



**ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ**

**ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ**

**КАТЕДРА „ПОЛИМЕРНО ИНЖЕНЕРСТВО”**

инж. Христо Руменов Георгиев

**“НОВИ КОПРИНА/СТЪКЛО-КЕРАМИЧНИ КОМПОЗИТИ ЗА  
РЕГЕНЕРАТИВНАТА МЕДИЦИНА”**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор” по научна специалност 5.10.

Химични Технологии (Технология на композитните материали)

Научен ръководител: доц. д-р инж. Лъчезар Радев

Научно жури:

1. доц.д-р инж. М. Симеонова. – председател, рецензент
2. проф.д-р инж. М. Незнакомова - рецензент
3. доц. д-р инж. Е. Кашчиева
4. проф.д-р инж. Ат. Атанасов
5. доц. д-р инж. Л. Радев

София, 2018

Дисертационният труд е написан на 121 страници, съдържа 36 фигури и 12 таблици.  
Цитирани са 252 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на научен съвет на научното звено на катедра „Полимерно инженерство”, състояло се на 28.02.2018г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 16.07.2018г. от 14.00 часа в зала 424, сграда "А" на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересуващите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

## Използвани съкращения

**A** – акерманит

**ALP** – алкална фосфатазна активност

**C** – кристобалит

**CO<sub>3</sub>HA** – карбонат съдържащ хидроксиапатит

**FTIR** – инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация

**HA** – хидроксиапатит, Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH)

**HM** - хидромагнезит

**ICP-AES** – атомно емисионна спектрометрия с индуктивно свързана плазма

**In vitro** – лабораторен експеримент, който се извършва или провежда в епруветка, петри или на друго място извън жив организъм

**In vivo** – характеризира експеримент, проведен в реални биологични условия в жив организъм

**M** – мервинит

**S** – силикокарнотит

**SBF** – разтвор, наподобяващ човешка кръвна плазма

**SEM** – сканираща електронна микроскопия

**SF** – фиброин на естествената коприна

**TEOS** – тетраетоксисилан, Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>

**TRIS** – хидроксиметил аминоетан, (CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>

**UV-Vis** – спектроскопия в ултравиолетовата и видимата област

**W** - витлокит

**XPS** – рентгеновата фотоелектронна спектроскопия

**XRD** – рентгенодифракционен анализ

## Въведение и цел

Последните години отбелязват интензивно развитие в областта на биоматериалите с приложение в тъканното инженерство. Основната цел на костната регенерация е да се използва материал, подпомагащ и стимулиращ естествените регенеративни механизми на човешкото тяло. Биоматериалите за костно възстановяване най-общо представляват временни матрици, които в последствие се заменят от новообразувана костна тъкан.

Понятието 'биоматериали' включва различни типове материали – метални, керамични, полимерни, композити, хибридни материали и др. Специализираната литература отбелязва разширяване и задълбочаване на изследванията относно композитни материали, съдържащи коприна в комбинация с неорганични материали за приложение в регенеративната медицина.

Естествената коприна е материал с многовековна история. В областта на медицината тя е позната отдавна. В сравнение с други биоматериали коприненият фиброин има отлични механични и биологични свойства. На специфичната му молекулярна структура се дължат свойствата биоразградимост и биосъвместимост на материалите, включващи фиброин.

От друга страна за редица калциево-силикатни-фосфатни керамики е установено, че са биосъвместими, биоактивни, остеокондуктивни и остеопродуктивни. Те се прилагат за възстановяване на костни дефекти, които могат да възникнат в резултат на травма, вродени недостатъци, заболявания като остеопороза или при отстраняване на тумори. Когато в човешкото тяло се имплантира биоактивен материал, на повърхността му се образува апатитов слой, който се свързва с живата костна тъкан., т.е. той се свързва с костта, посредством образуване на карбонат хидроксиапатит ( $\text{CO}_3\text{HA}$ ).

Магнезият (Mg) е един от най-важните минерални елементи в човешкото тяло. Някои изследвания показват, че  $\text{Mg}^{2+}$  имат ключова роля при ремоделирането на костите и развитието на скелета. Избрана е системата  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ , която е перспективна и подходяща за синтез на композитни материали с участието на фиброин, които в последствие да бъдат приложени за костна регенерация.

Казаното до тук определя **целта на настоящата дисертация**, която е фокусирана върху получаване в лабораторни условия и охарактеризиране на композитни материали от фиброин и зол-гелни керамики в системата  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ , които да съчетаят положителните свойства на двата компонента.

Основната теза на дисертационния труд е: третирането на зол-гелни стъкло-керамики с TRIS-HCl буфер е перспективен метод за повишаване на *in vitro* биоактивността на органично-неорганични композитни материали с участието на фиброин.

#### **Изпълнението на поставената цел включва решаването на следните задачи:**

- 1) Синтез на стъкло-керамики в системата CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO.
- 2) Синтез на композити, включващи получените стъкло-керамики и коприна в различни съотношения.
- 3) Физикохимично характеризирание на фазовия състав и структурата на биокерамиките и композитите.
- 4) Определяне на биоактивността на стъкло-керамиките и композитните материали чрез *in vitro* тест.
- 5) Изследване на биосъвместимостта на композитите чрез експерименти с клетки.

#### **Експериментални методи**

За изпълнение на задачите на дисертационния труд са приложени подходящи методи за фазово-структурно характеризирание на биоматериалите и за определяне на *in vitro* биоактивността им.

Методите за физико-химично характеризирание на синтезираните стъкло-керамики и композитни материали, използвани в дисертационния труд са:

- Рентгенодифракционен анализ (XRD);
- Инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация (FTIR);
- Сканираща електронна микроскопия (SEM);
- Оптична емисионна спектроскопия с индуктивно свързана плазма (ICP OES);
- Рентгеновата Фотоелектронна Спектроскопия (XPS)

За определяне на *in vitro* биоактивност е приложен тест в разтвор на SBF и последващо изследване на образците с XRD, FTIR, SEM, XPS, и ICP-OES за установяване на евентуален реакционен хидроксиапатитов слой, образуван в резултат на теста.

Човешки клетки остеосаркома MG63 са използвани за определянето на цитотоксичност и биосъвместимост на синтезираните композитни материали. С клетки са проведени следните типове анализи на композитите: МТТ анализ за определяне на клетъчният растеж и цитотоксичността на композитите; Установяване и оценка на минерализацията; Анализ на вътреклетъчната активност в алкална фосфатаза (ALP).

## 1. Синтез на биоактивните материали

### 1.1. Получаване на разтвор на фиброин

Всички получени композитни материали в съответствие с темата на изследването съдържат като основен компонент фиброина на естествената коприна. За получаването на различни видове материали е необходимо (SF) да бъде в разтворено състояние. Като изходен материал е използвана коприна, чиито влакна са с отстранен от тях серицин.

Има различни разтворители, които разтварят фиброина, като в конкретния случай е избрана трикомпонентната смес  $\text{CaCl}_2\text{-C}_2\text{H}_5\text{OH-H}_2\text{O}$  (в молно съотношение 1:2:8), в която  $\text{CaCl}_2$  е безводен. Накратко, 7g SF се разтваря в трикомпонентния разтворител, при температура от 75 °C в продължение на 60 min, при което се получава 7% (w/v) разтвор. Разтворът се диализира в дестилирана вода, през целулозна мембрана (MWCO 12000 Da) или диализни касети (*Slide-A-Lyzer*) за 72 часа, за отстраняване на  $\text{CaCl}_2$ .

Неразтворените твърди остатъци от разтвора се премахват, чрез двукратно центрифугиране от по 30 min при 3500 rpm. и филтруване. Постигнатата крайна концентрация на водният разтвор на SF е ~1.5% (w/v). Тя се определя тегловно, чрез сушене на образците при стайна температура от 20 °C до постоянно тегло, получени от точно определен обем от разтвора (10 ml).

### 1.2. Получаване на стъкло-керамики в системата $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ по зол-гелен метод

Стъкло-керамиката в системата  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$  е синтезирана посредством многостъпален модифициран зол-гелен метод. Наречен е по този начин, защото гелът се получава след последователно смесване на компонентите му, с участието на TEOS в една от стъпките на процеса. Съставът на магнезий-съдържащите калциеви силикатни-фосфатни материали е представен в табл. 1.

**Таблица 1.** Химичен състав на синтезираните магнезий-съдържащи калциеви силикатни фосфатни керамики

Образец	Състав на синтезираните образци,				Ca+Mg/Si+P молно отношение
	% <sub>mass</sub>				
	CaO	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	MgO	
C1	38	29	31	2	1
C2	55	20	22	3	2.18

Количествата на съответните оксиди (CaO, SiO<sub>2</sub> и P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) са определени на база молното съотношение Ca/P+Si(R), което в единия случай има стойност равна на стойността за чистите хидроксиапатитни структури (R=1.67), а в другия случай – по-висока от тях (R = 1.89).

Синтезирането на силиций съдържащите калциеви фосфати се извършва след последователното реализиране на следните етапи:

- Първи етап: Получаване на силициево диоксиден зол посредством прехидролизиране на (TEOS).

Необходимото количество TEOS се смесва, при непрекъснато разбъркване, на магнитна бъркалка с равни по обем количества етанол и дестилирана вода. Към тях се добавя солна киселина, като катализатор на процеса хидролиза на TEOS.

- Втори етап: Получаване на калциево-фосфатен разтвор.

Съответното количество CaO се разтваря, при непрекъснато разбъркване, с дестилирана вода до получаване на Ca(OH)<sub>2</sub>. Към така полученият разтвор се добавя необходимото количество ортофосфорна киселина при продължаващо хомогенизиране след което се добавя на порции MgO. Достигането на pH ~10-11 става чрез добавянето на 20% NH<sub>4</sub>OH.

- Трети етап: Получаване на смесен силикатен/калциево фосфатен зол.

Силициево диоксидният зол се добавя към алкалния разтвор на калциев фосфат. Хомогенизирането на получения смесен зол се извършва в продължение на 24 часа при стайна температура. Следва гелиране и сушене на получения смесен зол, което се извършва при температура 120 °C в продължение на 12 часа.

Термичното третиране на изсушените гелове се извършва със скорост на нарастване на температурата 10°/min и последващо задържане при температури 1200 °C в продължение на 2 часа.

### 1.3. Получаване на композитни материали със състав фиброин и калциево фосфатна силикатна керамика

Коприна/стъкло-керамичните композитни материали се получават, чрез метод на смесване без свързващи средства. Накратко, определено количество стъкло-керамика на прах се прибавя към разтвора на SF при разбъркване в продължение на 4 часа, за да се разпръснат равномерно частиците на стъклокерамиката. Получената смес се излива в петрита. Сместа се замразява при  $-70\text{ C}^{\circ}$ , след което се лиофилизира за 24 часа.

В настоящата работа са получени три вида проби в тегловното съотношение на фиброин и калциево фосфатна силикатна стъклокерамика, което е представено в табл. 2.

**Таблица 2.** Състав на коприна / стъкло-керамични композитни материали

Означения на образците	Състав на композита, % <sub>mass</sub>		
	C-1	C-2	SF
C1F50/50; C2F50/50	50	50	50
C1F20/80; C2F20/80	20	20	80
C1F80/20; C2F80/20	80	80	20

Като неорганична част в смесите, посредством многостъпален зол-гел метод е синтезираната калциева фосфатна силикатна керамика в системата  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ . Важно е да се допълни, че в синтеза на композитите са използвани стъкло-керамиките C-1\* и C-2\*, получени след 14 дневен престой в разтвор на TRIS-HCl буфер на изходните термично третираны стъкло-керамики.

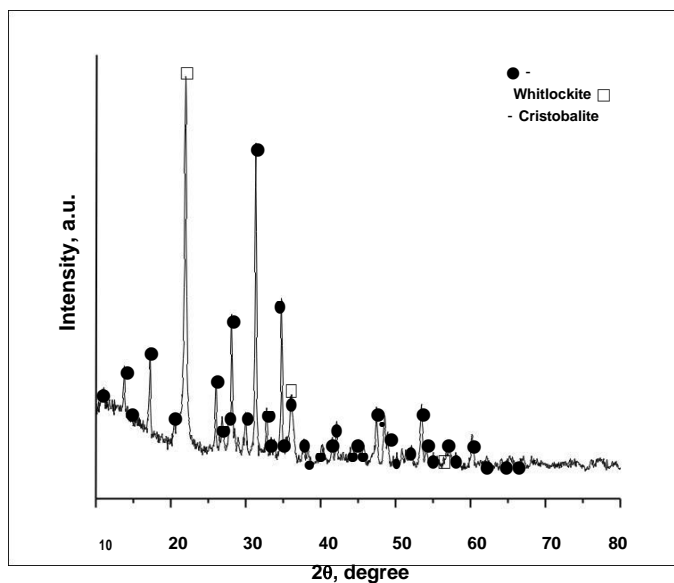


## 2. Физикохимично характеризиране на синтезираните стъкло-керамики

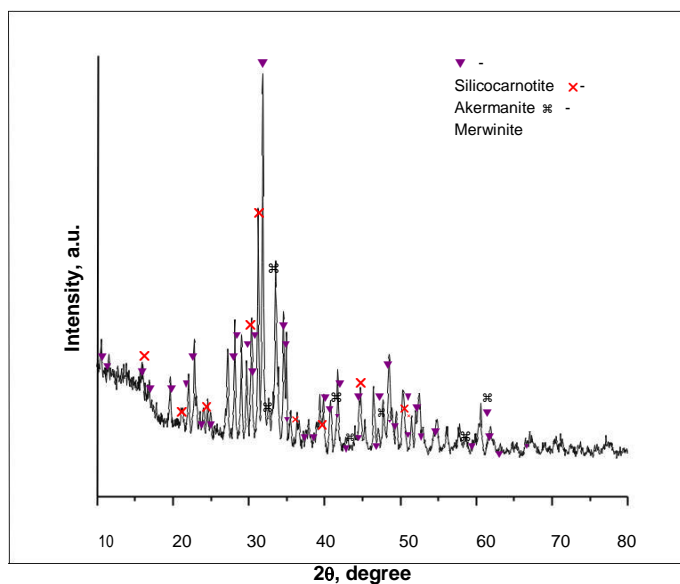
### 2.1 Фазов състав на образците по данни от рентгенодифракционния анализ

Стъкло-керамичните образци, означени с С-1 и С-2, са получени по зол-гелен метод с последващо термично третиране на сушените гелове при 1200 °С в продължение на 2 часа.

