилися дослідження по отриманню Ме-ГА методом жидкофазного осадження. На підставі даних літературних джерел була обрана методика отримання, а також етапи термообробки зразків у даному дослідженні.

Бездомішковий кальцій-дефіцитний гідроксиapatит (КДГАП) отримували методом хімічного осадження з розчину за методикою, описаною в роботах [9, 11, 12] і представленої схематично на рисунку 2.1.

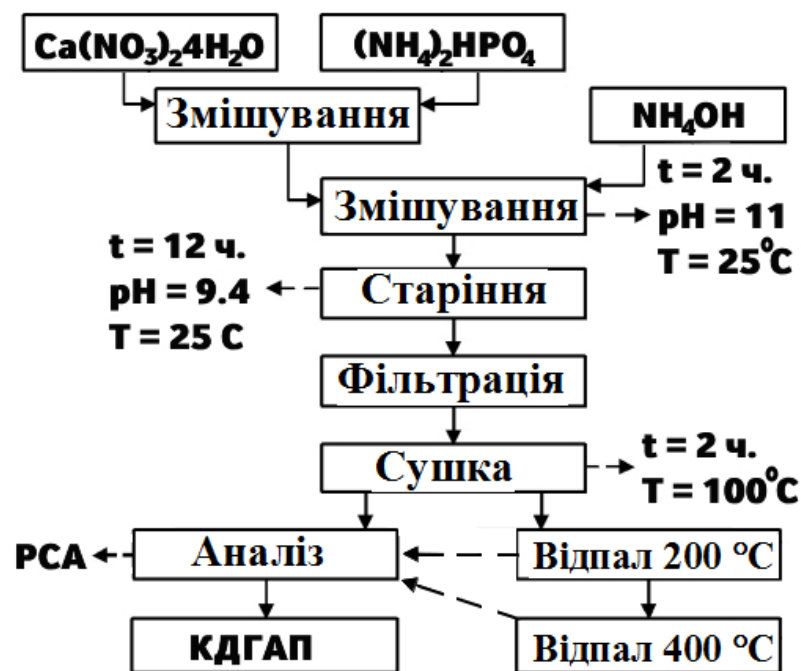


Рисунок 2.1 Схема отримання нанокристалічних зразків кальцій-дефіцитного гідроксиapatиту (КДГАП).

На рисунку 2.2 показана схема для отримання зразків магній- мідь-і цинк-заміщеного ГА (МеГА).

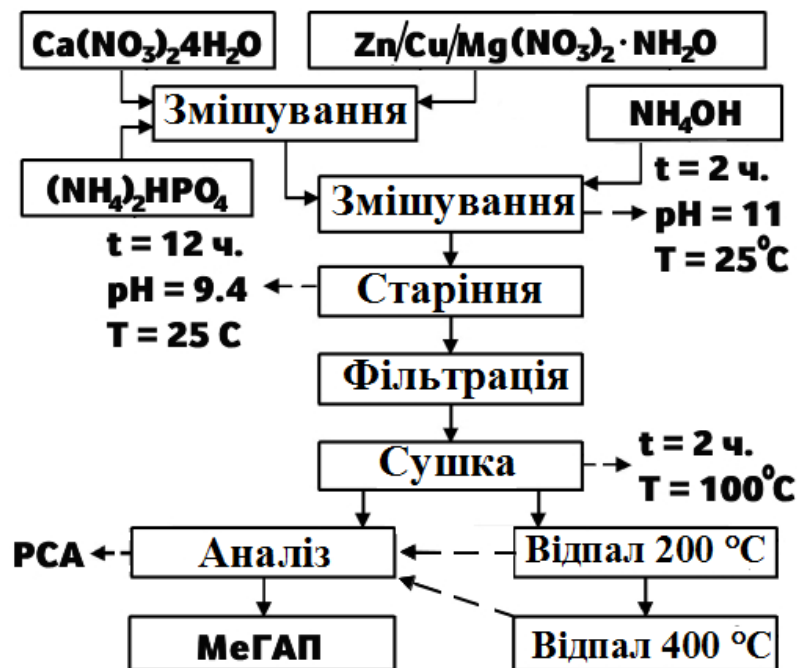
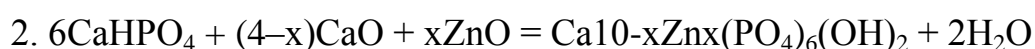


Рисунок 2.2 Схема отримання нанокристалічних зразків Ме-ГА

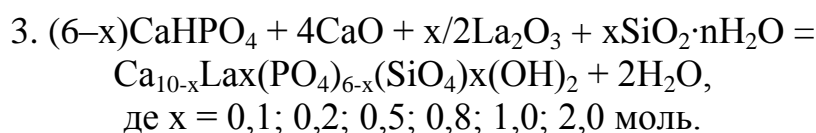
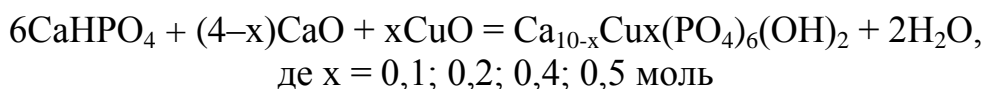
## 2.1 Матеріали

Тетрагідрат нітрату кальцію 0,167 М ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), гідрофосфат амонію 0,1М ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), гідроксид амонію ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) («ХЧ», «Merck»); 1% водний розчин альгінату натрію (Mr 15 кДа, (E401), Китай); 0,5 М розчини солей металів: сульфату міді  $\text{CuSO}_4$ , хлориду кальцію  $\text{CaCl}_2$ , сульфату магнію  $\text{MgSO}_4$ , хлориду алюмінію  $\text{AlCl}_3$ , сульфату цинку  $\text{ZnSO}_4$ .

ГА є основним компонентом синтезованих композитів. Синтез відбувався за класичною технологією згідно послідовності наступних реакцій:



або



Для створення оптимальних для синтезу значень рН (рН 10,5) у реакційне середовище додавали 25% розчин  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Далі проводили нагрівання реакційної суміші до  $80^\circ\text{C}$  (10 хвилин) з наступним «зістарюванням»

(24 години). Після цих процедур проводили ретельну промивкою осаду. Для відділення утвореного гідрогелю ГА від дисперсійного середовища проводили центрифугування (3000 об/хв, 5 хв). Вологість отриманого гідрогелю ГА склала 90 %. Для дослідження ГА методом рентгенівської дифракції частину синтезованого продукту відпалювали (400°C, 60 хвилин). Зображення ряду зразків приведено на рисунку 2.3. Аналіз результатів рентгенівської дифракції (XRD-аналіз) підтвердив наявність гідроксиапатиту (JCPDS 00-024-0033) (рис. 2.4). Структурні характеристики ГА, які були розраховані за допомогою XRD-аналізу, наведені у таблиці 2.1.

