



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ

КАТЕДРА „ТЕКСТИЛ И КОЖИ”

инж. Антоний Йорданов Колев

**Получаване на композитни материали на основата на
фиброин и изследване на техните *in vitro* отношения**

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 (Химична технология на влакнестите
материали)

Научни ръководители: доц., д-р, инж. Виолета Василева

доц., д-р, инж. Лъчезар Радев

Научно жури:

1. проф. д-р, инж. Росица Бечева - председател

2. проф. д-р, инж. Маргарита Незнакомова - рецензент

3. проф. д.н., Петър Петров - рецензент

4. доц., д-р, инж. Виолета Василева

5. доц., д-р, Даринка Христова

София, 2016 г.

Дисертационният труд е написан на 138 страници, съдържа 49 фигури, 1 схема и 13 таблици. Цитирани са 182 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на научен съвет на научното звено на катедра „Текстил и кожи”, състояло се на 19.12.2016 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 25.04.2017г. от 14.00 часа в зала 439, сграда „А” на ХТМУ.

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

Използвани съкращения и понятия

ALA – аланин

CO₃HA – карбонат съдържащ хидроксиапатит

CPS – калциев фосфат силикат

CPS-1 – калциев фосфат силикат, Ca₅(PO₄)₂SiO₄, силикокарнотит

CPS-2 – калциев фосфат силикат, Ca₁₅(PO₄)₂(SiO₄)₆

EDX – енергийно дисперсивен анализ

GLY – глицин

HA – хидроксиапатит, Ca₅(PO₄)₃(OH)

HOB - човешки остеобластни клетки

ICP-AES – индуктивно свързана плазмена атомно емисионна спектрофотометрия

In Vitro – лабораторен експерименти, който се извършва или провежда в епруветка, петри, или на друго място извън жив организъм.

SA – натриев алгинат

SBF – разтвор наподобяващ човешка кръвна плазма

SEM – сканираща електронна микроскопия

SER – серин

SF – фиброин на естествената коприна

TEOS – тетраетоксисилан

THR – треонин

TRIS – хидроксиметил аминометан, (CH₂OH)₃CNH₂

TYR – тирозин

UV-Vis – метод за определяне химически анализ на веществата, чрез поглъщане на ултравиолетови лъчи и видима светлина

VAL – валин

Номерацията на фигурите, таблиците и схемите в автореферата не съответстват на тези в дисертационната работа

Въведение и цел

Постиженията на съвременната медицина имат пряка връзка с развитието на други клонове на науката, като химия, физика, биология и др. Успехът на регенеративната медицина, чрез която се заменят човешки органи е в силна зависимост от природата на материалите и техните свойства. Същото важи и за други медицински дейности, които включват лечение на рани и употребата на лекарствени средства. Последните години бележат интензивна изследователска работа в посока замяна на синтетичните материали с природни. Съществени предимства на тези материали са тяхната биосъвместимост и биоразградимост, които ги правят незаменими в сравнение със синтетичните биоматериали.

Естествената коприна, чиито основен компонент е фиброинът, има многовековна връзка с човека. Позната е не само като желан текстилен материал, поради ценните си свойства, но и в медицината, където е използвана за хирургични конци и превързочни материали, тъй като притежава антимикробни и противовъзпалителни свойства.

От друга страна, стъкло-керамиките в системата $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ се оказват полезен продукт в сферата на костно-регенеративната медицина поради факта, че образуват апатитен слой при потапянето им в различни физиологични разтвори.

Алгинатът е естествен полизахарид с много добра биосъвместимост и биоразградимост. Получаваните от него материали могат да бъдат модифицирани по химически или физически път, с цел получаване на различни структури, свойства, функции, съответстващи на сферите на прилагане.

Друга възможност за модифициране на определени свойства на естествените полимери, прилагани в медицината, е получаването на композитни материали. Тя също бележи активно развитие през последните години, тъй като реализира целенасочена промяна на определени свойства, желани и специфични за дадената област на приложение.

С оглед на казаното до тук, **Целта** на настоящата дисертационна работа е:

Получаване на композитни материали на основата на фиброин и изследване на техните *in vitro* отношения.

Изпълнението на поставената цел включва решаването на следните **Задачи:**

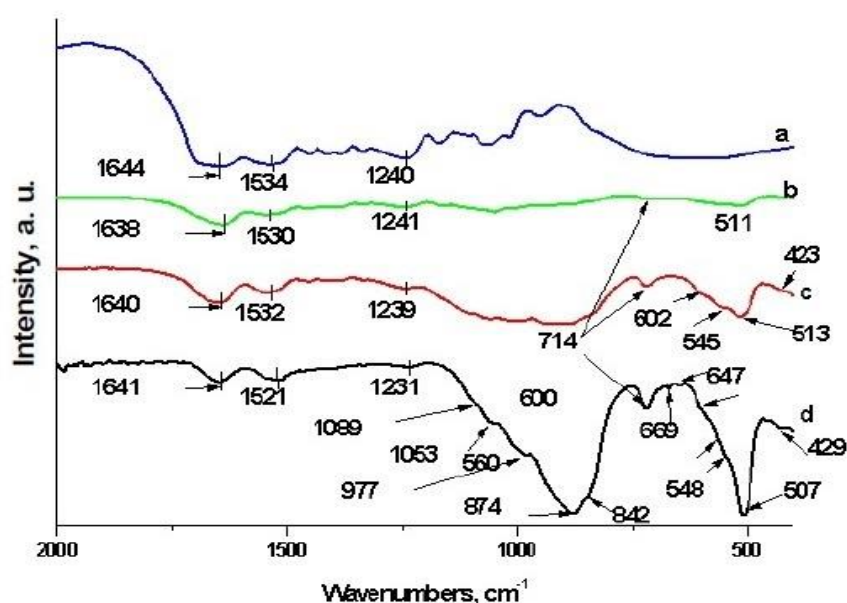
1. Получаване на композитни материали в състав фиброин/калциево фосфат силикатна керамика и изследване на техните *in vitro* отношения.
2. Получаване на композитни материали в състав фиброин/алгинат, във вид на филми и изследване на техните *in vitro* отношения.
3. Получаване на композитни материали в състав фиброин/алгинат, във вид на макропорести материали и изследване на техните *in vitro* отношения.
4. Получаване на антибактериални макропорести композитни материали в състав фиброин/алгинат, съдържащи биоцидите Ciprofloxacin и колоидно Ag.

1. Композитни материали в състав фиброин/калциево фосфат силикатна керамика

Синтезирани са композитни материали в състав силк фиброин (SF) и калциев фосфат силикатна (CPS) керамика в различно тегловно съотношение на компонентите. Композитите са синтезирани чрез смесване, без участието на свързващи агенти. Сушенето им е извършено в микровълново поле.

1.1. Изследване структурата на композитите преди *in vitro* тест - инфрачервена спектроскопия

На **Фиг.1.1** са показани инфрачервените спектри на SF и SF/CPS композити преди *in vitro* тест в диапазон на спектъра 2000-400 cm^{-1} .



Фиг.1.1. Инфрачервен спектър на композити в състав: чист фиброин, **a**, SF/CPS (75:25), **b**, SF/CPS (50:50), **c**, и SF/CPS (25:75), **d**, преди *in vitro* тест

Известно е, че SF като типична протеинова структура съществува в три конформации, а именно хаотично състояние (random coil), silk I (α -спирала) и silk II (β -конформации). Имайки предвид това, абсорбционните ивици при 1644 cm^{-1} за SF могат да се отнесат към амид I, асоцииран с конформацията random coil, появяваща се в

областта $1640\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, 1534 cm^{-1} за амид II в конформациите random coil и β -sheets при 1240 cm^{-1} за амид III.

От инфрачервения спектър на **Фиг.1.1**, а може да се предположи, че след микровълново сушене и двете конформации (random coil и β -sheets) присъстват в структурата на SF.

От друга страна, спектъра на композитите с различен тегловен състав SF и CPS (**Фиг.1.1**, b, c и d) показват отместване на максимума от 1644 на 1638 cm^{-1} за образца SF/CPS(75:25), на 1640 cm^{-1} за SF/CPS(50:50) и на 1641 cm^{-1} за SF/CPS(25:75). В случая на SF/CPS(75:25) (**Фиг.1.1**, b) наблюдаваното отместване към по-късата дължина на вълната, би могло да се обясни със структурен преход от random coil към β -sheets, например антипаралелна β -sheets структура. L.Li и др. установяват, че същият резултат може да се наблюдава, когато композитният материал е синтезиран по биомиметичен начин. От наша гледна точка има и друга възможна интерпретация. Установеното отместване в дясно към по-късовълновата част на спектъра, може да се отнесе към C=O (амид I), взаимодействала с Ca^{2+} от частично разтвореният CPS керамичен прах по време на синтеза по получаването на композитните материали. Същият резултат може да бъде наблюдаван и за абсорбционните максимуми, характерни за амид II и амид III. От друга страна, след синтезирането на образците се появяват нови ивици при $714\text{--}430\text{ cm}^{-1}$ в допълнение на характеристичните за амид I, II и III, които могат да се дължат на присъствието на CPS керамиката в изследваните образци.

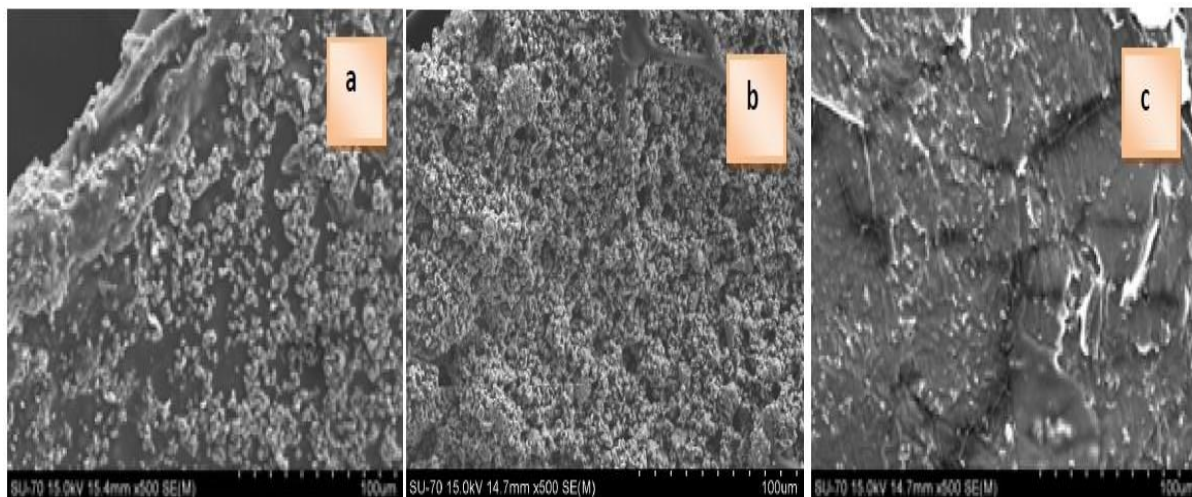
От представените инфрачервени спектри може да се заключи, че начинът на получаване на образците съществено влияе върху структурата им, като протичат ред конформационни промени, с допълнителен преход на random coils към по-стабилната, антипаралелна β -sheets структура в междинни форми, такива като β -turns и β -blends.

За да се оценят по-качествено промените в инфрачервените спектрите и по-специално на конформационните изменения в областта на амид I, беше направено разлагане на характеристичната ивица за тях, в областта $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$.

В резултат на проведеното разлагане на инфрачервените спектри на изследваните от нас образци в областта на структурно чувствителната ивица на амид I, може да се заключи, че CPS стъкло-керамиката влияе съществено върху вторичната структура на фиброиновата молекула. При това, интересно би било да се установят механизмите на това влияние, но това ще бъде обект на бъдещи изследвания.

1.2. Морфология на композитите преди *in vitro* тест - SEM анализ

На **Фиг.1.2.** са показани SEM изображенията на получените композити с различно тегловно съотношение на CPS стъкло-керамиката и фиброина.



Фиг.1.2. SEM на композити в състав: SF/CPS(25:75), **a**, SF/CPS(50:50), **b** и SF/CPS(75:25), **c**, преди *in vitro* тест в 1.5 SBF

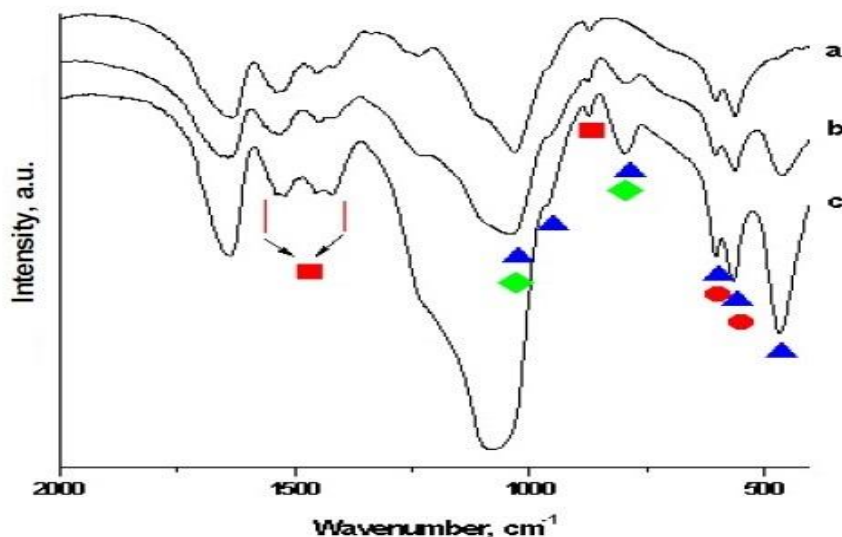
SEM на синтезираните образци, преди провеждане на *in vitro* тест в 1.5 SBF за различни периоди от време показва съществени морфологични разлики. Така, докато при SF/CPS(25:75) (**Фиг.1.2, a**) и SF/CPS(75:25) (**Фиг.1.2, c**) се наблюдава хетерогенно диспергиране на керамичният прах върху фиброина, то при SF/CPS(50:50) (**Фиг.1.2, b**), се наблюдава по-хомогенна морфология.