На фиг. 1 са представени рентгенодифракционните данни на изследваните образци.



(a)



(б)

**Фиг. 1.** Рентгенови дифрактограми на образци С-1 (а) и С-2 (б), след термична обработка при 1200 °С в продължение на 2 часа

Съгласно представените на фиг. 1 ренгенови дифрактограми, фазовият състав на образците ги определя като стъкло-керамики, т.е. те съдържат аморфна и кристални фази. Показателно за наличието на аморфна фаза е халото на дифрактограмите при малките стойности на  $2\theta$ . От друга страна наличието на добре изразени дифракционни максимуми е свързано с наличието на кристални фази в образците.

Образците се различават по формираните кристални фази. В стъкло-керамика С-1, са идентифицирани следните кристални фази: витлокит  $(Ca,Mg)_3(PO_4)_2$  (в съответствие с PDF 70-2064) и кристобалит  $SiO_2$  (PDF 82-0512), а в стъкло-керамика С-2 – силикокарнотит  $Ca_5(PO_4)_2SiO_4$  (PDF 40-0293), акерманит  $Ca_2MgSi_2O_7$  (PDF 79-2425) и мервинит  $Ca_3MgSi_2O_8$  (PDF 74-0382).

Въпреки, че на дифрактограмата на образец С-1 дифракционният пик с максимален интензитет принадлежи на кристобалита, съгласно данните от софтуер за фазова идентификация Match количественото отношение витлокит: кристобалит е  $\approx 7:2$ . Основната кристална фаза в образец С-1 е витлокитът, който е калциев фосфат, в който е включен магнезий като изоморфен примес, заемайки част от структурните позиции на калциевите йони.

Включването на магнезий в  $CaO-SiO_2-P_2O_5$  гелове стимулира образуването на кристобалит. Следователно наличието на споменатите кристални фази съответства на химичния състав на образца.

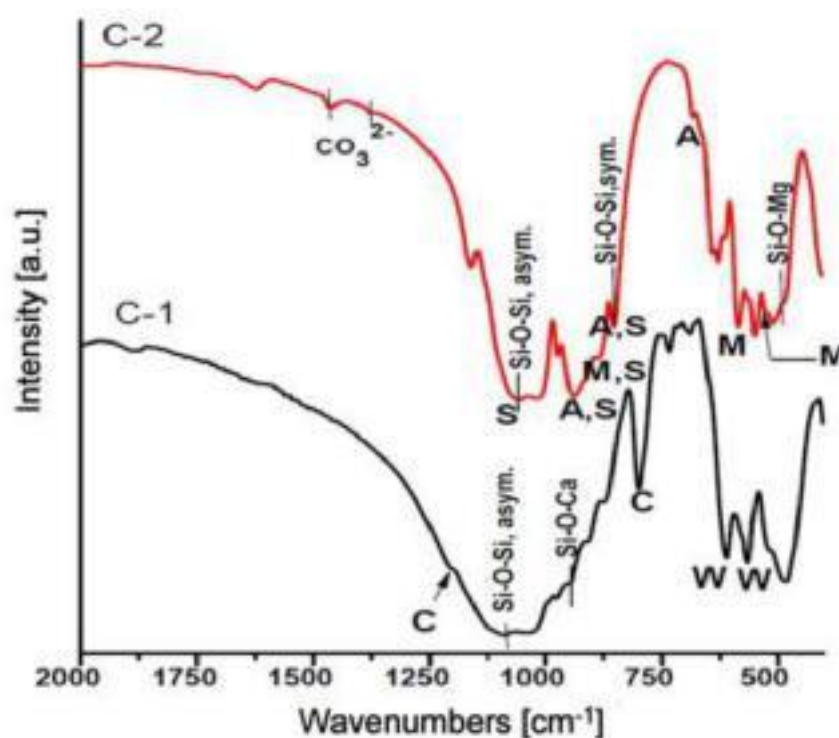
Основната кристална фаза в образец С-2 е силикокарнотит, който е калциев силикат фосфат, съпътстван от акерманит и мервинит – калциево-магнезиеви силикати. Силикокарнотитът би могъл да се разгледа като апатит  $Ca_5(PO_4)_3(OH)$ , в който една от групите  $(PO_4)_3$  е заместена от  $(SiO_4)$ -група. Акерманитът, от своя страна, съдържа в кристалната си структура  $MgO_4$  тетраедри, които свързват диортогрупите  $Si_2O_7$  в една обща мрежа (слой). Калциевите йони се разполагат между тези Mg-Si мрежи (слоеве). В случая на  $SiO_2-P_2O_5-CaO-MgO-Na_2O$  биоактивни стъкла, част от магнезия се включва в силикатната Si-O-Si аморфна мрежа като  $MgO_4$  тетраедри.

От гледна точка на фазовия състав и двата образци са структурно различни, интересни и оригинални. Магнезият се включва в различни кристални фази, в С-1 във фосфатна, а в С-2 – в силикатни фази. Установените кристални фази показват, че може да се очаква стъкло-керамиките да проявят биоактивност.

Към интерпретацията на данните от рентгенодифракционния анализ може да се допълни, че е вероятно съставът на полифазните стъкло-керамики е по-сложен. Експерименталните данни дават основание да се допусне наличието на допълнителни кристални фази в малко количество: акерманит в С-1. Химичният състав на геловите и условията на синтез са в подкрепа на възможността да присъстват гореспоменатите фази.

## 2.2. Структурно характеризирание на образци С-1 и С-2 с инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация

На фиг. 2 са представени инфрачервените спектри на образците, С-1 и С-2.



**Фиг. 2.** FTIR-спектри на образци С-1 и С-2, след термично третиране при 1200 °С в продължение на 2ч. (Означения: W - витлокит, С - кристобалит, S – силикокарнотит, А - акерманит, М - мервинит)

Представените FTIR-спектри показват характерни ивици за силикатни зол-гелни стъкла и стъкло-керамики. Могат да бъдат наблюдавани три вида колебания на Si-O групите. Абсорбционните ивици при 1085 (1056)cm<sup>-1</sup> съответстват към Si-O-Si симетрични валентни колебания, а ивиците около 477 cm<sup>-1</sup> могат да бъдат определени като Si-O-Si деформационни колебания. Ивицата при ≈ 490 cm<sup>-1</sup> може да бъде отнесена към колебанията на връзката Si-O-Mg. В допълнение, рамото при 939 (940) cm<sup>-1</sup> е свързано с немостови кислородни връзки Si-O-Ca. Освен това ивиците, разположени при 560 и 606

$\text{cm}^{-1}$ , могат да бъдат отнесени към деформационни колебания на Р-О в кристални фосфати. Заедно с това в спектъра присъства ивица при  $1620 \text{ cm}^{-1}$ , която се отдава на деформационно колебание Н-О-Н.

Инфрочервените спектри, и повечето от наблюдаваните абсорбционни ивици на фиг. 2, са с комплексен характер, поради полифазния състав на стъкло-керамиките, включващ силикатни и фосфатни аморфни и кристални фази, които имат характеристични ивици, които се припокриват или са в близки спектрални области.

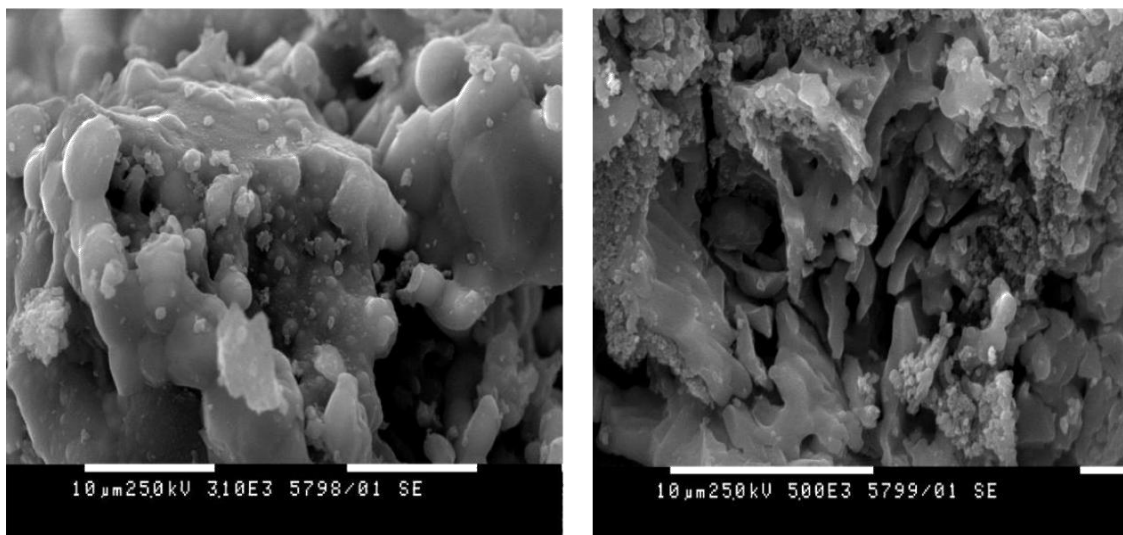
Установените абсорбционни ивици при  $606$  и  $560 \text{ cm}^{-1}$  във FTIR спектрите на образец С-1, може да бъдат свързани с присъствието на витлокит  $(\text{Ca}, \text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$  (W), а тези при  $1202$  и  $795 \text{ cm}^{-1}$  – с това на кристобалит. В допълнение, в FTIR спектъра на образец С-2 ивиците, разположени при  $939$ ,  $853$  и  $684 \text{ cm}^{-1}$ , се отнасят към колебания в структурата на акерманита. Ивиците при  $884$ ,  $585$  и  $520 \text{ cm}^{-1}$  могат да бъдат приписани на мервинит, а ивиците, разположени при  $1060$ ,  $1013$ ,  $939$ ,  $884$ ,  $853 \text{ cm}^{-1}$  – на силикокарнотит. Освен описаните, ивици с много малък интензитет при  $1461$  и  $1375 \text{ cm}^{-1}$  могат да се открият на фиг. 2. Те се отнасят съответно към  $\nu_3$  (асиметрично валентно колебание) при  $1461 \text{ cm}^{-1}$  и  $\nu_2$  (деформационно колебание) при  $1375 \text{ cm}^{-1}$  на групата  $\text{CO}_3^{2-}$ . Наличието на тези характеристични ивици за карбонати свидетелства за процес на известна карбонизация на стъклокерамиката С-2. Образецът, който е с високо съдържание на калциев оксид е взаимодействал с атмосферния  $\text{CO}_2$ . Получените резултати са в добро съгласие с литературните данни за  $\text{CaO-SiO}_2$  зол-гелни стъкла.

От сравняването на FTIR спектрите на синтезираните стъкло-керамики С-1 и С-2 можем да се направи извода, че интензитетът на ивиците между  $460$  и  $600 \text{ cm}^{-1}$  намалява по-забележимо в образец С-2 в сравнение С-1. Подобен извод е валиден за някои биологично активни стъкла в системата  $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO-K}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ .

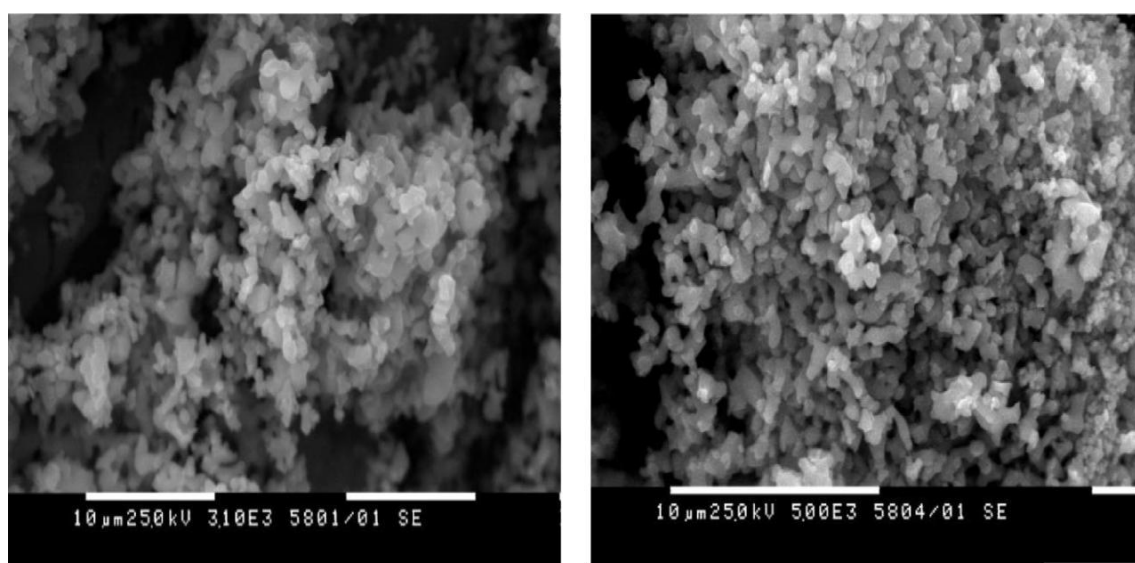
**В заключение**, данните от инфрочервената спектроскопия съответстват на литературните данни за материали с подобни състави и на фазовия състав на стъкло-керамиките, определен с рентгенодифракционен анализ. Спектрите се различават помежду си значително, което потвърждава структурното различие на синтезираните образци. Те са в съгласие с идентифицираните кристални фази.