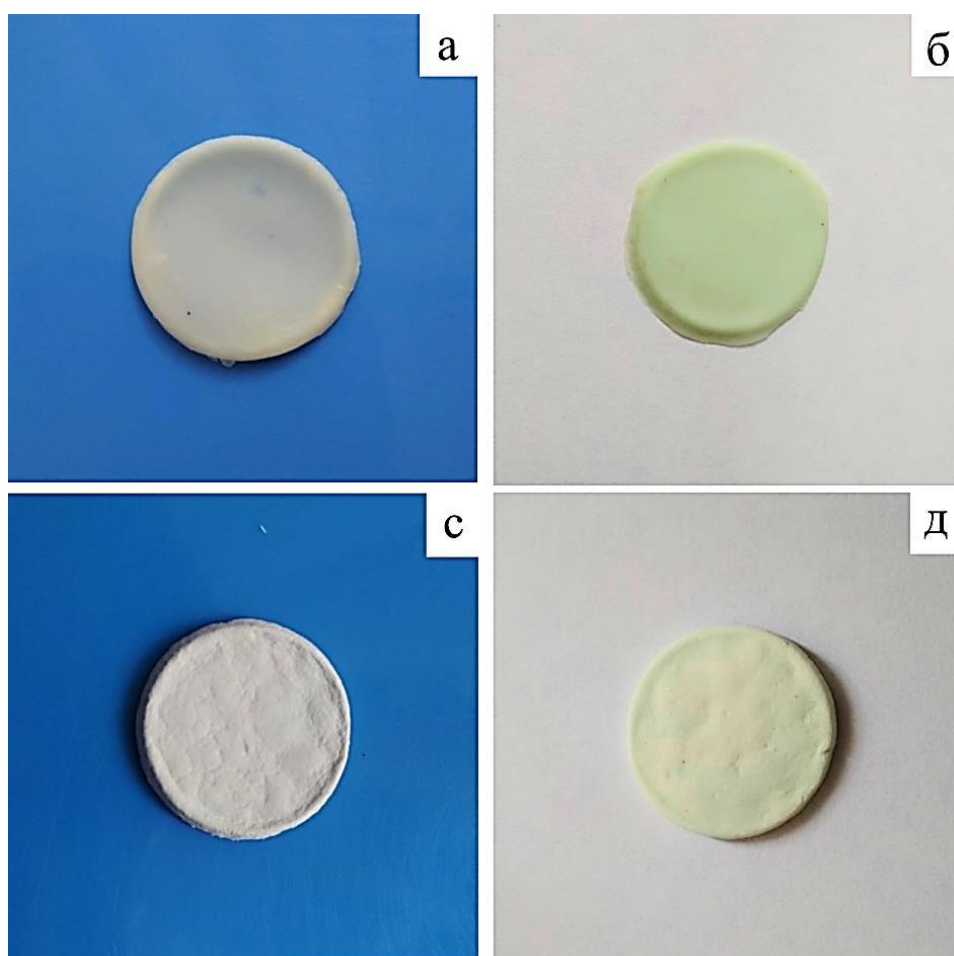


Рисунок 2.3 Зразки композитних матеріалів на основі ГА, альгінату та іонів металів, висушені при кімнатній температурі та відповідно, ліофілізовані при  $-53^{\circ}\text{C}$ .

На рисунку 2.5 наведені типові ПЕМ-зображення синтезованого ГА стехіометричного складу з співвідношенням  $\text{Ca} / \text{P} = 1,67$ .

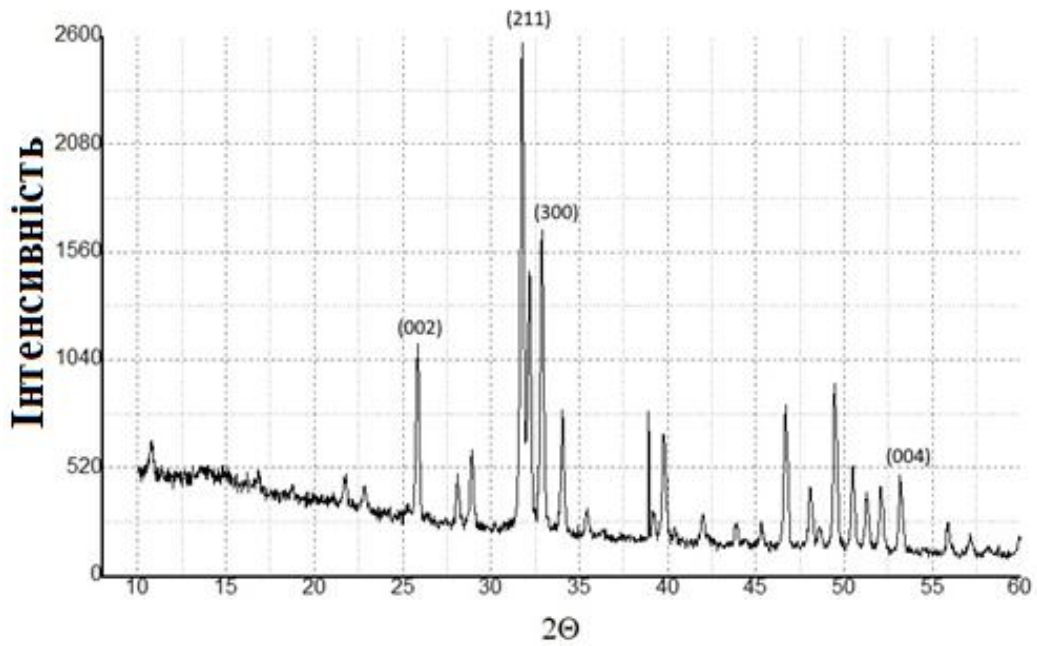


Рисунок 2.4 Дифрактограма зразка гідроксиapatиту, який синтезований при рН=10,5 та відпалений при температурі 400 °С.

Таблиця 2.1 – Структурні характеристики ГА.