Фибрилярната структура на фиброина е лесно разпознаваема в композита в състав SF/CPS(25:75) и SF/CPS(50:50) (**Фиг.1.2 a и b**). Когато количеството на фиброин се увеличи до 75 тегловни % (**Фиг.1.2, c**), SEM изображението показва изменение в морфологията на образца. То се отчита като промяна в морфологията на фиброина, а именно – наблюдаването на ясно дефинирани ламеларни структури, чието присъствие може да се отдаде на метода на получаване на изследваните материали.

Най-общо, синтезираните фиброин-калциев фосфат силикатни композити без предварително третиране, сушени в микровълнова среда (**Фиг.1.2, a-c**) притежават по-гладка повърхност, върху която са разпределени частиците на неорганичния компонент на композита.

1.3. Изследване структурата на композитите след *in vitro* тест в 1.5 SBF с помощта на инфрачервена спектроскопия

Инфрачервеният спектър на синтезираните SF/CPS композитни материали след *in vitro* тест в 1.5 SBF в продължение на 12 дни в статични условия, е показан на **Фиг.1.3**.



Фиг.1.3. Инфрачервен спектър на композити в състав: SF/CPS(75:25), **a**, SF/CPS(50:50), **b** и SF/CPS(25:75), **c**, след *in vitro* тест в 1.5 SBF в продължение на 12 дни

Появата на абсорбционните максимуми за PO_4^{3-} тетраедрите, отбелязани като ($\blacktriangle$) на **Фиг. 1.3.**, може да бъде обобщена както следва:

- максимумите с много слаб интензитет, при 1040 cm^{-1} (**Фиг.1.3**, **b** и **c**) се асоциират с асиметричните валентни колебания. Наличието им се приписва на присъствието на апатитната кристална фаза
- слабите по интензитет ивици при $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ (**Фиг.1.3**, **a**, **b** и **c**) се отнасят към деформационните колебания в PO_4^{3-} тетраедъра.
- ясно видимите ивици при 600 , 560 и 470 cm^{-1} могат да бъдат отнесени към различни асиметрични колебания на O-P-O връзките в кристалните фосфати. От друга страна, максимумът при $\sim 1040\text{ cm}^{-1}$ и тези при $\sim 796\text{ cm}^{-1}$ (**Фиг.1.3**, **b** и **c**) могат да бъдат отнесени към двете колебания от вида PO_4^{3-} и Si-O-Si ($\blacklozenge$) колебания. Освен това, ивиците при 600 и 560 cm^{-1} се асоциират със симетрични колебания от типа O-Si-O ($\bullet$) симетрични колебания. В допълнение, абсорбционните максимуми в областта $1560\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ и тези

при $\sim 875\text{ cm}^{-1}$ могат да бъдат отнесени към наличието на CO_3^{2-} (■) групата в кристалните карбонат заместени апатити.

По-подробна информация за вида на заместване в CO_3HA , образуван на повърхността на образците SF/CPS, след 12 дневен престой в 1.5 SBF, може да се получи при разлагането на инфрачервените спектри в областта $1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$.

Резултатите от разлагането на спектрите са показани в **Табл. 1.1**.

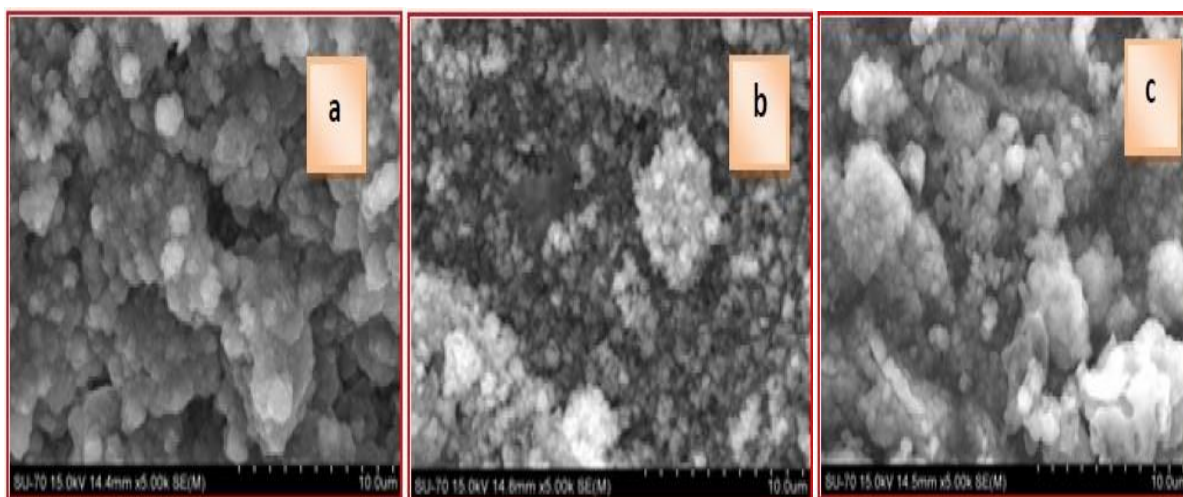
Табл. 1.1. – Разлагане на инфрачервените спектри в областта на CO_3^{2-} валентните колебания в SF/CPS композити, след *in vitro* тест в продължение на 12 дни в 1.5 SBF при статични условия.

Образец	Дължина на вълната, cm^{-1}	Площ на пика, %	Вид CO_3HA
SF/CPS (75:25)	1438	9	A/B
	1452	11	B
	1514	30	A
	1526	12	B
	1538	4	B
	1550	43	A
SF/CPS (50:50)	1409	2	B
	1422	13	A/B
	1446	7	B
	1457	11	B
	1500	2	A
	1516	16	A
	1531	3	B
	1547	45	A
SF/CPS (25:75)	1570	2	A
	1417	18	B
	1436	16	A/B
	1454	7	B
	1470	18	B
	1508	11	A
	1523	17	B
	1539	14	B

От представените в **Табл. 1.1**. резултати може да се заключи, че се наблюдава преференциално образуване на В-тип CO_3HA (биоапатит) върху повърхността на изследваните композити, независимо от техния състав, изразен в тегловни %.

1.4. Морфология на композитите след *in vitro* тест - SEM анализ

Данните от проведенният SEM анализ на образците, преминали *in vitro* тест в 1.5 SBF в продължение на 12 дни в статични условия, са представени на **Фиг. 1.4**.



Фиг.1.4. SEM изображения на композити в състав: SF/CPS(75:25), **a**, SF/CPS(50:50), **b** и SF/CPS(25:75), **c**, след престояване в 1.5 SBF разтвор в продължение на 12 дни

От SEM изображенията представени на **Фиг.1.4.** може да се заключи, че повърхността на изследваните образци напълно се покрива с кристални образувания, които са с различна морфология.

От представените на **Фиг.1.4.** а, b и c, SEM изображения ясно се вижда, че слой от карбонат апатит е съставен от големи сферични частици, както и от малки сфери с диаметър $\sim 2 \mu\text{m}$.

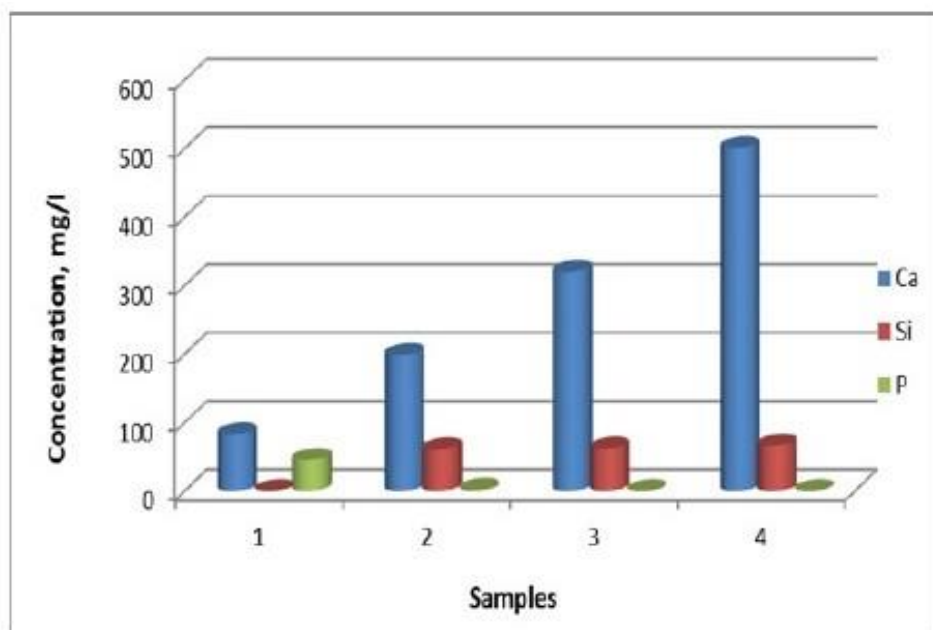
Наред с това, от представените на **Фиг.1.4.** SEM изображения може да се заключи, че изследваните от нас SF/CPS композити показват добра *in vitro* биоактивност. За това може да се съди и по факта, че повърхността на изследваните образци е изцяло покрита със сферични образувания, което показва, че на повърхността им е образуван плътен слой от карбонат апатит (CO_3HA).

От друга страна, с повишаване на съдържанието на CPS стъкло-керамиката в образците, слой от сферични образувания става по-плътен, а наред с това се забелязва и процес на агрегиране на карбонат-апатитните сфери на повърхността на композитите, преминали теста за *in vitro* биоактивност в продължение на 12 дни в статични условия.

Основният извод, който може да бъде направен е, че изследваните образци дават основание да бъдат изследвани и с човешки остеобластни (НОВ) клетки, не само поради резултатите от SEM изображенията, но и поради а priori допускането, че те ще покажат добър клетъчен отговор, щом показват толкова добра *in vitro* биоактивност. И не на последно място, данните от SEM анализа са в пълно съответствие с тези, получени в резултат на инфрачервеното изследване на композитните материали.

1.5. Анализ и оценка на йонния състав на разтвора на 1.5 SBF, след провеждането на *in vitro* теста за биоактивност

Фиг.1.5. показва резултатите от ICP-AES анализа за оценка на концентрацията на Ca^{2+} , Si^{4+} и P^{5+} йони в разтвора на 1,5 SBF след провеждането на *in vitro* тест в разтвор на 1.5 SBF в продължение на 12 дни.



Фиг.1.5. Изменение на концентрацията на Ca^{2+} , Si^{4+} и P^{5+} йони в разтвора на 1.5 SBF, (проба 1) и композити в състав SF/CPS(75:25), (проба 2); SF/CPS(50:50), (проба 3) и SF/CPS(25:75), (проба 4) след 12 дневен престой в 1.5 SBF в статични условия

От показаните на **Фиг.1.5.** резултати от ICP-AES анализа става ясно, че концентрацията на Ca^{2+} йони за образци 2,3 и 4 се повишава в сравнение с тази на Ca^{2+} в началния разтвор на 1.5 SBF(проба 1), което е в пряка зависимост от съдържанието на CPS стъкло-керамиката в образците. От данните на **Фиг.1.5**, се вижда още, че съдържанието на Si^{4+} в разтвора на 1.5 SBF нараства до 66 mg/l (проба 4). В съответствие с наши предходни изследвания може да се заключи, че силиции съдържащ CO_3HA ($\text{Si-CO}_3\text{HA}$) вероятно се образува на повърхността на образците след престой в 1.5 SBF в продължение на 12 дни. Накрая, концентрацията на P^{5+} намалява от 45 mg/l за разтвора на 1.5 SBF (проба 1) до 2 mg/l (проба 2) и 0 mg/l (проба 3 и 4). Получените резултати от ICP-AES показват, че образуването на HA е сходно и за трите композита, както и че CPS

керамиката претърпява частично разтваряне в среда на 1.5 SBF за времето на *in vitro* теста.

Отделените от керамиката Ca^{2+} йони взаимодействат с PO_4^{3-} йони, отделени също от нея и присъстващи в разтвора на 1.5 SBF, вероятно образуват, силициево субституиран хидроксиапатит на повърхността на изследваните образци, за които може да се съди по почти напълното изчерпване на P^{5+} йоните от разтвора на 1.5 SBF. Данните от ICP-AES анализа са в пълно съответствие с тези от инфрачервената спектроскопия и SEM за изследваните от нас образци.

