



**ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕНИ МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНИ ТЕХНОЛОГИИ
КАТЕДРА „ПОЛИМЕРНО ИНЖЕНЕРСТВО”**

Таня Неделчева Димова

ТЕМА

**Желатин съдържащи композитни материали
с участието на зол-гелни стъкла в системата
 $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователна и научна степен „доктор” по научна специалност
5.10. Химични технологии (Технология на композитните материали)

Научени ръководители: доц. д-р Лъчезар Радев
 проф. д-р Маргарита Апостолова

Научно жури:

1. доц. д-р Маргарита Симеонова – председател, рецензент
2. проф. д-р инж. Маргарита Незнакомова – рецензент
3. доц. д-р Даринка Христова
4. доц. д-р Елена Кашчиева
5. доц. д-р Лъчезар Радев

София, 2019

Дисертационният труд е написан на 142 страници, съдържа 32 фигури и 30 таблици. Цитирани са 287 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на катедрен съвет на научното звено на катедра „Полимерно инженерство“, състояло се на 26.04.2018 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 11.03.2019 г. от 14.00 часа в зала 424, 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.

Цел и задачи

Целта на настоящото изследване е получаване и характеризиране на серия желатин-съдържащи композитни материали на база зол-гелни стъкла (SGBG) в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$, притежаващи висока биоактивност и биосъвместимост.

За реализирането на тази цел са поставени следните задачи:

1. Синтез на серия SGBG в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ (BG/Ag) с различно съдържание на сребро.
2. Получаване на органично-неорганични композити (80BG/20G) между SGBG и желатин (Gel), посредством не-биомиметичен път без омрежващи вещества.
3. Физико-химично характеризиране на SGBG и 80BG/20G посредством XRD, FTIR и SEM.
4. *In vitro* тест за биоактивност на SGBG и 80BG/20G.
5. Провеждане на *in vitro* тестове с клетъчни култури.

Използвани методи

Синтез на SGBG в системите $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ и $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$

Съставите на синтезираните SGBG са представени в Табл. 1.

Таблица 1. Състави на SGBG.

Означения	Състав на гела [wt%]				общо [wt%]
	SiO_2	CaO	P_2O_5	Ag_2O	
BG0	70	25	5	---	100
BG1	69	25	5	1	100
BG2	68	25	5	2	100
BG3	67	24	5	4	100

SGBG са синтезирани по зол-гелен метод в няколко стъпки. Първата стъпка е получаването на SiO_2 зол чрез хидролиза на прекурсора TEOS. Необходимото количество TEOS (в ml) се смесва със съответните количества H_2O и $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, изчислени по химичното уравнение за хидролиза на TEOS. Разтворът представлява опалесцираща, млечнобяла течност. При непрекъснато разбъркване към нея се добавя много малко количество конц. HCl (pH=3). След около 15 - 20 мин, течността се избистря, но хомогенизирането ѝ продължава.

Необходимото за синтеза количество CaO се разтваря във вода, при непрекъснато хомогенизиране на разтвора в продължение на 1 h. След изтичане на посоченото време, към получения разтвор на Ca(OH)_2 , бавно и при продължаващо хомогенизиране, се прибавя необходимото количество H_3PO_4 до pH = 10. Към получения разтвор за всеки образец се включва изчисленото количество AgNO_3 и се хомогенизира в продължение на 1 h. След изтичане на посоченото време, разтворът на калциевия фосфат (с или без включено сребро) се прибавя към този на SiO_2 зол като хомогенизирането се извършва в продължение на 15 h. След това, золът се оставя при стайна температура, за да се получи гел. Той се суши при $t^\circ = 120^\circ\text{C}$ в продължение на 12 h за отстраняване на водата и алкохола. Полученият сух гел се подлага на термично третиране при $t^\circ = 600^\circ\text{C}$ в продължение на 6 h.

Получаване на желатинови композити

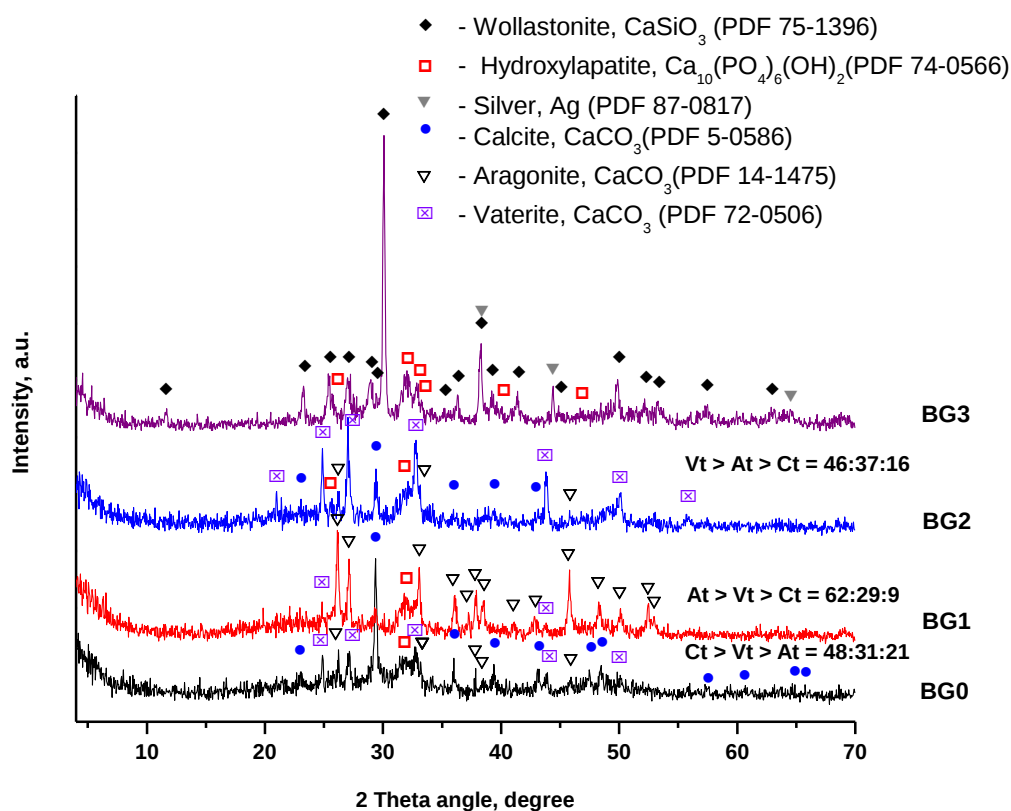
Необходимото количество от получените биоактивни стъкла (BG), се смесва с дестилирана вода, след което се суспендира в сонификатор UP400S HIRSCHER със сонотрод (приставка - Н7) за постигане на по-fino диспергиране във водната среда. След соникацията, суспендираната утайка от BG увеличава почти двойно обема си. С получената дисперсия се приготвя 1% (w/v%) разтвор на Gel, което става при загряване до 40°C. Съотношението на BG спрямо Gel е 80:20. Получената смес (за всеки композит) се изсипва в пластмасово петри, след което се охлажда при 4°C до желиране. Следва замразяване на образците при – 80°C в продължение на 12 h. След изтичане на посоченото време, те се лиофилизират в продължение на 72 h (лиофилизатор CHRIST с ледогенератор - 93 °C, вакуум 0,017 mbar, режим на полусушене).

Резултати и обсъждане

1. Физико-химично характеризиране на BG

Рентгенофазов (XRD) анализ на BG

XRD дифрактограмите на изследваните SGBG, след термично третиране при 600 °C в продължение на 6 h, са представени на **фиг. 1**.



Фигура. 1. Рентгенодифракционни данни на серия BG0, BG1, BG2 и BG3

Образците от серия BG са означени като BG0, BG1, BG2 и BG3, съгласно процентното съдържание на Ag_2O , съответно 0, 1, 2 и 4 wt%.

Образци BG0, BG1 и BG2 проявяват сходство по отношение на фазовия състав. От една страна, в дифрактограмите им се забелязва аморфно хало. Следователно те съдържат аморфна фаза. Но, от друга страна, на всички дифрактограми се установяват дифракционни пикове, които показват наличие на кристални фази. Те са идентифицирани като различни полиморфни форми на CaCO_3 : Vaterite (Vt), Aragonite (At) и Calcite (Ct).

От данните за дифракционните максимуми на стъклата ясно се вижда, че при нарастване съдържанието на сребро в гела за синтез се променя и фазовият състав.

Така, след термично третиране на образеца, несъдържащ сребро (образец BG0), се отчита присъствие на кристални фази, които могат да се отнесат към споменатите по-горе полиморфните форми на CaCO_3 : Ct (PDF 5-0586), Vt (PDF 72-0506) и At (PDF 14-1475). Процентното съдържание на упоменатите фази показва, че с най-високо съдържание е фазата на Ct, следвана от тази на Vt и най-накрая от тази на At.

Интересно обстоятелство е, че те се установяват в един образец. Принципно различните полиморфни форми на кристалните фази имат различни полета на устойчивост, определени от факторите температура и налягане.

От една страна, преходът $\text{At} \rightarrow \text{Ct}$ е при 400°C и е необратим. Той протича само в една посока, но не и в обратната.

От друга страна, след нагряване при 600°C , At би се превърнал в Ct. Поради това би могло да се заключи, че посочените фази са образувани вследствие на протекли карбонизационни процеси, в които участват Ca^{2+} от SGBG и CO_2 от въздуха. Вероятно термичното третиране на изходните гели при 600°C , е довело до свободен CaO , който впоследствие е взаимодействал с CO_2 от въздуха.

Това, по което образците се различават е, че в BG0 доминира Ct, но се установяват Vt и At, в BG1 преобладава At, а в BG2 - Vt.

От данните на **фиг. 1** се вижда още, че с нарастване съдържанието на Ag_2O в гела за синтез на образци BG1 и BG2, не настъпва съществена промяна във фазовия състав, а само в количеството на посочените по-горе фази. Така, за образец BG1 с най-високо процентно съдържание е фазата At (62%), докато за образец BG2 – фазата Vt (46%). Присъствието на тези фази също би могло да бъде в пряка връзка с протекли процеси на карбонатизация на образеца.

След като се означат пикове на карбонатните фази на всички дифрактограми се установява, че остават допълнителни близко разположени пикове между $31-33^\circ 2\theta$ ($d = 2.85 - 2.71$). Фазата, на която принадлежат, вероятно е HA, както е означено на **фиг. 1**.

За разлика от образците BG0, BG1 и BG2, образецът с най-високо съдържание на сребро (BG3) показва различна дифракционна картина. Той се различава от останалите образци, както по фазов състав, така и по по-високата степен на кристализация.

В дифрактограмата на образец BG3 се наблюдава максимум с най-висок интензитет при $\sim 31^\circ(2\theta)$. Той може да се отдаде на присъствието на кристалната фаза Wt (CaSiO_3 , PDF 75-1396). Заедно с нея, XRD анализа показва присъствие на HA (PDF 74-0566), както и на елементарно сребро (PDF 87-0817). Експерименталните дифракционни данни за образец BG3 показват категорично съответствие с еталоните на посочените кристални фази.

Присъствието на Wt в синтезирания образец BG3 не е негативно, а напротив. Wt е обещаващ материал като покритие за импланти, с приложение при възстановяване или заместване на увредена костна тъкан.

Всъщност кристалността на материала BG3 не е висока. Това се дължи на температурата и времето за термичното третиране ($600^\circ\text{C} / 6 \text{ h}$), които не са достатъчни за получаване на стъклокерамика.

От направената литературна справка, би могло да се заключи, че Wt кристали при образец BG3 са получени при по-ниска температура (600 °C / 6 h) от посочената в литературните източници до момента.

Наличието на сребърни частици, служещи като хетерогенни зародиши, вероятно стимулират кристализацията на Wt при термичната обработка на гела, макар че не откриваме подобен резултат описан в литературата. Към такова твърдение ни подтиква фактът, че BG3 е единственият образец, за който е установено присъствие на сребро като метална фаза. В другите образци среброто не се проявява на рентгенограмите. Това може да се дължи на обстоятелството, че е в по-малко количество, но и на включването му в аморфната мрежа.

От данните на **фиг. 1**, отразяващи рентгенографското изследване на получените от нас SGBG с различно съдържание на Ag₂O, могат да се направят следните **по-важни заключения**:

1. След термично третиране при 600 °C в продължение на 6 h на образца без сребро (BG0), както и за образците с ниско съдържание на Ag₂O, XRD показва присъствие на трите полиморфни модификации на CaCO₃ – Ct, Vt и At в различно процентно съотношение, което може да се отдаде на взаимодействие между Ca²⁺ на SGBG и CO₂ от въздуха.

2. В образците с 1% и 2% Ag₂O, XRD данните доказват, че в посочените тегловни количества Ag₂O не оказва влияние върху фазовия състав. Независимо от това обаче, формирането на нестабилните фази от Vt и At, може да окаже влияние върху *in vitro* биоактивността на образците BG1 и BG2, поради факта, че те притежават по-висока разтворимост от Ct. Известно е, че Vt е термодинамично най-нестабилната полиморфна форма на CaCO₃.

3. Наблюдава се кристализация на силикатна фаза – Wt (при 600 °C).

С нарастване количеството на Ag₂O до 4 wt.% в гела за синтез на BG, XRD отчита присъствие на нови и коренно различни от предходните фази – тези на Wt и HA. Във връзка с това, би могло да се предположи, че Ag⁺ играят ролята на „катализатор“ за формирането на посочените фази, но подобен резултат за стъкла от вида SiO₂-CaO-P₂O₅-Ag₂O не е намерен. В литературата е описано присъствието на фазите HA и Wt, но в стъкла с различно съдържание на компонентите на гела за синтез. Освен това, до момента липсват прецизни изследвания, относно „катализиращото“ влияние на Ag⁺, но в нашият случай, образуването на Wt и HA би могло да се дължи не толкова на температурата на термично третиране (600 °C в продължение на 6 h), колкото на състава на гела и по-специално на високото съдържание на SiO₂ в него (вж. **Табл. 1**).

Получените от нас образци показват интересен фазов състав, който може да послужи като указание, че изследваните BG ще покажат висока *in vitro* биоактивност, поради три основни факта:

Първият, че някои от тях (BG0, BG1 и BG2) съдържат различни по строеж, но нестабилни във воден разтвор, полиморфни форми на CaCO₃. Именно те, поради нестабилността си, създават предпоставка за повишаване на биоактивността. Ето защо в нашият случай може да се говори за формирането на CaCO₃ сходен с биогения.

Вторият, че в образца със сравнително високо съдържание на Ag₂O (4 wt.%) се отчита присъствието на Wt, за който е известно, че е високо *in vitro* биоактивен. Това, като цяло, би повлияло и на *in vitro* биоактивността на изследваното от нас SGBG - BG3.

Третият, че образуваният HA е с не много висока кристалност, което би могло да означава, че процесът на кристализация тепърва е започнал при възприетата от нас температура (600 °C). Това, в нашия случай, би могло да означава, че образувания HA, с ниска степен на кристалност, би бил по-разтворим в среда на SBF, което означава, че отделените от него Ca²⁺ и PO₄³⁻ йони в разтвора на SBF допълнително

ще го обогатят, а това пряко ще доведе до повишаване на *in vitro* биоактивността на образца.