Умови отримання		Параметри кристалічної ґратки			Склад, %		Ca /P
р Н	t , оС	a, нм	c, нм	L, нм	H A	b- TCP	
1 0,5	8 0	9,42	6,88	50,16	1 00	0	1,6 6

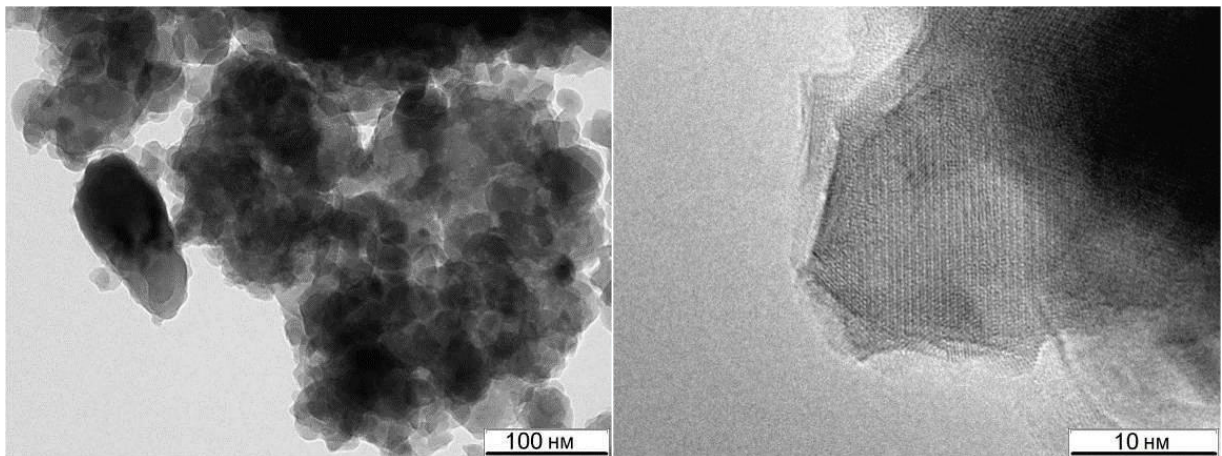


Рисунок 2.5 ПЕМ – зображення частинок синтезованого ГА стехіометричного складу  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$



## **2.2 Методи дослідження біокомпозитів та гібридних біоматеріали для медичних застосувань**

Матеріали на основі ГА є аналогами неорганічної складової кістки людини, тому необхідно досліджувати в першу чергу такі їх властивості, які дозволять нам порівнювати наші зразки з натуральної кістковою тканиною. Такі характеристики речовин (матеріалів), як фазовий склад, структура, морфологія, розчинність (біорезорбіруемість), пористість, поведінка у внутрішньому середовищі організму повинні бути максимально близькими до властивостей натуральної кістки. Дослідження проводилися у сумському центрі колективного користування науковим обладнанням «Лабораторія матеріалознавства геліоенергетичних, сенсорних та наноелектронних систем», який створений на виконання наказу Міністерства освіти і науки України від 02 травня 2018 р. № 444 «Про створення центрів колективного користування науковим обладнанням» та є структурним підрозділом науково-дослідної частини Сумського державного університету.

### **2.2.1 Методика рентгеноструктурного аналізу**

Рентгеноструктурний аналіз синтезованих фосфатів кальцію проводився на автоматизованому дифрактометрі ДРОН-3 (рис. 2.6). Дифрактограми отримували «методом порошку». Зйомка дифрактограм проводилася в інтервалі кутів  $2\theta$  від  $10^\circ$  до  $60^\circ$ . Метод рентгенівської дифракції (RD) дозволяє визначити ідентифікацію фаз, провести вимірювання ступеня кристалічності, розміру кристаліту, а також розрахувати параметри решітки отриманих зразків, що включає в себе просторову групу елементарної комірки, її розміри і форму, а також визначити групу симетрії кристала. Основу рентгенофазового аналізу становлять принципи дифракції хвиль при їх проходженні через кристалічну речовину. Кристали різних з'єднань є для рентгенівського випромінювання дифракційною решіткою з певними параметрами [1, 10, 15].



Рисунок 2.6 Рентгенівський дифрактометр ДРОН-3 (СумДУ)

Внаслідок цього будь-які спотворення кристалічної структури зразка через наявність дефектів або зміни фазового складу можна виявити і зареєструвати. Основним рівнянням, що описує дифракцію рентгенівських променів і зв'язує основні величини в рентгеноструктурном аналізі, є формула Вульфа-Брегга (2.1):

$$2d_{hkl} \cdot \sin \Theta = n \cdot \lambda \quad (2.1),$$

где  $d_{hkl}$  – межплоскостна відстань у кристалі з індексами Міллера (hkl);

$\Theta$  – кут між падаючим та відхиленим променем і площиною (hkl),

$\lambda$  – довжина хвилі рентгенівського випромінювання,

$n$  – порядок відображення.

### **2.2.2 Методика електронної растрової (скануючої мікроскопії)**

Для дослідження морфології зразків використовується метод скануючої електронної мікроскопії (SEM) (рис. 2.7). Даний метод зручний при аналізі змін морфології, що відбуваються в іономодифікованих зразках ГА [5, 6, 9, 13]. Такі дані дослідження необхідні при вивченні розвиненості поверхні матеріалу, наявності пір, визначення розмірів агломератів.

Порівняльний аналіз зразків методом SEM дає наочну інформацію про характер і розмір часток, що складають зразок. Принцип SEM полягає в скануванні ділянки досліджуваного зразка узкосфокусованим електронним зондом і детектуванні при цьому сигналів [5, 7, 10].

Режим роботи: низький вакуум; діапазон збільшень від  $\times 30$  до  $\times 9\,000$ ; прискорювальна напруга - 5-10 кВ; види контрасту - вторинні електрони, дозвіл - 5–500 мкн.

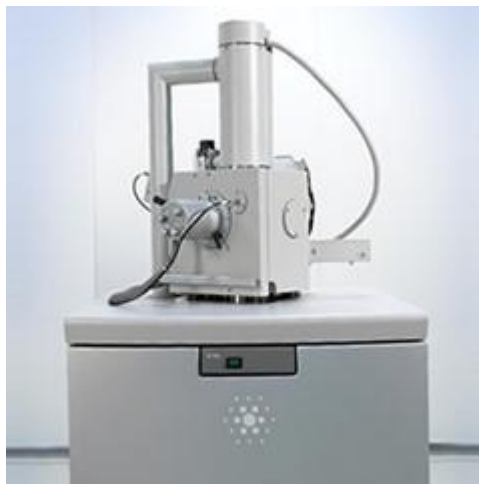


Рисунок 2.7 Скануючий електронний мікроскоп SEO-SEM Inspect S50-B (СумДУ)

### **2.2.3 Методи синтезу та вивчення наночастинок ZnS-Alg з антибактеріальними властивостями**

Композитний матеріал з сульфідом цинку був отриманий методом хімічного осадження з водного розчину [1, 18]. Попередником слугувала суміш нітрату цинку та тіосечовини (у кількості 1: 1). Для підвищення рН до 8 до суміші додавали розчин аміаку. Температуру хімічного реактору для синтезу підтримували на рівні 90°C. Для утворення композиту сульфїду цинку з альгїнатом (ZnS-Alg) до суміші додавали 3 % -розчин альгїнату натрію.

Дослідження мінерального складу отриманого наноматеріалу проводилось за допомогою рентгенівського флуоресцентного аналізу (РФА) за допомогою рентгенівського спектрометра «ElvaX Light SDD» (Україна). Зразки для елементарного аналізу композиту ZnS-Alg готували стандартним методом.