1.6. Заключение

В резултат на проведените изследвания на получените композитни материали в състав SF/CPS стъкло-керамика с различно тегловно съотношение на двата компонента в тях, могат да бъдат направени следните изводи:

1) Получени са композитни материали на основата на SF и CPS стъкло-керамика. Инфрачервените спектри показват наличието на характеристичните ивици за различните конформационни изменения на SF, като заедно с това е доказана възможността за образуване на връзка между Ca^{2+} (отделен от керамиката) и C=O (амид I) на фиброиновата молекула.

Новостта на факта се изразява в това, че присъствието на връзка Ca:C=O (амид I) се доказва при небiomиметичен път на образуване на композитите.

2) SEM изображенията на получените от нас композити доказват, че стъкло-керамиката е равномерно разпределена върху фиброиновата „матрица“, което дава възможност за установяване на нейната водеща роля в *in vitro* отнасянията на изследваните композити.

3) След престояването на образците в разтвор на 1.5 SBF в продължение на 12 дни при статични условия на експеримента, инфрачервените спектри доказват образуването на карбонат съдържащ хидроксиапатит (CO_3HA), наричан още биоапатит, върху повърхността на композитите. От друга страна, по-детайлното характеризиране на

спектрите, води до заключението, че на повърхността на изследваните композити се образува преференциално В-тип CO_3HA , което дава основание а priori да се предположи, че образците биха показали положителен резултат при изследване с човешки остеобластни (НОВ) клетки.

4) Анализът на разтвора на 1.5 SBF с ICP-AES доказва, че след приключването на *in vitro* теста за биоактивност, с ICP-AES доказва, че изследваните образци са биоактивни и по-специално, че отделените Ca^{2+} йони взаимодействат с PO_4^{3-} йони от разтвора на SBF. Резултатът от това се изразява във факта, че се образуват кристални фосфати върху повърхността на изследваните образци, което потвърждава данните и заключенията на инфрачервената спектроскопия.

5) SEM анализа на образците, след *in vitro* тестът доказва, че на повърхността им се образува слой от апатит с кристален строеж. Глобуларната морфология на отложения на повърхността CO_3HA е надеждно доказателство за реалното извършване на процеса.

Основното заключение, което може да бъде направено в резултат на проведените изследвания е, че са синтезирани нови композитни материали в системата SF/CPS стъкло-керамика. Изследването на тяхната *in vitro* биоактивност в 1.5 SBF в статични условия доказва, че получените композити са с добра *in vitro* биоактивност.

Анализът на инфрачервените спектри на получените композити, дава основание да се заключи, че получените от нас образци могат да се класифицират като органично-неорганични хибридни материали.

2. Композитни материали в състав фиброин/алгинат във вид на филми

Получени са композитни материали в състав копринен фиброин и натриев алгинат в различно тегловно съотношение на компонентите, във вид на филми. Композитите са получени чрез смесване. Сушенето им е извършено при стайна температура $\sim 20^{\circ}\text{C}$. Образците не са допълнително третирани с алкохоли (CH_3OH ; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), чиято роля е да подпомогнат процеса на структуриране на фиброина в композита, както показва направеното литературно проучване. Отсъствието на алкохоли позволява протичащите процеси при получаване на филмите да бъдат „наблюдавани в чист“ вид.

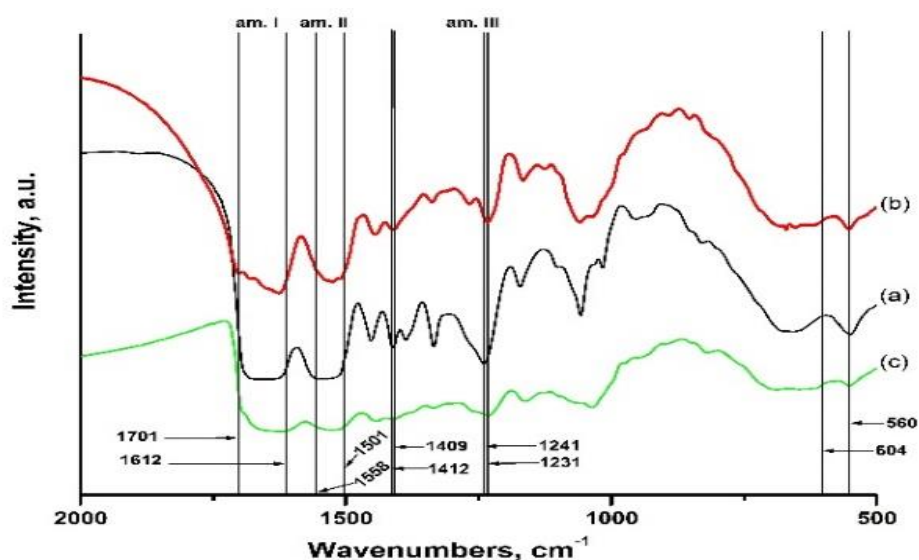
2.1. Инфрочервена спектроскопия на изследваните образци, преди *in vitro* тест в 1.5 SBF, конформационни промени

Анализът на извършеното литературно проучване показва липсата на единно мнение относно взаимодействието между компонентите на SF и SA в композитите. Едни от изследователите заключават, че няма такова взаимодействие. Други твърдят, че то се осъществява между карбонилната група от карбонамидната връзка на фиброина и хидроксилните групи на натриевия алгинат. Трети подкрепят тезата, че взаимодействието се осъществява между амидните групи на карбонамидната връзка на фиброина и карбоксилните групи на алгината.

С тази част от изследването си поставихме за цел да установим има ли взаимодействие между компонентите на композита и ако има в какво се изразява то.

Фиброинът на естествената коприна е влакнообразуващ полимер, съдържащ области с висока степен на организация – кристални β -sheets/ и такива с по-ниска – аморфни. Разтварянето на SF е свързано с разрушаване на тази организирана структура и преминаването ѝ в хаотично състояние /random coil/. Състоянието на основната градивна единица – фиброиновата макромолекула, също се променя и от изходна β -конформация преминава в α -спирала.

Известно е, че по данните на инфрачервената спектроскопия могат да се определят конформационните изменения, настъпили в молекулата на фиброина от α -спирала в β -конформация, както и нови взаимодействия и образувани нови връзки между двата компонента в композитите, предизвикани от начина на получаване на даден композитен материал. Резултатът от извършения анализ е даден на **Фиг.2.6**.



Фиг.2.6. Инфрачервени спектри на получените композити в състав: чист фиброин, **a**; композит SF/SA(75:25), **b**; композит SF/SA(50:50), **c**.

По-детайлният анализ на инфрачервеният спектър на чистия фиброин (**Фиг.2.6**, крива а) показва, че интензивните абсорбционни ивици за амид I от 1621 cm^{-1} до 1701 cm^{-1} , за амид II от 1523 cm^{-1} до 1558 cm^{-1} и за амид III при 1241 cm^{-1} присъстват в спектъра. Този резултат показва, че структурата на получения филм от чист фиброин съдържа едновременно както α -спирали, така също и β -конформации на полипептидните макромолекулни вериги. Това означава, че при процеса на сушене протичат конформационни промени, доказани и от други автори.

Процесът на филмообразуване е свързан с реорганизация на структурата на SF в композитите от random coil и α -спирала за част от макромолекулните вериги, които претърпяват трансформация в β -конформация и произтичащата от нея по-висока степен на организация (β -sheets).

Включването на алгинат като компонента в образците, в състав SF/SA(75:25), се отразява на характера на спектъра.

Широките абсорбционни ивици на амид I и амид II се фрагментират в отделни, ясно очертани максимуми (крива b). Така, в областта на амид I се оформят три добре очертани ивици при: 1621 cm^{-1} , 1678 cm^{-1} и 1701 cm^{-1} . От спектъра на **Фиг.2.6** се вижда също, че в областта на амид I могат да се отличат с висока степен на организация, структурите известни като β -sheets, която се определя от интензивността на абсорбционните максимуми в областта при $1697\text{--}1703\text{ cm}^{-1}$, както и в областите $1617\text{--}1637\text{ cm}^{-1}$.

В областта на амид II също се оформят две ясно очертани интензивни абсорбционни ивици при 1542 cm^{-1} и 1501 cm^{-1} , т.е. това са структури с хаотична и висока степен на организация на фиброиновите макромолекули.

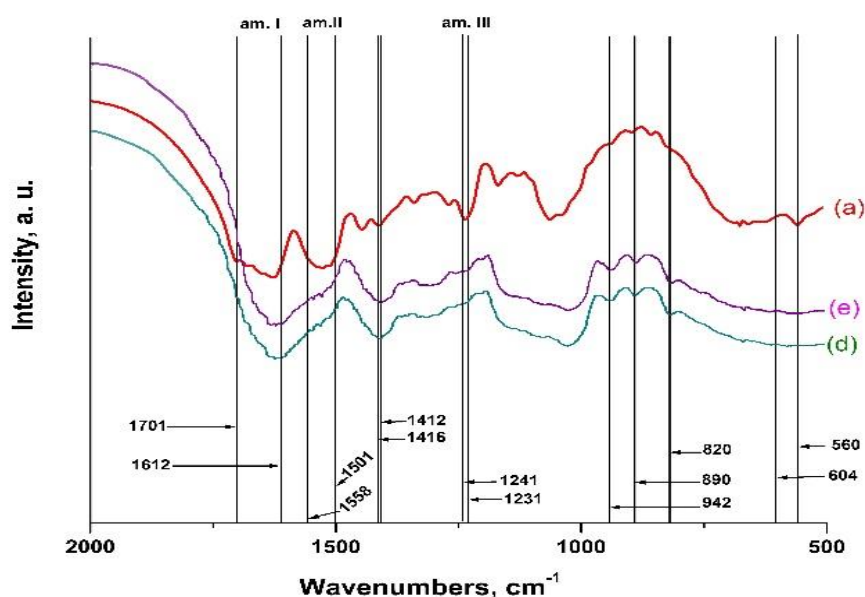
Абсорбционният максимум на амид III се отмества към по-късите дължини на вълните - 1241 cm^{-1} на 1231 cm^{-1} .

От друга страна обаче, карбоксилните групи на SA се характеризират със силна абсорбция в областта $1620\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, както и при $1420\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$. Получените от нас композити имат обширна зона на абсорбция за амид I на фиброина, която е от 1700 до 1610 cm^{-1} и тя не позволява да бъде наблюдавана промяната в ивицата $1620\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$. Това се отнася за цялото изследване. Ето защо е проследена само промяната в положението на абсорбционните максимуми на карбоксилната група на SA в областта $1420\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$. Както се вижда от инфрачервеният спектър, за композита в състав SF/SA(75:25) се наблюдава отместване към по-късовълновата част на спектъра и има стойност 1409 cm^{-1} .

Получените резултати за композитите могат да включат и индуциращата роля на алгината за конформационната трансформация на фиброиновите макромолекули. Подобни резултати са наблюдавани и от други изследователи: полизахаридите индуцират конформационната трансформация на фиброиновата макромолекула.

За установяване на протекли взаимодействия между SF и SA и техния характер са получени композити при различни рН стойности на средата.

Инфра червените спектри на получените композити са дадени на **Фиг.2.7**.



Фиг.2.7. Инфрачервени спектри на получените композити **при различно pH**: в състав SF/SA(75:25), **a**; SF/SA(75:25) при pH 6, **e** и SF/SA(75:25) при pH 4, **d**.

Както се вижда от инфрачервения спектър на **Фиг.2.7.**, областта на максимумите между $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ може да бъде отнесена към амид I на фиброиновата молекула; областта $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ към амид II, а ивиците в областта от $1350\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ към амид III.

В нашият случай, дълбоките и силно интензивни абсорбционни максимуми при $\sim 1615\text{ cm}^{-1}$, 1540 cm^{-1} и 1230 cm^{-1} са характерични, както за чистият фиброин (крива a), така и за получените с негово участие композитни материали в присъствието на алгинат в тегловно отношение 75 тегл.% фиброин и 25 тегл.% алгинат. При възприетите тегловни отношения е ясно, че спектрално по-видими ще бъдат характеричните ивици на фиброина. От друга страна обаче в инфрачервеният спектър се отчита и присъствието на характеричните ивици на алгината. Както се посочва и от други изследователи, ивиците при 1610 cm^{-1} и тези при $\sim 1412\text{--}1416\text{ cm}^{-1}$ могат да бъдат приписани на присъствието на карбоксилни групи.

Натриевият алгинат е полиелектролит, чиято макромолекула съдържа голям брой COOH в йонизиран и нейонизиран вид. По тази причина промяната на pH при получаване на композитите (pH 6 pH 4) ще окаже влияние върху състоянието на карбоксилните групи.

Фиброиновата макромолекула в единия край завършва с amino група, а в другия има карбоксилна група, поради което също е чувствителна към промяна на рН на средата.

Влиянието на рН и върху двата компонента може да се наблюдава върху фигурата. Получените 2 абсорбционни спектъра (**Фиг.2.7**, крива **e** и **d**) са подобни и много различни от крива **“a”**, която е за композит, получен в неутрални условия. И при двата спектъра (**Фиг.2.7**, крива **e** и **d**), се наблюдава промяна в абсорбционната ивица на амид I. Получава се абсорбционен максимум, който се измества към по-късата дължина на вълната, но остава в границата до 1612 cm^{-1} . Абсорбционните ивици за амид II изчезват, а за амид III остават с минимален интензитет. Тъй като амид II и амид III се дефинират, чрез състоянието на амидната група (N-H) от карбонамидната връзка на полипептидната верига, то може да се предположи, че тази промяна се дължи на участието им в междумолекулни взаимодействия, чрез водородни връзки. Вторият участник в това междумолекулно взаимодействие е алгинатът с неговите карбоксилни групи. На **Фиг.2.7** се наблюдава получаването на интензивна абсорбционна ивица с максимум при 1416 cm^{-1} . Изследователският опит свързва образуването на междумолекулни водородни връзки с промяна в местоположението и интензивността на абсорбционните максимуми на съответните функционални групи.