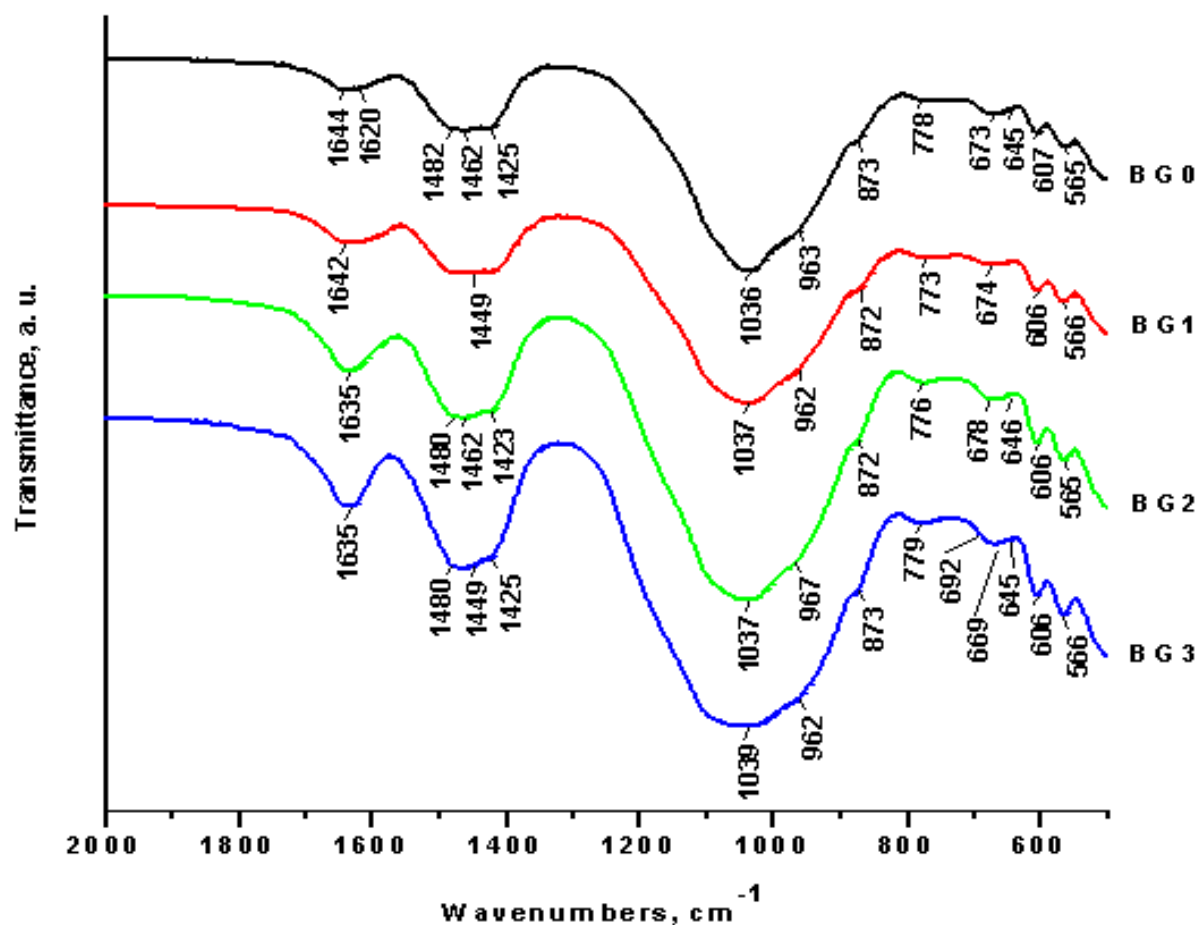
Анализ на инфрачервените спектри на BG

Инфрачервените спектри на термично третираните BG при температура 600 °C в продължение на 6 h са представени на **фиг. 2**.

В спектралната област 560 - 606 cm^{-1} могат да бъдат наблюдавани абсорбционни ивици, които се отнасят до P-O колебания. Силните абсорбционни максимуми в областта 800 - 1300 cm^{-1} доминират в спектъра и се свързват с колебания на връзките в SiO_4 и PO_4 , които са структурно-чувствителни.

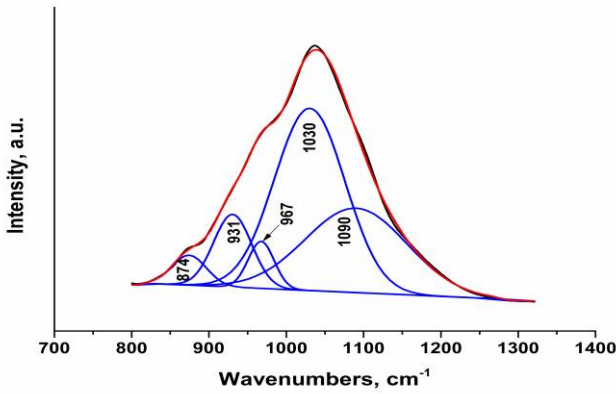
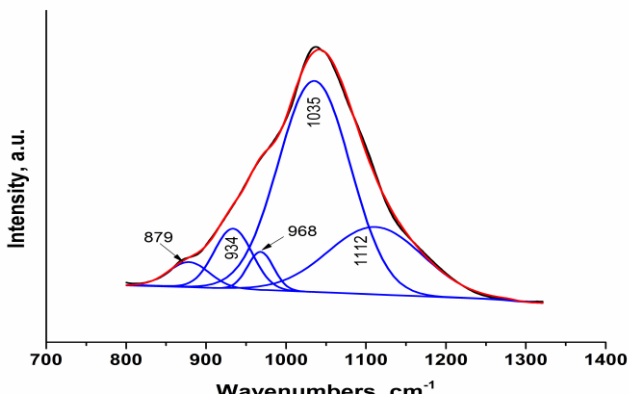
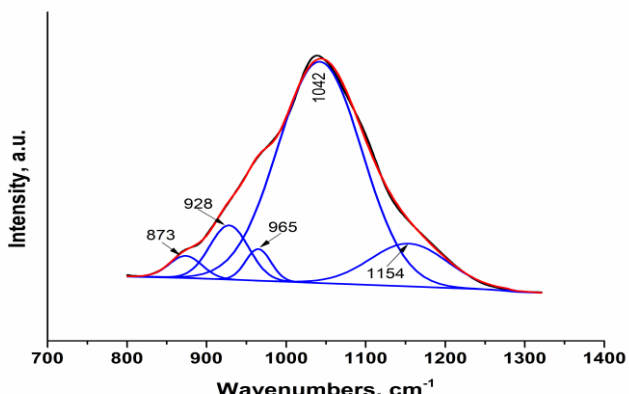
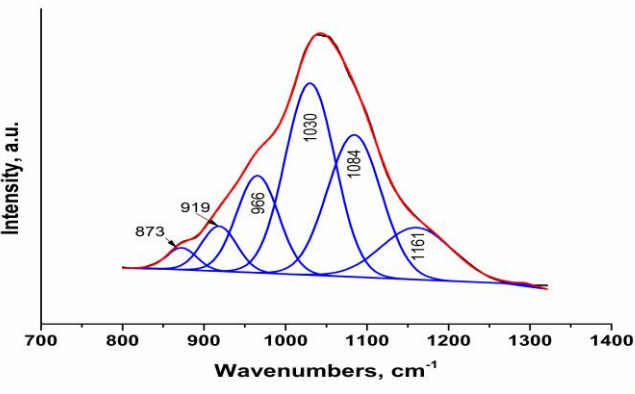
За да се оцени по-качествено характера на ивиците в посочения диапазон (800 – 1300 cm^{-1}), е приложено разлагане на спектъра. Прилагането на този метод носи допълнителна информация за структурата на изследваните от нас BG с различно съдържание на Ag_2O .

Получените резултати, след разлагане на спектъра в посочената област, са показани в **Табл. 2**.



Фигура 2. Инфрачервени спектри на BG0, BG1, BG2 и BG3 след термично третиране при 600 °C в продължение на 6 h.

Таблица 2. Инфрачервени спектри на BG термично третирани при 600°C в продължение на 6 h в областта 800-1300 cm⁻¹.

SGBG	Разлагане на ИЧ-спекър в областта 800-1300 cm ⁻¹
BG0	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm⁻¹ 874, 931, 967, 1030, 1090
BG1	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm⁻¹ 879, 934, 968, 1035, 1112
BG2	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm⁻¹ 873, 928, 965, 1042, 1154
BG3	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm⁻¹ 873, 919, 966, 1030, 1084, 1161

Абсорбционните ивици локализирани при 1090 и 1084 cm^{-1} за BG0 и BG3 се отнасят към Si-O връзките (Q^3) на тетраедричните структури. Освен това, ивиците при 1112 cm^{-1} (за BG1), 1154 cm^{-1} (за BG2) и 1161 cm^{-1} (за BG3) могат да се отнесат към асиметричните валентни Si-O-Si колебания. Ивиците при 931, 934, 928 и 919 cm^{-1} се свързват с колебания на не-свързани кислородни атоми (NBO) в Si-O-Si (Q^2), а тези при 1030, 1035, 1042 и 1030 cm^{-1} могат да бъдат отнесени към P-O колебанията на PO_4^{3-} тетраедъра. Дублетът кореспондиращ с P-O колебания в PO_4^{3-} тетраедъра се наблюдава при 565, 566 cm^{-1} и 606, 607 cm^{-1} . Ивиците 565 и 566 cm^{-1} могат да бъдат приписани на Ag-O колебания. В съответствие с получените резултати от XRD анализа (**фиг. 1**), абсорбционните ивици 566, 645, 962 и 1084 cm^{-1} могат да бъдат отнесени към фазата на Vt.

Както се вижда от данните на **фиг. 2** във FTIR спектъра на изследваните образци се забелязва и присъствието на интензивни и разляти ивици в областта 1420 – 1480 cm^{-1} . Посочената област е характеристична за CO_3^{2-} валентните колебания. Освен това, в съгласие с данните на XRD, в изследваните образци са установени и кристални фази на различни полиморфни модификации на CaCO_3 .

Ето защо отново се налага разлагане на ИЧ спектър, за да се установи с точност, дали има сходство между резултатите, получени с XRD анализа и тези, установени с помощта на FTIR метода.

Получените данни от разлагането на ИЧ спектър на изследваните образци в областта 1780 -1320 cm^{-1} са дадени в **Табл. 3**.

Абсорбционните ивици при 1415, 1438 и 1496 cm^{-1} (за BG0), 1421 cm^{-1} (за BG2), както и тези при 1415 и 1420 cm^{-1} (за BG3), могат да бъдат приписани на Vt. Абсорбционната ивица при 1412 cm^{-1} също може да се отнесе до Vt. От данните в **Табл. 2**, ивиците при 1030 cm^{-1} (за BG0), 1035 cm^{-1} (за BG1), 1042 cm^{-1} (за BG2) и 1030 cm^{-1} (за BG3) също могат да бъдат приписани на наличието на Vt в посочените образци.

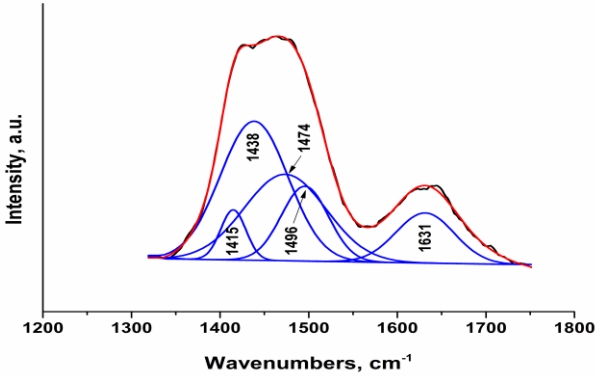
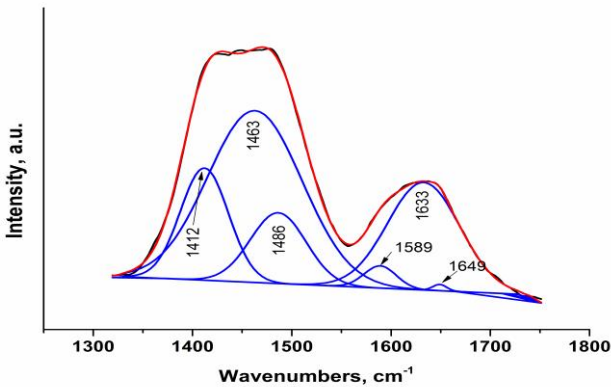
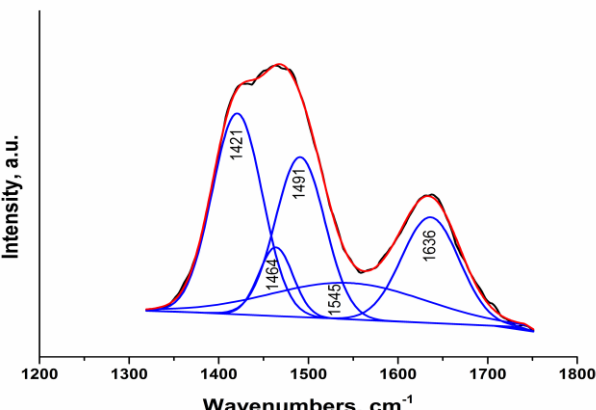
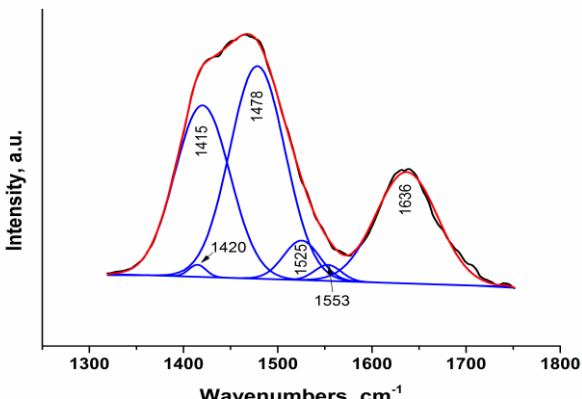
Ивиците при 1474 cm^{-1} (за BG0) и при 1486 cm^{-1} (за BG1) са показателни за наличието на At. Също така, ивиците при 1084 cm^{-1} за образец BG3 и при 1090 cm^{-1} за - BG0, говорят за наличие на At. В XRD анализа обаче за BG3 не се установява присъствие на At. Най-вероятно това е така, поради наличието му в образца в малки количества. Освен това, двете ивици при 1463 cm^{-1} (за BG1) и 1464 cm^{-1} (за BG2) също биха могли да бъдат приписани на At.

Ивиците 873, 1415, 1420, 1478, 1525 и 1553 cm^{-1} , наблюдавани при BG3, ясно говорят за включването на CO_3^{2-} в решетката на HA т.е. получените продукти са карбонатапатити (CO_3HA).