### *2.3. Сканираща електронна микроскопия на стъкло-керамичните образци*

На фиг. 3 и 4 са представени SEM изображенията на микроструктурата, на стъкло-керамика С-1, и на С-2, след термично третиране при  $1200 \text{ }^\circ\text{C}$  в продължение на 2 ч.



**Фиг. 3.** SEM изображения на микроструктурата на термично третиран образец С-1



**Фиг. 4.** SEM изображения на микроструктурата на термично третиран образец С-2

От представените SEM изображения на стъкло-керамичните образци (С-1 и С-2) се вижда, че различните състави за синтез на гелове, довели до различен фазов състав след термичното третиране, логично обуславят и разлика в микроструктурата на образците.

На SEM изображението на образец С-1 (фиг. 3) се забелязват два вида частици, различни по морфология и размер: големи бъбрековидни образувания с размер около 5  $\mu\text{m}$  и малки частици (под 1  $\mu\text{m}$ ). Виждат се неправилни по форма пори. Пластинчатите (призматични) частици напомнят по морфология на кристобалит, установен в подобни материали.

Както се вижда от SEM изображението, представено на фиг. 4, микроструктурата на стъкло-керамика С-2 се различава съществено от тази на С-1. Преобладават заоблени частици с размер  $\approx 1 \mu\text{m}$ , но присъстват и по-малки такива. Характерна черта на

структурата е високата ѝ порестост, като част от порите са съизмерими с размера на частиците, а други са значително по-големи по размер. По микроструктурните особености на този образец може да се допусне, че той е с висока степен на кристалност.

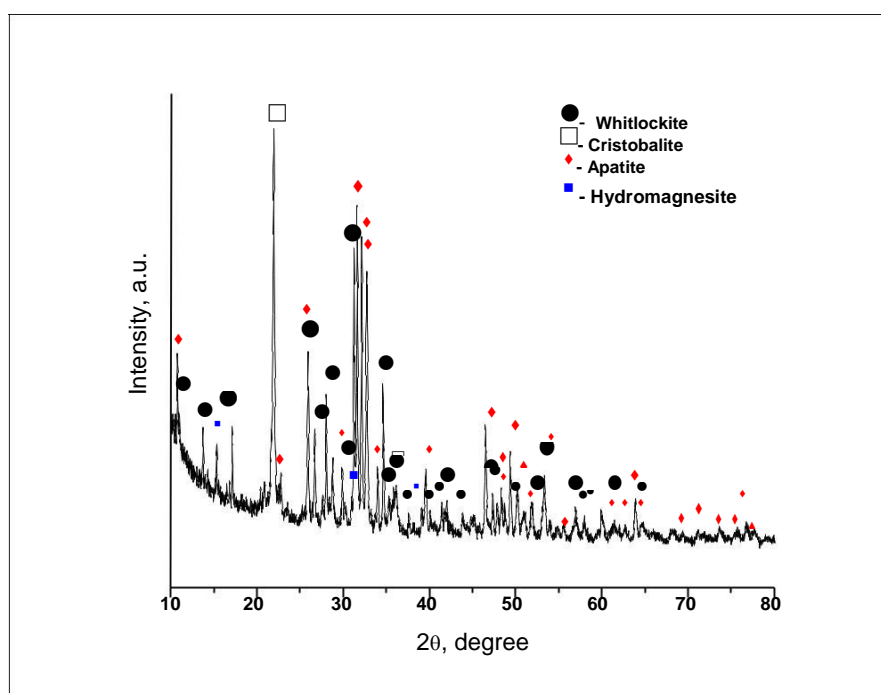
Имайки предвид, че изследваните стъкло-керамики са със сложен полифазен състав, установената хетерогенност в микроструктурата, т.е. присъствието на различни по форма и размер частици е логична. Може да се очаква, че различните кристални фази, образувани при синтеза на стъкло-керамиките, се отличават и морфологично.

### 3. Изследване на *in vitro* биоактивността на синтезираните стъкло-керамики след престояване в TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни

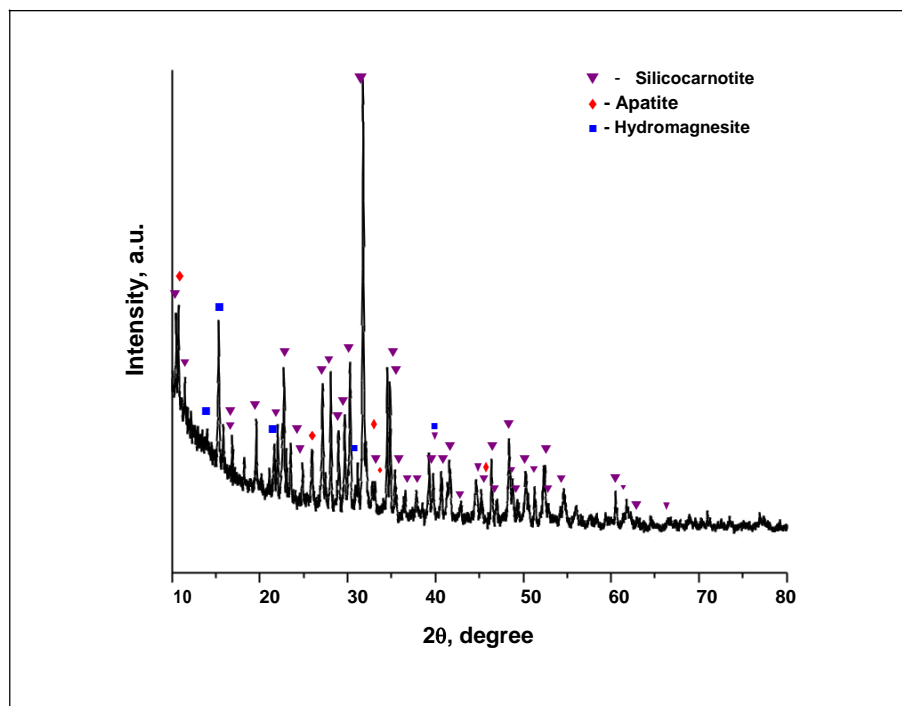
В съответствие с целта и задачите на дисертационния труд *in vitro* биоактивността на синтезираните стъкло-керамики C-1 и C-2 е изследвана чрез тест в TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни.

#### 3.1 Промяна във фазовия състав на образците след престояване в TRIS-HCl буфер

За да се различават стъкло-керамиките преди и след престояване в разтвор на TRIS-HCl буфер, тези след третирането ще бъдат означени с „\*“, т.е., C-1\* и C-2\*. Рентгенодифракционните данни на стъкло-керамичните образци C-1\* и C-2\*, след престояване в разтвор на TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни, при статични условия на теста, са представени на фиг. 5.



(a)



(б)

**Фиг. 5.** Рентгенви дифрактограми на стъкло-керамични образци С-1\* (а) и С-2\* (б) след престояване в TRIS буфер в продължение на 14 дни в статични условия

Сравняването на дифракционните данни на фиг. 5 с тези на изходните образци преди теста (на фиг. 1) категорично установява промени във фазовия състав на образците, които са настъпили по време на престоя им в разтвор на TRIS-HCl буфер.

От дифрактограмите на образците би могло да бъде установено, че са налице две новообразувани фази: карбонат хидроксиапатит  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_x0.5(\text{OH})$  (съгласно PDF 01-072-7532) и хидромагнезит  $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (съгласно PDF 25-0513). Идентифицирането на апатитова фаза, формирана в резултат на престоя в TRIS-HCl буфер доказва, че образците са *in vitro* биоактивни. Освен това калциевите и фосфатните йони в разтвора, които са образували апатит на повърхността на образците, са отделени от самите керамики, в резултат на разтварянето им в TRIS-HCl буфер.

В пробата С-1\* с молно съотношение  $\text{Ca}+\text{Mg}/\text{Si}+\text{P}=1$  (фиг. 5 (а)) се установяват и фазите витлокит  $(\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$  и кристобалит  $\text{SiO}_2$  с ниска кристалност. Тези фази съответстват на фазите, идентифицирани във фазовия състав на изходната стъкло-керамика С-1. От друга страна в рентгенограмата на образец С-2\* с молно съотношение  $\text{Ca}+\text{Mg}/\text{Si}+\text{P}=2.18$  (фиг. 5 (б)) след теста в TRIS-HCl буфер, не се установяват дифракционните пикове на акерманит  $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$  и мервинит  $\text{Ca}_3\text{Mg}(\text{SiO}_4)_2$ , т.е. тези две кристални фази са се разтворили. Магнезий съдържащата кристална фаза хидромагнезит  $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  е продукт, получен вследствие на частичното разтваряне на

витлокита  $(\text{CaMg})_3(\text{PO}_4)_2$  в образец С-1\*, както и от разтварянето на акерманита  $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$  и мервинита  $\text{Ca}_3\text{Mg}(\text{SiO}_4)_2$  в образец С-2\*.

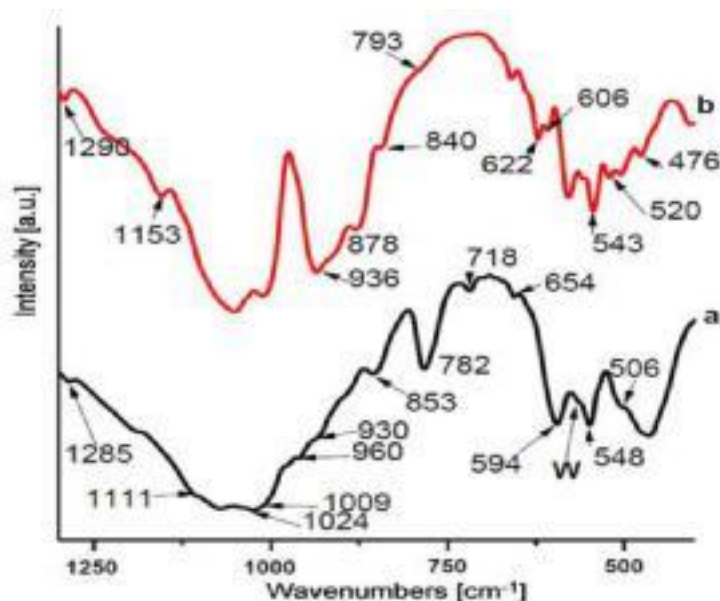
Основните резултати от представените XRD данни за промяната във фазовия състав на стъкло-керамиките С-1 и С-2, вследствие на 14-дневния престой в TRIS-HCl буфер, могат да бъдат обобщени, както следва:

- Кристалните фази от изходната стъкло-керамика С-1 (витлокит  $(\text{CaMg})_3(\text{PO}_4)_2$  и кристобалит  $\text{SiO}_2$ ) частично се разтварят в TRIS-HCl буфер;
- Кристалните фази от изходната стъкло-керамика С-2 (акерманит  $\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$  и мервинит  $\text{Ca}_3\text{Mg}(\text{SiO}_4)_2$ ) напълно се разтварят в среда на TRIS-HCl буфер;
- Хидромагнезит  $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  се образува от освобождения магнезий при разтварянето на съответните фази в стъкло-керамиките С-1\* и С-2\*.
- Важен резултат от проведения TRIS тест е регистриране на новообразувана апатитова фаза в С-1\* и С-2\*, която показва че стъкло-керамиките са *in vitro* биоактивни.

### 3.2 Инфрачервени спектри на образците С-1\* и С-2\* след престояване в TRIS-HCl буфер

Структурните промени в стъкло-керамиките, като резултат от престояването им в TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни бяха оценени и чрез FTIR.

Фиг. 6 представя FTIR спектрите на стъкло-керамичните образци, след престояването им в TRIS-HCl буфер.



**Фиг. 6.** Инфрачервени (FTIR) спектри на стъкло-керамични образци С1\* (а) и С2\* (б) (след тест в TRIS-HCl буфер, в продължение на 14 дни)



FTIR спектрите на образците, сравнени с тези на изходните стъкло-керамики, показват сходен характер. Това е указание за структурно подобие и може да се очаква, тъй като съгласно XRD основните кристални фази в стъкло-керамиките са съхранени и след теста в TRIS-HCl буфер. Могат да се забележат и някои промени.