В резултат на проведения анализ може да бъде направено заключението, че между амидните групи на SF и карбоксилните групи на SA се реализира взаимодействие, чрез водородни връзки.

В инфрачервения спектър на **Фиг. 2.7**. може да се отчете и присъствието на нови ивици при 942 , 890 и 820 cm^{-1} , които са характеристични за алгината. Така, ивицата при $\sim 940\text{ cm}^{-1}$ се приписва на C-O-H деформационните колебания в уроновите киселини, а ивицата с максимум при $\sim 890\text{ cm}^{-1}$ може да бъде отнесена към деформационните колебания от вида β -C1-H в молекулата на алгината. Ивицата при $\sim 820\text{ cm}^{-1}$ е характеристична за деформационните колебания на киселинните остатъци на β -мануроновата киселина.

Трябва да се отбележи, че и двата компонента на композитния материал се характеризират с разнообразие на функционални групи, чието състояние зависи от рН на средата. Не се изключват и електростатични взаимодействия между йонизираната карбоксилна група ($-\text{COO}^-$) на SA и йонизираната amino група ($-\text{NH}_3^+$) на SF в условията

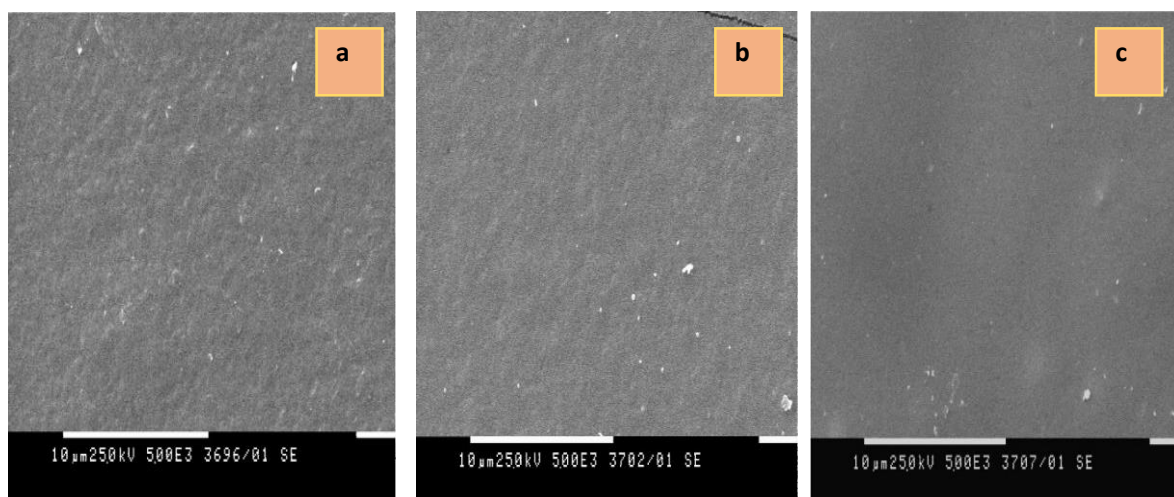
на кисело рН. Също така и вибрациите на първичните аминокислотни групи се наблюдават в интервала $850\text{--}750\text{ cm}^{-1}$.

Основният извод от анализа на инфрачервените спектри на филмите е, че между двата компонента на композитния материал се осъществява междумолекулно взаимодействие между амидните групи на полипептидната макромолекула и карбоксилните групи на алгината, чрез водородни връзки.

2.2. Морфологичен строеж - SEM анализ

Получените композити могат да бъдат описани и различени визуално в зависимост от състава им. Чистият фиброин дава гладък, прозрачен, хомогенен филм с добра здравина. Наличието на SA в състава на композита променя вида на филма, който при съотношение на компонентите SF/SA(50:50), става мътен и в някаква степен нехомогенен. Съотношението на композит в състав SF/SA(25:75) не беше изследвано, тъй като се получава нехомогенна и разслоена структура с фибрили от SF.

SEM анализът на опитните образци, е извършен при увеличение 5000, за да се види по-ясно характерната топография на изследваната повърхност.



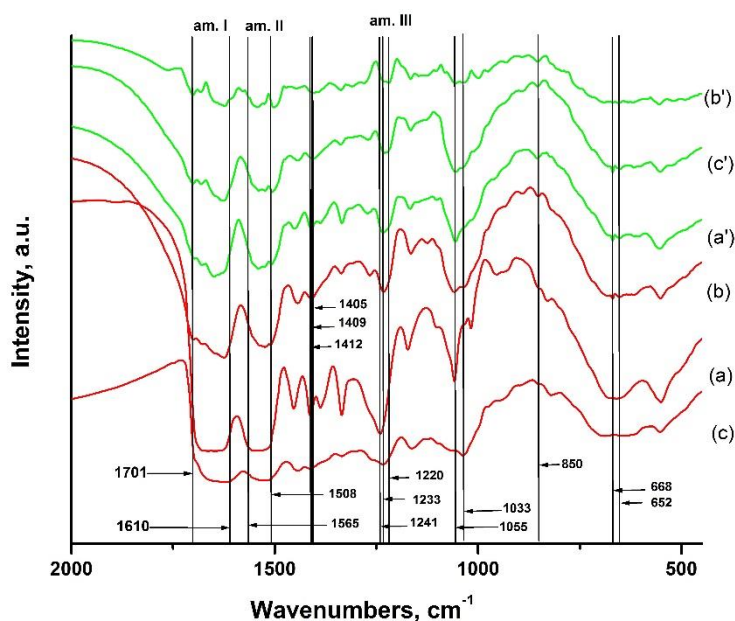
Фиг.2.8. SEM снимки на получените композити във вид на филм: чист фиброин, **a**; SF/SA(75:25), **b** и SF/SA(50:50), **c**.

При SEM микрографското изображение на чист SF (**Фиг.2.8**, изображение а) наблюдаваме зърнеста и нееднородна морфология. Аналогични резултати са наблюдавани и от други автори и обяснението на тази топография е превръщането на аморфната структура в β -sheets (silk II). Наличието на SA в композитите променя вида на филма и зависи от неговото съотношение в композита. Добавянето на SA в SF в съотношение SF/SA(75:25) прави повърхността на филмите по-гладка, в сравнение с тази на чистия филм на SF (**Фиг.2.8**, изображение “b” и изображение “c”). Филмите в съотношение SF/SA(50:50) са гладки, но непрозрачни, опалесцентни и в някаква степен нееднородни (**Фиг.2.8**, изображение c). Композити в състав SF/SA(25:75) дават нехомогенна структура с фибрили от SF. Съотношение SF/SA(25:75) очевидно дава нехомогенна структура. Повечето автори разглеждащи композитни материали на основата на SF/SA, наблюдават хомогенна структура за всички изследвани съотношения на образците. Има изследване , че в образци с количеството на SF повече от 25 тегл.%, съществува формирането на фиброинови фибрили.

2.3. *In Vitro* биоактивност на композитите

2.3.1. Инфрачервена спектроскопия на образците, след *in vitro* тест

Инфрачервените спектри на композитите преди и след *in vitro* престояването им в разтвор на 1.5 SBF в продължение на 25 дни, са представени на **Фиг.2.9**.



Фиг.2.9. Инфрачервени спектри на изследваните филми преди и след (') *in vitro* тест в 1.5 SBF в продължение на 25 дни : чист фиброин, **a** и **a'**; SF/SA (75:25), **b** и **b'** ; SF/SA(50:50), **c** и **c'** .

От представените на **Фиг.2.9** инфрачервени спектри се вижда, че те са сложни както по вид, така и по възможност за интерпретиране. Независимо от това обаче, в тях могат да се проследят някои важни промени, които се отнасят до възможността за получаване на карбонат-апатит, след престояването на образците в разтвор на 1.5 SBF в продължение на 25 дни в статични условия. Получаването на карбонат-апатит е указание, че изследваните образци притежават биоактивност.

В представените инфрачервени спектри могат да бъдат установени следните промени, обобщени както следва:

- Характеристичната ивица за амид I при 1628cm^{-1} (за чистия фиброин, крива а), 1624cm^{-1} (за образца SF/SA(75:25), крива b) и 1625cm^{-1} (за образца SF/SA(50:50), крива c) се измества забележимо към по-късовълновата част на спектъра, респективно при 1624cm^{-1} (за чистия фиброин, крива а), 1619cm^{-1} (за образца SF/SA(75:25), крива b) и 1621cm^{-1} (за образца SF/SA(50:50), крива c). От посочените данни се вижда, че отместването (по ред на образците по-горе) е от 4cm^{-1} , 5cm^{-1} и 4cm^{-1} . Това дава основание да се предположи образуването на йонна връзка, между Ca^{2+} йони от разтвора на 1.5 SBF и C=O амид I, от вида $(\text{C=O})_2\text{Ca}^{2+}$.

В съгласие с наши и предходни изследвания на други автори може да се заключи, че чистия фиброин и композитите с участие на алгинат проявяват *in vitro* биоактивност, за която се съди по образуването на йонна връзка.

Редица изследвания потвърждават образуването на йонна връзка между калциеви йони от разтвора на 1.5 SBF и карбоксилните групи на алгината. Обикновено Ca^{2+} е един от най-често използваните дивалентни катиони за йонно омрежване на алгинат, а калциевият дихлорид (CaCl_2) е една от най-добрите възможности за тази цел.

Както може да се види от спектрите на **Фиг.2.9.**, ивиците на COO^- за образците в състав SF/SA(75:25) и SF/SA(50:50) са при 1412cm^{-1} . След приключване на теста за биоактивност в продължение на 25 дни престой в 1.5 SBF, тя е съответно при 1405 и 1406cm^{-1} . Следователно тя е отместена към по-късовълновата част на спектъра.

Наблюдаваното инфрачервено отместване дава основание да се заключи, че се образува йонна връзка от вида $(\text{COO})_2\text{Ca}^{2+}$, което дава основание да се предположи, че композитите са *in vitro* биоактивни. От друга страна именно фрагментите $(\text{COO})_2\text{Ca}^{2+}$ се оказват подходящи кристализационни места за формирането на кристална апатитна фаза.

● В областта на амид II са установени следните промени:

- за чистият фиброин, максимумът за амид II при 1540 cm^{-1} се измества на 1545 cm^{-1} след *in vitro* теста (криви а и а').

- за композит в състав SF/SA(75:25) амид II се измества от 1536 cm^{-1} (преди *in vitro* теста, крива b) на 1542 cm^{-1} (след *in vitro* теста, крива b').

- за композит в състав SF/SA(50:50), ивицата на амид II се измества от 1538 cm^{-1} (преди *in vitro* теста, крива c) на 1543 cm^{-1} (след *in vitro* теста, крива c').

● В областта на амид III също се установява, че абсорбционният, характеристичен за фиброина максимум се отмества в късовълновата част от спектъра, както следва: от 1239 cm^{-1} (за чистия фиброин, преди *in vitro* теста, крива a) на 1232 cm^{-1} (крива а'); от 1229 cm^{-1} (за образец SF/SA(75:25), крива b) на 1218 cm^{-1} (за същия образец, след *in vitro* теста, крива b') и от 1229 cm^{-1} (за образец SF/SA(50:50), крива c) на 1220 cm^{-1} (за същия образец, след *in vitro* теста, крива c').

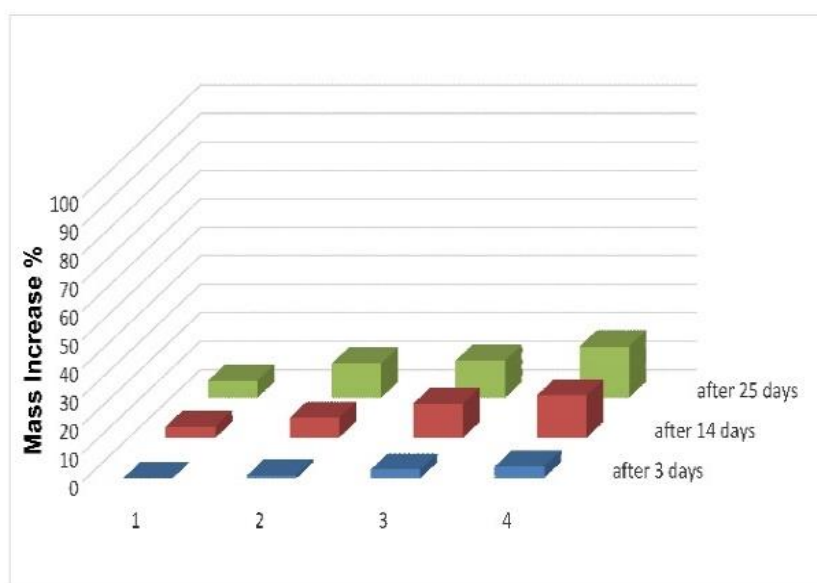
Установеното отместване дава основание да се потвърдят горните заключения. Те са установени по-рано от нас в композити, с участието на фиброин и стъкло-керамика.