При сравнение на резултатите получени от FTIR анализа (**фиг. 2, табл. 2 и 3**) с тези от XRD анализа (**фиг. 1**) се вижда, че синтезираните BG с различни количества Ag_2O в състава си, могат да образуват *in situ* различни полиморфни форми на CaCO_3 по повърхността си - Vt, At и St.

Основният **извод**, който може да бъде направен е, че на основа получените резултати от XRD и FTIR анализа на изследваните от нас образци, се установява пълна сходимост.

Таблица 3. Инфрачервени спектри на стъклата след термично третиране при 600°C за 6 h в областта 1780-1320 cm⁻¹.

SGBG	Разлагане на ИЧ-спекър в областта 1780-1320 cm ⁻¹
BG0	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm⁻¹ 1415, 1438, 1474, 1496, 1631
BG1	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm⁻¹ 1412, 1463, 1486, 1589, 1633, 1649
BG2	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm⁻¹ 1421, 1464, 1491, 1545, 1636
BG3	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm⁻¹ 1415, 1420, 1478, 1525, 1553, 1636

Сканираща електронна микроскопия на BG

Сканираща електронна микроскопия (SEM) се използва за установяване повърхностната морфология на BG и 80BG/20G. SEM-EDX анализ е приложен за качествено и количествено определяне на области от изследваните материали, както и на отделни точки в тях.

Настоящите изследвания са извършени при ускоряващо напрежение 20 kV. Агломератите от частици се наблюдават при увеличения - 500x (50µm) и 200x (100µm). Електронномикроскопските изображения на BG, преди теста за биоактивност в разтвор на 1,5 SBF са показани в **Табл. 4**. (със стрелки са показани някои по-големи по размер твърдофазни образувания, които се наблюдават сред структурата на SGBG).

SEM изображенията на изследваните образци показват, че след термичното им третиране при 600 °C в продължение на 6 h, по повърхността се наблюдават макроагломерати от сфероидални частици. Наблюдаваната морфология на получените BG, не се различава съществено при отделните образци, с тази разлика, че при BG0 и BG1 сферичните твърдофазни образувания са по-добре изразени, по-малки и по-отчетливи, от тези при образци BG2 и BG3.

При образците BG2 и BG3 агломератите нямат определена форма. Струпванията на кристали при тях са видимо повече и заемат почти цялата повърхност на стъклата.

Във връзка със SEM изображенията, представени в **Табл. 2**, би могло да се предположи, че наблюдаваната неравна повърхност на стъклата, се дължи на установените при XRD анализа кристални фази – HA, Vt, At, Ct при всички образци и при BG3 – HA, Wt и Ag⁰.

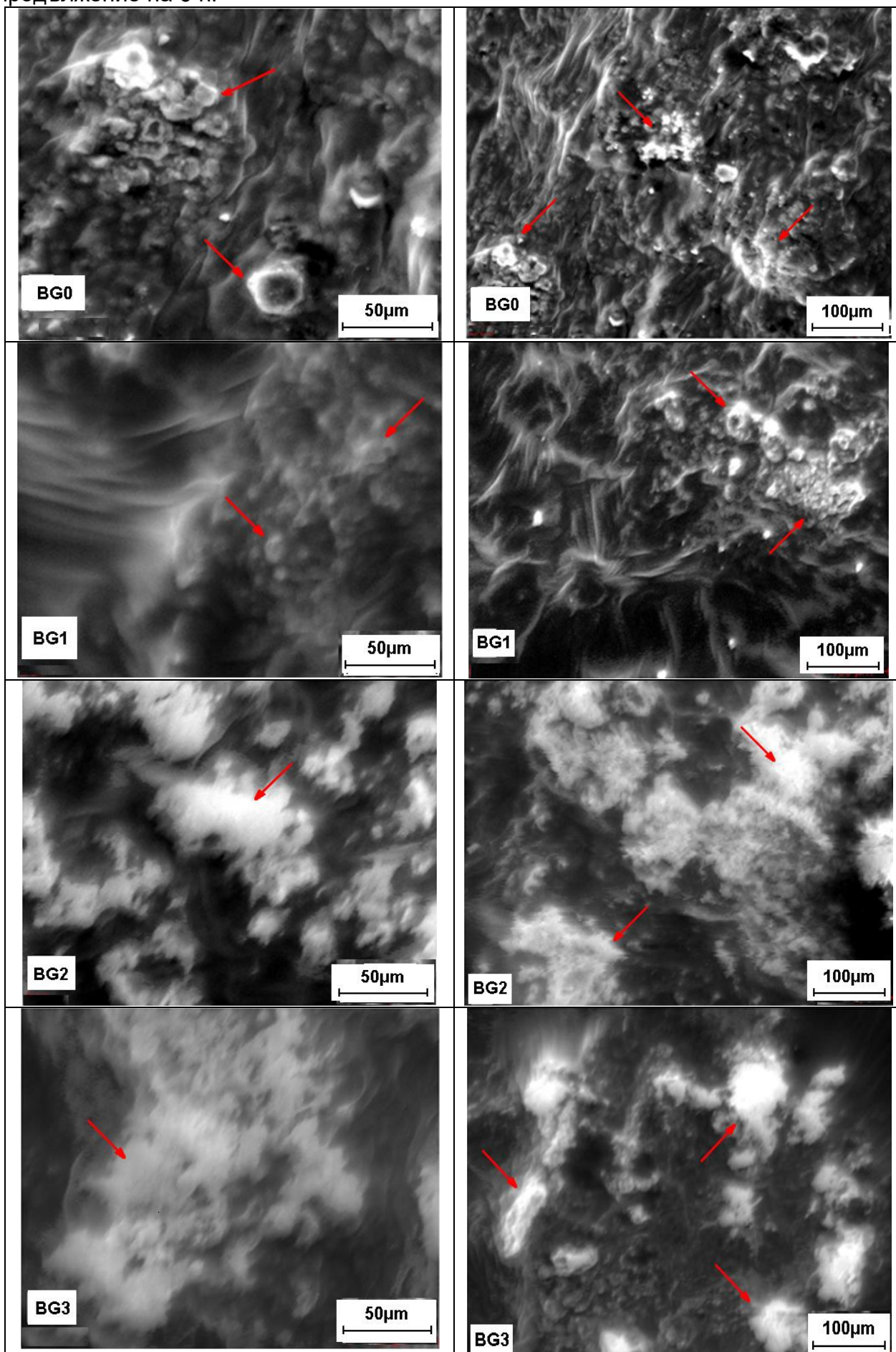
Предвид резултати получени от различни автори, може да се обобщи, че наблюдаваните твърдофазни образувания се дължат на специфични процеси на кристализация. Но, освен това, в съгласие с данните на XRD (**фиг. 1**), наситената с кристални частици повърхност, би могла да се отнесе и към самия фазов състав на изследваните образци. С най-голям относителен процент на кристализация е фазата Ct 48% при BG0, следван от Vt с 31% и от At с 21%. При BG1 са установени кристалите At, Vt и Ct в съотношение съответно 62:29:9. Относителният процентен състав на фазите на CaCO₃ за образца BG1 е по-голям отколкото този на BG0. За BG2 кристалните фази са At 37%, Vt 46% и Ct 16%.

Погледнати от тази гледна точка, резултатите от SEM анализа са допустими и резонни. Повърхностната морфология за BG2 и BG3 е сравнима, макар че фазите в образец BG3 са коренно различни, а именно – HA, Wt и Ag⁰.

На основата на получените резултати от SEM анализа би могло да се направи **извода**, че те напълно съвпадат с данните на XRD и FTIR. Заедно с това резултатите показват твърде висока степен на сходимост с данните установени от други автори.

Обобщено казано, в резултат на проведените до момента изследвания би могло да се заключи, че са получени SGBG с различен фазов състав в зависимост от съдържанието на Ag₂O в тях като методите за физикохимично характеризиране на стъклата показват сходни резултати.

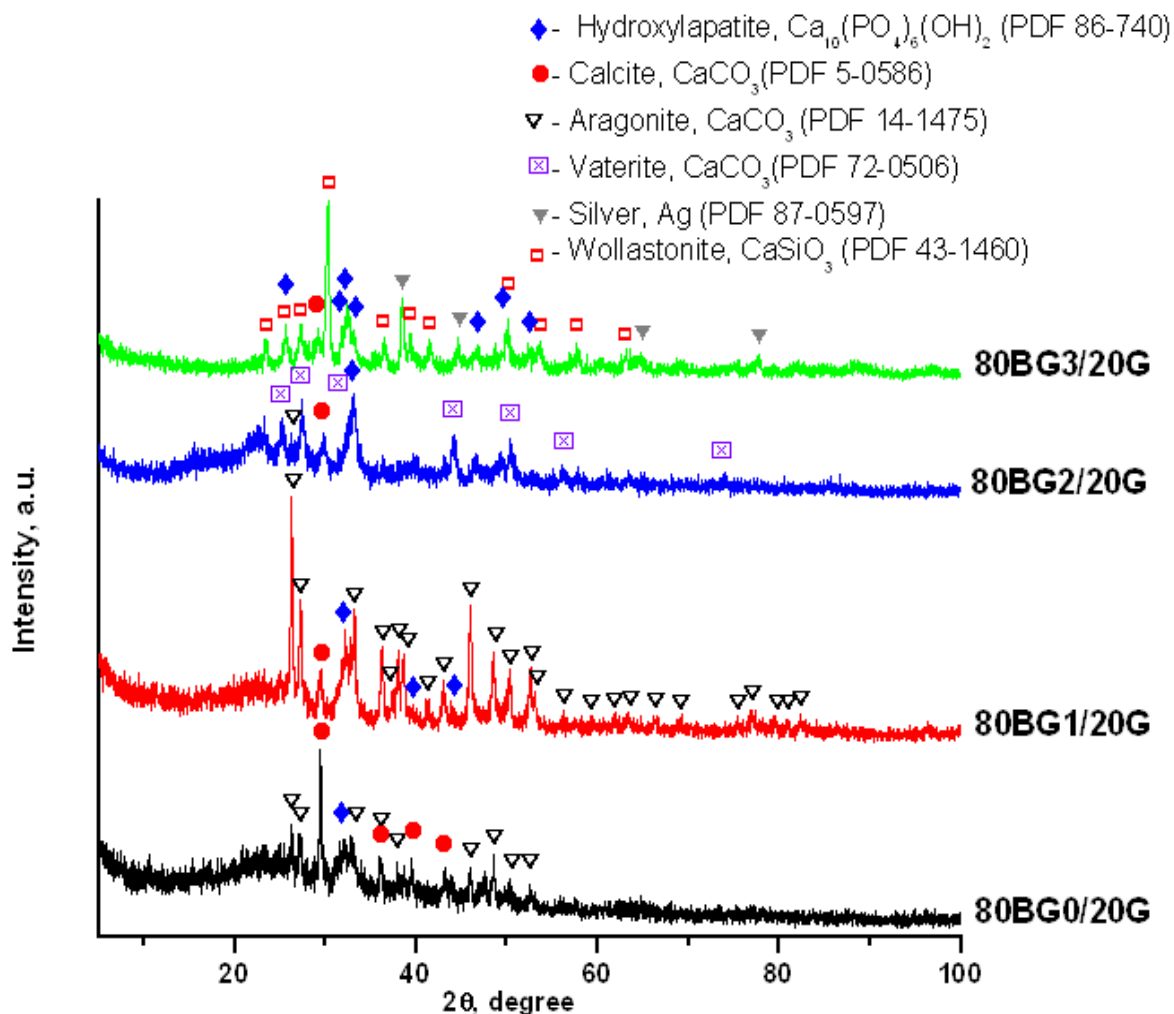
Таблица 4. SEM изображения на стъклата BG0, BG1, BG2 и BG3 при увеличение 500x (50 μ m) и 200x (100 μ m), след термичното им третиране при 600 °C в продължение на 6 h.



2. Физикохимично характеризиране на желатин съдържащи композитни материали с участието на BG.

Рентгенофазов анализ на композити

На **Фиг. 3** са представени XRD дифрактограмите на получените композитни материали в съотношение BG : Gel = 80 : 20, означени като 80BG0/20G, 80BG1/20G, 80BG2/20G и 80BG3/20G, в зависимост от вида на включеното SGBG.



Фигура 3. Рентгенодифракционни данни на композити 80BG0/20G, 80BG1/20G, 80BG2/20G и 80BG3/20G, преди *in vitro* тест за биоактивност в SBF.

От рентгенограмите се вижда, че композитните материали притежават приблизително еднакъв фазов състав с тези на SGBG (виж фиг. 1 и фиг. 3).

В състава на всички композитни материали се отчита присъствието на HA фаза (PDF 86-740), която най-вероятно се формира още при синтеза на SGBG. Тя се наблюдава в рентгенограмите на SGBG и присъствието ѝ в композитните състави се запазва.

Полиморфните форми At (PDF 14-1475) и Ct (PDF 5-0586) се наблюдават, както при BG0, BG1 и BG2, така и при композитите, получени с тяхно участие. Относно присъствието на Ct-на фаза може да се твърди, че в състава на разглежданите композитни материали 80BG0/20G и 80BG2/20G, нейното наличие е в следи, докато в образците BG0 и BG2 тя е в значително по-голям процент.

При композит 80BG3/20G се забелязва присъствие на фазите установени при BG3 – HA, Wt, Ag⁰ (фиг. 3), но се отчита и нова фаза – тази на Ct, макар и в малко

количество. Причината за този резултат, вероятно са множеството дифракционни пикове на Wt кристали, които при BG3 съвпадат с ивиците на Ct-та и ги прикриват.

В образец 80BG3/20G също се наблюдава намаляване интензитета на Wt-та фаза, което вероятно се дължи на частичното ѝ разтваряне в процеса на получаване на композита.

Това, което прави впечатление, е отсъствието на термодинамично най-нестабилната полиморфна форма на CaCO_3 – тази на Vt (PDF 72-0506), при образците 80BG0/20G и 80BG1/20G, но тя присъства в стъклата BG0 (31%) и BG1 (29 %), което може да се види от данните на фиг. 3. Причина за това може да се търси в разтворимостта на Vt.

Известно е, че разтворимостта на полиморфните форми на CaCO_3 намалява в реда $Vt > At > Ct$. Вероятно това, че Vt е най-нестабилната полиморфна форма, води до нейното разтваряне в желатина при синтеза на композитите 80BG0/20G и 80BG1/20G.

Интересен е фактът, че в композита 80BG2/20G, се наблюдава предимно Vt и е по-добре представен от другите две термодинамично по-стабилни полиморфни форми - At и Ct. От тези резултати, може да се заключи, че Vt се стабилизира в рамките на синтезирания композит.

По литературни данни, Vt при взаимодействие с вода се трансформира до At и в последствие до Ct, тъй като те имат по-ниска разтворимост и са по-стабилни. Това обяснява присъствието им в композитите 80BG0/20G и 80BG1/20G, както и отсъствието на Vt в същите композити, но не обяснява присъствието на Vt в композита 80BG2/20G. Факт е, че всички композити са получени след взаимодействието на съответното SGBG с воден разтвор на Gel и би следвало Vt изобщо да не се открива в композитите.