Установява се намаляване на интензитета на ивиците при  $930\text{ cm}^{-1}$ , които се отнасят към Si-O колебания, което вероятно се дължи на намалената концентрация на SiO<sub>4</sub> единици в резултат на протичащите процеси на разграждане на силикатната мрежа в среда на TRIS-HCl буфер.

Наличието на рамо при  $\sim 960\text{ cm}^{-1}$  за образец C\*-1 (фиг. 6 а) може да се отнесе към колебания C-O в групата CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, както и към колебания на връзката P-O-P. Не и съавтори отнасят тази ивица към  $\nu_1$  колебание на групата PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> в структурата на кристални фосфати за проби, в контакт с разтвор на SBF. Тази ивица, както и друга с много малък интензитет при  $894\text{ cm}^{-1}$  се свързват с колебания на P-O връзка. Във FTIR спектъра на C-1\* се установява ивица при  $1200\text{ cm}^{-1}$  (видима и на фиг. 2 за образца преди теста), която се отнася към кристобалита SiO<sub>2</sub>. Освен това, интензитетът на ивиците при 795, 606 и  $560\text{ cm}^{-1}$ , които са характерни за кристобалита и витлокита (Ca,Mg)<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> леко намалява.

Този факт може да бъде обяснен с частичното разтваряне на тези фази в TRIS-HCl буфер, което потвърждава резултатите и заключенията от XRD. Във FTIR спектъра на проба C-1\* с молно съотношение Ca+Mg/Si+P=1 се наблюдава появата на нови ивици при 654, 718, 853, 1009, 1024 и  $1111\text{ cm}^{-1}$ . Пикът, разположен при  $654\text{ cm}^{-1}$ , може да се припише на  $\nu_4$  колебанието на групата PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. Ивицата при  $718\text{ cm}^{-1}$  може да се отнесе към CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Карбонатната група може да е включена в структурата на B-тип CO<sub>3</sub>HA, в която CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> → PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, калцит или комбинация от HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> и CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, присъстващи в Mg<sub>5</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O. Някои изследователски групи доказват, че ивицата при  $853\text{ cm}^{-1}$  може да бъде свързана с лабилна CO<sub>3</sub> в CO<sub>3</sub>HA от A/B тип. Пикът при  $1009\text{ cm}^{-1}$  може да бъде отнесен към  $\nu_3$  колебания на групата PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, а останалите при 1024 и  $1111\text{ cm}^{-1}$  се отнасят също така към  $\nu_3$  колебания на групата PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> в A тип CO<sub>3</sub>HA, в който CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> → OH<sup>-</sup>. От друга страна пиковете при 594 и  $853\text{ cm}^{-1}$  се свързват и с CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> в Mg<sub>5</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O.

От представените резултати от FTIR анализа може да се заключи, че след потапянето в TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни, характерните ивици за кристобалита и витлокита претърпяват промени в интензивността си, като тя намалява. Освен това, установяват се и характерните ивици за A/B CO<sub>3</sub>HA и Mg<sub>5</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>×4H<sub>2</sub>O.

В допълнение, във FTIR спектъра на пробата С-2\* с молно съотношение  $\text{Ca}+\text{Mg}/\text{Si}+\text{P}=2,18$  (фиг. 6 б) характеристичните пикове за акерманита (при  $853\text{ cm}^{-1}$ ) и мервинита (при  $884$  и  $585\text{ cm}^{-1}$ ) не се наблюдават (или са с намален интензитет) след престояване на образеца в TRIS-HCl буфер за 14 дни. Освен това, в представения спектър могат да бъдат отчетени някои нови ивици при  $520$ ,  $543$  и  $606\text{ cm}^{-1}$ . Те могат да бъдат свързани с  $\nu_4$  колебания на  $\text{PO}_4^{3-}$  групата.

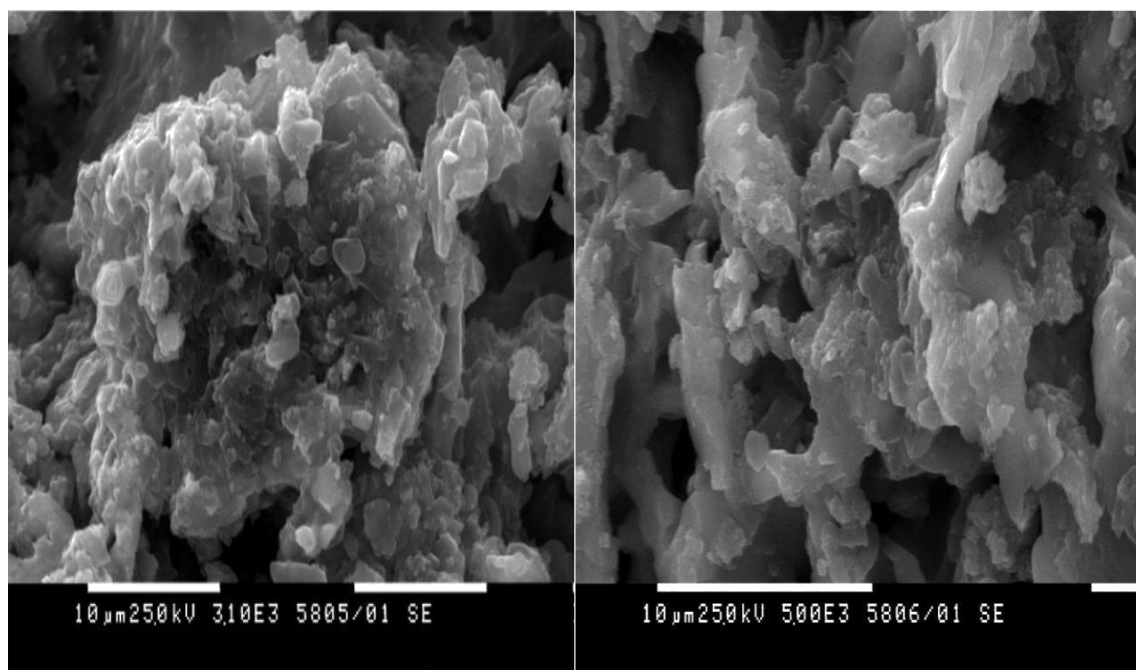
Ивицата с нисък интензитет, при  $840\text{ cm}^{-1}$ , може да бъде свързана с  $\text{CO}_3^{2-}$  йон, включен в кристалната структура на HA, в съответствие с изследванията на Regnier и съавтори. Ивицата при  $878\text{ cm}^{-1}$  може да бъде приписана на  $\text{CO}_3^{2-}$  в  $\text{CO}_3\text{HA}$  от тип В. Но тази ивица, както и тази, при  $793\text{ cm}^{-1}$ , могат да бъдат свързани също така с  $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

Въз основа на получените резултати може да се обобщи, че вследствие на престояване на образците в TRIS-HCl буфер за 14 дни във FTIR спектъра на образеца С-2\* настъпват следните промени: Характеристичните пикове за акерманита и мервинита не се установяват. От друга страна, някои нови ивици се появяват. Те се отнасят към колебания на образуваните нови кристални фази на повърхността на тестваната стъклокерамика.

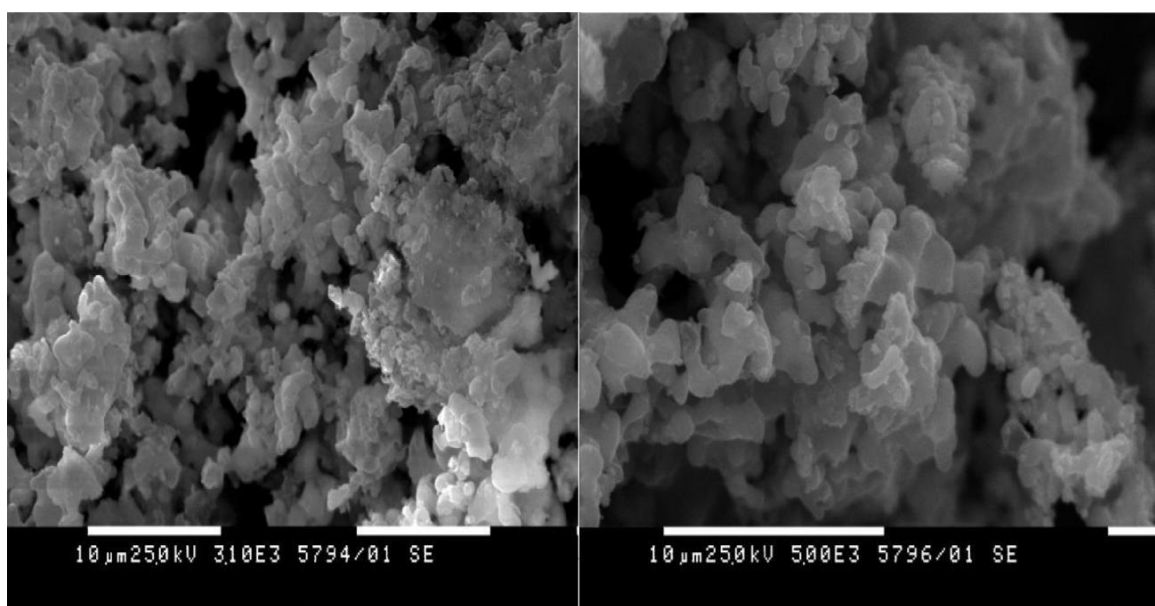
### *3.3 Морфология на повърхността на образците С-1\* и С-2\*, установена със SEM след престояване в TRIS-HCl буфер*

SEM изображенията на стъкло-керамиките, синтезирани по зол-гелен метод, и термично третираны при  $1200\text{ }^\circ\text{C}$ , след престояването им в разтвор на TRIS-HCl буфер за 14 дни, са представени на фиг. 7 и фиг. 8.

От SEM изображенията на стъкло-керамиките след наkisване в TRIS-HCl буфер се вижда, че между изходните образци и тези, след TRIS теста се установяват някои разлики. При С-1\* се променя морфологията на повърхността на частиците от гладка и равна, като по нея са образувани по-малки по размер, но агломерирали частици, някои от които са със сферична форма. Това може да се приеме като указание за получаване на кристален апатит. SEM наблюденията показват наличието и на големи кухини в образеца, чието присъствие би могло да се свърже с процеси на разтваряне на стъкло-керамиката в TRIS-HCl буфер.



**Фиг. 7.** SEM изображения на C-1\* (след тест в TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни)



**Фиг. 8.** SEM изображения на C-2\* (след тест в TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни)

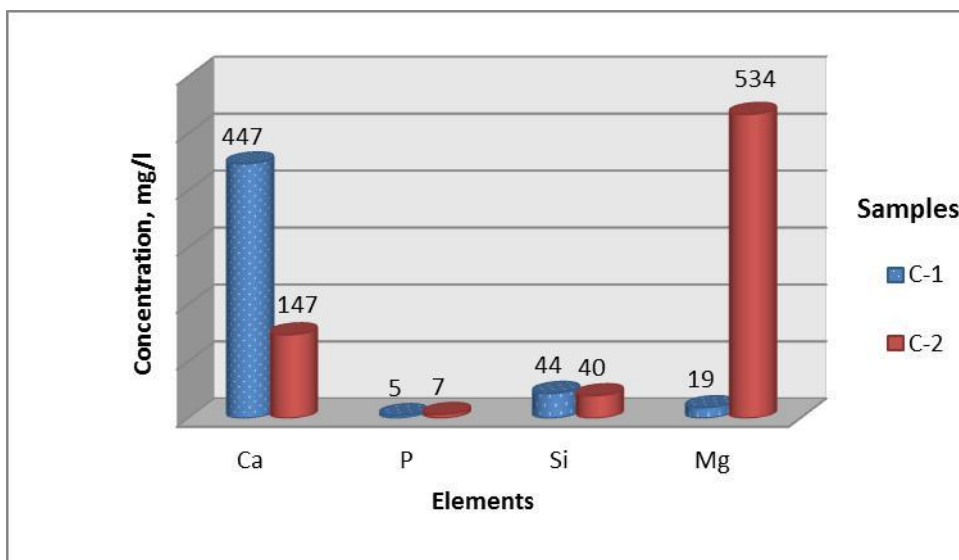
SEM изображенията на C-2\* показват друга особеност, а именно, че формално погледнато морфологията не се променя. Но това не е напълно вярно, защото след теста в TRIS-HCl буфер се променя размера на кристалните образувания, те стават по-големи.

Експерименталните данни от проведените анализи с XRD и FTIR ни дават основание да допуснем, че са протекли два процеса. Единият на разтваряне на керамиката, а другият на утаяване на продуктите на разтварянето върху повърхността на керамиката. Вследствие, размерът на частиците след престоя на образеца в разтвор на TRIS-HCl буфер

е значително по-голям. Забелязва се и образуването на широки пори, което е доказателство за протичането на гореспоменатите корозионни процеси.

### 3.4. Промяна на концентрацията на йоните в разтвора на TRIS-HCl буфер

Концентрацията на Ca, Si, P и Mg йони в разтвора на TRIS-HCl буфер, след теста на стъкло-керамиките, в продължение на 14 дни, е представена на фиг. 9.



**Фиг. 9.** Концентрация на Ca, Si, P и Mg йони, след престояване на стъклокерамиката (съответно C-1\* и C-2\*) в разтвор на TRIS-HCl буфер, в продължение на 14 дни, в статични условия.