Спектри записувались у «легкому» та «жорсткому» режимах. Час накопичення спектра становив 120 сек. Морфологічні дослідження композиційної структури ZnS-Alg проводили методом трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ). Зразки для ТЕМ готували шляхом осадження ізопропілового спиртового розчину ZnS-Alg на мідну сітку, покриту тонкою вугільною плівкою. Після цього зразки висушували на повітрі при кімнатній температурі. ТЕМ-аналізи проводили за допомогою «РЕМ-125k» (Україна).

Антибактеріальні властивості наночастинок ZnS-Alg були вивчені з використанням чистих культур мікроорганізмів *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae*, які відіграють важливу роль у розвитку запальних ранових ускладнень. Антибактеріальну активність досліджуваного зразка вивчали шляхом нанесення суспензії тестових культур на поверхню щільного живильного середовища з додаванням суспензії ZnS-Alg. Колонії мікроорганізмів підраховували після інкубації протягом 24 годин при  $37 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , кількість яких відповідає кількості життєздатних клітин досліджуваних культур. Для контролю експерименту випробувані штами мікроорганізмів були осажені в однаковій кількості на культуральному середовищі, доповненому суспензією ZnS та Alg. Експеримент проводили десять разів для кожної досліджуваної культури.

### *Висновки*

Об'єктами дослідження в даній роботі є зразки кальцій-дефіцитного гідроксиapatиту  $\text{Ca}_{10-x} ((\text{HPO}_4)_y (\text{PO}_4)_{1-y})_6 (\text{OH})_2$  і металзамещеного гідроксиapatиту  $\text{Ca}_{10-x-z}\text{Me}_{x-z} ((\text{HPO}_4)_y (\text{PO}_4)_{1-y})_6 (\text{OH})_2$ , що отримані методом хімічного осадження з розчину.

Для отримання метал-заміщених зразків гідроксиapatиту використовувалися концентрації розчинів, відповідні заміщення атомів кальцію атомами Zn, Cu, Mg у кількості 1,3,5 ат%.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Дослідження впливу ізоморфних заміщень на структуру та властивості гідроксиапатиту

*Гідроксиапатит, що містить іони цинку та міді*

Для описання механізму встраивання іонів цинку або міді в катіонну подрешетку структури ГА необхідно нагадати, що ГА кристалізується в гексагональній сингонії з просторовою групою  $P6_3/m$  [1, 10, 14, 16]. Катиони  $Ca^{2+}$  займають в структурі ГА дві кристаллографічно різні позиції (рис. 1.1). Кальцій першої позиції Ca1 з симетрією  $C_3$  координований дев'ятьма іонами кисню фосфатних груп. Кальцій другої позиції Ca2 з симетрією  $C_{1h}$  пов'язаний з шістьма іонами кисню фосфатних груп і одним іоном кисню ОН-групи, утворюючи семівершинник – осевий канал. Трикутники з катіонів Ca2 лежать в дзеркальних площинах при  $z = 1/4$  і  $z = 3/4$  з гвинтовими осями  $6_3$  (гексагональна вісь  $c$ ) в їх центрі.

Описуючи механізм вбудовування іонів цинку або міді в катіонну підгратку структури ГА необхідно згадати, що ГА кристалізується в гексагональній сингонії з просторовою групою  $P6_3/m$  [6, 10, 14]. Катіони  $Ca^{2+}$  займають у структурі ГА дві кристаллографічно різні позиції (рис. 1.1). Кальцій першої позиції Ca1 з симетрією  $C_3$  координований дев'ятьма іонами кисню фосфатних груп. Кальцій другої позиції Ca2 з симетрією  $C_{1h}$  пов'язаний з шістьма іонами кисню фосфатних груп і одним іоном кисню ОН-групи, утворюючи семівершинник – осевий канал. Трикутники з катіонів Ca2 лежать в дзеркальних площинах при  $z = 1/4$  і  $z = 3/4$  з гвинтовими осями  $6_3$  (гексагональна вісь  $c$ ) в їх центрі. Вбудовування катіонів  $Zn^{2+}$  або  $Cu^{2+}$  у структуру ГА відбувається за механізмом ізовалентного заміщення зі збереженням зарядності катіона-заступника, коли двозарядні іони  $Zn^{2+}$  або  $Cu^{2+}$  вбудовуються в позиції Ca1 або Ca2 двозарядного катіона  $Ca^{2+}$  (рис. 3.1). Слід зазначити, що на здатність ГА до ізоморфного заміщення великий вплив робить розмірний фактор, який визначається за іонним радіусів.

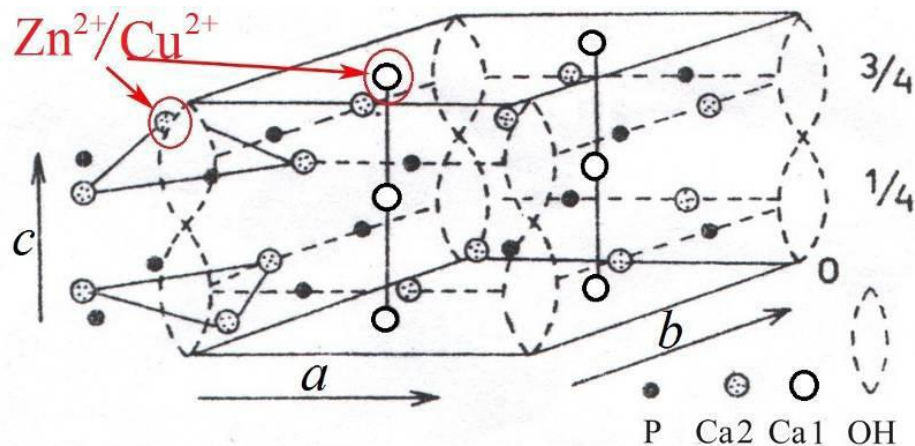


Рисунок 3.1 Схема елементарної ґратки ГА з можливими локалізаціями іонів-ізоморфних заміщень  $Zn^{2+}$  або  $Cu^{2+}$ [6]

### 3.2 Дослідження структури та фазового складу КДГАП і Ме-ГА

За результатами XRD визначено елементний склад модифікованих ГА.

Розподіл елементів модифікуючих іонів по поверхні зразків відбувається рівномірно, локальні неоднорідні зони відсутні. Відношення Ca/P в зразках знаходиться в межах 1.66-1.77, що практично відповідає стехіометричному співвідношенню в біогенному ГА (1,67).

#### *Цинк-заміщений КДГАП (Zn-ГА)*

Аналіз фазового складу зразків Zn-ГА (рис. 3.2), отриманих концентраціями (1, 3, 5%) і відпалених при 400 °С, показав, що весь набір міжплощинних відстаней відноситься до твердого розчину гідроксиapatиту кальцію. На дифрактограмах порошків ГА не спостерігається зрушення дифракційних максимумів і зменшення їх інтенсивності при збільшенні введеної концентрації Zn (рис. 3.2). При рідинному способі отримання гідроксиapatиту температура відпалу 400 °С КДГАП є верхньою межею його температурної стабільності. Було встановлено, що допірування цинком не приводить до зміни температурної стабільності гідроксиapatиту.