Анализът на спектрите на **Фиг.2.9.** показва още един интересен факт. Той се заключава в това, че се установява отместване на ивицата за COO^- , след *in vitro* тест в 1.5 SBF в продължение на 25 дни. В представените на **Фиг.2.9.** инфрачервени спектри се забелязват и ивици с много ниска интензивност при 470 , 560 и 610 cm^{-1} , които са характеристични за кристални апатити. Ниската им интензивност може да бъде обяснена с отсъствието на стъкло-керамика в образеца, както и с относително ниския брой на пролиферационни места за формирането на кристални апатити.

Прави впечатление, че ивицата при 875 cm^{-1} , която също е характеристична за кристални апатити в синтезираните композити е при $\sim 850\text{ cm}^{-1}$. Това дава основание да се заключи, че образуваните кристални апатити върху повърхността на образците са калциево-дефицитни апатити (Ca-def.HA). С оглед на състава на изследваните от нас образци, тяхното присъствие в спектрите дава основание да се заключи, че композитите в състав фиброин/алгинат във вид на филми са *in vitro* биоактивни. От друга страна обаче, тяхната *in vitro* биоактивност е по-слаба, от колкото тази на композитите с участие на калциево-фосфат-силикатна керамика.

2.3.2. Изменение в масата

Извършеният анализ включва четири опитни образци с различно съотношение на композитните материали във вид на филми, които са потопени в разтвор на 1.5 SBF с различна продължителност от време - 3, 14 и 25 дни. Получените резултати са представени на **Фиг.2.10**. Посредством експеримента се наблюдава и анализира влиянието на следните фактори: съотношение на композитите; продължителност на престой в разтвор на 1.5 SBF; морфологична структура.



Фиг.2.10. Нарастване на масата на филмите в зависимост състава им* и продължителността на престой в разтвор на 1.5 SBF: чист фиброин, (проба 1), SF/SA(75:25), (проба 2), SF/SA(50:50), (проба 3) и SF/SA(25:75), (проба 4)

На **Фиг.2.10**. се вижда, че изследваните образци, в зависимост от състава си, проявяват различно нарастване в масата, след престой в разтвора на 1.5 SBF. Наблюдаваната обща тенденция е нарастване в масата с увеличаване продължителността на престой. Композитните материали с участието на алгинат, се отличават с по-голямо нарастване в масата на образците, в сравнение с чистия фиброин. Наред с това, по-голямото количество алгинат в композитния материал, води до по-голямо нарастване в масата на образците. Една от причините за тези разлики между чистия фиброин и композитните материали е неговата много компактна структура, която затруднява достъпа и проникването на разтвора (Образец 1). В този смисъл комбинирането на фиброин с алгинат води до „по-рехавата структура“ на композитите, която е и „по-

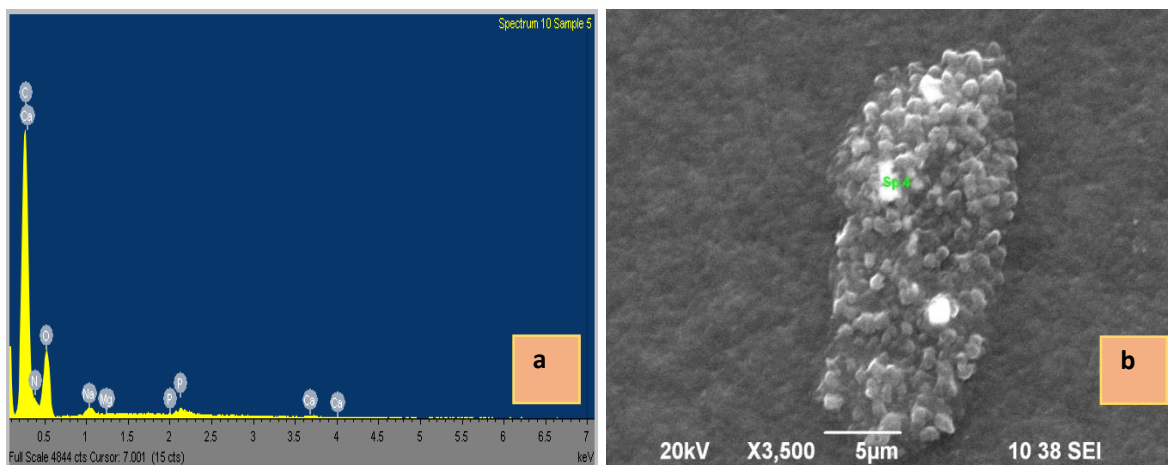
хидрофилна“, благодарение на хидрофилната природата на алгината (голямо количество –COOH групи и естествена поръзност). По своята същност нарастването на масата на образците се свързва с участието на Ca^{2+} , съдържащи се в разтвора на 1.5 SBF, които образуват йонна връзка с карбоксилни групи на алгината от вида $(\text{COO}^-)_2\text{Ca}^{2+}$. Известно е, че при полимерите, омрежването води до стабилизиране на структурата им. Установеното нарастване в масата на филмите с увеличаване на времето на престояване във физиологичната среда (1.5 SBF), може да бъде свързано и с получаването на по-стабилна структура. Сравнението между нарастването на масата на филмите от чист фиброин с това на композитните материали, потвърждава положителната роля на алгината за получаване на материали с по-голяма достъпност за физиологичната среда.

Изводът, който може да се направи от изследванията е, че добавянето на алгинат има положително влияние върху свойствата на композитните материали. Увеличаването на тяхното тегло, което е пропорционално както на тегловното съдържание на алгинат, така и на времето за извършване на *in vitro* теста, доказва косвено, че изследваните композитни материали са *in vitro* биоактивни. Освен това, наблюдаваните в случая промени, доказват заключенията, направени въз основа на инфрачервените спектри.

2.3.3. Получаване на хидроксиапатит – EDX анализ

Както стана ясно от анализа на инфрачервените спектри, установените отмествания на абсорбционните ивици за карбоксилните групи след престояването на образците в 1.5 SBF, дават основание да се заключи, че е образувана йонна връзка между COO^- и Ca^{2+} . Механизмът на образуването ѝ е известен и доказан от други автори. Освен това фрагментите от вида $(\text{COO}^-)_2\text{Ca}^{2+}$ се явяват “зародишни места” за образуването на карбонат-съдържащи калциеви фосфати, във вид на карбонат заместен апатит (CO_3HA).

За по-пълното характеризиране на получените кристали на повърхността на образците, беше извършен EDX анализ. Данните от него са представени на **Фиг.2.11**.



Фиг.2.11. SEM-EDX анализ на образец в състав SF/SA(75:25), след *in vitro* тест в 1.5 SBF в продължение на 25 дни, при статични условия

Както се вижда от SEM изображението на **Фиг.2.11(b)**, повърхността на изследваният образец в състав SF/SA(75:25), е покрита със слой от сферични образувания с размер $\sim 2\mu\text{m}$. Морфологията на слоя доказва, че формираните сферични кристали са от карбонат-съдържащ апатит, което е в пълно съответствие с данните на инфрачервените спектри. От друга страна, сферичната морфология на кристалитите подкрепя идеята за получен карбонат-apatит. Извършеният EDX анализ показва, че образуваният слой съдържа Ca, P, O, Mg, Cl и C, което е съвсем естествено, защото Ca, P, O и C участват в образуването на $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, а Cl и Mg (в твърде малки количества) се утаяват на повърхността, защото те присъстват в разтвора на 1.5 SBF.

Изводът, който се налага е, че SEM-EDX анализа показва, че на повърхността на образца в състав SF/SA(75:25), след 25 дневно престояване в разтвор на 1.5 SBF, кристализира карбонат-съдържащ апатит, със следи от Mg и Cl, което напълно доказва анализа от инфрачервените спектри.

2.4. Заключение

1) Извършеното изследване на композитни филми в състав SF/SA показва, че те са изградени от макромолекулни вериги в различни конформационни състояния – α -спирала и β -конформация. Тъй като получените филми не са обработени допълнително с алкохол, реалната картина показва способността на фиброина към самоорганизация,

включваща конформационни промени, наблюдавани при преминаването на Silk I в Silk II. Тези преходи обаче са частични и получените филми имат смесен строеж.

2) Включеният алгинат в композитите индуцира конформационните промени на фиброиновата макромолекула, както и процеса на рекристализация (β -sheets). Установено е междумолекулно взаимодействие между -NH групите на SF и $-\text{COOH}^-$ групите на SA, реализирано чрез H-връзки.

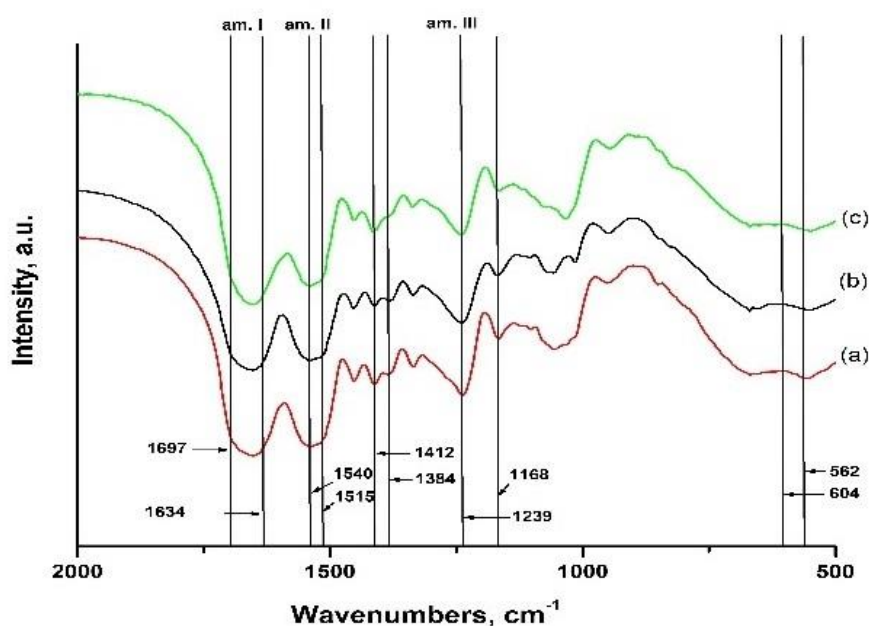
3) *In vitro* поведението на композитите SF/SA се характеризира с образуването на йонна връзка от вида $(\text{COO}^-)_2\text{Ca}^{2+}$ между $-\text{COO}^-$ групите на SA и Ca^{2+} от разтвора на 1.5 SBF. Също така е възможно и на йонна връзка между Ca^{2+} йон от разтвора на 1.5 SBF и C=O амид I, от вида $(\text{C=O})_2\text{Ca}$. Образуването на хидроксиапатит на тези места е указание, че филмите притежават биоактивност.

3. Макропорести композитни материали в състав фиброин/алгинат

Целта на проведеното изследване е да се получи отговор на въпроса: какво е влиянието на морфологията на фиброин/алгинатни композити върху *in vitro* биоактивността им?

За изпълнението на поставената цел бяха получени макропорести фиброин/алгинатни композити (виж експерименталната част).

3.1. Инфрачервена спектроскопия



Фиг.3.12. Инфрачервени спектри на получените макропорести композити в състав: чист фиброин, **a** ; SF/SA(75:25), **b** и SF/SA(50:50), **c**.

Анализът на инфрачервеният спектър на чист фиброин (Фиг.3.12, крива а) няма добре изразени интензивни абсорбционни ивици, с ясно оформени абсорбционни максимуми. Областта на амид I обхваща $1651\text{--}1697\text{ cm}^{-1}$, за амид II от 1515 cm^{-1} до 1540 cm^{-1} и за амид III при 1239 cm^{-1} . Този резултат показва, че в структурата на получения

макропорест материал от чист фиброин се съдържат едновременно както α -спирали, така също и β -конформации на полипептидните макромолекулни вериги.

