

УДК 544.2

## ПОКРИТТЯ ДЛЯ БІОМЕДИЧНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ НА ОСНОВІ ГІДРОКСИАПАТИТУ, ХІТОЗАНУ ТА СРІБЛА

Г.О. Яновська\*, В.М. Кузнецов, О.С. Станіславов, В.Ю. Ілляшенко

*Інститут прикладної фізики Національної академії наук України  
вул. Петропавлівська, 58, Суми, 40000, Україна*

*Покриття імплантатів, що містять гідроксиапатит та срібло, є перспективними завдяки їхнім потенційним антимікробним властивостям. Їхнє застосування дозволяє зменшити вірогідність інфікування у місці контакту імплантату з оточуючими тканинами. Метою роботи є одержання покриттів, що містять у своєму складі як неорганічні (Ag), так і органічні (хітозан) компоненти, і оцінка вмісту срібла в одержаних покриттях, що здійснювали методом атомно-абсорбційної спектроскопії. Методом термодепозиції одержано покриття на основі гідроксиапатиту на поверхні титанового сплаву Ti6Al4V з додаванням срібла. Введення до вихідного розчину для синтезу хітозану дозволяє підвищити концентрацію срібла в одержаних покриттях.*

### ВСТУП

Бактеріальні інфекції в контактах імплантат–тканини організму часто мають місце. Одним із шляхів зменшення інфекцій, пов'язаних з імплантатом, є створення антибактеріальних покриттів на поверхні імплантату. Хітозан (ХТЗ), будучи похідним природного полімера, має бактерицидні властивості, нижчі, ніж синтетичні бактерицидні агенти, тому з часом він зберігає лише бактериостатичну, а не бактерицидну активність.

Використання срібла є одним з найкращих методів для посилення антимікробних властивостей біоматеріалів та імплантатів [1]. Срібло відоме як своїм бактерицидним впливом, так і широким спектром антимікробної дії [2–4].

Для посилення антимікробних властивостей хітозану необхідним є його додаткове модифікування. В роботі [5] мембрани, модифіковані хітозаном, витримували в розчинах різних неорганічних бактерицидних агентів. Показано, що мембрани, оброблені розчином  $\text{AgNO}_3$ , мають 100 % бактерицидну активність і зберігають її протягом 56 днів [5].

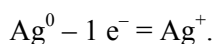
Покриття Ag–гідроксиапатит (ГА) також мають антибактеріальну активність [6–9]. Їх одержують різними методами: термічним розпиленням [10–11], колоїдним золь-гель осадженням [8, 12–13], плазмовим розпиленням [6], магнетронним розпиленням [7], електрохімічним осадженням [14–16], осадженням за допомогою пучків іонів [17]. В нашій роботі покриття Ag–гідроксиапатит одержані методом термодепозиції, в основі якого покладено принцип зменшення розчинності ГА при збільшенні температури субстрату, на який відбувається осадження з водного розчину [18].

Відомо, що антибактеріальна активність покриттів обумовлена наявністю вільних іонів срібла [19]. Бактерії є надзвичайно чутливими до іонів срібла, бактерицидна активність спостерігається навіть при таких незначних концентраціях як 35 ppb [20]. Інші автори [10] зазначають, що мінімальна концентрація срібла у розчині сироватки телячих ембріонів (FBS – fetal bovine serum), яка пригнічує активність мікроорганізмів, становить 4.0–7.9 ppm. Але в біологічному середовищі їхня активність може втрачатися, завдяки поєднанню з протеїнами, а саме їхніми групами SH– та NH– [19]. У зв'язку з цим актуальним є пошук оптимальної методики для введення Ag до складу покриттів на основі ГА, одержаних методом термодепозиції, комбінування хітозану, срібла та гідроксиапатиту в одержаних покриттях з метою створення покриттів, що матимуть антибактеріальні властивості.

### ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Розчин іонів  $\text{Ag}^+$  з концентрацією 10 мг/л було одержано при електролізі з розчинним срібним анодом, в ході наступного процесу:

\* контактний автор [biophy@yandex.ru](mailto:biophy@yandex.ru)



Як вихідні розчини для синтезу гідроксиапатиту брали: 10 ммоль/л  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  + 6 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Всі реактиви мали кваліфікацію х.ч.

В експериментах використовували розчинний в кислотах хітозан з молекулярною масою 200 кДа, ступенем деацетилювання 87 % виробництва Haidebei Marine Bio Ltd. (Китай). Оскільки хітозан переходить у водний розчин у кислому середовищі у формі полікатиона, для його розчинення використовували 1 % розчин  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Розчини хітозану мали концентрації 5 г/л та 1 г/л. Розчин з концентрацією 5 г/л використовували для одержання полімерної плівки. Для цього титановий субстрат послідовно занурювали в розчини  $\text{H}_2\text{O}_2$  та 10 М  $\text{NaOH}$ , після чого висушували протягом доби при кімнатній температурі. На одержану плівку методом термодепозиції проводили осадження покриттів протягом 60 хв при 80 °С, рН = 6.72.

Для визначення концентрації іонів срібла в одержаному покритті застосовували метод атомно-абсорбційної спектроскопії (КАС-120.1, Україна). Титанові субстрати з покриттями ГА обробляли концентрованою азотною кислотою до припинення реакції. Об'єм проби був доведений до 3 мл. Промиті та висушені субстрати зважували на лабораторних електронних вагах AD50 і за різницею мас до та після обробки  $\text{HNO}_3$  визначили масу покриття ГА. Проби, що необхідно проаналізувати, дозували всередину печі дозатором FAA-50. Довжина хвилі для  $\text{Ag}$  – 328.1 нм, ширина спектральної щілини 0.4 нм. Розчини для калібрування були приготовані з державних стандартних зразків розчинів солей металів (ГСО 6077–91) з концентраціями 0.25 та 0.5 мг/л. Результати вимірювань перераховані на суху масу ГА покриття для кожного зразка.

Морфологію поверхні та елементний склад одержаних покриттів досліджували методом растрової електронної мікроскопії РЕММА-102 (Україна). Фазовий склад покриттів досліджували на приладі ДРОН-4-07 (Росія). Покриття одержували методом термодепозиції (рис. 1) [18].

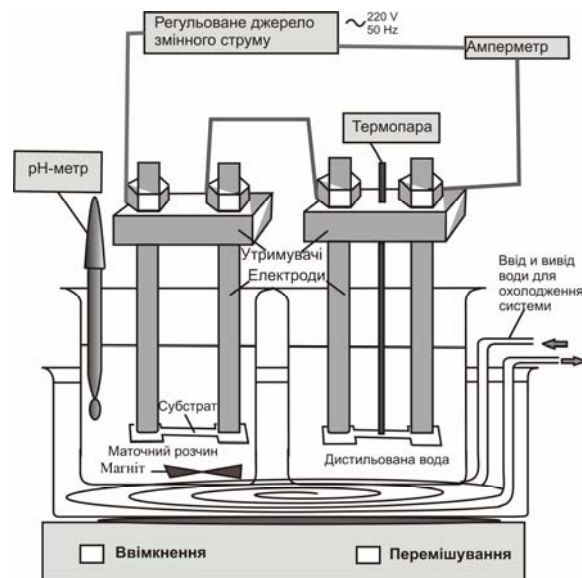


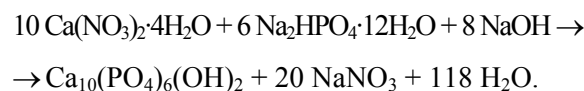
Рис. 1. Установа для одержання покриттів методом термодепозиції [18].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Введення хітозану та срібла до складу покриттів на основі ГА відбувалось при спільному осадженні компонентів з водних розчинів методом термодепозиції. Субстрати, на які здійснювали осадження, виготовлені зі сплаву  $\text{Ti6Al4V}$ , який широко використовується як матеріал для імплантатів в ортопедії та стоматології.