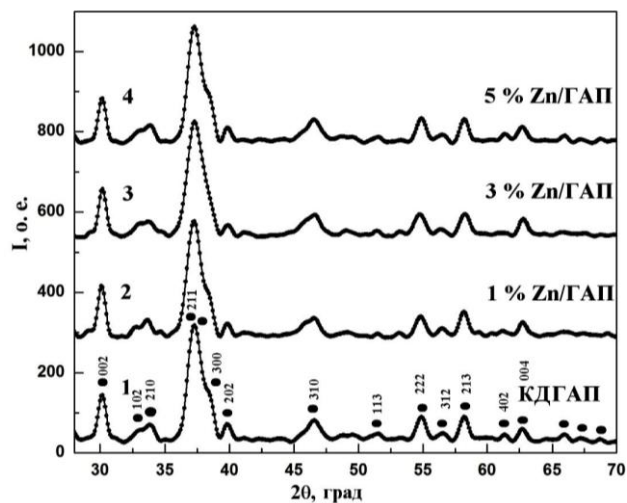


Рисунок 3.2 Дифрактограми отриманих матеріалів КДГАП та Zn-ГА з концентраціями Zn 1, 3, 5 % відпалених при 400 °С

*Мідь-заміщені КДГАП (Cu-ГА).*

На рисунку 3.3 представлені дифрактограми зразків КДГАП та Cu-ГА, відпалених при максимальній температурі 400 °С. Результати рентгенівської дифрактометрії встановлюють утворення другої фази  $\text{Ca}_{19}\text{Cu}_2\text{H}_2(\text{PO}_4)_{14}$  в зразках з концентрацією міді 3 і 5%. Інтенсивність дифракційних ліній другої фази для зразків Cu-ГА стає порівнянна з лініями КДГА, що свідчить про збільшення частки другої фази в зразку Cu-ГА 5% зі збільшенням температури відпалу. Більш того, при цій температурі відпалу друга фаза з'являється і в зразку Cu-ГА 3%.

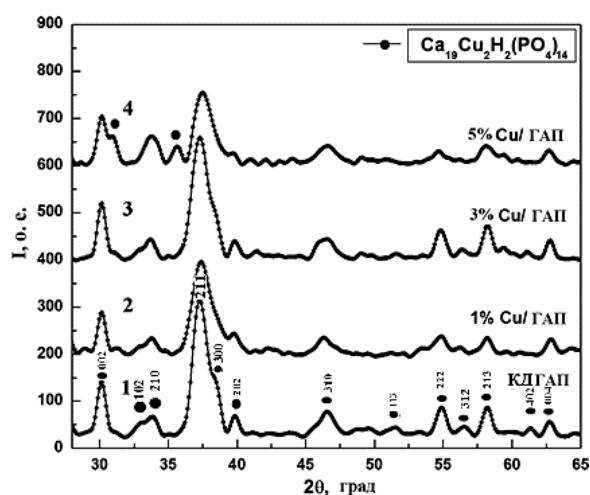


Рисунок 3.3 Дифрактограми матеріалів КДГАП і Cu-ГАП з закладається концентрацією Cu 1, 3, 5% і відпалених при 400 °С

Слід зазначити, що для зразків Zn-ГАП не спостерігалось присутності других фаз навіть при максимальних концентраціях (5%). Така відмінність у

поведінці Me-ГА при заміщенні атомів кальцію в ґратці ГА різними металами Zn і Cu може пояснюватися істотною відмінністю їх електронної будови. Електронна будова останніх оболонок атомів міді Cu  $3d^{10}4s^1$  дозволяє виявляти їм як двовалентний стан в гексагональній фазі твердого розчину  $\text{Ca}_{10-x-z}\text{Cu}_z(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , так і одновалентний стан в іншій фазі  $\text{Ca}_{19}\text{Cu}_2\text{H}_2(\text{PO}_4)_{14}$ .

#### *Магній-заміщені ГА (Mg-ГА)*

Особливістю дифрактограм магній-заміщених ГА, які отримані з концентраціями 1, 3, 5% і відпалені при  $400^\circ\text{C}$  (рисунок 3.4) є наявність значного числа рентгенодифракційних ліній, що відносяться до гідроксиапатиту, а також поділ ліній (112), (211) і (300). Це свідчить про значне збільшення розмірів нанокристалів у процесі відпалу. Результати досліджень, показують закономірність, що збільшення температури відпалу до  $400^\circ\text{C}$  призводить до зростання розмірів нанокристалів в середньому в 1,5 рази.

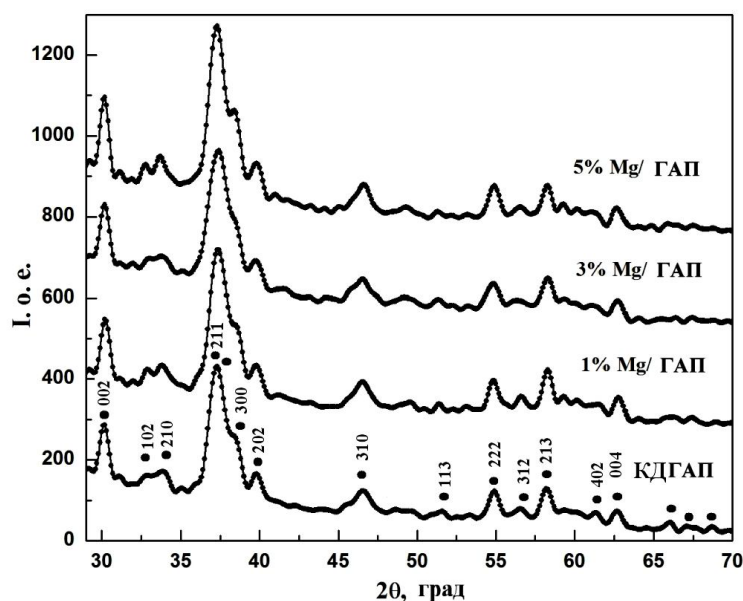


Рисунок 3.4 Дифрактограми отриманих матеріалів КДГАП і Mg-ГА з концентрацією Mg 1, 3, 5% відпалених при  $400^\circ\text{C}$ .