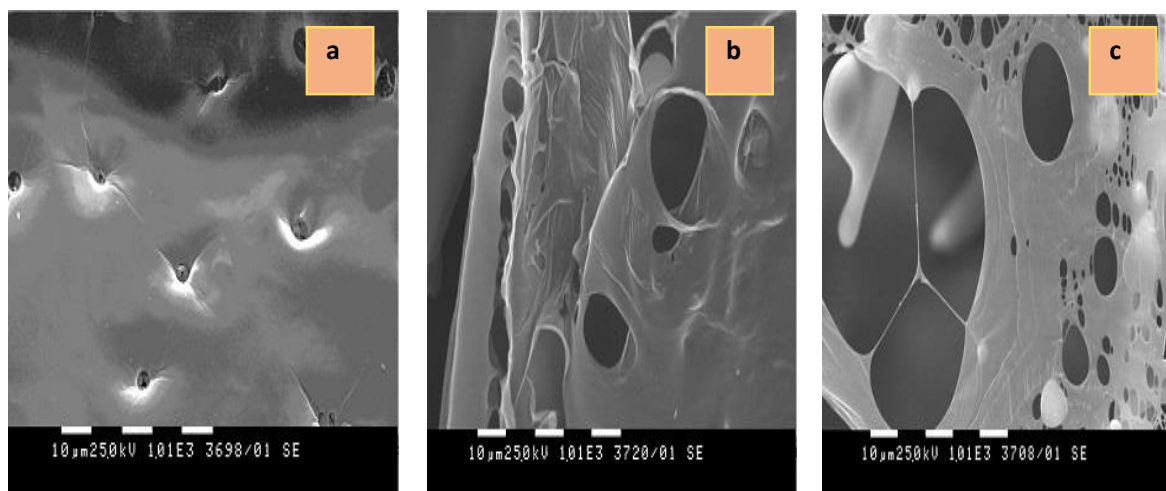
Композитните материали в състав SF/SA(75:25) (Фиг.3.12, крива b) и SF/SA(50:50) (Фиг.3.12, крива c) имат различни спектрални криви, породени от включването на различно количество алгинат като компонента в композитите. В сравнение с чистия фиброин техните спектри имат интензивни и широки абсорбционни ивици. За амид I зоната включва $1651\text{--}1697\text{ cm}^{-1}$, за амид II при $1540\text{--}1515\text{ cm}^{-1}$ и за амид III е при 1239 cm^{-1} и тези стойности са подобни и за двата композита. Този резултат показва, че структурата на получените макропорести композитни материали, съдържа както α -спирала, така и β -конформация на полипептидните макромолекулни вериги. Когато при получаване на макропорестите материали, те са непосредствено лиофилизирани, липсва технологично време за конформационни промени и този процес остава да се състои в условията на лиофилизиране.

Същевременно обаче, карбоксилните групи на SA се характеризират със силна абсорбция в областта при $1420\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, която и за двата състава е при 1412 cm^{-1} .

Изместването към по-късовълновата част на спектъра и получаването на добре оформени абсорбционни максимуми, може да бъде обяснено с протекли взаимодействия чрез водородни връзки. Ако се извърши сравнение между инфрачервените спектри на филмите и на макропорестите композитни материали, може да се заключи, че филмите имат добре организирана структура, докато макропорестите композити притежават структура с по-ниска степен на организация.

3.2. Морфология на образците

Изследването на морфологията на получените композити беше извършено с помощта на SEM, при увеличение 1000, за да се види по-ясно характерната топография на изследваната повърхност. Данните от анализа на морфологията на образците са представени на Фиг.3.13.



Фиг.3.13. SEM изображения на получените макропорести композити: чист фиброин, **a** ; SF/SA(75:25), **b** и SF/SA(50:50), **c**

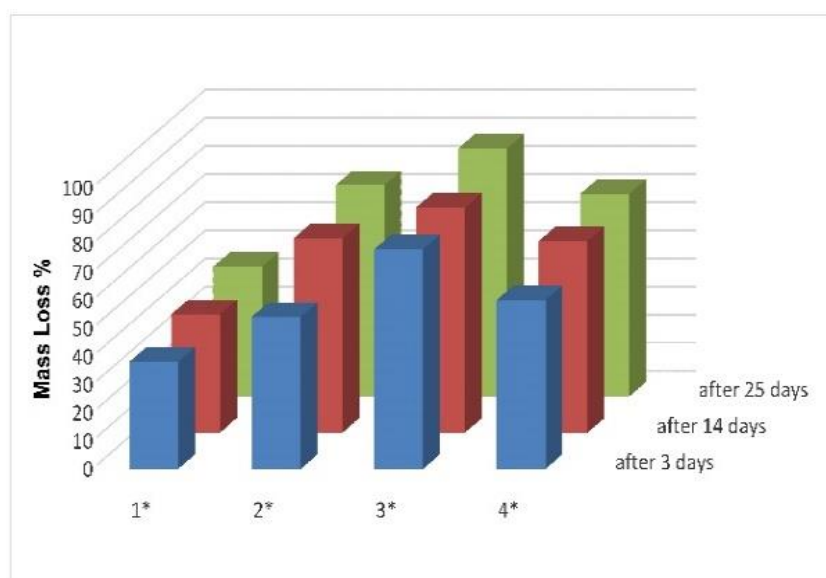
SEM изображението на лиофилизиран чист фиброин (**Фиг.3.13**, изображение **a**), показва, че при условията на експеримента не се наблюдава получаването на макропорест материал. Както се вижда, в случая по-скоро се получава филмообразна текстура, с деформирана на произволни места структура от цепнатини с малки отвори. Това доказва, че температурата, при която фиброинът е лиофилизиран не е достатъчна за получаване на макропорест материал.

За разлика от чистия фиброин обаче, композитните материали с участието на алгинат (**Фиг.3.13**, изображения **b** и **c**), формират типичните макропорести структури. От SEM изображенията на **Фиг. 3.13**. може да се заключи още, че с увеличаване на съдържанието на алгината, порьозитета на образците нараства. Ето защо от проведеното изследване на композитите със SEM, може да се заключи, че алгинатът способства за формирането на типични широкопорести структури. Това би могло също да означава и повишаване на *in vitro* биоактивността на макропорестите образци.

3.3. *In vitro* биоактивност на макропорестите композитни материали

Проявеното *in vitro* разграждане на образците във вид на макропорести материали, бе системно проследено за интервал от 25 дни, в който образците са престояли в 1.5 SBF

разтвор, при температура от 37°C. Изследването включва 4 опитни образци, които бяха потопени в 1.5 SBF разтвор за различна продължителност от време - 3, 14 и 25 дни. Получените резултати са дадени на **Фиг.3.14**. По време на експеримента се проследи и анализира влиянието на следните фактори: съотношение на композитите; време на престой в 1.5 SBF; морфологичната структура.



Фиг.3.14. Намаляване масата на макропорестите материали в зависимост състава им* и продължителността на престой в разтвор на 1.5 SBF: чист фиброин, (проба 1*), SF/SA(75:25), (проба 2*), SF/SA(50:50), (проба 3*) и SF/SA(25:75), (проба 4*)

От фигурата се вижда, че всички опитни образци показват загуба в масата, които могат да бъдат обяснени с включване в разсъжденията на процеса разграждане във физиологични условия. Сравняването с поведението на филмите в същия разтвор и при същите условия насочва към определящата роля на морфологичния строеж на композитите. Макропорестите материали от чистият фиброин имат най-малки загуби в маса /под 10 %/, което може да бъде обяснено с процес на разграждане, за разлика от филмите. Наличието на алгинат, като втора компонента в композита и увеличаване на количеството ѝ, има за резултат ясно изразено нарастване в загубите в маса /достигат до 40 %/. Факторът продължителност на престой в разтвора на 1.5 SBF, също играе важна роля за процеса разграждане на всички опитни образци. Наблюдават се по-високи загуби в масата с увеличаване на времето на престой. Полученият резултат показва, че в среда на 1.5 SBF, композитни материали с изследвания състав, когато са във вид на макропорести структури, претърпяват процес на разграждане. Пробата в състав

SF/AL(25:75) единствена прави изключение като „спира“ процеса на разграждане. Наблюдаваното намаляване в масата на макропорестите композитни материали е пропорционално на нарастването на количеството SA в композитите, както и на продължителността на престой в разтвора на 1.5 SBF.

Композитни материали в състав SF/SA във вид на макропорест материал проявяват *in vitro* разграждане в разтвора на 1.5 SBF .

3.4. Заключение

Получени са макропорести композитни материали в състав фиброин/алгинат, притежаващи добре изразена пореста структура.

1) Анализът на резултатите от изследването на макропорестите композити с помощта на инфрачервена спектроскопия показва, че е получена структура с ниска степен на организация, която съдържа едновременно фиброинови макромолекули - както α -спирала така и β -конформация. Не се наблюдават зони с висока степен на организация - (β -sheets).

2) Морфологичният строеж на образците, изследван посредством SEM анализ, установи пореста структура, като броя и размера на порите нараства с увеличаване количеството на алгината в композитите.

3) *In vitro* отнасянията на макропорестите композитни материали, охарактеризирани чрез инфрачервена спектроскопия и SEM анализ, показаха разграждането им в разтвор на 1.5 SBF.

Сушенето чрез лиофилизиране има за резултат получаването на структура с по-ниска степен на организация, която съдържа едновременно фиброинови макромолекули

в α -спирала и β -конформация. Не се наблюдават зони с висока степен на организация (β -sheets).

In vitro поведението на макропорестите материали показва разграждане в разтвор на 1.5 SBF.

Сравняването на *in vitro* поведението на филмите и макропорестите композитни материали показва диаметрално противоположно поведение – биоактивност и разграждане, обусловено единствено от различен морфологичен строеж.

4. Антибактериални макропорести композити в състав фиброин/алгинат, съдържащи Ciprofloxacin и колоидно Ag

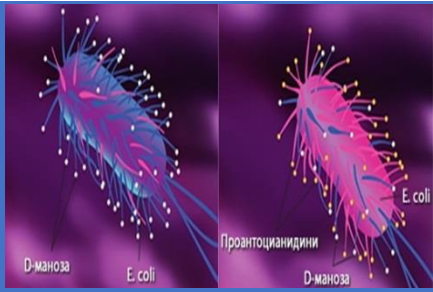
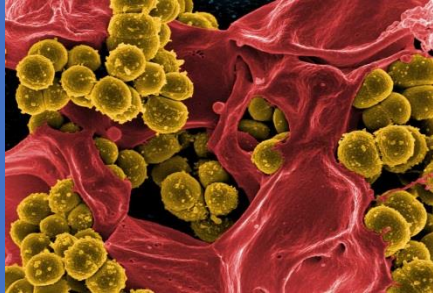
Последната задача от извършената изследователска работа е получаване и охарактеризиране на макропорести биокompозитни материали в състав SF/SA(75:25), съдържащи биоцидите Ciprofloxacin и Колоидно сребро.

С ценните си свойства, биосъвместимост и биоразградимост, тези материали са изключително подходящи като носители на лекарствени средства. Включването на биоциди превръща композитите в материали с по-висока степен на защита, която осигурява и превенция от евентуални инфекции в организма.

4.1. Антибактериална активност

Антибактериалната активност е основно свойство на изследваните композитни материали и тя е определена чрез два стандартни метода: за грам-отрицателни бактерии *Escherichia coli* - ATCC 25922 и за грам-позитивни микроорганизми *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923. Изследвани са три вида образци в състав SF/SA(75:25) и различна концентрация на Ciprofloxacin в тях – 0.5, 1 и 1.5 мг/мл, дадени в Табл. 1.2.

Табл. 1.2. – Антибактериална активност на композитите

Sample №	Result	Ciprofloxacin, mg/ml	 <i>Escherichia coli</i>, ATCC 25922
1	—	0.5	
2	—	1	
3	—	1.5	
Sample №	Result	Colloidal Silver, mg/ml	 <i>Staphylococcus aureus</i>, ATCC 25923
1	—	0.6	
2	—	0.8	
3	—	1	
Sample №	Result	Ciprofloxacin, mg/ml	
1	—	0.5	
2	—	1	
3	—	1.5	
Sample №	Result	Colloidal Silver, mg/ml	
1	—	0.6	
2	—	0.8	
3	—	1	

Забележка*: Символът — означава постигната антибактериална активност, няма растеж на бактериите

Колоидното сребро също е добавено към композит в състав SF/SA(75:25) в три различни концентрации – 0.6, 0.8 и 1 мг/мл, дадени в **Табл. 1.2**.

Резултатите от проведения тест за антибактериална активност са както следва:

Всички изследвани макропорести биокompatитни материали, съдържащи Ciprofolxacin, в изследвания концентрационен интервал, показаха антибактериална активност към грам-отрицателни бактерии *Escherichia coli* и грам-позитивни микроорганизми *Staphylococcus aureus* (**Табл. 1.2**).

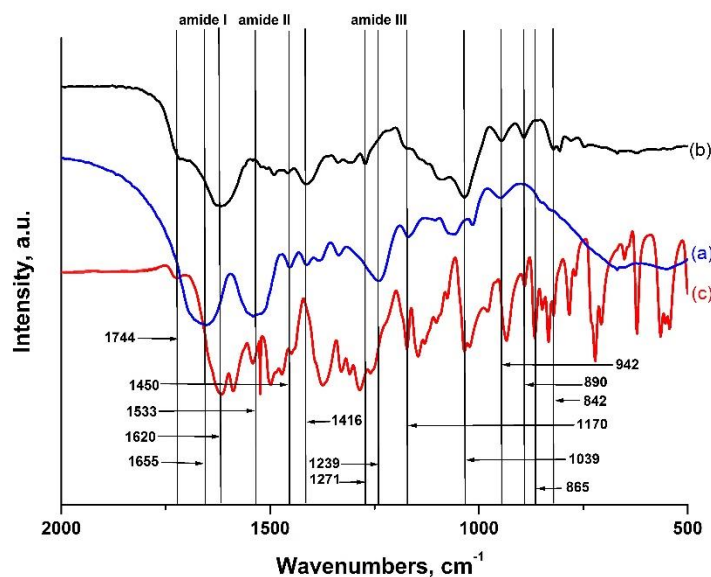
Всички изследвани макропорести биокompatитни материали, съдържащи Колоидно сребро, в изследвания концентрационен интервал, показаха антибактериална активност към грам-отрицателни бактерии *Escherichia coli* и грам-позитивни микроорганизми *Staphylococcus aureus* (**Табл. 1.2**).