От данните на фиг. 9 се вижда, че след престояването на стъкло-керамиките в разтвор на TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни, се установяват съществени различия между двата разтвора вследствие на отделените от керамиката йони. Така например, значителни са разликите в установените концентрации на Ca йони. От друга страна и в двете проби концентрацията на P йони е минимална (5-7 mg/l).

Вероятно ниската концентрация на P йони е лимитиращ фактор за нарастване на карбонат хидроксилапатитов слой на повърхността на потопените стъкло-керамики.

Това, обаче, в никакъв случай не означава, че тези йони не са били отделени от керамиката до 14-тия ден. По-скоро тези йони вече са утаени като кристални калциеви фосфати (апатит), както показват SEM изображенията. И при двата образца се наблюдава почти еднакво количество на отделените Si йони, което означава, че основната структурна мрежа Si-O-Si остава почти незасегната. Образец C-2\* показва по-голямо количество на отделени Mg йони. Това, по всяка вероятност, може да бъде обусловено от пълното разтваряне на Mg-съдържащите фази (новобразуваната Mg-фаза (хидромагнезит) е по-

голямо за този образец. Счита се, че повишените концентрации на Mg йони инхибират образуването на кристален хидроксиапатит. Това съответства на получените от нас експериментални резултати, според които образуването на СОзНА е в значително по-ниско количество за стъкло-керамика С-2\* в сравнение с С-1\*.

### 3.5. XPS спектри на образците С-1\* и С-2\* след престояване в разтвор на TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни

Проведени са изследвания с XPS, за да се идентифицират химичните състояния и структури на повърхността на синтезираната стъкло-керамика, след теста в разтвор на TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни в статични условия.

Позициите на пикове в експериментално получените XPS спектри на образците са представени в таблица 3.

**Таблица 3.** Позиции на пикове в XPS-спектрите на стъкло-керамики С-1\* и С-2\* (след престой в TRIS-HCl буфер за 14 дни)

C1s		Ca2p		P2p		O1s		Si2p	
C-1*	C-2*	C-1*	C-2*	C-1*	C-2*	C-1*	C-2*	C-1*	C-2*
Binding energy (BE) [eV]									
285.0	285.0	347.0	347.0	134.0	134.2	532.0	532.0	103.5	102.4
286.9	286.0	347.0	348.5		135.1	533.5	532.5	104.4	104.4

В Ca2p спектъра на стъкло-керамика С-1\* се наблюдава пик при 347.9 eV. В съответствие с литературни данни този пик може да се припише на малко количество CaCO<sub>3</sub> (арагонит). Освен това, се установяват два пика, при 347,0 eV за пробите С1\* и С2\*, които могат да се отнесат към Ca2p<sub>3/2</sub> в кристалната решетка на НА. Пикът при 348,5 eV за образец С-2\* също може да бъде свързан с Ca2p<sub>3/2</sub> в хидроксиапатит.

При наблюдението на P2p показва присъствието на три пика, с позиции съответно при 134,0 eV (за образец С-1\*) и при 134,2 и 135,1 eV (за образец С-2\*). В съответствие с литературни данни, пикове при 134,0 (134,2) eV съответстват на P2p в PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> в В-тип СОзНА.

Спектърът O1s показва две състояния, на които съответстват два пика със стойности на свързващата енергия при 532,0 eV (и за двата образца) и при 533,5 (532,5) eV за образците С-1\* и С-2\*, съответно. Първият може да съответства на Р-ОН връзки в

НА. Пикът при 533.5 eV може да е свързан с ОН групи, а пикът при 532.5 eV е показателен за наличието на SiO<sub>2</sub>, в който O<sub>2</sub> атоми са свързани с два SiO<sub>4</sub> тетраедъра.

Пиковите в спектрите на Si2p са разположени при 103.5 (102.4) eV за образец С-1\* и С-2\*; при 104.4 eV (и за двете проби). Пикът при 102,4 eV може да бъде свързан със Si-O връзки, а този при 103,5 eV с SiO<sub>2</sub> структури. Освен това двата пика при 104.4 eV може да се припишат на силиций, съдържащ аморфен калциев фосфат.

**От проведените изследвания могат да бъдат направени следните изводи**

Две нови стъкло-керамики в системата CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO са синтезирани по зол-гелен метод. След сушене на геловите и термична обработка при 1200 °C в продължение на 2 часа, с XRD е доказано наличието на витлокит и кристобалит в стъкло-керамикаС-1 с молно отношение Ca+Mg/Si+P=1 и силикокарнотит, акерманит и мервинит в стъкло-керамикаС-2 с молно отношение Ca+Mg/Si+P=2.18.

FTIR-спектрите на синтезираните образци показват наличието на основните абсорбционни ивици, съответстващи на колебания на химични връзки в кристални фази, в съгласие с данните за фазовия състав.

С помощта на SEM се установява, че структурата на стъкло-керамиките е специфична и хетерогенна. Тя се състои от неправилни частици с различна морфология и размери, в зависимост от състава на двете синтезирани стъкло-керамики.

След престояването на стъкло-керамиките в TRIS-HCl буфер, в продължение на 14 дни при статични условия, с XRD се установяват промени във фазовия състав на образците. В С-2\* след теста, отсъстват фазите акерманит и мервинит. От друга страна, в С-1\* витлокитът и кристобалитът са частично разтворени в буферната среда. И в двата образца се установява формиране на нови фази хидроксиапатит и хидромагнезит. Данните от FTIR са в съответствие с XRD анализа.

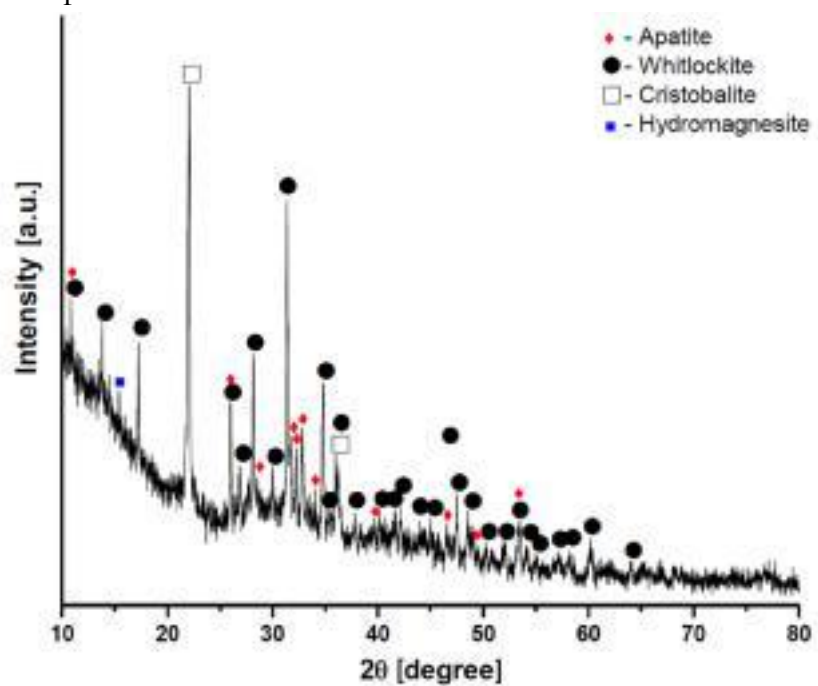
Освен това, във FTIR спектрите на образците се отчита присъствието на нови ивици, които дават основание да се счита, че в TRIS-HCl буферния разтвор на повърхността на синтезираните стъкло-керамики се образува карбонат хидроксиапатит (CO<sub>3</sub>HA). Въз основа на резултатите от FTIR анализа се приема, че на повърхността се образува А-тип и В-тип CO<sub>3</sub>HA.

SEM изображенията на тези образци показват, че повърхността им е покрита с карбонат апатитен слой с различна морфология. Спектрите на C1, Ca2p, P2p и Si2p от XPS анализа потвърждават, че върху повърхността на стъкло-керамиките след престоя им в буферния разтвор на TRIS-HCl се образува карбонат апатит, за който е вероятно и включване на силиций (Si-CO<sub>3</sub>HA).

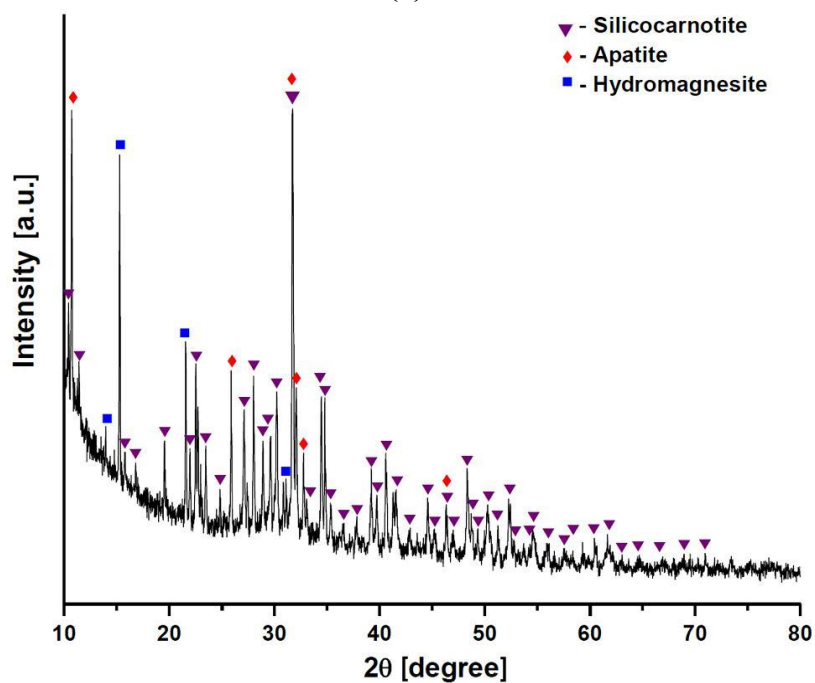
#### 4. Физикохимично характеризиране на синтезираните стъкло-керамика/ фиброин композити C1F и C2F

##### 4.1 Фазов състав на композитите по данни от рентгенодифракционния анализ

Рентгеновите дифрактограми на композитите C1F80/20 и C2F80/20 (в теговни %) са представени на фиг. 10.



(a)



(б)

Фиг. 10. Рентгенови дифрактограми на композити C1F80/20 (a) и C2F80/20 (б)

Представените експериментални резултати на фиг. 10 се отнасят за композити, съдържащи 80тегловни % стъкло-керамика (съответно С-1\* или С-2\*) и 20 % фиброин. Важно е да се напомни, че в синтеза на композитите са използвани стъкло-керамиките С-1\* и С-2\*, получени след 14 дневен престой в разтвор на TRIS-HCl буфер на изходните термично третираны стъкло-керамики.

Най-общо, посредством XRD са идентифицирани същите кристални фази, както и в стъкло-керамичните образци след престояването им в разтвор на TRIS-HCl буфер: С1\* и С2\*. В образец С1F80/20 са установени витлокит  $(\text{Ca},\text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF 70-2064), кристобалит  $\text{SiO}_2$  (PDF 85-0512), карбонат хидроксиапатит  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_x1/2(\text{OH})$  (PDF 01-072-7532) и хидромагнезит  $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (PDF 25-0513).

В другият образец С2F80/20 са установени силикокарнотит  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$  (PDF 40-0293), карбонат хидроксиапатит  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_x1/2(\text{OH})$  (PDF 01-072-7532) и хидромагнезит  $\text{Mg}_5(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  (PDF 25-0513).

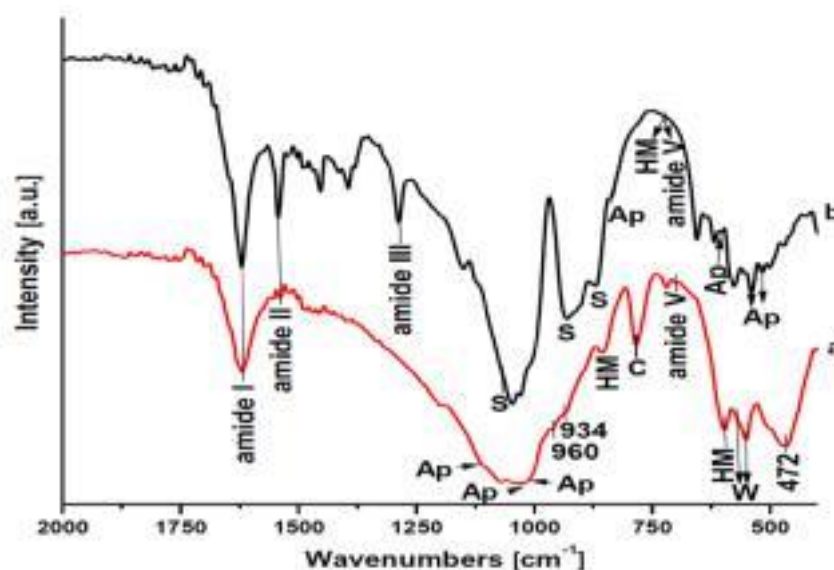
От вече описаните експериментални резултати за двете стъкло-керамики от системата  $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-MgO}$ , можем да заключим, че  $\text{CO}_3\text{HA}$  и хидромагнезитът са образувани на повърхността на образците вследствие на реакциите, протекли в средата на TRIS-HCl буфер. Ако се сравнят резултатите от XRD за С-1\* и С-2\* от фиг. 5, с тези за композитите на фиг. 10 ще се види, че дифракционните пикове на  $\text{CO}_3\text{HA}$  и хидромагнезита в композитите С1F80/20 и С2F80/20 имат по-малък интензитет. **Следователно**  $\text{CO}_3\text{HA}$  и хидромагнезитът са намалели количествено и този факт може да бъде свързан с процеса на частичното им разтваряне при експерименталните условия на синтез на композитите.