Хітозан є слабким катіонним поліелектролітом, розчинність якого залежить від рН. В розчині оцтової кислоти аміногрупи хітозану є протонованими. При збільшенні рН протоновані аміногрупи хітозану нейтралізуються. Однією з найважливіших властивостей хітозану є те, що аміногрупи та гідроксогрупи можуть утворювати хелатні комплекси з іонами срібла завдяки координаційній взаємодії [21]. Ця властивість дозволяє використовувати хітозан як відновник при виробництві нанорозмірних матеріалів, що містять срібло. Тому при спільному осадженні  $\text{H}_2\text{O}_2$  та ГА із водних розчинів доцільним є спочатку ввести розчин іонів срібла до розчину хітозану з коригуванням рН, а потім додавати вихідні компоненти для синтезу ГА.

Синтез гідроксиапатиту відбувався за наступною реакцією:



Склад вихідних розчинів для синтезу покриттів методом термодепозиції наведено в таблиці 1.

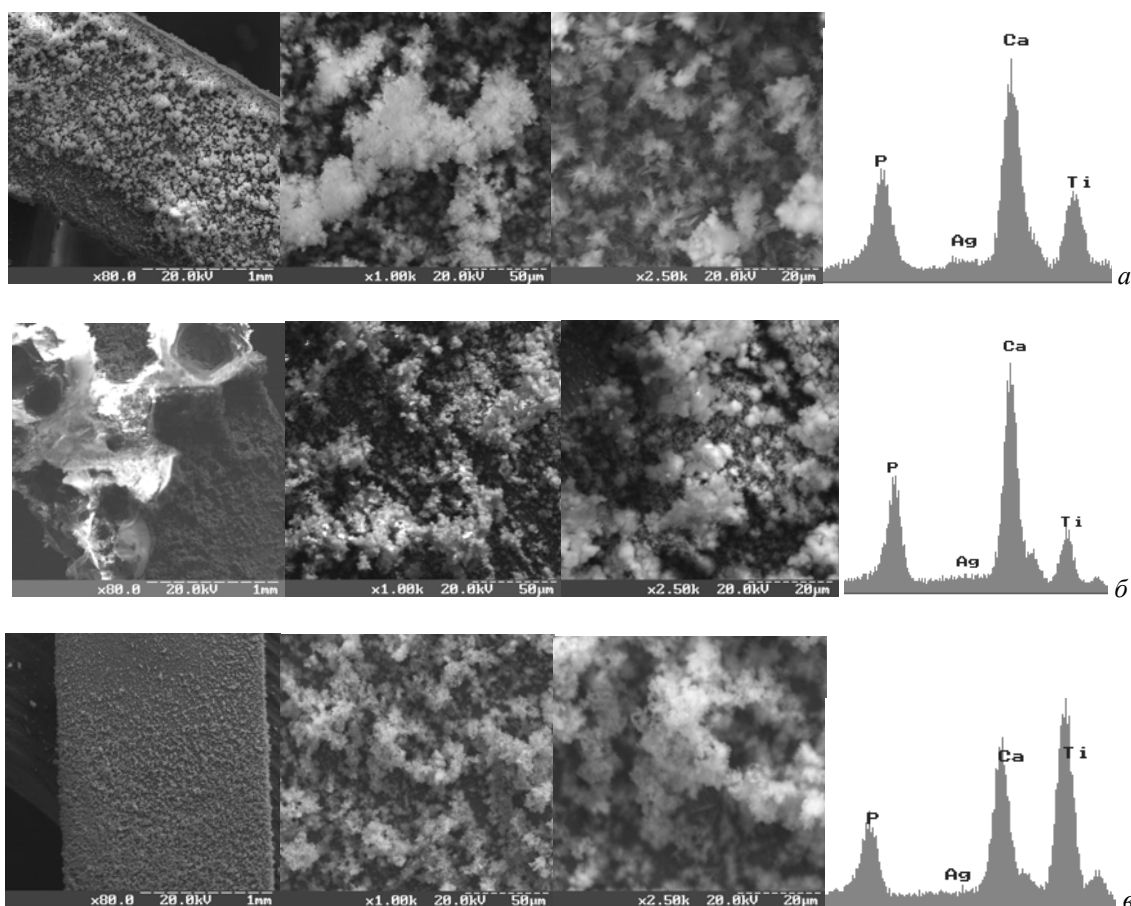
Перевагою одержання покриттів з хітозаном методом термодепозиції є низька температура (до 100 °С), що дозволяє запобігти руйнуванню полімерного компонента покриття, а також