Аминокиселините Gly и Glu влизащи в състава на Gel оказват съществено влияние върху минерализацията на различни полиморфни модификации на CaCO_3 и са „отговорни“ за формирането на At и Ct. Последният би могъл да кристализира в присъствие на споменатите аминокиселини при температура 24°C. Активно влияние върху формирането на CaCO_3 фази, оказват още pH на средата, концентрацията на йоните в разтвора, йонната сила и др.

Изводите, които могат да се направят на основа на получените данни от XRD анализа на изследваните от нас композити са:

1) във всички композити се образува НА, по всяка вероятност, карбонат субституиран;

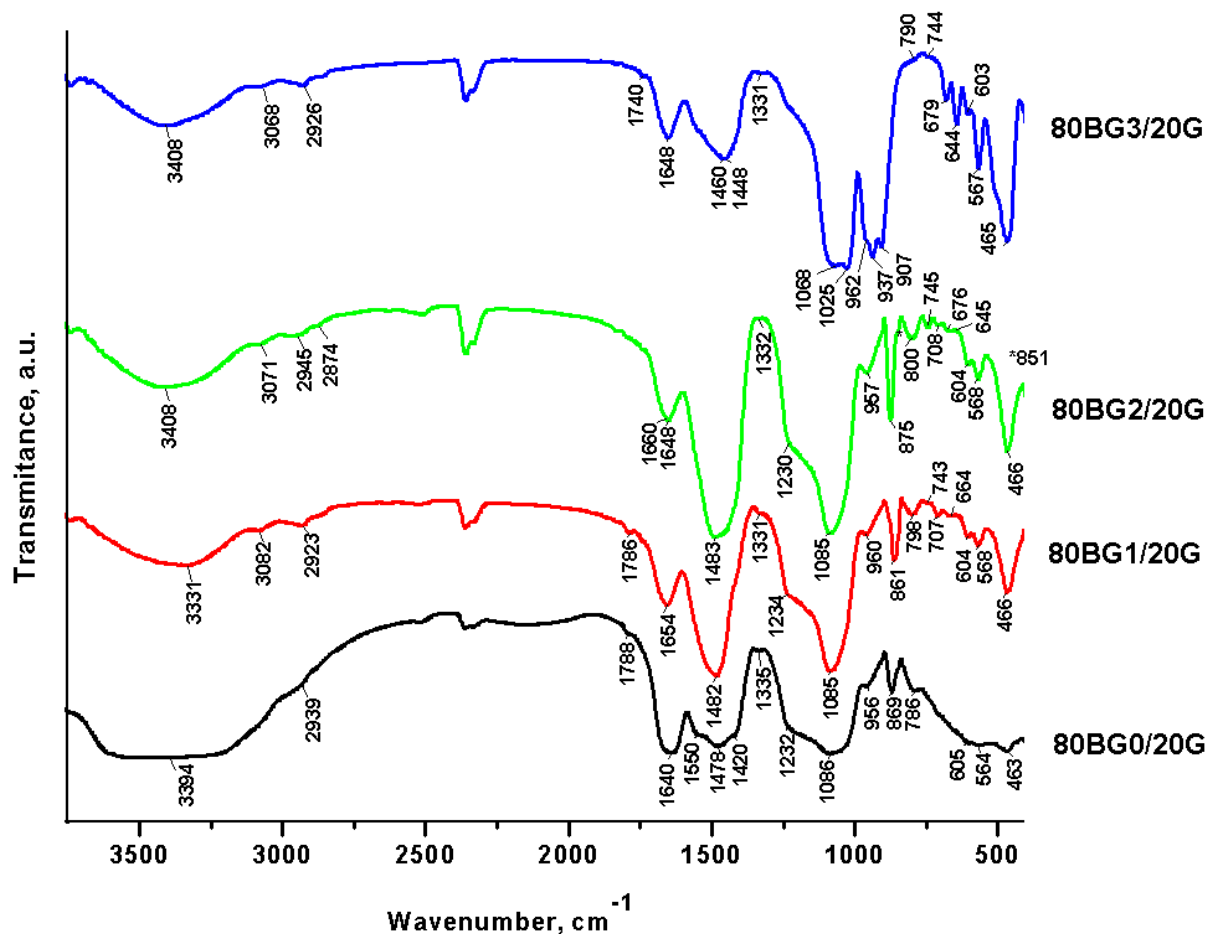
2) в композитите 80BG0/20G и 80BG1/20G преобладават полиморфните форми на CaCO_3 – At и Ct, докато в композита 80BG2/20G преобладава полиморфната форма – Vt. Тези кристални фази вероятно са стабилизирани от Gel-те молекули.

3) наблюдава се частично разтваряне на Wt-та фаза в композита 80BG3/20G;

4) за композита 80BG2/20G може да се очаква повишена *in vitro* биоактивност, тъй като е възможно обогатяване на разтвора на SBF с Ca^{2+} и CO_3^{2-} йони, вследствие разтваряне на нестабилната Vt фаза.

Инфрачервени спектри на композитните материали

Инфрочервените спектри на композитни материали със състав 80BG/20G са показани на фиг. 4.



Фигура 4. ИЧ-спектри на композити 80BG/20G преди *in vitro* тест за биоактивност в разтвор на SBF.

От ИЧ спектри на **фиг. 4** се вижда, че те са сложни по своя характер, което, по принцип е характерно за органично-неорганичните композитни материали.

В представените спектри ясно се очертават две области. Едната – на неорганичната компонента на композитите, която е в областта $1088 - 468 \text{ cm}^{-1}$ и другата – на органичната компонента на композита в областта $1786 - 1085 \text{ cm}^{-1}$.

Разгледани по този начин, в ИЧ-спектри се откроява ивица при 869 cm^{-1} (80BG0/20G), 861 cm^{-1} (80BG1/20G) и 875 cm^{-1} (80BG2/20G), чието присъствие може да се отдаде на формираните CaCO_3 фази в процеса на получаване на посочените композити. Прави впечатление, че в образец 80BG3/20G ивицата при $\sim 875\text{ cm}^{-1}$ не се открива, но това не е така. Силно интензивната и широка ивица с максимуми при 962 , 937 и 907 cm^{-1} би могла да „маскира“ появата на споменатата ивица.

Ето защо, за да се отстранят от анализа подобни допускания, се налага разлагане на ИЧ спектри на изследваните композитни материали.

Основният въпрос, след разлагането на спектрите, е: образува ли се (или не) химична връзка в изследваните композити?

От отговора на този въпрос ще стане ясно, дали синтезираните и изследвани образци са композити, или хибриди.

Данните от разлагането на ИЧ спектри на изследваните материали са показани в **Табл. 5**.

Интересен и важен момент в ИЧ-спектри на изследваните от нас композити е положението на ивицата при 1335 cm^{-1} , която се дефинира като характеристична за депротонирани карбоксилни групи (COO^-). Но, както може да се види от ИЧ-спектри на **фиг. 4**, положението на ивицата в композита е „изместено“ към по-късовълновата част на спектъра, а именно: 1331 cm^{-1} (за 80BG1/20G), 1332 cm^{-1} (за 80BG2/20G) и 1331 cm^{-1} (за 80BG3/20G). Според някои автори, изместването интензитета на ивицата към по-късовълновата област на спектъра е пряко доказателство за формирането на връзка между отделените от SGBG Ca^{2+} в разтвора на желатина и образуването на връзки от вида $(\text{COO}^-)_2\text{Ca}$ в получените композитни материали. В нашия случай обаче, наблюдаваното изместване е в границите на грешката на метода (3 cm^{-1}). Въз основа на това е твърде рисковано да се твърди, че има забележимо отместване към по-късовълновата част на спектъра. Според нас, отместване над 5 cm^{-1} би могло да се приеме за валиден резултат и доказателство за образуване на химична връзка от вида $(\text{COO})_2^- \text{Ca}^{2+}$, за която споменават ред други автори.

Абсорбционните ивици в спектъра за C=O амид I са при 1660 cm^{-1} , а за амид II - около 1590 cm^{-1} . При повишаване съдържанието на Gel в композити, позицията на посочените ивици се отмества към по-късовълновата част на спектъра.

Ивиците, характеристични за амид II в настоящите изследвания, са „маскирани“ в широкия абсорбционен максимум при $\sim 1480\text{ cm}^{-1}$ (за всички композити). При това обстоятелство може да се предположи, че след разлагане на спектъра (**табл. 6**), ще се очертае възможността за конформационни изменения в молекулата на желатина при формирането на композита.

Въз основа на данните от **фиг. 4**, може да се твърди само това, че в изследваните композитни материали не се установява образуването на химична връзка от вида $(\text{COO}^-)_2\text{Ca}$, за която се съди по отместването на характеристичната ивица при 1335 cm^{-1} за COO^- в по-късовълновата част на спектъра. Такова изместване е установено от нас за някои композити със състав колаген/стъклокерамика.

В спектралния регион $564\text{--}603\text{ cm}^{-1}$ могат да бъдат наблюдавани абсорбционните сигнали, свързани с P-O трептения.

Инфрачервените спектри на композитите в областта $1320\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ са дадени в **Табл. 5**, а спектрите в областта $1320\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ – в **Табл. 6**.

От данните на **Табл. 5** може да се види, че абсорбционните ивици при 1031 и 1079 cm^{-1} за 80BG0/20G, 1076 cm^{-1} за 80BG1/20G, 1077 cm^{-1} за 80BG2/20G, и тези при 1024 , 1074 и 1085 cm^{-1} за 80BG3/20G могат да се припишат на $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$.

Ивицата при 961 cm^{-1} за образеца 80BG3/20G би могла да се отнесе към $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, а тази при 1007 cm^{-1} за образеца 80BG1/20G може да се отнесе към Si-O-Si връзките.

Двете ивици при 938 и 945 cm^{-1} за композитите 80BG3/20G и 80BG2/20G могат да се отнесат към Si-O-Si симетричните колебания на силикатната мрежа.

Ивиците при 1206 , 1203 и 1201 cm^{-1} за 80BG0/20G, 80BG1/20G и 80BG2/20G също могат да бъдат отнесени към Si-O-Si симетрични колебания.

От друга страна, ивиците при 910 , 961 и 1085 cm^{-1} за образеца 80BG3/20G са показателни за наличието на Wt фаза.

ИЧ-спектрите на композитите (80 : 20 wt %) с различно съдържание на Ag_2O в SGBG, са разгледани в областта $1750\text{--}1320\text{ cm}^{-1}$, където се наблюдават абсорбционните ивици, характерни за CO_3^{2-} (**Табл. 6**). Разлагането на спектрите се прави, за да се установи вида на CaCO_3 , които са установени с помощта на XRD анализа (**фиг. 3**).

Таблица 5. Разлагане на инфрачервените спектри на композитите в областта 1320 – 800 cm^{-1} .

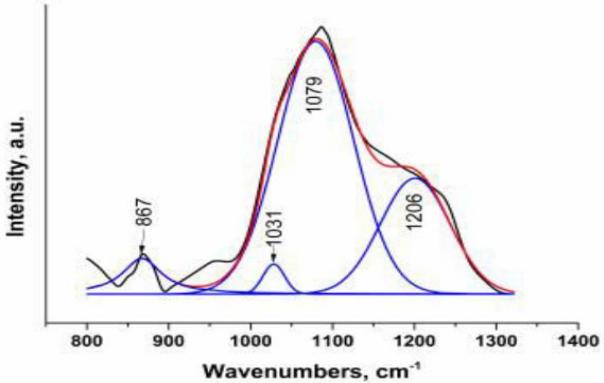
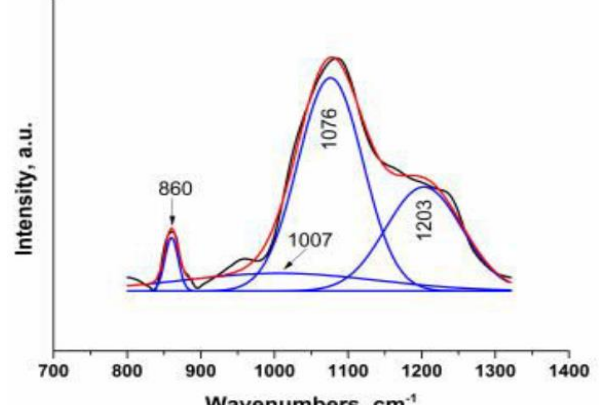
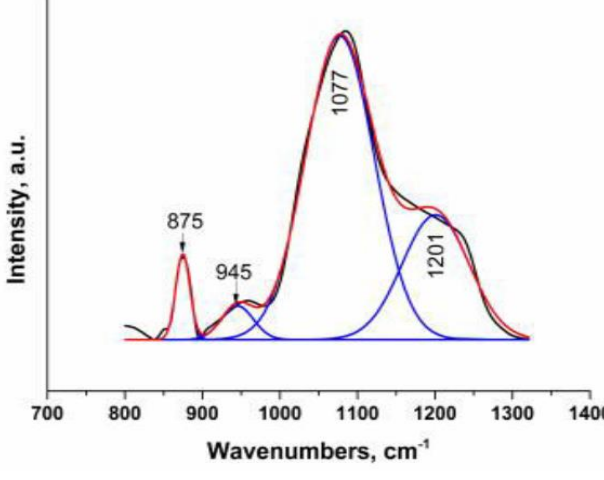
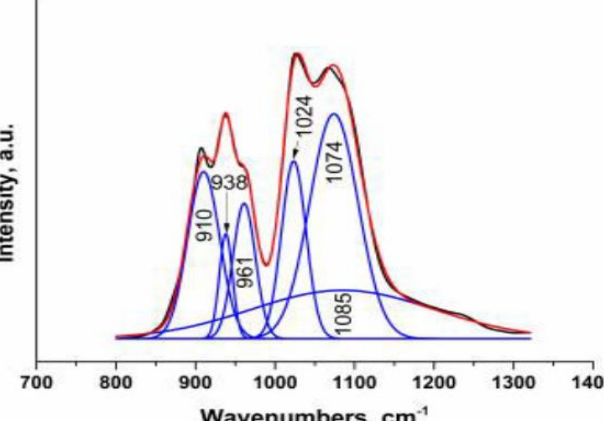
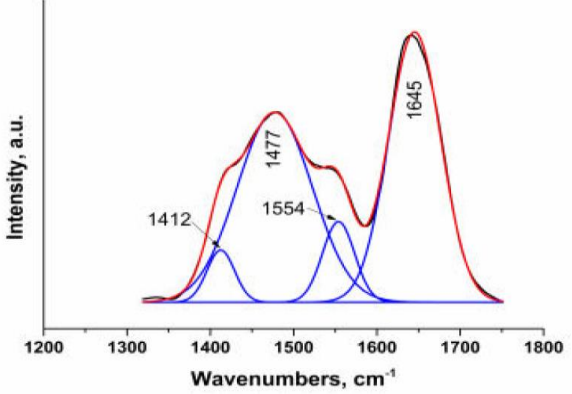
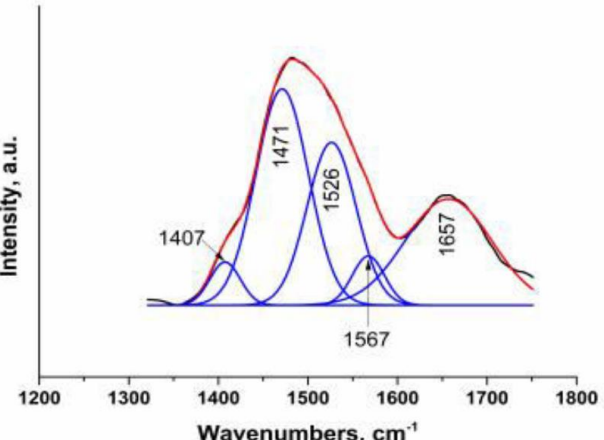
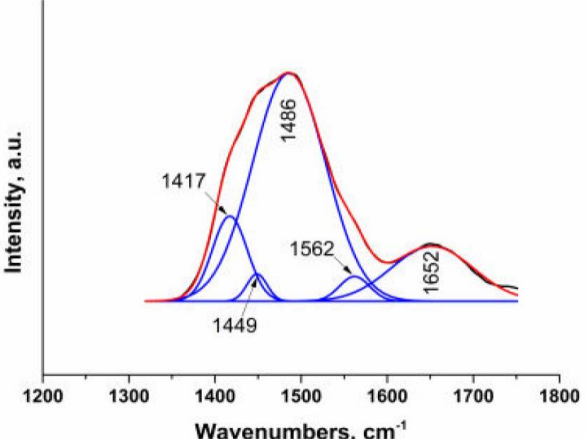
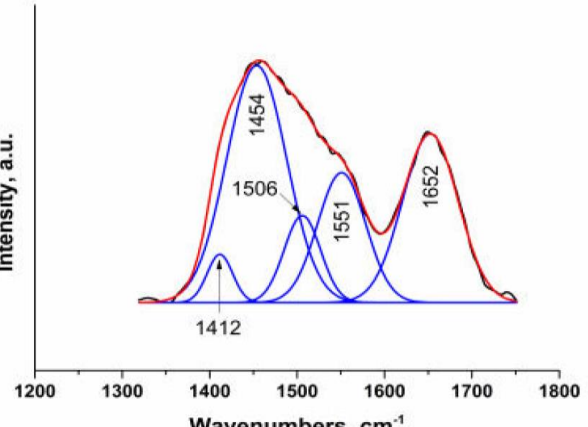
Композити	Разлагане на ИЧ-спектр в областта 1320 – 800 cm^{-1}
80BG0/20G	 The IR spectrum of the 80BG0/20G composite shows four deconvolution peaks. The x-axis represents Wavenumbers in cm^{-1} from 800 to 1400, and the y-axis represents Intensity in arbitrary units (a.u.). The peaks are labeled with their respective wavenumbers: 867, 1031, 1079, and 1206.
80BG1/20G	 The IR spectrum of the 80BG1/20G composite shows four deconvolution peaks. The x-axis represents Wavenumbers in cm^{-1} from 700 to 1400, and the y-axis represents Intensity in arbitrary units (a.u.). The peaks are labeled with their respective wavenumbers: 860, 1007, 1076, and 1203.
80BG2/20G	 The IR spectrum of the 80BG2/20G composite shows four deconvolution peaks. The x-axis represents Wavenumbers in cm^{-1} from 700 to 1400, and the y-axis represents Intensity in arbitrary units (a.u.). The peaks are labeled with their respective wavenumbers: 875, 945, 1077, and 1201.
80BG3/20G	 The IR spectrum of the 80BG3/20G composite shows six deconvolution peaks. The x-axis represents Wavenumbers in cm^{-1} from 700 to 1400, and the y-axis represents Intensity in arbitrary units (a.u.). The peaks are labeled with their respective wavenumbers: 910, 938, 961, 1024, 1074, and 1085.