Получените резултати дават основание за обобщението, че композитен материал в състав SF/SA(75:25) е подходящ носител на биоциди, тъй като постига антибактериална активност в изследвания интервал от концентрации.

Последният резултат обуславя възможности за прилагане на материалите в различни медицински области, имащи специфика на оздравителните процеси.

4.2. Инфрачервена спектроскопия на композити, съдържащи Ciprofolxacin и Колоидно сребро

Инфрачервените спектри на Ciprofolxacin-съдържащи композитни материали в състав SF/SA(75:25) са представени на **Фиг. 4.15**.



Фиг.4.15. Инфрачервени спектри на получените композити в състав : SF/SA(75:25), **a** ;
композит SF/SA(75:25) съдържащ Ciprofloxacin, **b** ;
чист Ciprofloxacin, **c**.

Инфрачервеният спектър на чистият Ciprofloxacin (**Фиг.4.15**, крива c), показва присъствието на ред характеристични ивици, както следва:

- Ивиците в областта 1750 – 1700 cm⁻¹, представят C=O валентните колебания на COOH групи;
- Включването на Ciprofloxacin в полимерната матрица се потвърждава от абсорбцията на характерната за флуорохинолиновите съединения - C-F група, която абсорбира в интервала 1000-1050 cm⁻¹. Както се вижда от **Фиг.4.15** (криви b и c), тази абсорбция е при 1039 cm⁻¹ и при двата наблюдавани спектъра – съдържащия Ciprofloxacin композит SF/SA и самостоятелния спектър на Ciprofloxacin. Други изследователи получаващи биокompозити с различни полимерни матрици установяват абсорбция на -C-F групата при около 1050 cm⁻¹. Също така е възможно да протече взаимодействие между -COOH на антибиотика и -ОН групите на полимерната матрица и по-конкретно на SF, който съдържа аминокиселините тирозин и серин. При това взаимодействие се образува естерна връзка (-O-C=O), която абсорбира в интервала 1300-1250 cm⁻¹. Полученият композит има абсорбционна ивица при 1271 cm⁻¹.

За включването на Ciprofloxacin в структурата на композита се съди още и по наличието на абсорбционна ивица при $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$, която не се наблюдава в инфрачервеният спектър на композита в състав SF/SA(75:25). Присъствието на посочената ивица може да се приеме като доказателство за образуван композит с участието на антибиотика.

Анализът на спектъра на композита, съдържащ Ciprofloxacin (**Фиг.4.15**, крива b), показва, че характеристичните ивици за Ciprofloxacin са със силно намалена интензивност, но са позиционирани при същите дължини на вълните. Това е още едно доказателство за присъствието на антибиотик в структурата на композита.

И тук, както в предишните разглеждания, фиброинът претърпява структурни изменения, предизвикващи:

1) Изместване на абсорбционната ивица за амид I в по-късовълновата част на спектъра (от 1655 cm^{-1} за чистия фиброин на 1620 cm^{-1} за композита);

2) “Изчезване” на амид II и амид III се свързва с ниското pH на средата, необходимо условие за разтварянето на Ciprofloxacin.

3) “Изчезването” на амид II и амид III повтаря поведението на композита в Точка 2.1 (**Фиг.2.7**). Този факт потвърждава предполагаемата теза за образуването на водородни връзки между NH групата от CONH връзката на фиброина и COOH групата на алгината. Същевременно се наблюдава интензивна ивица на абсорбция при 1416 cm^{-1} (характерна за COOH^- на SA).

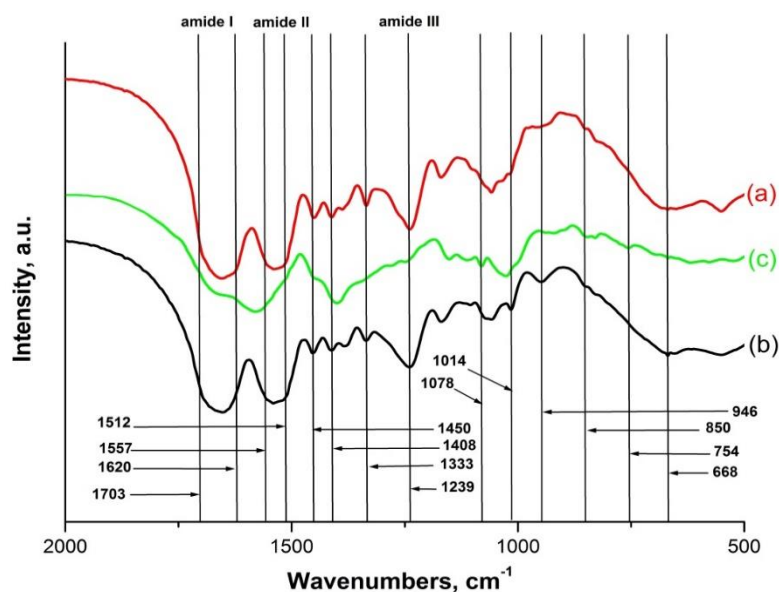
Изводът, който може да бъде изведен от инфрачервените спектри на **Фиг.4.15**, е, че е образуван композитен материал в състав SF/SA(75:25) с включен в състава му Ciprofloxacin, за което се съди по:

- Наличието на нова ивица при $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$, която е характеристична за COOH групата на Ciprofloxacin
- Интензивната ивица на абсорбция в областта $1000\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$, която е характеристична за C-F групите
- Връзката между COOH на Ciprofloxacin и OH групите на SF.

Фиброин-алгинатните композити SF/SA(75:25), съдържащ и несъдържащ колоидно сребро композит, също са изследвани с помощта на инфрачервена

спектроскопия.

Получените инфрачервени спектри са представени на **Фиг.4.16**.



Фиг.4.16. Инфрачервени спектри на получените композити в състав: SF/SA(75:25), **a** ; SF/SA(75:25) съдържащ колоидно сребро, **b** ; колоидно сребро, **c** .

Както по-рано беше изяснено, ивиците в областта $1700 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ обикновено се използват като маркери за проследяване на конформационните промени във фиброиновата макромолекула. Съгласно инфрачервените спектри на **Фиг.4.16**, дълбоката и ясно отчетлива ивица при $\sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ може да бъде приписана на β -sheets структури. Присъствието им може да бъде доказано и по наличието на силно интензивен максимум при $\sim 1520 \text{ cm}^{-1}$. В спектъра отсъстват характеристикните ивици на Silk I, от където може да се заключи, че при условията на получаване на композита преференциално се образуват β -sheets структури.

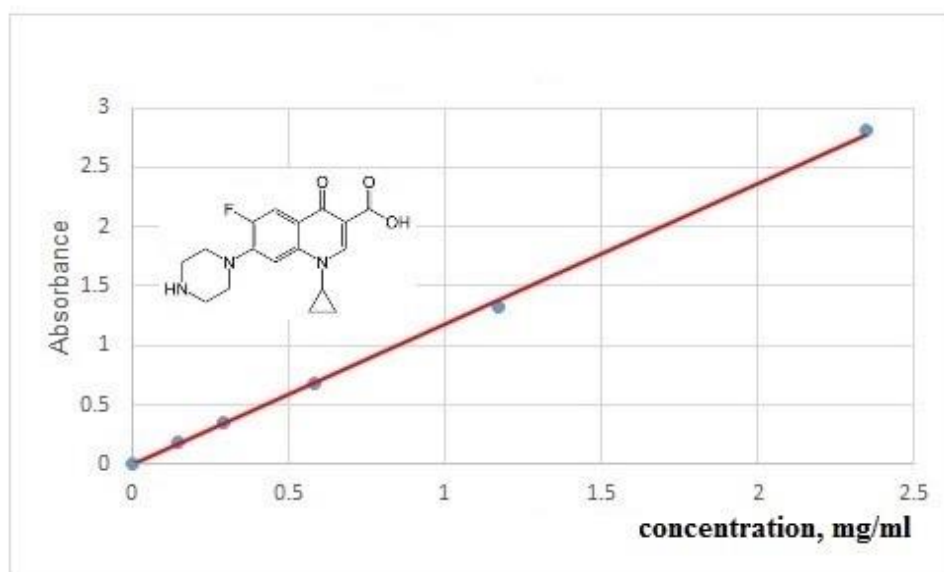
От инфрачервените спектри на **Фиг. 4.16**, се вижда още, че няма различия в хода на спектъра за образец без и този, съдържащ колоидно Ag. Това води до заключението, че Ag не влияе върху структурни преходи във фиброиновата молекула. Промяната в структурата е свързана само с начина на получаване на изследваните композити. Този факт е установен и от други автори, изследвали, че Ag не влияе върху структурните преходи в молекулата на фиброина.

4.3. Отделяне на Ciprofloxacin във воден разтвор

Важно свойство на прилаганите композити, като носители на лекарствени средства е възможността тези средства да се отделят и преминават върху лекуваните организми.

Свойството отделяне на Ciprofloxacin от композита във водна среда (pH=7.4) е изследвано с помощта на UV-Vis спектроскопия. Изследването включва няколко последователни стъпки, като получените резултати са дадени на **Фигури 4.17, 4.18 и 4.19.**

Избирателната абсорбция на светлината (електромагнитен поток от фотони) от вещества в разтвори, следва закона на Буге-Ламберт-Бер. Количествената мярка за поглъщане е абсорбцията $A = \epsilon \cdot c \cdot b$, уравнение на права, минаваща през началото на координатната система при const λ и b . Получената за Ciprofloxacin стандартна права е дадена на **Фиг.4.17.**

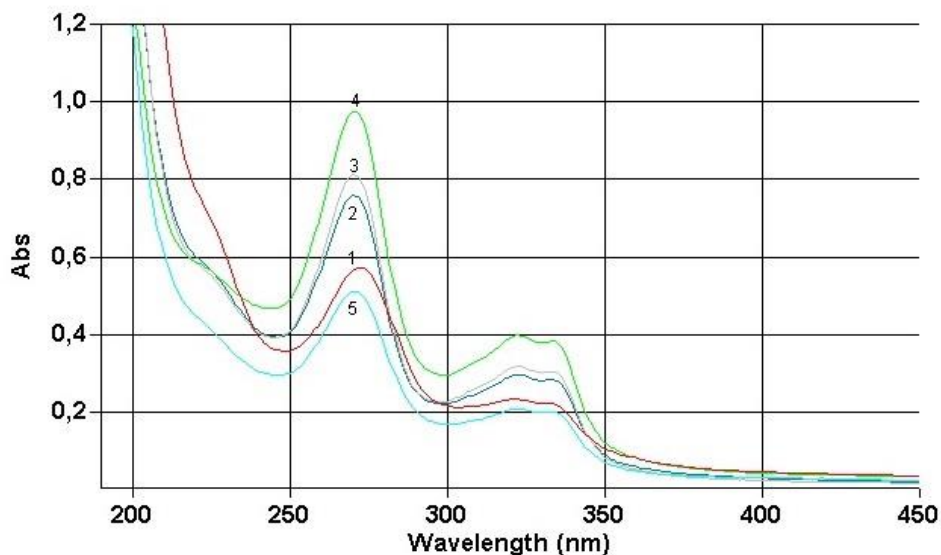


Фиг.4.17. Стандартна права на Ciprofloxacin, снета при $\lambda_{\max}=270\text{nm}$

Така получената стандартна права, позволява да бъде определяна всякаква неизвестна работна концентрация на Ciprofloxacin.

Избран композит в състав SF/SA(75:25), съдържащ 1 мг/мл Ciprofloxacin, престоява във водна среда (pH=7.4) и продължителности от време 0.5,1,2,3 и 5 часа.

Така получените водни извлеци са спектрофотометрирани в интервала 200-450nm и резултатите са дадени на **Фиг.4.18**.



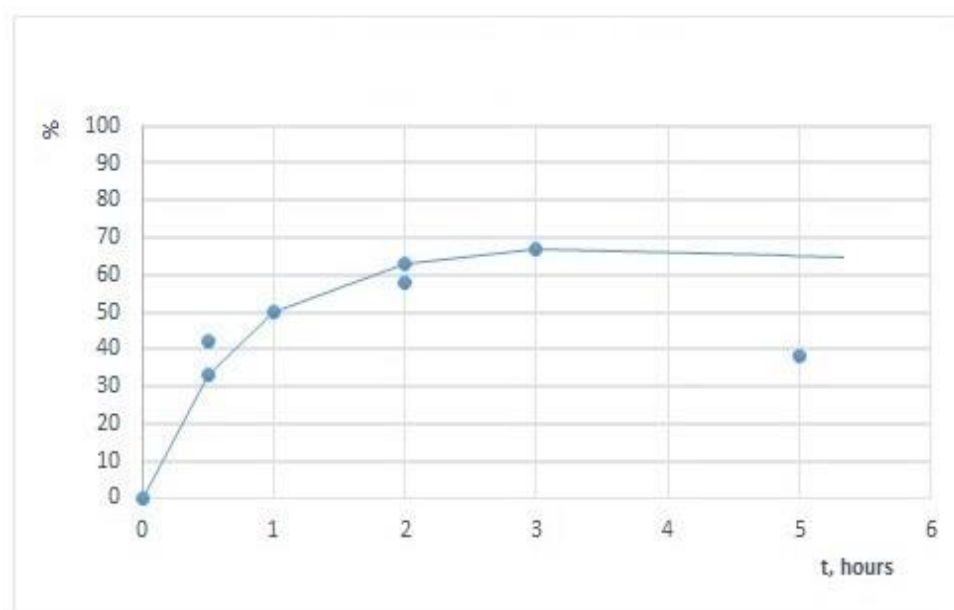
Фиг.4.18. Абсорбционни спектри на разтворите, съдържащи на отделения Ciprofloxacin

Полученият резултат за отделеното количество Ciprofloxacin е даден в **Табл.1.3**.