одержати однорідні покриття з заданим фазовим та елементним складом різної товщини.

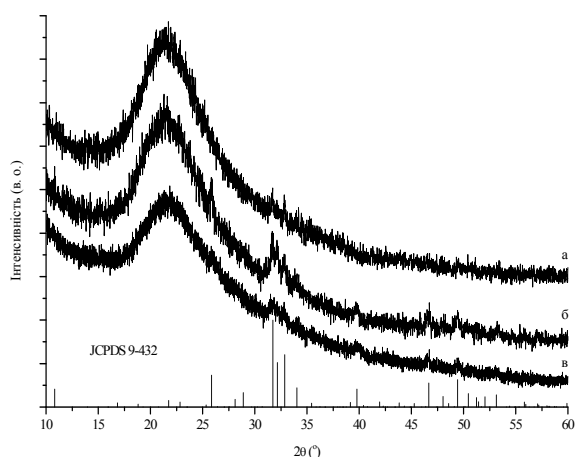
Додавання хітозану у вихідний розчин для синтезу ГА дозволяє одержати щільне покриття з більшою товщиною (рис. 2, б), ніж покриття, одержане з вихідного розчину без хітозану (рис. 2, а).

**Таблиця 1.** Умови проведення експерименту та концентрації вихідних речовин при одержанні покриттів з додаванням  $Ag^+$  методом термодепозиції

| Склад вихідного розчину        | Розчин хітозану (1г/л), мл | Розчин Ag (10 мг/л), мл | Розчин $10 Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O / Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ , мл | Умови експерименту       |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------------|---|--------------------------|
| 75 % ГА<br>25 % Ag             | –                          | 50                      | 150   | 80 °С, рН 6.72, 60 хв    |
| 50 % ГА<br>25 % Ag<br>25 % Хтз | 50                         | 50                      | 100   | 80 °С, рН 6.72, 60 хв    |
| 100 % ГА                       | –                          | –                       | 200   | 80 °С, рН 6.6–6.9, 60 хв |



**Рис. 2.** Морфологія покриттів на основі ГА одержаних з водних розчинів з концентраціями: 75 % ГА – 25 % Ag (а); 50 % ГА – 25 % Ag – 25 % Хтз (б), 100 % ГА (в)



**Рис. 3.** Криві рентгенівської дифракції для покриттів, одержаних методом термодепозиції з розчинів з наступним співвідношенням вихідних компонентів: 75 % ГА, 25 % Аg (а), 50 % ГА, 25 % Аg, 25 % Хтз, (б); 100 % ГА (в)

На рис. 3 спостерігається гало в області  $2\theta - 10^\circ$  та  $20^\circ$ , яке обумовлено як незначною кількістю одержаного покриття, так і матеріалом кювети (оргскло). Саме в цьому діапазоні знаходяться основні піки хітозану, тому даним методом однозначно визначити його присутність неможливо.

Вміст срібла в покриттях на основі гідроксиапатиту має істотне значення, оскільки антибактеріальна активність забезпечується поступовим вивільненням іонів срібла в оточуючу імплантат рідину. Метод рентгенівської дифракції та рентгенівського мікроаналізу не дозволяє визначити наявність в покриттях срібла при незначних його концентраціях. Тому для визначення вмісту срібла в одержаних покриттях використовували метод атомно-абсорбційної спектрометрії. Визначено, що для покриттів, які містять у своєму складі Аg та ГА, концентрації срібла в покритті є меншими (таблиця 2), і становлять приблизно 4.75 мг/г, ніж для покриттів, осаджених з водних розчинів, які містять 25 % хітозану.