Таблица 6. Инфрачервени спектри на композитите 80BG/20G в областта 1320 – 1750 cm^{-1} .

Композити	Разлагане на ИЧ-спекър в областта 1320 – 1750 cm^{-1}
80BG0/20G	 The IR spectrum for 80BG0/20G shows a broad peak around 1450 cm^{-1} and a sharp peak at 1645 cm^{-1}. The deconvolution peaks are labeled at 1412, 1477, 1554, and 1645 cm^{-1}.
80BG1/20G	 The IR spectrum for 80BG1/20G shows a broad peak around 1450 cm^{-1} and a sharp peak at 1657 cm^{-1}. The deconvolution peaks are labeled at 1407, 1471, 1526, 1567, and 1657 cm^{-1}.
80BG2/20G	 The IR spectrum for 80BG2/20G shows a broad peak around 1450 cm^{-1} and a sharp peak at 1652 cm^{-1}. The deconvolution peaks are labeled at 1417, 1449, 1486, 1562, and 1652 cm^{-1}.
80BG3/20G	 The IR spectrum for 80BG3/20G shows a broad peak around 1450 cm^{-1} and a sharp peak at 1652 cm^{-1}. The deconvolution peaks are labeled at 1412, 1454, 1506, 1551, and 1652 cm^{-1}.

В съгласие с резултатите от разлагането на ИЧС (**Табл. 6**), абсорбционните максимуми при 1471, 1477 и 1486 cm^{-1} , биха могли да се отнесат към присъстващ в образците At, а ивиците при 1407 и 1496 cm^{-1} могат да бъдат приписани на Vt. В контекста на данните от **Табл. 6**, ивиците при 1412, 1417, 1477 и 1486 cm^{-1} могат да бъдат отдадени на присъствието на St. Освен това, максимумите при 1412, 1417, 1449, 1454, 1471, 1477, 1526, 1551 и 1554 cm^{-1} биха могли да се свържат с CO_3^{2-} в хидроксиапатитната решетка.

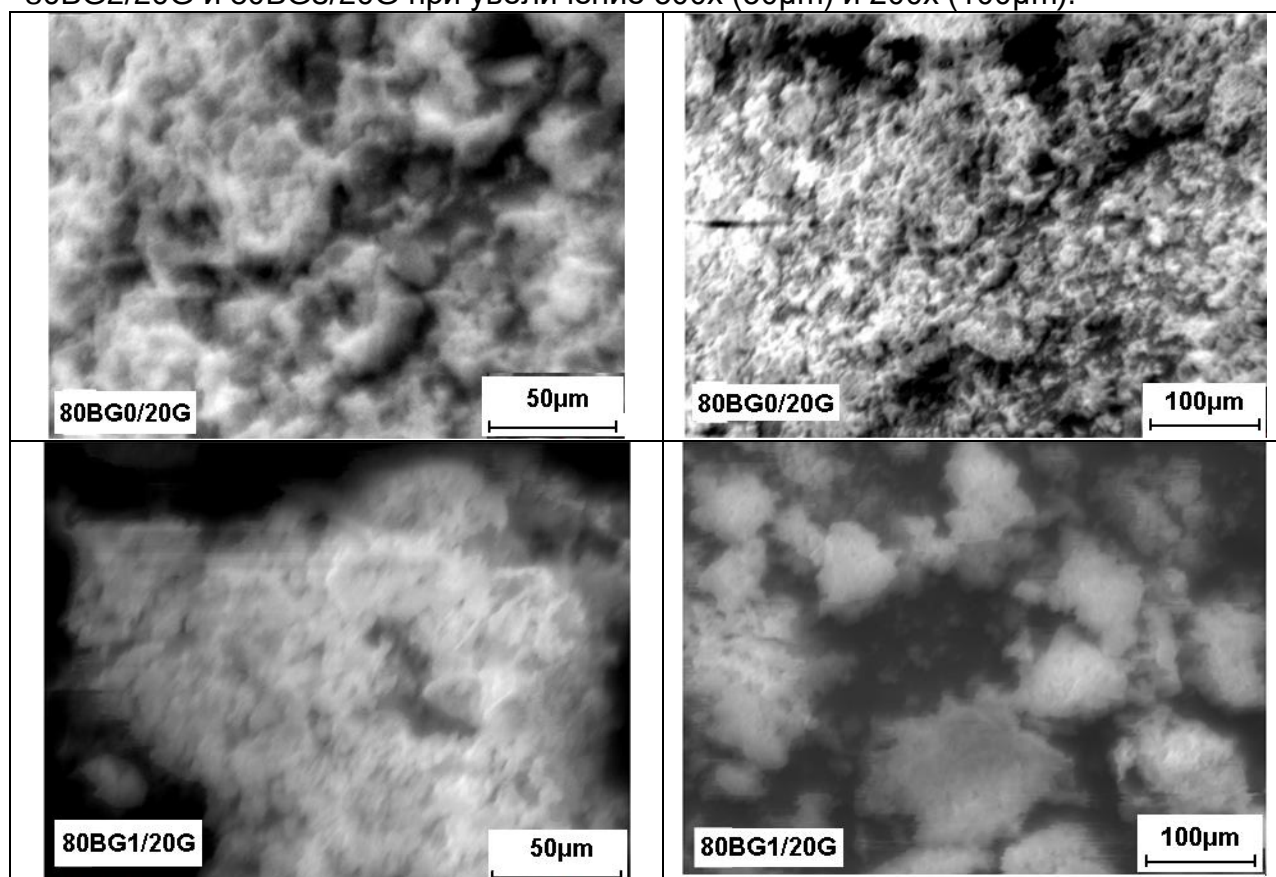
В резултат на данните от ИЧС и тяхното последващо разлагане може да се заключи, че са получени органично-неорганични композитни материали BG/Gel и по-специално това, че данните от XRD и FTIR анализа на изследваните композити са в пълна корелация.

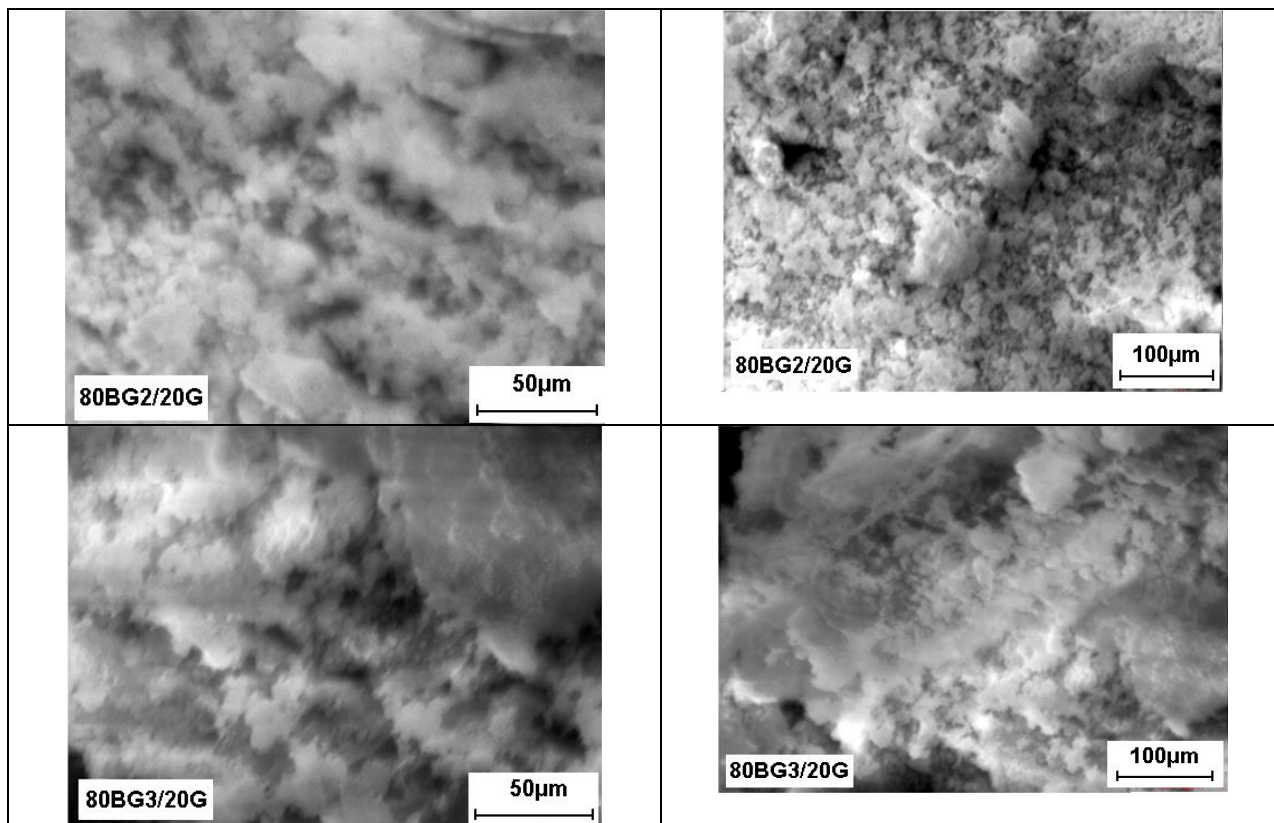
Изводът, който би могъл да бъде направен е, че изследваните от нас композити не се отличават съществено по фазов състав от SGBG, участващи в тях. От друга страна обаче Wt претърпява частично разтваряне в разтвора на Gel, което още веднъж потвърждава очакването за по-добра *in vitro* биоактивност на изследваните образци.

SEM анализ на композити

SEM микрографии на композитите 80BG/20G са представени в **Табл. 7**.

Таблица 7. SEM изображения на композити 80BG0/20G, 80BG1/20G, 80BG2/20G и 80BG3/20G при увеличение 500x (50 μm) и 200x (100 μm).





SEM изображенията на изследваните композити, показани в **Табл. 7** се характеризират с неравна повърхност, върху която са разположени различни по големина агрегати от частици. Тъй като процентният състав на SGBG в композитите преобладава (80 wt%), може да се предположи, че установените при рентгеноструктурния анализ кристални фази на SGBG (HA, Vt, At, Ct, Wt), се наблюдават и по повърхността на композитите.

От получените SEM изображения става ясно, че в условията на синтез на композитите, фибриларната структура на Gel отчасти се запазва. Това е от особена важност при оценката на *in vitro* свойствата на изследваните композити, защото е известно, че именно върху фибрилите се натрупва апатит след приключване на *in vitro* теста за биоактивност. Gel притежава специфични места по повърхността си, такива като amino групи, които взаимодействат със SGBG и се създават ядра за нарастване на HA кристали. Според някои автори HA кристали се разпределят равномерно в Gel матрица с нанофиброзна морфология. Това се дължи на ролята на аминокиселините в молекулата на Gel, които улесняват утаяването на HA кристали. Тези сведения до голяма степен изясняват наблюдаваните в **Табл. 7** SEM микрографии и може да се твърди, че цялата повърхност на композитите е покрита с наслоени HA кристали, които показват типичната за тях морфология.