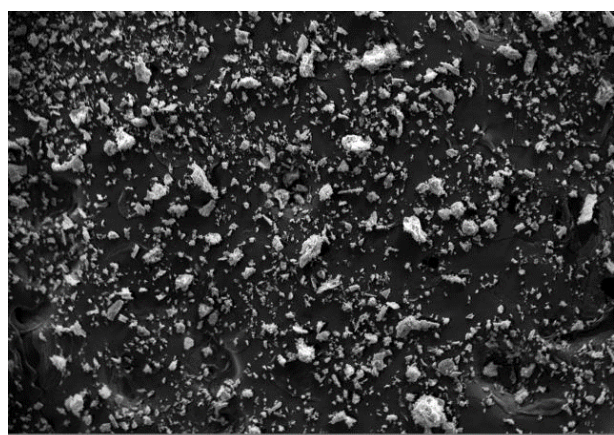
### **3.3. Дослідження морфології зразків за даними SEM**

Особливості морфології бездомішкових та метал-заміщених кальцій-дефіцитних зразків гідроксиапатиту досліджувалися методом SEM. На рисунках 3.5 представлені SEM зображення поверхні всіх груп зразків, що

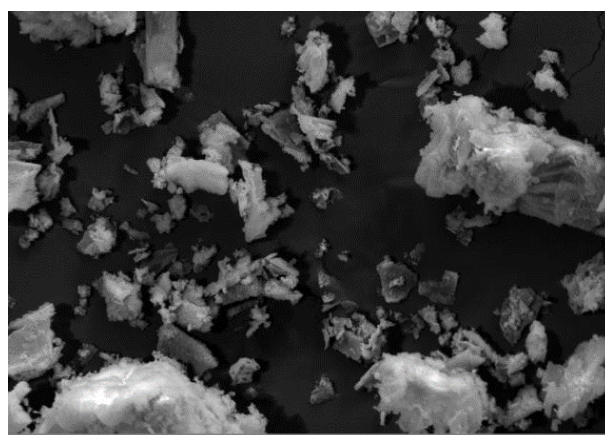


готувалися в різних умовах. Найбільш щільну морфологію має ліофілізований зразок кальцій-дефіцитного гідроксиапатиту; зразок – Cu-ГА пористу морфологію; Zn-ГА має найбільш однорідну і пористу морфологію. Вибрані мікрофотографії є типовими зображеннями даних матеріалів. При збільшенні у всіх зразках спостерігається наявність великих глобул різних розмірів. У бездомішковому зразку КДГАП розмір агломератів варіюється в найбільш широких межах від 1 до 40 мкм (рисунок 3.5, а, б). При збільшенні на поверхні зразка Cu-ГА, виявляється складна будову агломератів, які відповідно до даних рентгенофазового аналізу, складаються з безлічі нанокристалів із середніми розмірами ~ 50 нм. Морфологія, подібна КДГАП, спостерігається і в зразках Mg-ГА. Це означає, що для обраних матеріалів внесення атомів металів магнію в кристалічну решітку ГА не змінює морфологію матеріалів Mg-ГА в порівнянні з КДГАП.

Зіставлення SEM зображень для КДГАП, Zn-ГА і Cu-ГА встановило, що для зразків Cu-ГАП розмір агломератів (при збільшенні) збільшується в середньому до 20 мкм (рисунок 3.5, d, f).



WD=14.3mm 20.00kV x50.0 1mm a)



WD=14.7mm 20.00kV x500 100µm b)

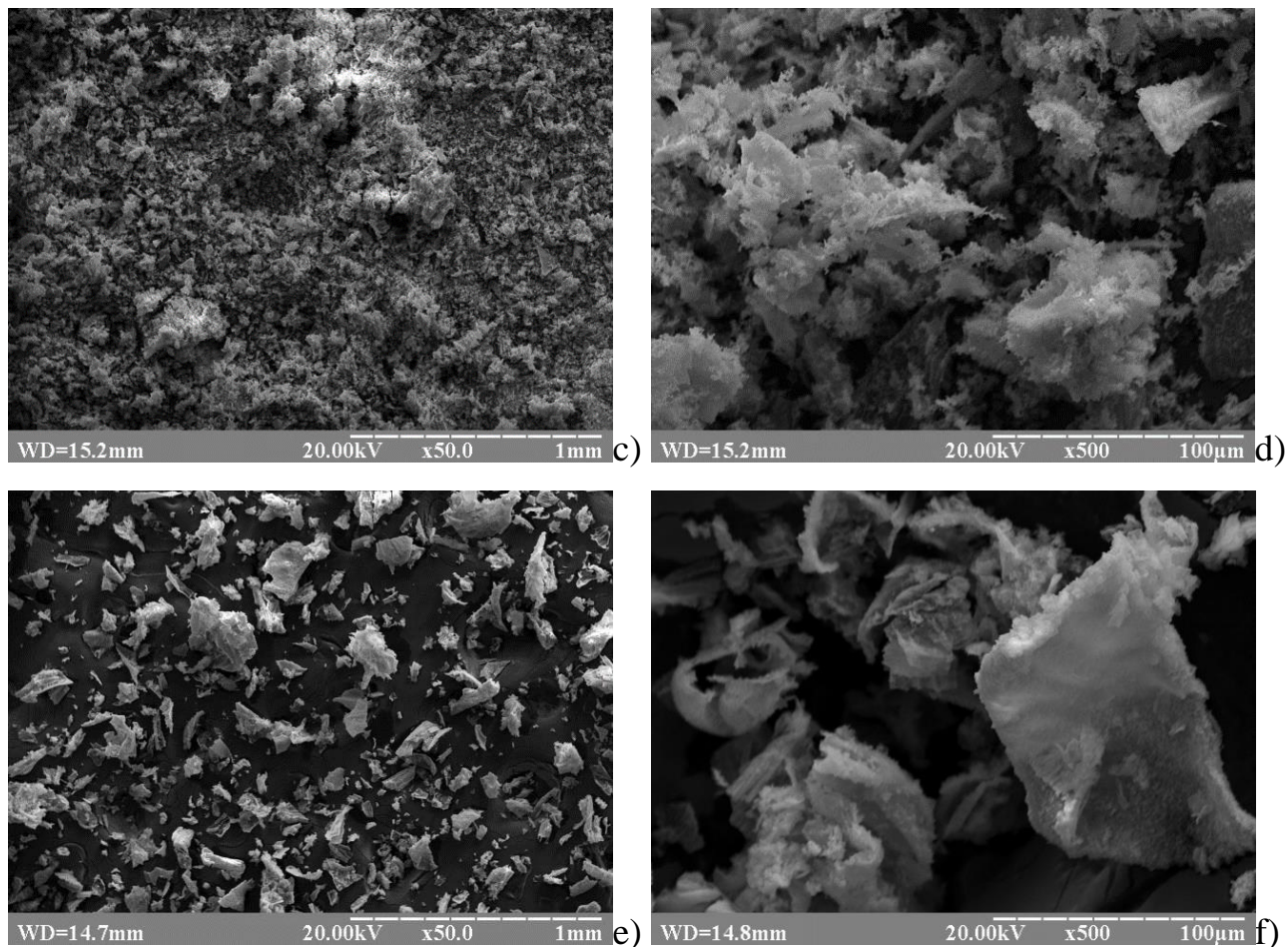


Рисунок 3.5 SEM зображення поверхні зразків: а, б – зразки КДГА; с, d – зразки Cu-ГА; е, f – зразки Zn-ГА.