**Таблиця 2.** Вміст срібла в покриттях на основі ГА

| Склад вихідного розчину для отримання покриттів методом термодепозиції | Концентрація Аg, мг/г | Відносне середньоквадратичне відхилення, % |
|--|-----------------------|--|
| 75 % ГА, 25 % Аg   | 4.75                  | 4  |
| 50 % ГА, 25 % Аg, 25 % Хтз   | 6.40                  | 8  |

На наш погляд, підвищення концентрації срібла в покриттях, одержаних із розчинів з додаванням хітозану, можна пояснити властивістю хітозану утворювати хелатні комплекси з іонами металів, зокрема  $Ag^+$ , захоплюючи їх в свою структуру. Синтез покриттів ГА методом термодепозиції відбувається при рН 6.72. За цих умов Хтз переходить у нерозчинний стан, захоплюючи срібло з розчину.

#### ВИСНОВКИ

Метод термодепозиції є прийнятним як для введення срібла до складу покриттів на основі гідроксиапатиту, так і для створення покриттів, що містять в своєму складі неорганічні та органічні компоненти. Доцільним при приготуванні вихідного розчину є додавання срібла до хітозану з подальшим додаванням компонентів для синтезу гідроксиапатиту. Вихідний розчин з концентрацією хітозану 0.25 г/л дозволяє одержати більш щільні покриття з більшим вмістом срібла.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Nair L.S., Laurencin C.T.* Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2007. – V. 3. – P. 301–316.
2. *Betts A. J., Dowling D. P., McConnell M. L., Pope C.* The influence of platinum on the performance of silver-platinum antibacterial coatings // *Mater. Design.* – 2005. – V. 26. – P. 217–222.
3. *Kawashita M., Tsuneyama S., Miyaji F. et al.* Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method // *Biomaterials.* – 2000. – V. 21. – P. 393–398.
4. *Zhao Q., Liu Y., Wang C.* Development and evaluation of electroless Ag-PTFE composite coatings with antimicrobial and anticorrosion properties // *Appl. Surf. Sci.* – 2005. – V. 252. – P. 1620–1627.
5. *Коновалова В.В., Побегай А.А., Брык М.Т. и др.* Исследование антимикробных свойств