Изводът, който би могъл да се направи от SEM изследването морфологията на композитите е, че са получени структури, даващи възможност, от една страна, за нарастване на HA кристали, а от друга страна, за прикрепване на остеобластни клетки. Наблюдаваните агрегати от частици, най-вероятно, са *in situ* получени HA кристали и други кристални фази (HA, Vt, At, Ct, Wt), установени при рентгеноструктурния анализ и ИЧ-спектроскопия.

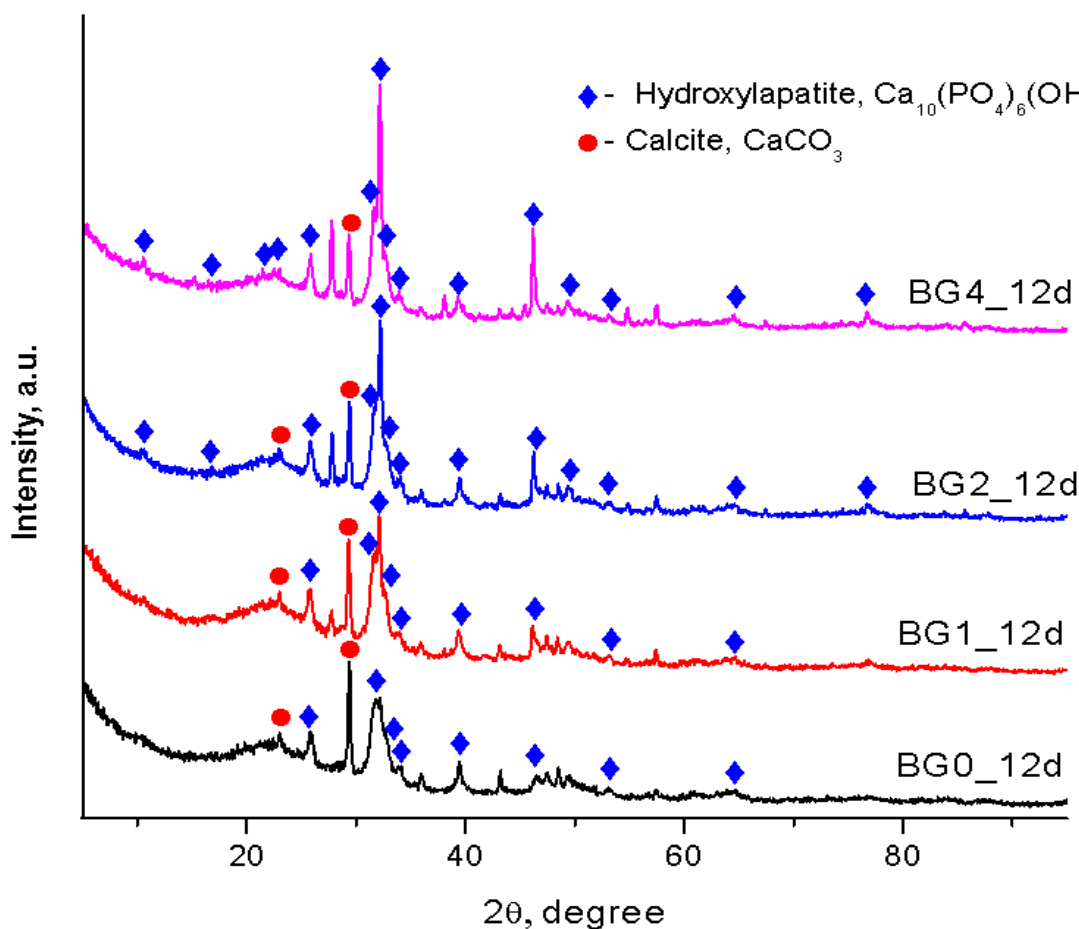
2. Тестове за *in vitro* биоактивност на BG

От всяко SGBG се вземат по 0,0667g и се поставят в полиетиленови контейнери. Към всяка проба се добавят по 20 ml разтвор на 1,5 SBF. SGBG престояват в разтвора в продължение на 12 дни при температура 37°C. След изтичане на определеното време, образците се промиват многократно с дестилирана вода и се сушат. Така получените образци се характеризират с помощта на XRD, FTIR и SEM.

Тестът за композитите се извършва по процедурата описана за SGBG.

XRD анализ на BG след теста за *in vitro* биоактивност

На **фиг. 5.** са представени рентгенодифракционните данни на серията SGBG (BG1, BG2, BG3 и BG4) след тест за *in vitro* биоактивност в разтвор на 1,5 SBF в продължение на 12 дни при статични условия.



Фигура 5. Рентгенодифракционни данни на стъкла BG0, BG1, BG2 и BG3 след *in vitro* тест в разтвор на 1,5 SBF за период от 12 дни в статични условия.

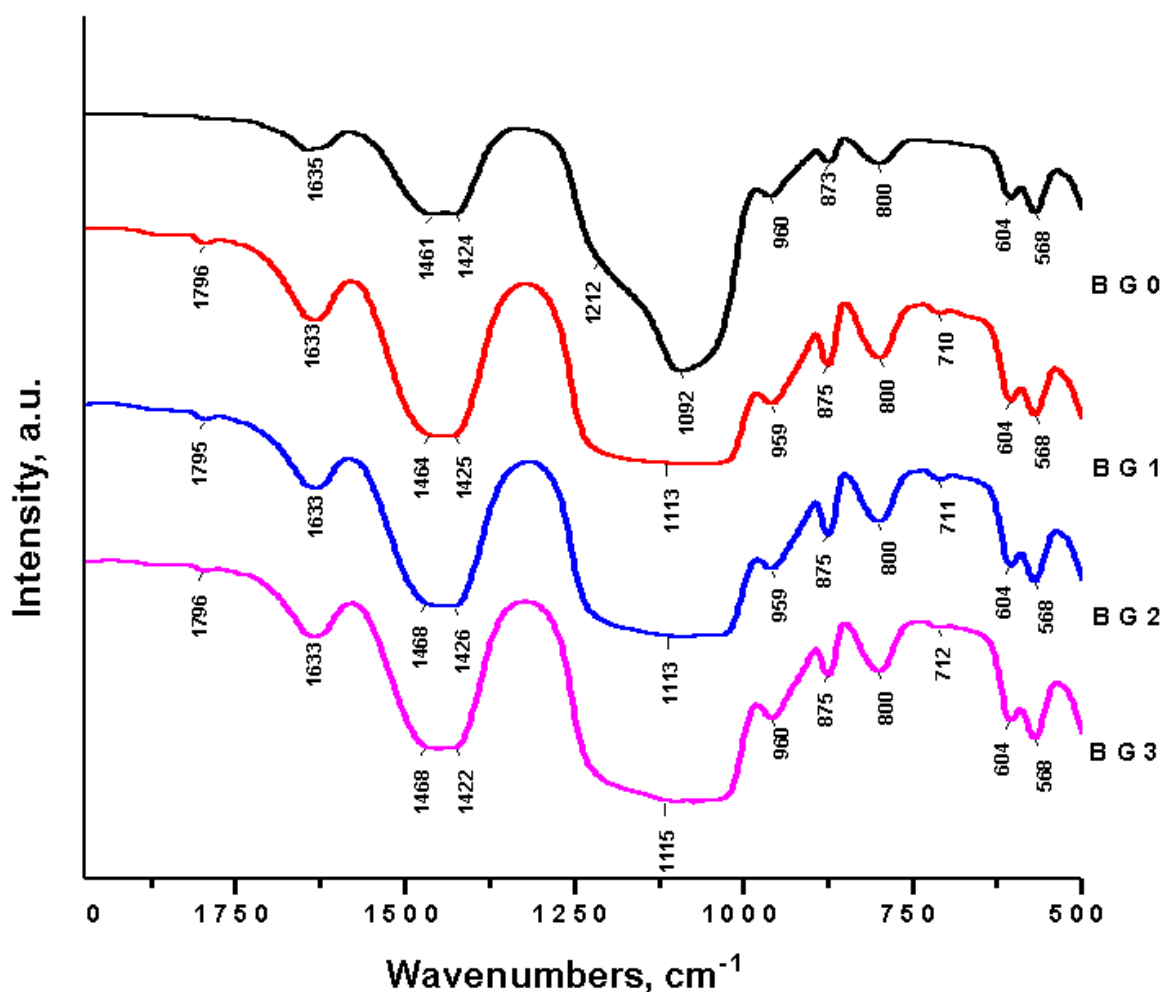
При сравнение на рентгенограмите преди (и след) *in vitro* теста, се установява тенденция за увеличаване количеството на HA в образците, в резултат на взаимодействието с разтвора на 1,5 SBF.

Образуването на кристален HA се отдава на пренасищане разтвора на 1,5 SBF с Ca^{2+} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} йони от SGBG и последващото им утаяване върху повърхността на композита. И още нещо. Както може да се види от предходните изследвания, в синтезираните SGBG има различни по тип CaCO_3 , които се характеризират с различна разтворимост. Така, от данните на **фиг. 5**, ясно се вижда, че At и Vt са напълно разтворени в SBF. Очевидно, отделените при това разтваряне CO_3^{2-} са включени в новообразувания HA. Естествено при това е, че образуваният върху изследваните композити HA е карбонат съдържащ (CO_3HA).

Инфрачервени спектри на BG след теста за *in vitro* биоактивност

In vitro биоактивността на SGBG с различно теглово съдържание на Ag_2O е изследвана при статични условия след 12 дневно престояване в разтвор на 1,5 SBF.

Данните от снетите ИЧ-спектри на изследваните от нас SGBG са представени на фиг. 6.



Фигура 6. Инфрачервени спектри на BG0, BG1, BG2 и BG3, с различно теглово съдържание на Ag_2O (съответно 0, 1, 2 и 4 wt.%), след 12 дневно престояване в разтвор на 1,5 SBF при статични условия.

Теоретично, в ИЧ-спектр ивиците на PO_4^{3-} в НА са както следва: $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ при $960\text{--}965 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ при 460 cm^{-1} , $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ при $1190\text{--}980 \text{ cm}^{-1}$, и $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ при $660\text{--}520 \text{ cm}^{-1}$. В нашия случай, трите нови ивици 604 cm^{-1} , 568 cm^{-1} и $710\text{--}712 \text{ cm}^{-1}$ биха могли да бъдат отнесени към $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$. Ивицата $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ се наблюдава при $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$, докато $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$ при $\sim 460 \text{ cm}^{-1}$ (не може да се види в спектрите) за всички образци. В ИЧ-спектр се наблюдава също наличието на силна абсорбционна ивица за CO_3^{2-} йоните при $873\text{--}875 \text{ cm}^{-1}$, което е показателно за наличието на CO_3HA във всички образци.

В представените данни от ИЧ спектри се наблюдават интензивни ивици в областта $1330\text{--}1580 \text{ cm}^{-1}$, които биха могли да бъдат приписани на CO_3^{2-} йони. От присъствието на тези ивици става ясно, че в образците се установяват кристални калциеви фосфати, които могат да бъдат свързани с CO_3HA . Ивицата при $\sim 1635 \text{ cm}^{-1}$ се свързва с водата.

От друга страна, известно е, че апатитната структура зависи от химичния състав. В този контекст, съществуват два типа заместване в апатитната решетка: CO_3^{2-} йони заместени с PO_4^{3-} (В-тип) и CO_3^{2-} йони заместени с OH^- (А-тип).

За по-подробна информация, относно типа на заместването в образувания CO_3HA по повърхността на SGBG след 12 дневен престой в разтвор на SBF, се извършва анализ на ИЧ-спектрите в региона $1320 - 1750 \text{ cm}^{-1}$. Те са представени в **Табл. 8**.

На базата на получените резултати, може да се заключи, че преференциално на повърхността на BG, след престояването им в разтвор на 1,5 SBF, се наблюдава В-тип CO_3HA .

От данните на ИЧ-спектри за SGBG (**фиг. 2** и **Табл. 8**) може да се обобщи, че синтезираните BG са *in vitro* биоактивни, защото:

1) В ИЧ-спектри се наблюдава присъствието на високо интензивна ивица при 875 cm^{-1} , което е индикация за формирането на кристални HA по повърхността на SGBG. Както се вижда от ИЧ-спектри в образците с включен Ag_2O , интензивността е по-висока, което дава основание да се предположи, че Ag^+ биха могли да имат „катализираща“ роля във формирането на HA.

2) Твърде разлятите, но интензивни ивици при около 1115 cm^{-1} не дават основание да се смята, че този интензитет е обусловен и от участието на PO_4^{3-} след *in vitro* теста, защото в областта $\sim 1110 \text{ cm}^{-1}$ се „наслагват“ както Si-O-Si колебанията, така и вибрационните колебания на PO_4^{3-} , които са характеристични за кристални фосфати. Ето защо, е извършено разлагане на спектъра, за по-фин и обстоен анализ.

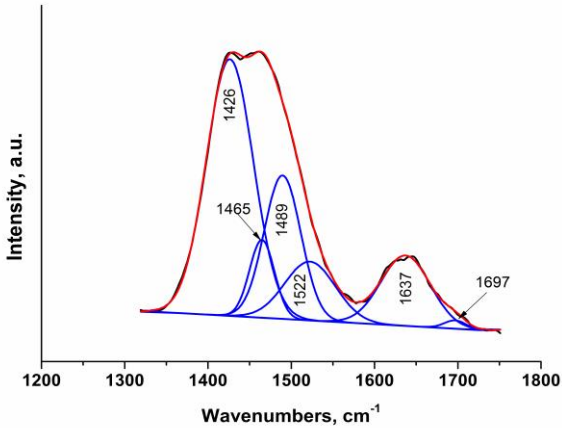
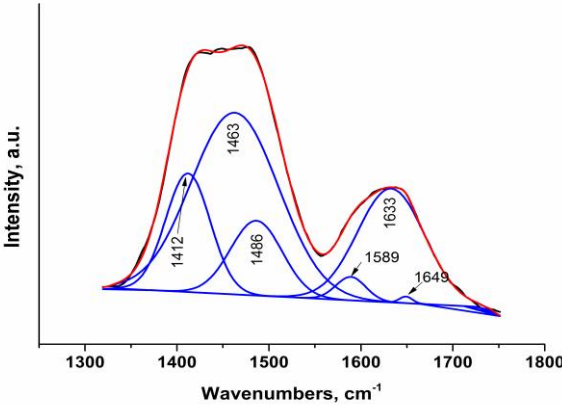
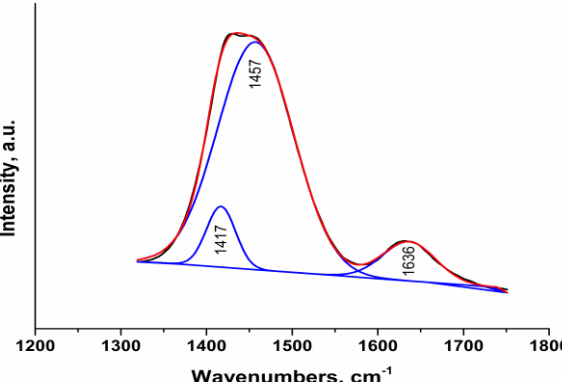
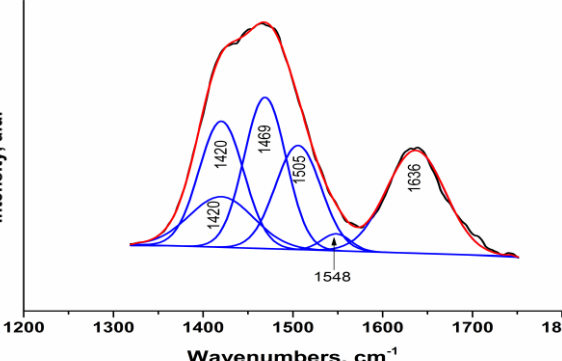
3) По подобен начин стои въпросът и с интензивните разляти максимуми, характерни за CO_3^{2-} в областта $1560 - 1320 \text{ cm}^{-1}$ (за всички образци). След разлагането на спектъра, се вижда, че ивиците при ~ 1424 и $\sim 1465 \text{ cm}^{-1}$ биха могли да бъдат отнесени към В-тип карбонат апатит ($\text{V-CO}_3\text{HA}$), който е известен като биоапатит. По принцип в литературата, не са забелязани данни, нито за SGBG, нито за керамики, които да потвърждават тезата за образуване на В-тип CO_3HA . Напротив, често срещано е да се образуват както А-, така и $\text{V-CO}_3\text{HA}$, така и смесен АВ- CO_3HA .