Табл.1.3. – Отделено количество Ciprofloxacin, в зависимост от времето на престой

Образец №	Време/ч	Abs	Ciprofloxacin, mg/ml	Отделен %
1	0.5	0.58	0.42	42
2	1	0.76	0.50	50
3	2	0.82	0.58	60
4	3	0.98	0.67	67
5	5	0.51	0.38	38

Точното количество отделен Ciprofloxacin е важен за проведеното изследване резултат, тъй като той носи информация, каква част от антибиотика, съдържащ се в биокомпозита се е отделила от него. Извършеното изчисление, за конкретния случай, позволи построяването на графиката, за количествено отделен Ciprofloxacin, %, в зависимост от продължителността на престой във водната среда. Резултатът е даден на **Фиг.4.19**.

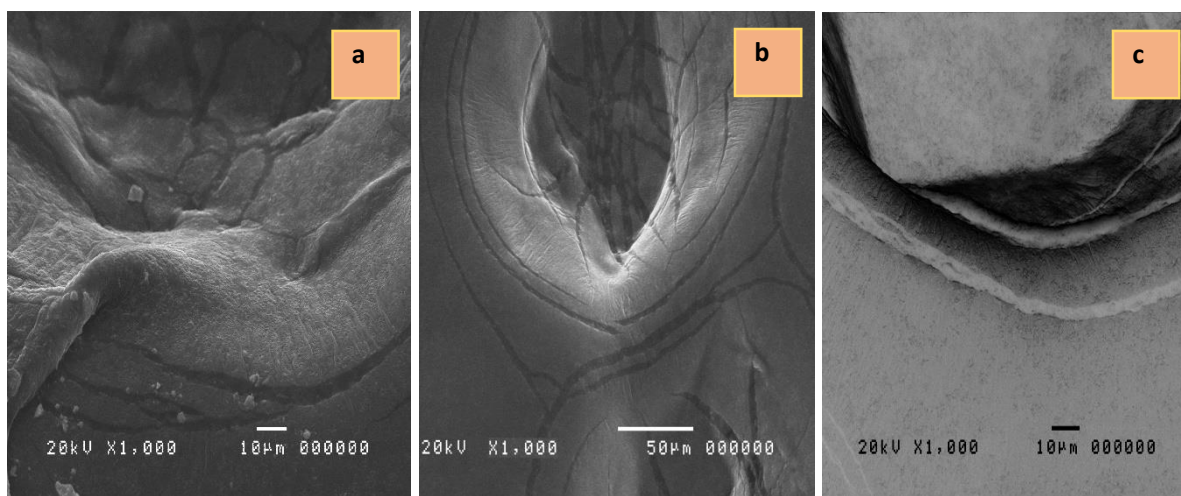


Фиг.4.19. Количество отделен Ciprofloxacin, (%) в зависимост продължителността на престой на композита във водна среда

Значимостта на получените резултати е установената способност за постепенно отделяне на Ciprofloxacin във времето от изследваната макропореста матрица SF/SA(75:25).

4.4. Морфологичен строеж - SEM анализ

Изследването на морфологичния строеж на получените биоцидни композит е извършено при увеличение 1000 чрез SEM анализ – **Фиг.4.20.**



Фиг.4.20. SEM композитен материал SF/SA(75:25), съдържащ Ciprofloxacin, **a** чист композит SF/SA(75:25), **b** ; композит SF/SA(75:25), съдържащ колоидно Сребро, **с.**

Сравняването на показаните на **Фиг.4.20** изображения, дава основание за обобщението, че **не се наблюдава промяна във вида на текстурата на трите вида макропорести** композитни материали - SF/SA(75:25) с Ciprofloxacin, **a** ; чист композит SF/SA(75:25), **b** ; SF/SA(75:25) с колоидно сребро, **с**. Когато в макропорестите материали има включен Ciprofloxacin на повърхността се наблюдават разпръснати малки кристалчета, наблюдавани и от други автори , които доказват наличието на антибиотик в синтезираните композити.

Добавянето на колоидно сребро към разтвора на фиброина има за резултат промяна на размера и формата на порите, както и фибрилизирание на фиброиновата компонента. Допускането е ,че причина за тези разлики в морфологията се дължат на наличието на ПАВ в колоидната система на среброто.

4.5. Заключение

1) Получените макропорести композитни материали с включен в тях антибиотик (Ciprofloxacin), проявяват антибактериална активност, както към грам-положителни микроорганизми (*Staphylococcus aureus*), така и към грам–отрицателни бактерии (*Escherichia coli*), в изследвания концентрационен интервал.

2) Получените макропорести композитни материали с включено в тях Колоидно сребро, проявяват антибактериална активност, както към грам-положителни микроорганизми (*Staphylococcus aureus*), така и към грам–отрицателни бактерии (*Escherichia coli*), в изследвания концентрационен интервал.

3) Получените чрез инфрачервена спектроскопия и допълнени от SEM анализ резултати установиха, че Ciprofloxacin е включен в полимерната матрица, като задържането му освен механично, може да бъде и чрез естерна връзка между COOH на Ciprofloxacin и OH групите на фиброина от тирозиновия фрагмент.

4) Изследването чрез UV-Vis спектроскопия установи постепенно отделяне на Ciprofloxacin във воден разтвор, като количеството му зависи от продължителността на престой на биоматериала във водата.

5) Получените резултати дават основание антибактериалните макропорести биокompозитни материали, които притежават комплекс от свойства, да бъдат препоръчани като носители на лекарствени средства, прилагани за лечение на рани или за перорална употреба.

5. Изводи

Извършено е изследване на *in vitro* отнасянията в 1.5 SBF на композитни материали с основна компонента фиброин. За целта са получени различни по вид и състав органично-неорганични и органично-органични композитни материали. Анализът на резултатите от изследването дава основание да бъдат направени следните изводи:

Композитни материали в състав фиброин/калциев-фосфат силикатна керамика

1. Бифазна керамика в системата $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ проявява ***in vitro* биоактивност**, която се свързва с образуването на карбонат-съдържащ хидроксиапатит, върху повърхността си след *in vitro* тест в 1.5 SBF.

2. Наблюдаваните чрез инфрачервена спектроскопия промени в абсорбционна способност на композитния материал в състав SF/CPS предполагат образуването на **химична връзка** между керамиката и фиброина, с участието на Ca^{2+} на керамиката и C=O амид I на фиброина.

3. Получените композитни материали проявяват ***in vitro* биоактивност**, за която се съди по образуването на В-тип карбонат апатит (биоапатит).

Композитни материали в състав фиброин/алгинат във вид на филми

4. Анализът на резултатите от изследване на филми в състав фиброин/алгинат с инфрачервена спектроскопия установи настъпили конформационни промени във фиброиновата макромолекула и образувани междумолекулни водородни връзки между амидните групи на фиброина и карбоксилните групи на алгината.

5. Включването на алгинат в състава на филмите индуцира структурни промени във фиброина – конформационна трансформация от α -спирала в β -конформация и процес на рекристализация на β -sheets.

6. Анализът на резултатите от инфрачервената спектроскопия след *in vitro* теста установи, образуването на йонна връзка между Ca^{2+} от разтвора на 1.5 SBF и карбоксилната група на алгината от вида $(\text{COO}^-)_2\text{Ca}^{2+}$, която е зародишно място за последващо образуване на хидроксиапатит. Не се изключва и образуването на друга йонна връзка, отново между Ca^{2+} от разтвора на 1.5 SBF и C=O (амид I) на фиброина от вида $(\text{C=O})_2\text{Ca}^{2+}$.

7. Филмите в състав фиброин/алгинат проявяват *in vitro* биоактивност, доказана от локализирано образуване на хидроксиапатит върху повърхността им (EDX), както и от инфрачервена спектроскопия и нарастването в масата на образците.

8. 1.5 SBF ускорява процесите на конформационна трансформация и рекристализация на фиброина в композитните филми в състав фиброин/алгинат.

Макропорести композитни материали в състав фиброин/алгинат

9. Анализът на резултатите от изследване на макропорести композитни материали с помощта на инфрачервена спектроскопия показва, че е получена структура с по-ниска степен на организация – съдържа едновременно α -спирала в β -конформация и отсъстват β -sheets зони.

10. Макропорестите композитни материали, охарактеризирани с помощта на инфрачервена спектроскопия, SEM анализ и тегловен метод за определяне на масата, показваха *in vitro* разграждане в разтвор на 1.5 SBF.

Антибактериални макропорести композитни материали в състав фиброин/алгинат

11. Получените макропорести композитни материали с включен в тях антибиотик (Ciprofloxacin), проявяват антибактериална активност, както към грам-положителни микроорганизми (*Staphylococcus aureus*), така и към грам-отрицателни бактерии (*Escherichia coli*), в изследвания концентрационен интервал.

13. Получените макропорести композитни материали с включено в тях Колоидно сребро, проявяват антибактериална активност, както към грам-положителни микроорганизми (*Staphylococcus aureus*), така и към грам-отрицателни бактерии (*Escherichia coli*), в изследвания концентрационен интервал.

14. Включеният в полимерната матрица Ciprofloxacin може да се отделя постепенно във времето. Оригиналната система макропорест биокомпозит в състав фиброин/алгинат (75:25) + Ciprofloxacin може да бъде препоръчана за получаването на носители на лекарства, подходящи за перорално приложение или за лекуване на рани.

15. Антибактериална активност в комбинация с биразградимост, дава основание тези материали да бъдат препоръчани като носители на лекарствени средства, прилагани за лечение на рани или за перорална употреба.

6. Приноси

1. Получени са композитни материали в състав фиброин/алгинат в различни тегловни въотношения, във вид на филми, без допълнително третиране с алкохол. При тези условия, протичащите конформационни и структурни промени, както и междумолекулни взаимодействия се обуславят единствено от природата на полимерите. Получаване без алкохолно третиране, освен че може да има технологични и икономически предимства, е определящо за истинността на получените резултати, относно свойствата на композитите, както и за сигурността на тяхната възпроизводимост.

2. Резултатите от *in vitro* изследването в 1.5 SBF по същество разграничават композитни материали с еднакъв химичен строеж и състав, но с различен морфологичен строеж: филмите проявяват биоактивност, докато макропорестите материали се разграждат. Това означава, че филмите са подходящи за условия, в които биоактивността е желана, докато макропорестите са подходящи за прилагане с желано разграждане.

3. Анализът на инфрачервените спектри на получените филми при различни рН условия, дава основание да бъде подкрепена тезата за образуването на междумолекулни водородни връзки между NH групите от -CONH- на фиброина и COOH на алгината, в условията на получаването им.

Важността на този принос може да бъде оценена като се знае, че в теорията на взаимодействието и връзките между полизахаридите и фиброина има три различни тези, една от които ние подкрепяме.

Значимостта на този принос също така може да бъде свързана и с възможността филмите от SF/SA да бъдат отнесени към хибридните материали, тъй като съществува междумолекулно взаимодействие чрез водородни връзки между фиброина и алгината.

4. Изследването на получените макропорести биокомпозитни материали, съдържащи Ciprofloxacin показва, че е възможно трайното му задържане в матрицата на композита и постепенното му отделяне във времето. С други думи, този вид биоматериал е подходящ за носител на лекарствени средства, прилагани за лечение на рани или за перорална употреба.

Списък на публикациите:

1. Lachezar Radev, Todor Gerganov, Hristo Georgiev, Antony Kolev, Violeta Vassileva, Rumiana Iankova, Ekaterina Cholakova, International Journal of Materials and Chemistry, Silk Fibroin/Calcium Phosphate Silicate Composites: *In vitro* Bioactivity, (2013), 3(3A): 8-15.
2. Antony Kolev, Violeta Vassileva, Lachezar Radev, Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR), The Role of Morphological Structure of Fibroin/Alginate Blended Biomaterials on Their In Vitro Behavior, Vol-2, Issue-11, (2016), ISSN: 2454-1362. (IF)
3. Antony Kolev, Violeta Vassileva, Lachezar Radev, Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR), Antibacterial fibroin/alginate blended biomaterials containing Silver and Ciprofloxacin, Vol-2, Issue-12, (2016), ISSN: 2454-1362. (IF)
4. Antony Kolev, Violeta Vassileva, Hristo Georgiev, Journal of Chemical Technology and Metallurgy, Interaction between fibroin and alginate into the blended films, 52, 3, 449-456, (2017).
5. Violeta Vasileva, Antony Kolev, Magazine Textile and clothing, Preparation and characterization of silk fibroin/alginate biomaterials, 7-8 (2013).

Цитати на публикуваните статии :

1. Midha S, Tripathi R, Geng H, Lee P D, Sourabh Ghosh, Elucidation of differential mineralisation on native and regenerated silk matrices, 68, (2016), 663-674.
– цитирана статия „*Silk Fibroin/Calcium Phosphate Silicate Composites: In vitro Bioactivity*“.