### **3.4 Дослідження наночастинок композитного матеріалу з іммобілізованими в їх структуру іонів металів, що мають антибактеріальну властивість**

ТЕМ-аналіз отриманих наночастинок ZnS-Alg показав, що умови, які були створені у реакторі хімічного синтезу, виявились оптимальними для утворення частинок належної сферичної форми. За нашими оцінками розмір наночастинок складав 50-80 нм. Подальший ТЕМ-аналіз нанокompозиту дозволив переконатися, що наночастинки мають ядро, утворене ZnS та пухкою полімерною оболонкою альгінату натрію (Alg).

Результати елементарного аналізу отриманого нанокompозитного матеріалу показані у вигляді XRF-спектра на рисунку 3.6.

Спектрограми нанокompозиту ZnS-Alg дозволили довести наявність сульфідної солі цинку в досліджуваному зразку. Альгінат натрію відповідає за

наявність піку флуоресценції іонів Na. Щільність Rh, Ru, Ca, Fe в цьому випадку викликана шумом рентгенівської трубки пристрою.

Відмінність щільності флуоресценції Zn у "легкому" та "важкому" спектрах слід розглядати як специфічну особливість роботи XRF-аналізатора в режимі "легкого" запису.

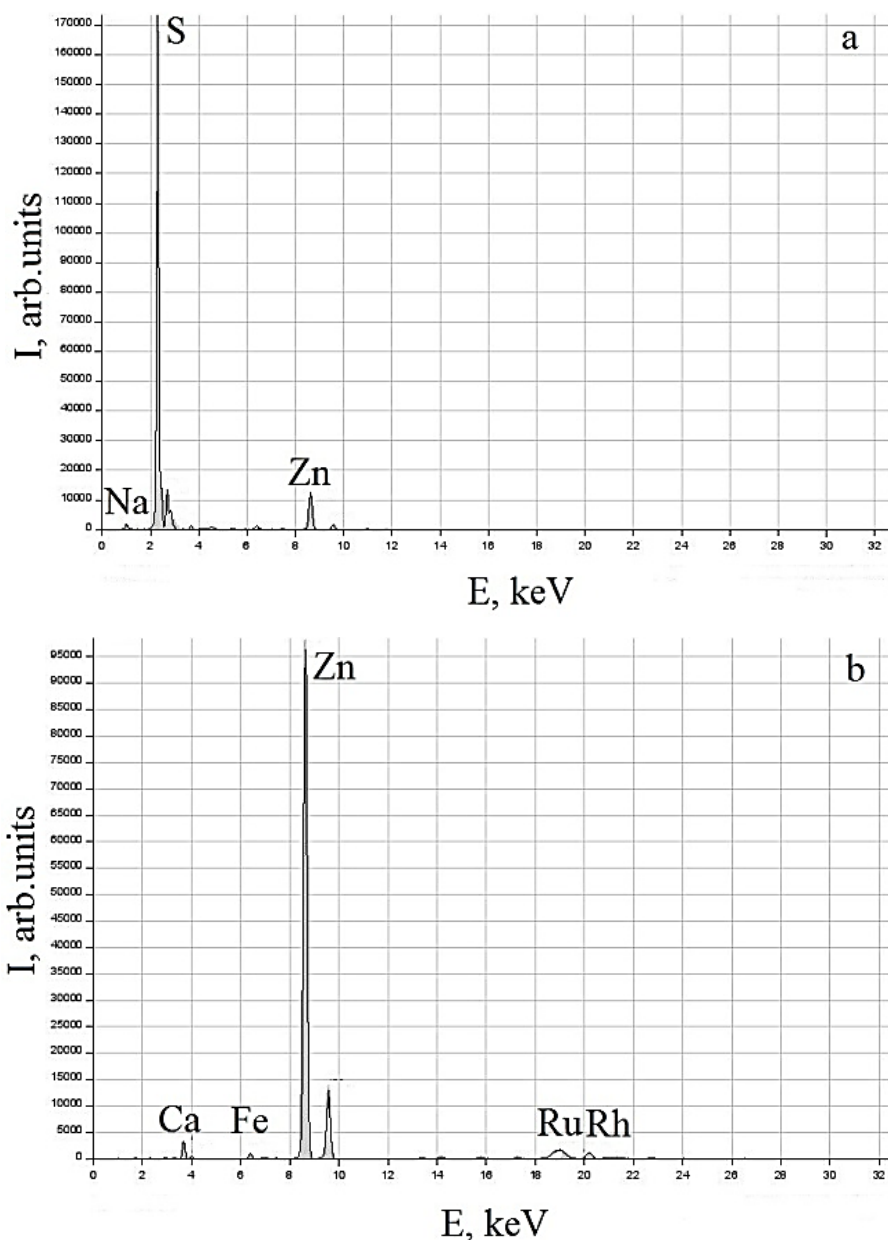


Рисунок 3.6 РФА-спектри нанокompозитного матеріалу ZnS-Alg у "легкому" (a) та "важкому" (b) режимі.

Утворення наночастинок ZnS, покритих природним біополімером (Alg), дозволило припустити зміну біологічних властивостей солей цинку, зокрема, щодо мікроорганізмів. Перспектива практичного застосування отриманих наночастинок у медицині та/або косметології визначила подальший напрямок наших досліджень, спрямованих на вивчення антибактеріальних властивостей

ZnS-Alg. Під час вивчення антибактеріальної активності наночастинок ZnS-Alg щодо досліджуваних штамів мікроорганізмів було виявлено високий ступінь бактерицидної активності досліджуваного зразка. Було встановлено, що зразок ZnS-Alg має бактерицидну активність до грампозитивних та грамнегативних тестових культур, таких як *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumonia*. У експерименті не було виявлене зростання бактеріальних колоній після культивування протягом 24 годин на живильному середовищі, яке містило наночастинок ZnS-Alg,

Для оцінки ступеня антибактеріальної активності зразка було проведено ряд контрольних експериментів на поживних середовищах, які містили окремі компоненти композиту. Було показано, що кількість колоній на живильних середовищах змінювалася після додавання ZnS, але суттєвої різниці в кількісних показниках вмісту в початковій суспензії тестових культур та в досліджуваних культурах після інкубації не виявлено ( $p > 0,05$ ). У серії контрольних експериментів на поживних середовищах, доповнених Alg, було виявлено антибактеріальну активність цього біополімеру щодо досліджуваних культур. Однак слід зазначити, що бактерицидна активність Alg була значно нижчою, ніж активність зразка, що містить наночастинок ZnS-Alg ( $p < 0,05$ ).