Независимо от изказаните по-горе съображения е ясно, че получените и изследвани от нас SGBG са биоактивни, но също така, че тази биоактивност е значителна, ако се съди по интензитета на разгледаните по-горе ивици и области.

Обобщеният **извод**, който може да бъде направен е, че след престояване на изследване SGBG в разтвор на 1.5 SBF за период от 12 дни при статични условия, FTIR анализа показва някои ивици за CO_3^{2-} йони, т.е. след *in vitro* теста по повърхността на синтезираните SGBG се формира $\text{V-CO}_3\text{HA}$.

От резултатите в **Табл. 8**, се установяват четири типични области за $\nu_3 \text{CO}_3^{2-}$, които се наблюдават при $1410\text{-}1430 \text{ cm}^{-1}$, $1430\text{-}1460 \text{ cm}^{-1}$, $1460\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$ и $1500\text{-}1530 \text{ cm}^{-1}$. Ивиците за В-тип CO_3HA са при 1417, 1420, 1426, 1457, 1469, 1486, 1636, 1548, 1589 и 1649 cm^{-1} , а за А-тип CO_3HA при 1465, 1505 и 1522 cm^{-1} .

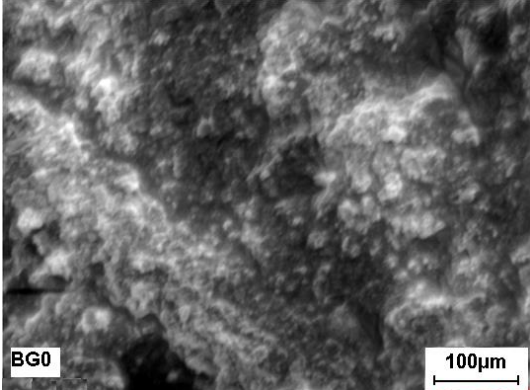
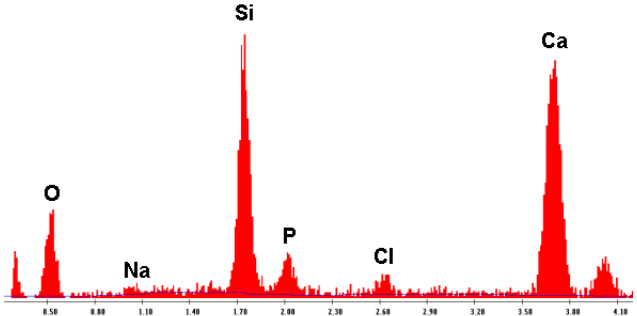
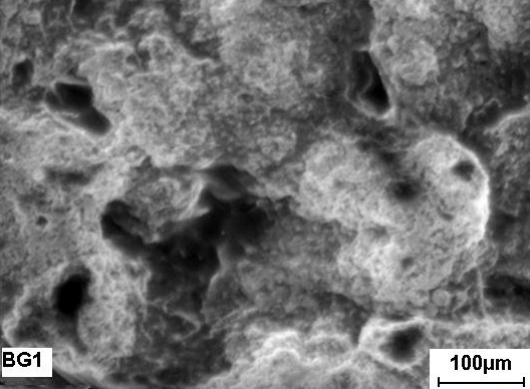
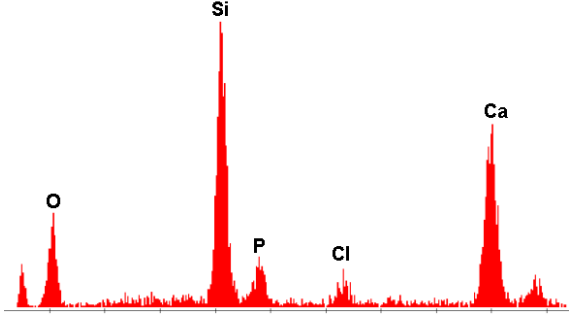
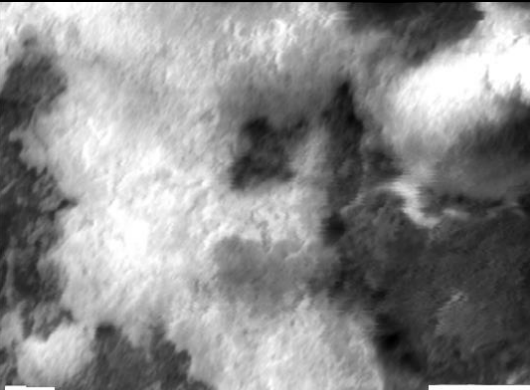
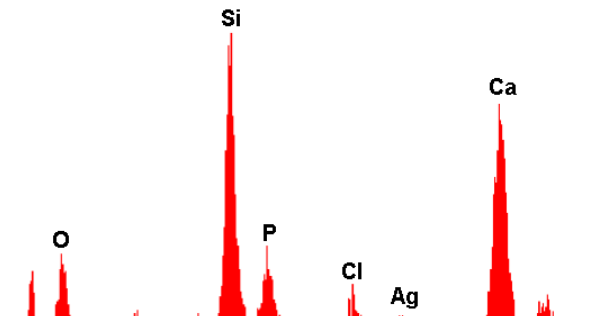
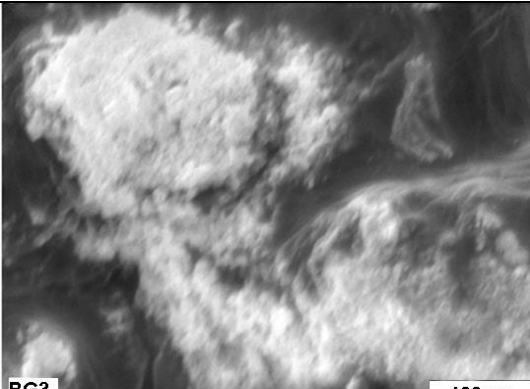
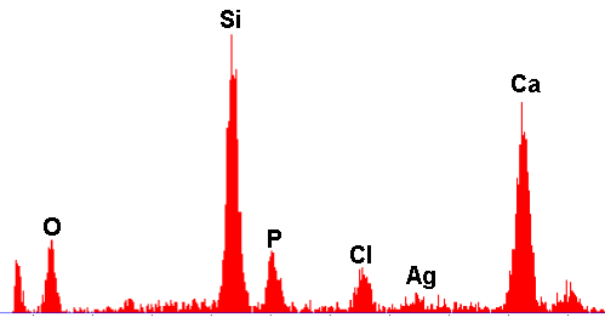
Таблица 8. FTIR спектри на стъклата в областта 1750-1320 cm^{-1} , след *in vitro* тест в разтвор на 1,5 SBF в продължение на 12 дни в статични условия.

SGBG	Разлагане на ИЧ-спектри в областта 1750-1320 cm^{-1}
BG0	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm^{-1} 1426, 1465, 1489, 1522, 1637, 1697
BG1	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm^{-1} 1412, 1463, 1486, 1589, 1633, 1649
BG2	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm^{-1} 1417, 1457, 1636
BG3	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm^{-1} 1420, 1469, 1505, 1548, 1636

SEM - EDX анализ на BG, преминали теста за *in vitro* биоактивност

SEM микрографии с енергетично–дисперсионната спектроскопия или рентгенов микроанализ (EDX) на SGBG, преминали теста за *in vitro* биоактивност в разтвор на 1,5 SBF, са представени в Табл. 9.

Таблица 9. SEM - EDX анализи на BG0, BG1, BG2 и BG3 при увеличение 200x (100µm) след теста за *in vitro* биоактивност в разтвор на SBF.

SEM	EDX
 BG0	
 BG1	
 BG2	
 BG3	

От **Табл. 9** може ясно да се види, че повърхностната морфология на разглежданите образци е различна.

При образец BG0 се забелязва неравна, дребнозърнеста структура, без ясно изразени очертания между отделните частици, тъй като те са свързани в основата си. За разлика от него, при BG1 се наблюдава слоеста структура на повърхността, с образувани различни по размер и форма пори.

SEM микрографиите при BG2 и BG3 видимо не показват съществени различия. Повърхността на SGBG е по-скоро загладена, слоеста, но без пори.

Процесите на формиране на HA, могат да се видят от SEM изображенията представени в **Табл. 9**. Логично е да се предположи, че при настоящите изследвания формирането на HA-слой е на различен етап при различните образци. Това означава, че с повишаване количеството на Ag₂O в състава на SGBG, се ускорява образуването на HA-слой.

Някои автори съобщават, че в състава на BG малки количества сребро или Ag⁺ йони, могат да имат силен стимулиращ ефект върху формирането на апатит след *in vitro* тест в разтвор на SBF.

Преминаването, на OH⁻ и CO₃²⁻ йони от разтвора към повърхността на SGBG продължава до преобразуването на аморфния калциевофосфатен слой в HA-слой. Формирането на HA-слой е предпоставка за адсорбцията на растежните фактори, прикрепването, пролиферацията и диференциацията на остеопрогениторни клетки. Именно това са биологичните механизми, чрез които се осъществява свързването на SGBG с костната тъкан. Освен това, адсорбцията на адхезионни протеини, например, фибронектин, витронектин и т.н. е необходимо условие за клетъчно прикрепване.

Литературни данни потвърждават предположението, че при SEM изображенията на образците се наблюдават различни етапи от образуването на HA-слой при настоящите изследвания.

В този контекст е важно да се отбележи и още едно обстоятелство: наличието на кухини в образците, след *in vitro* теста за посоченото време означава, че SGBG претърпяват частично разтваряне в SBF. Това разтваряне би могло да се приеме като вторичен критерий за биоактивност още повече, че след приключване на теста върху повърхността на образците се формира кристален CO₃HA. Заедно с това, както се вижда от данните на **Табл. 9**, той напълно покрива повърхността на образците.

Данните от EDX анализа, представени в **Табл. 9** и **Табл. 10**, дават информация за вида на образувания карбонатапатит. Елементите, които се откриват в малки количества или следи, не са означени. Количеството Ag при образец BG1 е извън откриваемия минимум на използваната апаратура. При BG2 се установява минимално количество Ag, докато при образец BG3, то е приблизително 6 wt%.

В резултат от престояването на образците в разтвор на 1,5 SBF, наред с елементите на SGBG, се откриват и атоми на елементи от разтвора за изпитване на биоактивността. Това са елементи като Na, Cl, Mg. Освен това кислородът заема около 20 at % от образците.

В **табл. 10** са представени количествата на елементите Ca, P и Si в at.%, определени с помощта на рентгенов микроанализ.

Таблица 10. Данни от EDX анализа на SGBG, след *in vitro* теста за биоактивност в разтвор на 1,5 SBF в продължение на 12 дни.

Образци	Елементи, at. %			
	Ca	P	Si	Ca/P+Si
BG0	30,83	7,03	24,55	≈ 1,00
BG1	31,65	6,50	22,65	1,08
BG2	33,16	7,68	22,86	1,09
BG3	30,73	6,59	23,56	1,02

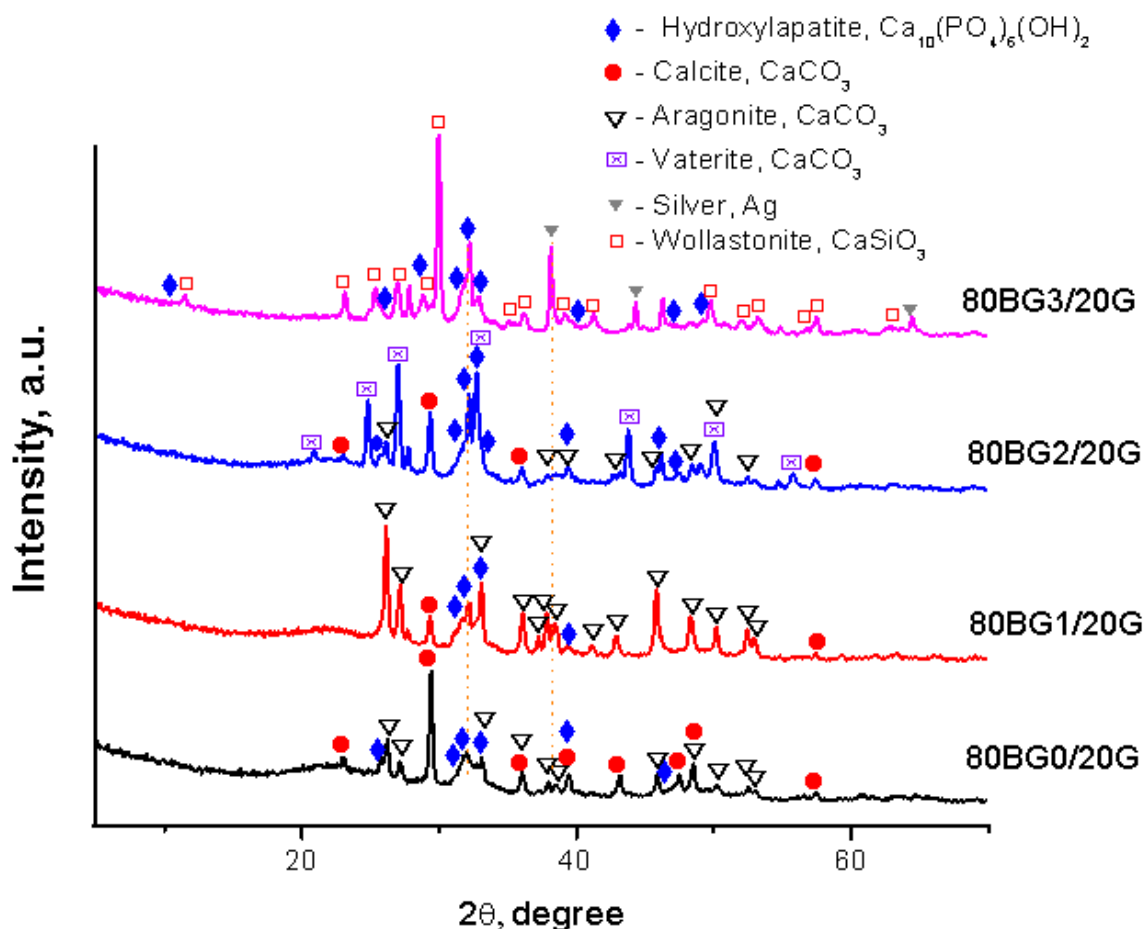
От данните за количествения елементен състав на повърхността на изследваните SGBG с (и без) добавки на Ag_2O става ясно, че числените стойности на отношението $\text{Ca}/\text{P}+\text{Si}$ се движат около 1. Това показва, че апатит с отношение $\text{Ca}/\text{P}=1,67$ не е утаен и образуван. Стойностите, получени от анализа показват, че на повърхността на образците е формирана „смес“ от кристален и аморфен HA, което е причина за получените стойности. Очевидно, в резултат на проведения анализ може да се обобщи, че времето за престояване на образците в разтвор на 1,5 SBF трябва да бъде удължено. Основната причина за това е да се даде време на аморфния HA напълно да се превърне в кристален.