#### *4.2. Структурно характеризирание на композитите с инфрачервена спектроскопия с Фурие трансформация*

Задачата на FTIR анализа е да установи какви са промените, настъпили в резултат на синтеза на композитите, включващ процеси на замразяване и лиофилизация, върху двата компонента на композита – стъкло-керамика и фиброин. Стъкло-керамиките С-1\* и С-2\* след 14-дневен престой в среда на TRIS-HCl буфер са включени в състава на композитите.



Тъй като по-голям интерес представляват композитите C1F80/20 и C2F80/20 със съотношение на органичната и неорганичната част: 80% стъкло-керамика и 20% силк-фиброин на фиг. 11 е представено сравнение на тези композити.



**Фиг. 11.** Сравнение на FTIR спектри на композитни материали C1F80/20 (a) и C2F80/20 (b)

Фиброинът, който е органичен компонент в двата композита, показва адсорбционни ивици при  $1630\text{ cm}^{-1}$  и  $1550\text{ cm}^{-1}$  (за образец C1F80/20) и при  $1632\text{ cm}^{-1}$  и  $1552\text{ cm}^{-1}$  (за C2F80/20). Наблюдаваните пикове са характерни за  $\beta$ -sheet конформация на фиброина. Пикът при  $1286\text{ cm}^{-1}$ , наблюдаван в спектъра C2F80/20, е характерен за амид III. Ивиците за амид III не се установяват в спектъра на композит C1F80/20, а тези за амид II силно намаляват по интензитет, както може да се види от фиг. 11 (a). Съгласно литературни данни ивиците, свързани с амид II и амид III, също изчезват в инфрачервените спектри в дадените композити.

Какво е обяснението за изчезването на ивиците за амид III в спектъра на композита C1F80/20. Възможен отговор може да бъде намерен в изследването на хитозан/SF композити. Авторите са синтезирали хитозан/SF материали чрез смесване на хитозан и SF в съотношение 1:1 и заключават, че изчезването на ивицата при  $1628\text{ cm}^{-1}$  (амид I) може да бъде свързано с образуването на вътрешна молекулна връзка между хитозана и SF. В нашият случай, изчезването на ивицата за амид III и намаляване на интензитета на ивицата за амид II в C1F80/20, може да се обясни с образуването на силни водородни връзки между силк фиброина и ОН групите на Са-дефицитния карбонат хидроксиапатит,

който е образуван на повърхността на стъклокерамиката C-1 след престояването в TRIS-HCl буфер в продължение на 14 дни.

От друга страна, във FTIR спектъра на композит със състав C1F80/20 (фиг. 11(a)), ивицата при  $782\text{ cm}^{-1}$ , както и тези при  $560, 594, 606$  и  $853\text{ cm}^{-1}$ , могат да бъдат свързани с наличието на кристобалит и витлокит в образеца. Освен това, ивиците при  $654, 853, 960, 1009, 1024$  и  $1111\text{ cm}^{-1}$ , могат да бъдат отнесени към наличието на HA в композита със състав C1F80/20. Във FTIR спектъра на получения композит C2F80/20 (фиг. 11 (b)) се наблюдават абсорбционни ивици при  $520, 543, 606$  и  $840\text{ cm}^{-1}$ , които са характеристични за кристалните HA структури. В допълнение, пиковете при  $868, 939$  и  $1060\text{ cm}^{-1}$  могат да бъдат отнесени към силикокарнотита. Абсорбционните ивици, видими при  $\sim 720\text{ cm}^{-1}$ , могат да бъдат свързани с наличието на хидромагнезит и амид V.

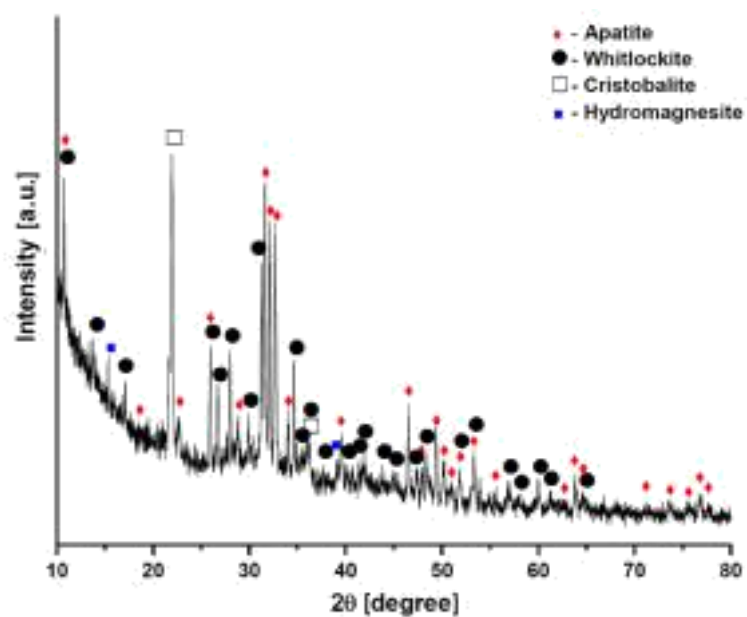
От представените резултати от FTIR анализа може да се заключи, че данните относно фазовия състав са в съответствие с представените резултати от XRD анализа. Основните кристални фази в стъкло-керамичните образци се запазват и при синтеза на композитите. Данните от инфрачервена спектроскопия потвърждават, че настъпват известни промени в съотношението на кристалните фази в образците поради частичното им разтваряне в процеса на синтез. По-значителна е тази промяна за композитите C1F, където карбонат хидроксиапатитът значително намалява количеството си.

FTIR-спектрите на композитите предоставят информация и за структурата на органичния компонент фиброин. Установено е отместване (*red shift*) на ивиците във FTIR-спектъра на композит C1F80/20, което се отнася към възможна връзка между отделните при частично разтваряне на карбонатапатита  $\text{Ca}^{+2}$  йони и C=O връзка на амид I. За същия композит, изчезването в спектъра на ивицата за амид III и намаляването на интензитета на ивицата за амид II се обяснява с образуването на силни водородни връзки между фиброина и OH групите на карбонат хидроксиапатита.

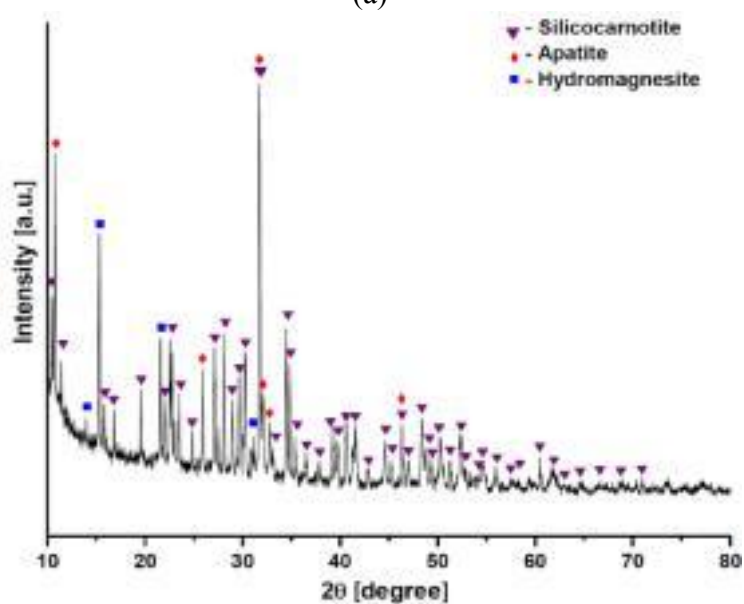
## **5. Изследване на *in vitro* биоактивността на стъклокерамика/силк фиброин композити в разтвор на SBF**

### *5.1 Промяна във фазовия състав на композитите след in vitro тест в SBF, според данните от рентгенодифракционния анализ*

Промяната във фазовия състав на изследваните композитни материали, след престояването им в разтвор на SBF в продължение на 14 дни в статични условия може да се проследи при рентгенограмите, дадени на фиг.12.



(a)



(б)

**Фиг. 12.** Ренгенови дифрактограми на композити C1F80/20 (а) и C2F80/20 (б) след престояване в разтвор на SBF тест в продължение на 14 дни

Резултатите от XRD, получени за композитите, преминали *in vitro* тест в 1.5 SBF разтвор за 14 дни в статични условия, са представени на фиг. 12.

Провеждането на тест за *in vitro* биоактивност в SBF има за цел да установи способността на материала да образува хидроксиапатит на повърхността си в разтвора, който наподобява естествена биологична среда.

В този смисъл, резултатите от проведения рентгенодифракционен анализ недвусмислено доказват, че в композит C1F80/20 количеството на кристален апатит (PDF 01-072-7532) е значително увеличено след престоя му в SBF.

Интензитетът на пиковете на апатитната фаза е нарастнал няколко пъти. Това заключение не е валидно за композит C2F80/20, в чиято рентгенограма след SBF-теста, не се установява нарастване на интензитета на дифракционните максимуми, отнесени към апатита и респективно на количеството му.

Необходимо е да се поясни, че методът позволява да идентифицираме кристални фази, и не изключва образуването на повърхността на композита на рентгеноаморфен апатитоподобен слой.

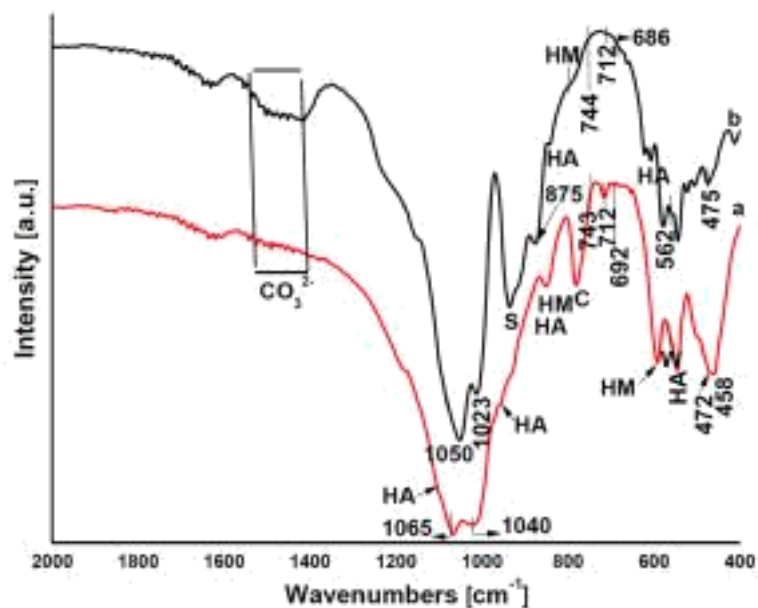
Към данните, получени от XRD може да се допълни, че както за синтезираните композити (фиг. 10), така и за композитите след SBF-теста (фиг. 12), на рентгеновите им дифрактограми се установява наличието на аморфно хало. Вероятно е то да се дължи и на фиброина, и на стъкловидната част на стъкло-керамиките.

От друга страна кристалността на останалите фази витлокит в C1F80/20; хидромагнезит и силикокарнотит в C2F80/20 е леко понижена след престояване в 1.5 SBF в продължение на 14 дни, т.е. те са частично разтворени в 1.5 SBF разтвора по време на теста.

## 5.2. Структурни промени в композитите след тест в SBF, съгласно данните от инфрачервена спектроскопия

Сравнението на FTIR спектрите на композитите C1F80/20 и C2F80/20 (със съотношение 80 тегл.% стъклокерамика: 20 тегл. % фиброин), преминали тест в SBF за *in vitro* биоактивност в продължение на 14 дни е представено на фиг. 13.

FTIR спектъра на композит със състав C1F80/20 (тегл.%) (фиг. 13 (a)) показва наличието на кристобалит с характеристични пикове съответно при  $795\text{ cm}^{-1}$ , и хидроксиапатит– при  $545, 960, \text{ и } 1111\text{ cm}^{-1}$ .



**Фиг. 13.** FTIR спектри на композити C1F80/20 (a) и C2F80/20 (b) след *in vitro* тест в разтвор на SBF в продължение на 14 дни в статични условия

Във FTIR спектъра на композит C2F80/20 (фиг. 13 (b)), ивицата при  $939\text{ cm}^{-1}$ , може да бъде отнесена към силикокарнотит, а тази при  $795\text{ cm}^{-1}$  може да бъде свързана с хидромагнезит.

Ивиците при  $608$  и  $840\text{ cm}^{-1}$  са показателни за наличие на хидроксиапатит. Наред с това FTIR спектрите и на двата композита показват ивици, които могат да се отнесат към колебания на фосфатната група:  $\nu_2\text{ PO}_4^{3-}$ ,  $\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$  и  $\nu_4\text{ PO}_4^{3-}$ . В спектъра на композит със състав C2F80/20 се установяват абсорбционни ивици, които могат да се отнесат към колебания на карбонатната група, по-конкретно: при  $875\text{ cm}^{-1}$  – към  $\nu_2$  на  $\text{CO}_3^{2-}$ , между  $1410$  и  $1570\text{ cm}^{-1}$  – към  $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ . Те съответстват на В-тип карбонатно заместване ( $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$ ) в решетката на HA.