З нашої точки зору, підтверджена антибактеріальна активність наночастинок ZnS-Alg до деяких штамів мікроорганізму дозволить спрямувати подальшу діяльність на дослідження можливого практичного застосування зазначених властивостей ZnS-Alg у медицині та/або косметології.

## ВИСНОВКИ

1. Результати дослідження методом рентгеноструктурного аналізу зразків КДГАП і Ме-ГА, що отримані в даній роботі, показують можливість утворення за рідкофазною методикою кальцій дефіцитного та металозаміщеного гідроксиапатиту, при цьому співвідношення Ca/P зменшується.

2. У зразках системи Cu -ГАП при заміщенні атомів кальцію атомами міді на рівні концентрації 5% закладається характерне утворення другої фази, інтенсивність дифракційних ліній якої зростає зі збільшенням температури відпалу.

3. За даними дослідження методом SEM нанокристали зразків КДГАП мають середні розміри  $\sim 50$  нм. Встановлена подібність морфології порошкоподібних зразків всіх систем КДГАП і Ме-ГА з розмірами агломератів, що варіюються в широких межах від 1 до 40 мкм. Зі збільшенням концентрації металів Zn, Cu, Mg у структурі гідроксиапатиту розмір нанокристалів твердих розчинів Ме-КДГАП зменшується в порівнянні з розмірами КДГАП (близько 50 нм). Частинки цих агломератів складаються з нанокристалів, які збільшуються в системах Ме-ГА, при цьому збільшується їх питома поверхня і однорідність форм.

4. Відсутність цитотоксичної дії, висока біологічна активність і явний антибактеріальний ефект дозволяють рекомендувати композитні матеріали на основі заміщених Ме-КДГАП як імплантати для остеосинтезу, що сприяють зменшенню частоти і ризику перипротезної інфекції та підвищення osteointegraції медичних виробів.

5. Дослідження описаних в роботі матеріалів не завершені і будуть надалі активно продовжуватися з метою створення імплантаційних матеріалів, що мають структуру, склад і

морфологію, ідентичну натуральній кістці людини, а також володіють антибактеріальними властивостями.

**6.** Плануються подальші біологічні дослідження композитних матеріалів з вмістом іонів срібла, частінок оксиду цинку та магнетиту в модельному реакціях *in vitro*.

## ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Koutsopoulos S. Synthesis and Characterisation of Hydroxyapatite Crystals: A Review Study on the Analytical Methods. *J Biomed Mater Res.* 2002;62(4):600-612.
2. Danilchenko SN, Kukharenko OG, Moseke C, et al. Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strain from diffraction line broadening. *Cryst. Res. Technol.* 2002. V. 37(11). P. 1234–1240.
3. Pramanik N, Mohapatra S, Bhargava P, et al. Chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite-poly(ethylene co vinyl alcohol) (EVA) nanocomposite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications. *Mater . Sci. Eng. C.* 2009. V. 29. P. 228–236.
4. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J.Biomed. Mater. Res.* 1990. V. 24 P. 721-734.
5. Zhixia Li, Masakazu Kawashita. Current progress in inorganic artificial biomaterials. *J Artif Organs.* 2011. V.14. P.163–170.
6. Суходуб Л. Ф. Апатит-біополімерні матеріали та покриття для біомедицини (стан та перспективи досліджень у лабораторії «Біонанокмпозит» СумДУ) : монографія / Л. Ф. Суходуб, Л. Б. Суходуб, Г. О. Яновська, І. В. Чорна ; за заг. ред. чл.-кор. НАНУ Л. Ф. Суходуба. – Суми : Сумський державний університет, 2015. – 251 с.
7. Teddy Tite, Adrian-Claudiu Popa, Liliana Marinela Balescu, Iuliana Maria Bogdan, Iuliana Pasuk, José M. F. Ferreira, and George E. Stan Cationic Substitutions in Hydroxyapatite: Current Status of the Derived Biofunctional Effects and Their In Vitro Interrogation Methods. *Materials (Basel).* 2018 Nov; 11(11): 2081.

8. Rodriguez-Lorenzo L.M., Vallet-Regi M. Controlled crystallization of calcium phosphate apatites. *Chem. Mater.* 2000. V. 12. P. 2460-2465.

9. Sukhodub, L. F., Sukhodub, L. B., Litsis, O., & Prylutsky, Y. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-alginate nanostructured composites for the controlled drug release. *Materials Chemistry and Physics.* 2018. V. 217. P. 228–234.

10. Panda A., Dyadyura K., Balynskiy Mark Hydroxyapatite and zinc oxide based two-layer coating, deposited on ti6al4v substrate. *Trends and Innovative Approaches in Business Processes “2017”*, Vol. 20, p. 112-120.

11. Popescu A., Florian P., Stan G., Popescu-Pelin G., Zgura I., Enculescu M., Oktar F., Trusca R., Sima L., Roseanu A. Physical-chemical characterization and biological assessment of simple and lithium-doped biological-derived hydroxyapatite thin films for a new generation of metallic implants. *Appl. Surf. Sci.* 2018; 439: 724–735.

12. Andres, N.C.; D’Elia, N.L.; Ruso, J.M.; Campelo, A.E.; Massheimer, V.L.; Messina, P.V. Manipulation of Mg(2+)-Ca(2+) switch on the development of bone mimetic hydroxyapatite. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 15698–15710.

13. Huang, Y.; Zhang, X.; Zhao, R.; Mao, H.; Yan, Y.; Pang, X. Antibacterial efficacy, corrosion resistance, and cytotoxicity studies of copper-substituted carbonated hydroxyapatite coating on titanium substrate. *J. Mater. Sci.* 2015, 50, 1688–1700.

14. Shi, F.; Liu, Y.; Zhi, W.; Xiao, D.; Li, H.; Duan, K.; Qu, S.; Weng, J. The synergistic effect of micro/nano-structured and Cu(2+)-doped hydroxyapatite particles to promote osteoblast viability and antibacterial activity. *Biomed. Mater.* 2017, 12, 035006.



15. Ananth, K.; Sun, J.; Bai, J. An innovative approach to manganese-substituted hydroxyapatite coating on zinc oxide-coated 316L SS for implant application. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2340.
16. Begam, H.; Nandi, S.K.; Chanda, A.; Kundu, B. Effect of bone morphogenetic protein on zn-hap and zn-hap/collagen composite: A systematic in vivo study. *Res. Vet. Sci.* 2017, 115, 1–9.
17. Yang, H.; Qu, X.; Lin, W.; Wang, C.; Zhu, D.; Dai, K.; Zheng, Y. In vitro and in vivo studies on zinc-hydroxyapatite composites as novel biodegradable metal matrix composite for orthopedic applications. *Acta Biomater.* 2018, 71, 200–214.
18. Iconaru, S.L.; Prodan, A.M.; Buton, N.; Predoi, D. Structural characterization and antifungal studies of zinc-doped hydroxyapatite coatings. *Molecules* 2017, 22, 604.