- мембран, модифицированных хитозаном // Серия Критические технологии. Мембраны. – 2006. – Т. 32, № 4. – С. 56–61.
6. *Chen Yi Kai, Zheng Xue Bin, Li Baoe et al.* In vitro cytocompatibility of silver-containing hydroxyapatite coatings // *Mat. Sci. Forum.* – 2009. – V. 620–622. – P. 567–570.
  7. *Chen W., Liu Y., Courtney H.S. et al.* In vitro antibacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27, N 32. – P. 5512–5517.
  8. *Chen W., Oh S., Ong A.P. et al.* Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process // *J. Biomed. Mat. Research. A.* – 2007. – V. 82, N 4. – P. 899–906.
  9. *Ghani Y., Coathup M.J., Hing K.A. et al.* Development of a hydroxyapatite coating containing silver for the prevention of peri-prosthetic infection // *J. Orthop. Res.* – 2012. – V. 30, N 3. – P. 356–363.
  10. *Noda I., Miyaji F., Ando Y. et al.* Next generation antibacterial hydroxyapatite coating: antibacterial activity of Ag ions in serum // *Bioceramics Devel. Appl.* – 2011. – V. 1. – P. 101–102.
  11. *Yonekura Y., Miyamoto H., Shimazaki T. et al.* Osteoconductivity of thermal-sprayed silver-containing hydroxyapatite coating in the rat tibia // *J. Bone Joint Surg. Br.* – 2011. – V. 93, N 5. – P. 644–649.
  12. *Chung R.-J., Hsieh M.-F., Huang K.-C. et al.* Antimicrobial hydroxyapatite particles synthesized by a sol-gel route // *J. Sol-Gel Sci. Techn.* – 2005. – V. 33, N 2. – P. 229–239.
  13. *D'iaz M., Barba F., Miranda M. et al.* Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite // *Journal of Nanomaterials.* – 2009. – V. 11, N 55. – P. 498–505.
  14. *Ding Y., Leng Y., Lu X. et al.* Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition // *J. R. Soc. Interface.* – 2010. – Published online 29 September. – P. 1–11.
  15. *Liu R.F., Xiao X.F., Xu D.X.* Composite electrodepositing HA/Ag bioceramic coatings // *J. Chin. Ceram. Soc.* – 2003. – V. 31. – P. 616–619.
  16. *Liu R.F., Xiao X.F., Zhen L.Q. et al.* HA/Ag composite coatings prepared by two-step electrodeposition // *Chin. J. Appl. Chem.* – 2003. – V. 20. – P. 547–551.
  17. *Bai X., More K., Rouleau C.M. et al.* Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components // *Acta Biomater.* – 2010. – V. 6. – P. 2264–2273.
  18. *Яновская А.А., Кузнецов В.Н., Данильченко С.Н. и др.* Получение однородных покрытий на основе гидроксипатита методом термодепозиции // *Біофізичний вісник.* – 2010. – Вип. 25 (2). – С. 131–143.
  19. *Bragg P.D., Rainnie D.J.* The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli* // *Can. J. Microbiol.* – 1974. – V. 20. – P. 883–889.
  20. *Chambers C.W., Proctor C.M., Kablar P.W.* Bactericidal effect of low concentrations of silver // *J. Am. Water. Works Assoc.* – 1962. – V. 54. – P. 208–216.
  21. *Huang H.Z., Yang X.R.* Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method // *Carbohydr. Res.* – 2004. – V. 339. – P. 2627–2631.

Поступила 26.06.2012, принята 02.07.2012

## **Покриття для біомедицинського застосування на основі гідроксиапатиту, хітозана і срібла**

**А.А. Яновська, В.Н. Кузнецов, А.С. Станіславов, В.Ю. Ілляшенко**

*Інститут прикладної фізики Національної академії наук України  
ул. Петропавлівська, 58, Суми, 40000, Україна, biophy@yandex.ru*

*Покриття імплантатів, що містять гідроксиапатит і срібло, є перспективними завдяки їх потенційним антимікробним властивостям. Їх застосування дозволяє зменшити ймовірність інфікування в місці контакту імплантату з оточуючими тканинами. Метою роботи було отримання покриттів, що містять в своєму складі як неорганічні (Ag), так і органічні компоненти (хітозан), і оцінка вмісту срібла в отриманих покриттях, що здійснювалася методом атомно-абсорбційної спектроскопії. Методом термодепозиції отримано покриття на основі гідроксиапатиту на поверхні титанового сплаву Ti6Al4V з додаванням срібла. Введення в вихідний розчин для синтезу хітозана дозволяє підвищити концентрацію срібла в отриманих покриттях.*

## **Coatings based on hydroxyapatite, chitosan, and silver for biomedical application**

**G.O. Yanovska, V.M. Kuznetsov, O.S. Stanislavov, V.Yu. Illiashenko**

*Institute of Applied Physics of National Academy of Sciences of Ukraine  
58 Petropavlovskaya Str., Sumy, 40000, Ukraine, biophy@yandex.ru*

*Hydroxyapatite coatings containing silver are very promising due to their antimicrobial properties. Their application allows to decrease the possibility of contamination in the contacting area of implant with surrounding tissues. The aim of the work is deposition of coatings containing both inorganic (Ag) and organic (chitosan) components and estimation of silver concentration in the obtained coatings by atomic absorption spectroscopy. The coatings of hydroxyapatite with addition of silver were obtained on Ti6Al4V substrates by thermal deposition method. Adding chitosan to the initial solution allows to increase silver concentration in the coatings obtained.*