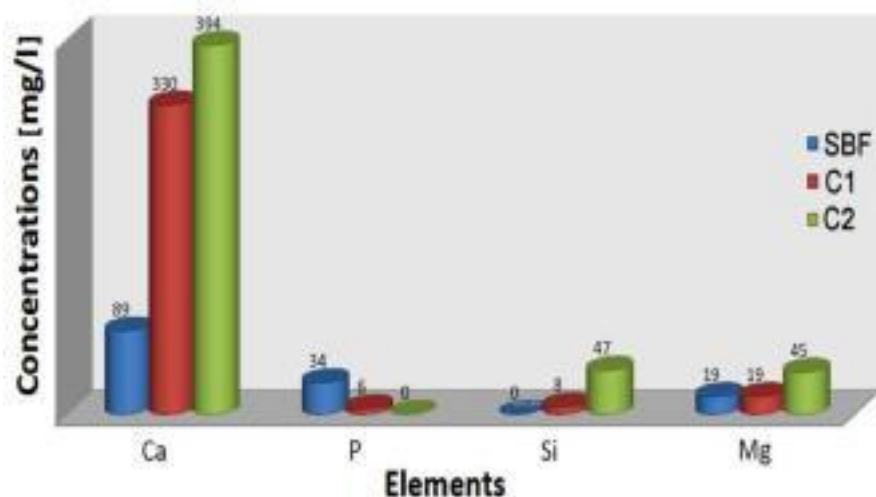
Също така, на фиг. 13 може да се види, че двата FTIR спектъра показват ивица, при  $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ , което може да се дължи на А-тип карбонатна субституция ( $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{OH}^-$ ) в апатитната структура, както и към амид II.

Тези данни ни позволяват да допуснем наличието на  $\text{CO}_3^{2-}$  йони в каналите на апатитната структура. От данните на FTIR спектрите представени на фиг. 13 може да се заключи, че В-тип  $\text{CO}_3\text{HA}$  (биоапатит) се образува преференциално на повърхността на образците в разтвор на 1.5 SBF, придружени със следи от различни полиморфни модификации на  $\text{CaCO}_3$  ватерит, арагонит и калцит.

### 5.3. Промяна на концентрацията на йоните в разтвора на 1.5 SBF след *in vitro* тест в продължение на 14 дни при статични условия

Фиг. 14 представя данните от проведения ICP-AES анализ за оценка на количеството йони Ca, Si, P и Mg.

Данните се отнасят за концентрацията на йони в разтворите на 1.5 SBF, след взаимодействието им с композитите със състав C1F80/20 и C2F80/20 (тегл.%) в продължение на 14 дни, при статични условия.



**Фиг. 14.** Резултати от ICP-AES за концентрацията на йони в SBF след 14 дневен тест на композити C1F80/20 и C2F80/20

Ca показва подобно поведение за композитите със състав C1F80/20 и C2F80/20. Както ясно се вижда, количеството на Ca нараства до 330 и 394 mg/l (за сравнение концентрацията на Ca в първоначалния 1.5 SBF разтвор е 89 mg/l).

Концентрацията на P (6 и 0.5 mg/l) е може би ограничаващият фактор за растеж на слоя CO<sub>3</sub>HA върху повърхността на синтезираните композити. Концентрацията на Mg в разтвора 1.5 SBF след престоя на композит C1F80/20 не е променена (19 mg/l) в сравнение със съдържанието на Mg в изходния 1.5 SBF (19 mg/l). От една страна количеството на магнезий в стъкло-керамика C-1 не е високо, а от друга, както тестът в TRIS-HCl буфер, така и този не водят до значително отделяне на магнезиеви йони в разтворите, което може да бъде обяснено и с ниската степен на разтворимост на Mg съдържащите фази, респективно: витлокита и аморфната силикатна фаза. По-високо е съдържанието на Mg в разтвора, взаимодействал с композит C2F80/20 (45 mg/l). Хидромагнезитът и вероятно аморфната силикатна фаза са източници на отделените магнезиеви йони в SBF.

Освен това, концентрацията на Si е съответно 8 mg/l (за образца C1F80/20) и 47 mg/l (за образца C2F80/20). Този факт също може да бъде свързан с фазовия състав на

пробите. Известно е, че кристобалитът има по-ниска скорост на разтваряне в сравнение със силикокарнотита в SBF.

### 3.4.3. XPS анализ на композитите C1F и C2F след след *in vitro* тест в разтвор на SBF в продължение на 14 дни

Изследванията с XPS на композитните материали, след *in vitro* теста в разтвор на 1.5 SBF, са проведени, за да се идентифицират химичните състояния и получените повърхностни структури. Позициите на пиковете на различните химични състояния на елементите са посочени в Таблица 4.

**Таблица 4.** Профилни параметри на XPS-спектрите на композити C1F80/20 и C2F80/20 след *in vitro* тест в разтвор 1,5 SBF за състояния на Ca2p, O1s, Si2p, P2p и C1s

C1s		Ca2p		P2p		O1s		Si2p	
C1F	C2F	C1F	C2F	C1F	C2F	C1F	C2F	C1F	C2F
Binding energy (BE) [eV]									
285.0	285.0	345.5	347.5	133.5	133.7	531.3	531.01	103.3	103.5
		347.5				532.6	532.6		
						533.3	533.8		

Пиковете при 345.5 и 347.5 eV (Ca2p) и 133.5, 133.7 eV (P2p) и 531.01, 531.3 eV (O1s) потвърждават наличието на апатит, както става ясно и от изследванията на други автори.

В допълнение, пикове за Ca2p със свързваща енергия при 347.5 eV могат също да бъдат отнесени към Si-НА структури с различно количество силиций.

От проведените до момента изследвания на синтезираните композитни материали, се оформят следните **изводи**.

Две нови стъкло-керамики (C\*-1 и C\*-2) в системата CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO, след третиране в TRIS-HCl буфер, са използвани за синтез на стъкло-керамика/ фиброин композитни материали, в които неорганичният и органичният компонент са съответно в три различни тегловни съотношения 80/20, 50/50 и 80/20.

След синтеза на двете серии композити, с помощта на XRD е доказано наличието на различни кристални фази: витлокит, кристобалит, хидроксиапатит и хидромагнезит,

които са включени в състава на стъклокерамиката С\*-1 и силикокарнотит, хидромагнезит и хидроксиапатит – в С\*-2. FTIR спектрите на получените композити показват наличието на основни абсорбционни ивици, съответстващи на органичните и неорганичните фази на композитите. След *in vitro* теста в разтвор на 1.5 SBF в продължение на 14 дни в статични условия, с XRD е потвърдено образуване на НА.

От друга страна, количеството на витлокит, хидромагнезит и силикокарнотит леко се понижава, т.е. тези фази частично се разтварят в 1.5 SBF по време на теста. Освен това, интерпретацията на FTIR спектрите на образците установява, че В-тип СО<sub>3</sub>НА (биоапатит) е преференциално образуван на повърхността на образците след *in vitro* теста. XPS спектрите на пробите доказват, че НА се образува върху повърхността на композитите, в среда на 1.5 SBF. ICP-AES измерванията на концентрацията на йоните в разтвор на 1,5 SBF, след теста за *in vitro* биоактивност дават основание да се допусне, че на повърхността на С2F80/20 композит се образува силициево заместен СО<sub>3</sub>НА.

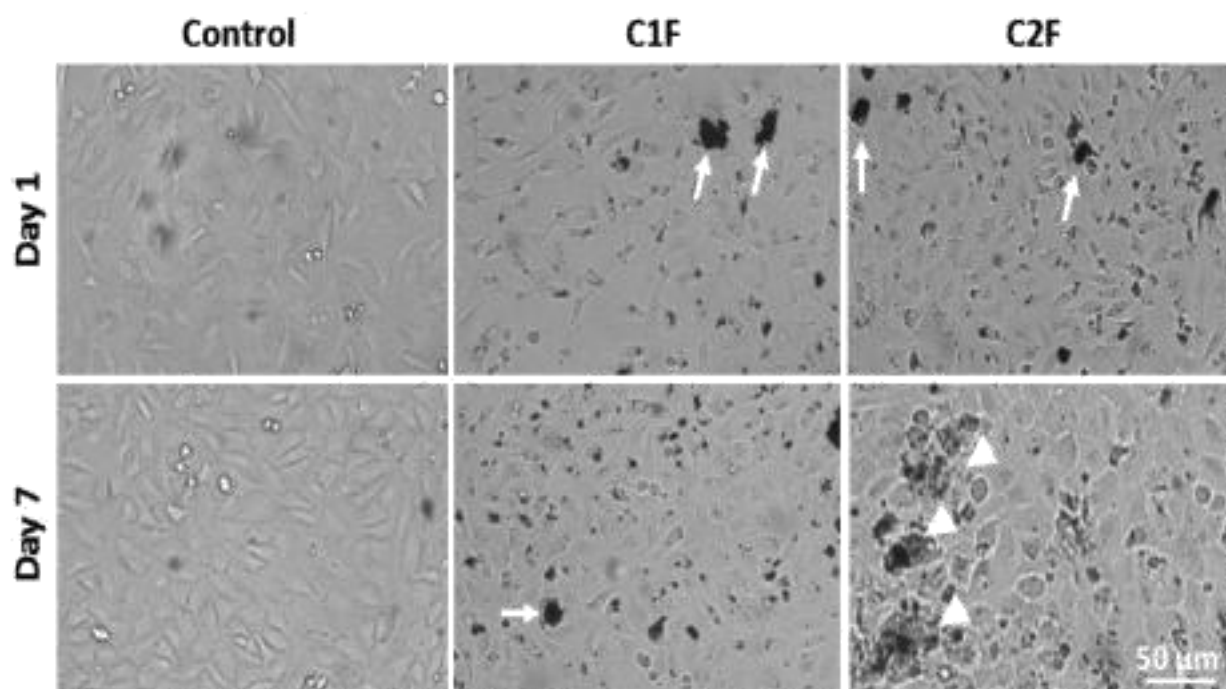
На основа на получените експериментални резултати може да се обобщи, че изследваните композитни материали са с добра *in vitro* биоактивност.

## **6. Цитотоксичност на композити С1F и С2F**

Двата охарактеризирани композитни материали със състав С1F80/20 и С2F80/20 (тегл.%) са тествани за цитотоксичност върху MG63 клетки.

Резултатите показват, че няма ефект на токсичност в концентрационен диапазон от 1 до 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  от С1F80/20 или С2F80/20 от първия ден до седмия ден. Контрастната микроскопия показва, че на първия ден след третирането клетките са прикрепени върху блюдата и са с полигонална морфология (фиг. 15). Образуването на агрегати в клетъчната среда съдържаща композити С1F и С2F също е ясно видимо на снимките (фиг. 15). При нормална скорост на клетъчно делене, клетките пролиферират и достигат сливане на третия ден, имобилизирайки гранулите в клетъчния слой. След това клетките се натрупват около гранулите образувайки рефриращи мултислоеве (фиг. 15). MG63 клетките не показват напреднала диференциация през периода на изследване и не са забелязани значителни морфологични разлики между двата композита, използвани за третиране на клетъчните култури.



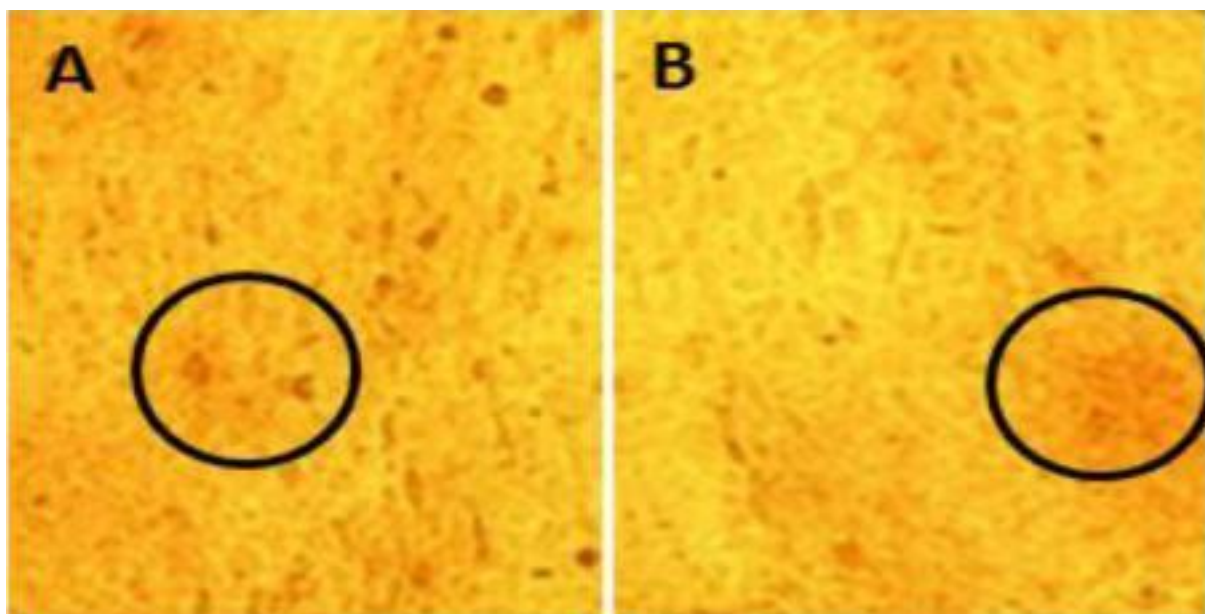


**Фиг. 15.** Контрастна микроскопия на MG63 клетъчна пролиферация след третиране с  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  на образците C1F или C2F за различни интервали от време (стрелките показват образувани агрегати от биоматералите, а белите триъгълници показват образуването на рефрингентна матрица около гранулите).

Някои проучвания показват, че йонните продукти, които се освобождават от биокерамиките при разтварянето им, създават благоприятна среда за пролиферация на остеобласти и диференциация *in vivo*. Високият индекс на биоактивност обаче може да доведе до бързо изместване на рН на хранителната среда *in vitro*, което може да е неблагоприятно за клетъчния метаболизъм.

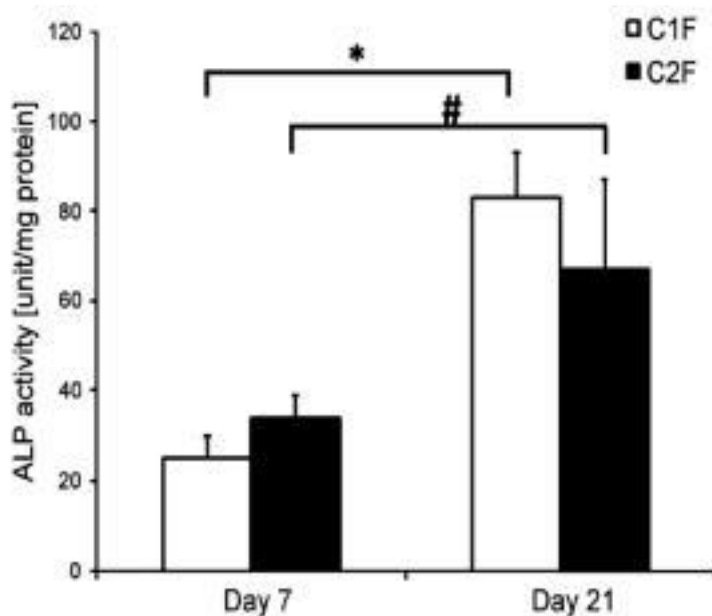
За да се проучи този процес, допълнително се проучи ефекта на C1F80/20 и C2F80/20 върху минерализацията на MG63 за период до 21 дни, като показател за напреднала клетъчна диференциация. образуването на калциеви възли се открива чрез оцветяване с Alizarin Red S (ARS).

Както е показано на фиг. 16, диференциация, индуцирана от калциеви възли, се наблюдава в MG63 клетки, третирани и с двата композита в продължение на 21 дни. Клетките са третирани с  $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  C1F80/20 (фиг. 16 А) или C2F80/20 (фиг. 16 В). Всички клетки са оцветени с ARS, за да се открият калциевите възли и са анализирани при увеличение 40x. Окръжностите ограждат области, където клетките образуват калциеви възли в контакт с композитите.



**Фиг. 16.** Неразтворими калциеви възли (червено), образувани в клетки MG63, подложени на диференциация за композити със състави: а) C1F80/20 и б) C2F80/20 (тегл.%)

За да се определи биоактивността на MG63 клетките, култивирани в присъствието на C1F и C2F композити, особено внимание е обърнато на алкалната фосфатазна – (ALP) активност, тъй като този ензим е общ индикатор за експресията на остеобластичния фенотип.



**Фиг. 17.** ALP активност в монослой MG63, нарастващ в присъствието на композити със състав C1F80/20 и C2F80/20, определени от три репликатни култури, показани като средната  $\pm$ SD (\*  $p < 0.010$ , #  $p < 0.033$ )

Фиг. 17 показва ALP активността на MG63 клетки, култивирани върху C1F и C2F в продължение на 7 и 21 дни. Активността на ALP на клетките MG63, култивирани за 7 дни с C1F и C2F, не се различава значително. Въпреки това, ALP активността на MG63 клетките, култивирани с C2F, е малко по-висока от тази за другите проби, култивирани с композит C1F. Данните показват, че ALP активността на клетките MG63, култивирани с композити C1F и C2F, е приблизително 4 пъти по-висока на 21-ия ден, отколкото на 7-ия ден.

**Изводите**, които могат да бъдат направени спрямо биологичните експерименти с клетки на остеосаркома MG63 показваха, че композитите създават благоприятна среда за пролиферация и диференциация на остеобластите *in vitro*.

В този контекст ALP активността на MG63 клетките, култивирани за 7 дни с C1F и C2F, не се различава значително, като активността на ALP на MG63 клетките, култивирани с C2F, е малко по-висока от тази за другите проби, култивирани с C1F. Важен положителен резултат е, че активността на алкалната фосфатаза на MG63 клетки, култивирани с композити C1F и C2F, е приблизително 4 пъти по-висока на 21-ия ден в сравнение с тази на седмия ден.

## ИЗВОДИ

1. Две **нови стъкло-керамики** в системата CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO са синтезирани чрез зол-гелен метод, съответно C-1 е с молно отношение Ca+Mg/Si+P=1, а C-2 – Ca+Mg/Si+P=2.18.
2. Чрез проведеното експериментално фазово-структурно охарактеризиране на синтезираните стъкло-керамични материали с рентгенодифракционен анализ, инфрачервена спектроскопия и сканираща електронна микроскопия е установено, че те са полифазни и значително се различават помежду си по фазов състав и микроструктура. В стъкло-керамика C-1 преобладава витлокит, съпътсван от кристобалит, докато силикокарнотит е основната фаза в C-2, но присъстват още акерманит и мервинит. Идентифицираните кристални фази в стъкло-керамиките показват, че те са перспективни за биоприложения.
3. Проведено е изследване на *in vitro* биоактивността на стъкло-керамиките чрез тест в TRIS-HCl буфер и комплекс от експериментални методи, включващ рентгенодифракционен анализ, инфрачервена спектроскопия, сканираща електронна микроскопия, оптично емисионна спектроскопия с индукционно свързана плазма, рентгенова фотоелектронна спектроскопия. Категорично е установена способността на стъкло-керамиките да отделят Ca<sup>2+</sup> и PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-йони в разтвора и да образуват на повърхността си хидроксиапатитов слой, т.е. те проявяват висока *in vitro* биоактивност. Образуваният апатит е А- и В-тип субституиран карбонат хидроксиапатит, за който е вероятно да включва и силиций в кристалната си решетка.
4. Синтезирани са нови стъкло-керамика/ фиброин композити, в които неорганичният и органичният компонент са съответно в три различни тегловни съотношения 80/20, 50/50 и 20/80. **Нов и оригинален подход** е приложен при синтеза на композитите, като повърхността на стъкло-керамиките е модифицирана, чрез третиране в TRIS-HCl буферен разтвор. Вследствие на третирането е образуван хидроксикарбонат апатит и хидромагнезит в модифицираните стъкло-керамики C\*-1 и C\*-2 и частично или напълно са разтворени някои от съдържащите се в изходните стъкло-керамики фази.
5. След синтеза на двете серии композити с рентгенодифракционен анализ, инфрачервена спектроскопия е доказано наличието на основните кристални фази на стъкло-керамиките C\*-1 и C\*-2. Витлокит, кристобалит, хидроксиапатит и малко хидромагнезит са включени в състава на композитите C1F, а силикокарнотит, хидромагнезит и хидроксиапатит – в C2F.
6. Инфрачервените спектри на получените композити показват наличието на основни абсорбционни ивици, съответстващи на органичните и неорганичните фази на композитите. Интерпретацията на спектроскопските данни дава основание да се предположи образуването на силни водородни връзки между силк фиброина и ОН групите на карбонат хидроксиапатита в композит C1F80/20.

7. Проведено е изследване на *in vitro* биоактивността на композитите чрез тест в 1.5 SBF за 14 дни при статични условия и комплекс от методи за фазов анализ. Експериментално е потвърдена *in vitro* биоактивността на композитите чрез способността им да натрупват хидроксиапатит. В-тип силициевозаместен карбонат хидроксиапатит е преференциално образуван върху повърхността на композитите след теста, съгласно данните от инфрачервена спектроскопия, оптично емисионна спектроскопия с индукционно свързана плазма и рентгенова фотоелектронна спектроскопия.
8. Биологичните експерименти с клетки на остеосаркома MG63 доказват, че композитите C1F80/20 и C2F80/20 създават благоприятна среда за пролиферация и диференциация на остеобластите *in vitro*. В този контекст ALP активността на MG63 клетките, култивирани за 7 дни с C1F и C2F, не се различава значително, като активността на ALP на MG63 клетките, култивирани с C2F, е малко по-висока от тази за другите проби, култивирани с C1F. Важен положителен резултат е, че активността на алкалната фосфатаза на MG63 клетки, култивирани с композити C1F и C2F, е приблизително 4 пъти по-висока на 21-ия ден в сравнение с тази на седмия ден.
9. Резултатите от проведените *in vitro* и биологични експерименти доказват, че синтезираните нови стъкло-керамика/ фиброин композити проявяват много добра *in vitro* биоактивност и биосъвместимост, следователно те могат да намерят практическо приложение в костно регенеративната медицина.

### **Приноси на дисертационния труд**

В контекста на представените цели на дисертацията може да се заключи, че те бяха изпълнени в своята цялост с използването на нов подход за синтез на органично-неорганични композитни материали в системата фиброин / стъкло-керамика.

Приносите на настоящата докторска теза са:

1. Синтезирани са две нови стъкло-керамики с различно молно отношение на компонентите, влизащи в състава на гела за синтез доказана е тяхната висока *in vitro* биоактивност.
2. Осъществен е нов подход за получаването на композитни материали чрез третиране на стъкло-керамиките в TRIS-HCl буфер, което води до значителна *in vitro* активност.
3. Доказана е биологичната активност на изследваните композитни материали, което отваря потенциална възможност за бъдещи клинични приложения.

## Публикации

### Публикации в списания с импакт фактор и/или импакт ранг

Lachezar Radev, Irena Michailova, **Hristo Georgiev**, Diana Zaimova, Carbonate apatite formation on novel multiphase CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO glass-ceramics in TRIS-HCl buffer, *Processing and Application of Ceramics*, Volume 10, Issue 2, 2016, 57-66. (IF=1.070)

Lachezar Radev, Irena Michailova, Silviya Stateva, Diana Zaimova, **Hristo Georgiev**, Margarita Apostolova, *In vitro* bioactivity of glass-ceramic/fibroin composites, *Processing and Application of Ceramics*, Volume 11, Issue 2, 2017, 136-146. (IF=1.070)

Antony Kolev, Violeta Vassileva, **Hristo Georgiev**, INTERACTION BETWEEN FIBROIN AND ALGINATE IN THE CORRESPONDING BLENDED FILMS, *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 52, 3, 2017, 449-456. (SJR=0.194)

### Други публикации в международни реферирани списания

Lachezar Radev, Todor Gerganov, **Hristo Georgiev**, Antony Kolev, Violeta Vassileva, Rumiana Iankova, Ekaterina Cholakova, "Silk fibroin/calcium phosphate silicate composites: In vitro bioactivity" *International Journal of Materials and Chemistry* 2013, 3(3A): 8-15.

### Участия в научния форуми

SIXTH BALKAN CONFERENCE ON GLASS SCIENCE & TECHNOLOGY and 18<sup>th</sup> CONFERENCE ON GLASS AND CERAMICS, 01.10 – 04.10 2014, Nessebar, Bulgaria.

THE MACROJOURNALS CONFERENCE ON MEDICINE, SCIENCE, AND TECHNOLOGY, 4-5 AUGUST 2014 DUBROVNIK, CROATIA.

16<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE "MATERIALS, METHODS AND TECHNOLOGIES" 11-15 JUNE, 2014, ELENITE HOLIDAY VILLAGE, BULGARIA

### Забелязани цитати на публикации по темата на дисертацията

Radev, L., Michailova, I., Georgiev, H., Zaimova, D., Carbonate apatite formation on novel multiphase CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>- MgO glass-ceramics in TRIS-HCl buffer, *Processing and Application of Ceramics*, 10, (2016) 2, 57-66.

1. Lovón-Quintana, J. J., Rodriguez-Guerrero, J. K., Valença, P.G., Carbonate hydroxyapatite as a catalyst for ethanol conversion to hydrocarbon fuels, *Applied Catalysis A: General*, 542 (2017) 136–145.
2. Abbas Ghasemi, Babak Hashemi, Co-existence effect of tricalcium phosphate and bioactive glass on biological and biodegradation characteristic of Poly L-Lactic Acid (PLLA) in trinary composite scaffold form (Nov 2017) *Bio-medical materials and engineering*.

Radev, L., Michailova, I., Stateva, S., Zaimova, D., Georgiev, H., Apostolova, M., In vitro bioactivity of glass-ceramic/fibroin composites, *Processing and Application of Ceramics*, Volume 11, Issue 2, 2017 136-146.

3. Sepantafar, M., Mohammadi, H., Maheronnaghsh, R., Tayebi, L., Baharvand, H., Single Phased Silicate-containing Calcium Phosphate Bioceramics: Promising Biomaterials for Periodontal Repair, *Ceramics International* (2018) in press.