Изводът, който може да бъде направен от SEM-EDX анализа е, че изследваните SGBG проявяват *in vitro* биоактивност, като на повърхността на стъклата се откриват Si, Ca, P и Cl (който присъства в разтвора на SBF), което е доказателство за наличието на SGBG в разтвора на 1,5 SBF. Повишеното съдържание на елементите след *in vitro* теста е доказателство за протекли процеси на образуване на кристален HA на повърхността на образците.

4. Тестове за *in vitro* биоактивност на композитите

Рентгенофазов анализ на композити след теста за *in vitro* биоактивност

На **фиг. 7.** са представени рентгенодифракционните данни на композитите 80BG/20G, след тест за биоактивност с продължителност 12 дни.



Фигура 7. Рентгенодифракционни данни на композити 80BG0/20G, 80BG1/20G, 80BG2/20G и 80BG3/20G след тест за *in vitro* биоактивност в 1,5 SBF за период от 12 дни.

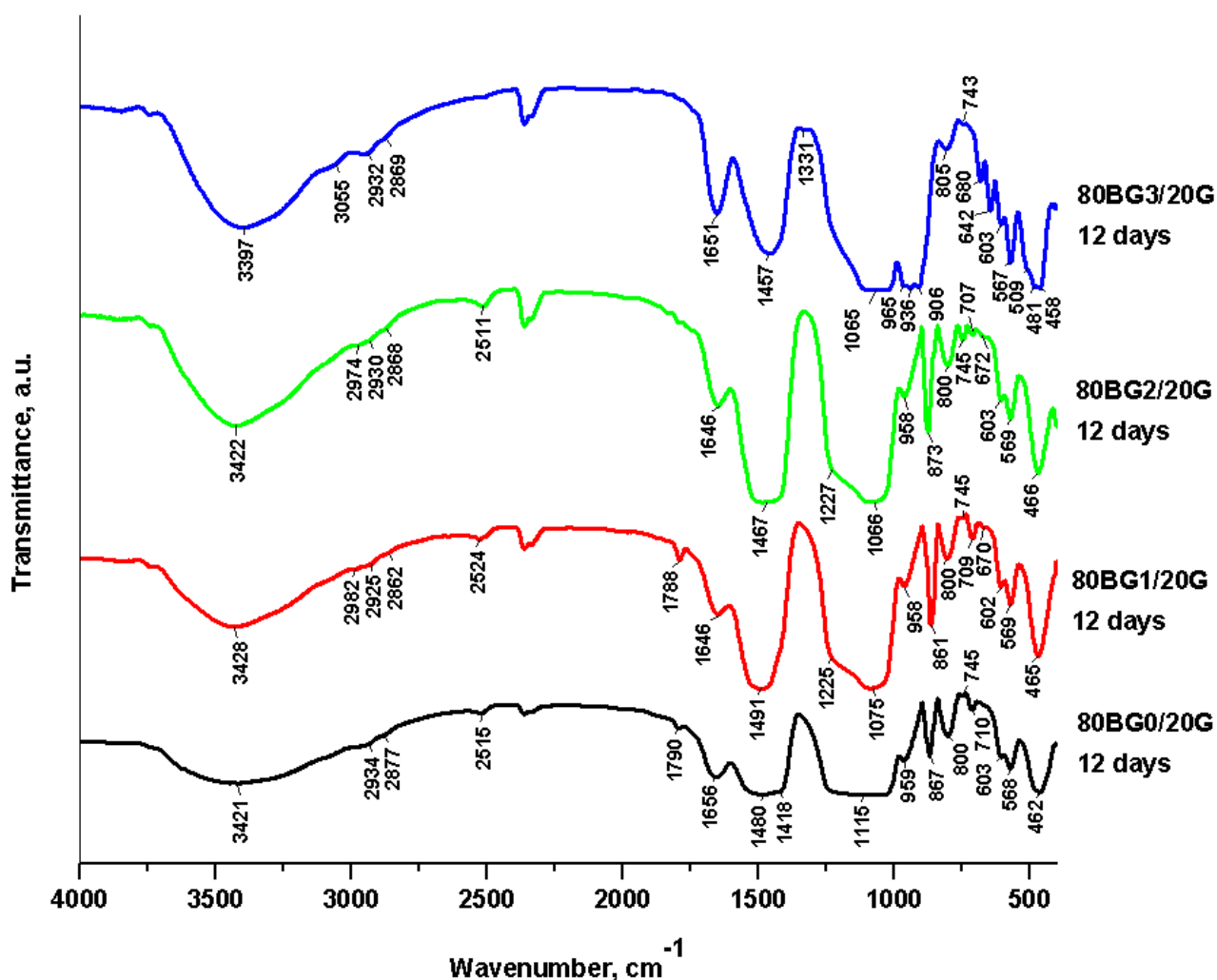
При сравнение дифрактограмите на композитите преди *in vitro* теста за биоактивност (фиг. 3), с тези – след престояването им в разтвор на SBF (фиг. 7), ясно се вижда, че HA е в по-голямо количество. За останалите фази в образците (St, At, Vt, Wt и Ag⁰) не се установяват съществени промени.

Образуването на кристален HA се дължи на пренасищане разтвора на 1,5 SBF с Ca²⁺, PO₄³⁻, CO₃²⁻ йони от композитите и последващото им утаяване върху повърхността, както беше споменато по-горе за SGBG. От данните на фиг. 5, ясно се вижда, че At и Vt са напълно разтворени в разтвора на 1,5 SBF, докато при композитите не се наблюдава разтваряне на тези фази (фиг. 7).

От данните на рентгенофазовия анализ може да се види, че след престояване на композитите в разтвор на 1,5 SBF в продължение на 12 дни върху повърхността им кристализира HA. В съответствие с XRD данните на SGBG се потвърждава **изводът**, че и композитните материали са *in vitro* биоактивни. За това се съди по образуването на HA с по-висока кристалност. Очевидно влияние би могъл да има и самия Gel, който като полипептид също би могъл да прояви своята биоактивност, макар и по-слаба.

Инфрочервени спектри на композити след теста за *in vitro* биоактивност

ИЧ спектри на композитните материали 80BG/20G след *in vitro* тест в продължение на 12 дни, при статични условия, са представени на фиг. 8.



Фигура 8. Инфрочервени спектри на композити 80BG/20G след *in vitro* тест в разтвор на 1,5 SBF в продължение на 12 дни при статични условия.

При сравняване ИЧ-спектри на SGBG (фиг. 6) и на 80BG/20G (фиг. 8) след *in vitro* теста, може да се каже, че композитните материали показват по-висок интензитет на ивиците. Една от причините за това би могла да бъде собствената *in vitro* биоактивност на Gel.

Представеният на **фиг. 8** ИЧ-спектр на композитни материали, преминали *in vitro* тест за биоактивност в продължение на 12 дни, е сложен по характер. Независимо от това обаче, от него могат да се направят следните по-важни обобщения:

1) За всички образци интензитетът на ивиците в областта $960 - 460\text{ cm}^{-1}$ нараства, което е указание за формиране на кристални фосфати след *in vitro* теста.

2) Интензитетът на максимумите при $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ е необичайно висок, което дава основание да се направят предварителни заключения относно *in vitro* биоактивността на изследваните композитни материали.

Със сигурност, това предположение може да бъде доказано след „разлагане“ на посочената интензивна, но разлята ивица. В нея ще се открият промени, касаещи Si-O-Si фрагментите и ще се открият точните местоположения на характеристичните ивици за кристални фосфати, формирани след *in vitro* теста в продължение на 12 дни.

3) Силно интензивните, но разляти ивици за CO_3^{2-} в областта $1700 - 1300\text{ cm}^{-1}$ показват, че са получени два типа кристални фази – на CO_3HA и на различни типове CaCO_3 (биогенен калциев карбонат). След разлагане на абсорбционния максимум може с точност да се докаже кои фази са кристализирали по време на *in vitro* теста.

От **фиг. 8** може да се види, че представените FTIR резултати наподобяват тези на композити (CO_3HA)-белтък. Ивицата за амид I при 1650 cm^{-1} за чист желатин се измества (т.нар. “red shift”) към $\sim 1646\text{ cm}^{-1}$ при всички образци. Отместването може да бъде свързано с формирането на HA по повърхността на образците след престояване в SBF, което съответства на резултати публикувани от други автори. Абсорбционните ивици в областта $1500 - 1400\text{ cm}^{-1}$ могат да бъдат свързани с образуването на CO_3HA , след престояване на композитите в 1.5 SBF разтвор за 12 дни. На основание на тези резултати може да се приеме, че се формира B-тип CO_3HA по повърхността на образците 80BG/20.

За получаване на по-детайлна информация относно типа на PO_4^{3-} трептения, след *in vitro* теста в разтвор на 1.5 SBF за период от 12 дни на композитите 80BG/20G, е приложено разлагане на спектъра в областта $1320 - 800\text{ cm}^{-1}$ (**Табл. 11**).

В нашият случай ивиците при 919, 947, 953, 956 и 958 cm^{-1} могат да бъдат приписани на $\nu_1\text{ PO}_4^{3-}$. Освен това, пиковите при 1023, 1029, 1046, 1073, 1078, 1080, 1107, 1129, 1187, 1197 cm^{-1} могат да бъдат свързани с $\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$, в съответствие с публикувани резултати. Ивиците позиционирани при 861, 868 и 873 cm^{-1} могат да бъдат отнесени към $\nu_2\text{ CO}_3^{2-}$ в кристалната структура на HA.

На основание на резултатите от приложеното разлагане, може да се заключи, че по повърхността на композитите след *in vitro* теста за биоактивност, се отлага кристален CO_3HA . Но за да се твърди със сигурност, какъв вид субституция в решетката на CO_3HA е протекла ($\text{OH}^- \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$ или $\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$), е необходимо допълнително разлагане спектрите на изследваните композити. Това доказателство е важно, защото B- CO_3HA е биогенния хидроксилapatит. Ако той се формира на повърхността на образците, се предполага, че композитите ще дадат положителни резултати за биосъвместимост с човешки клетки.

FTIR спектрите на образците 80BG/20G, са изследвани допълнително чрез разлагане на региона $1750-1320\text{ cm}^{-1}$, в който се откриват ивиците на CO_3^{2-} йони (**Табл. 12**).

Таблица 11. ИЧ- спектри на композити 80BG/20G в интервала 1320 - 800 cm^{-1} , след *in vitro* теста в разтвор на SBF, за период от 12 дни, при статични условия.

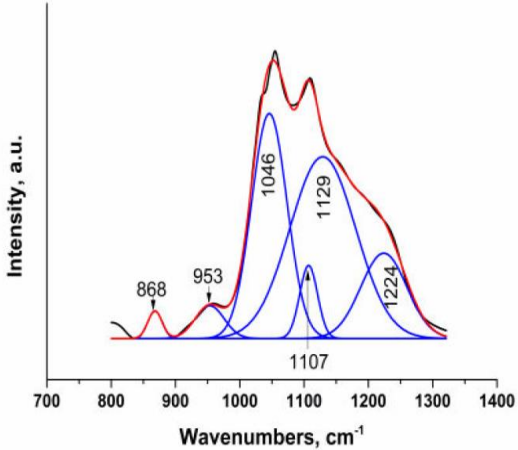
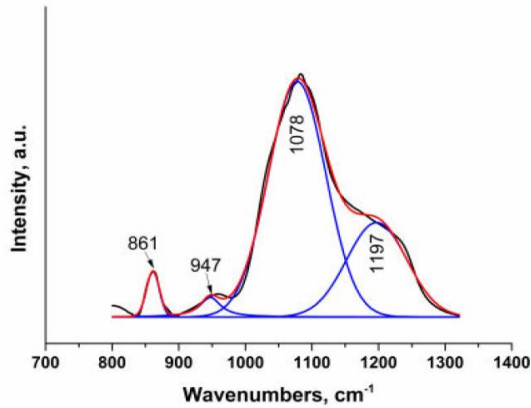
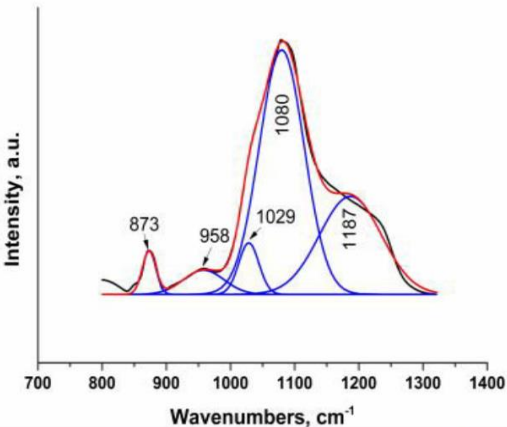
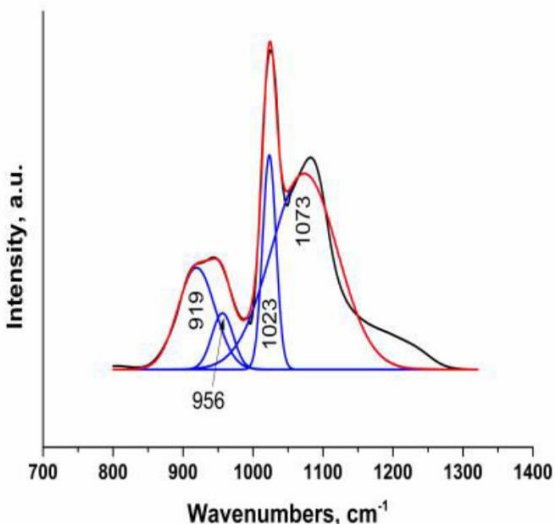
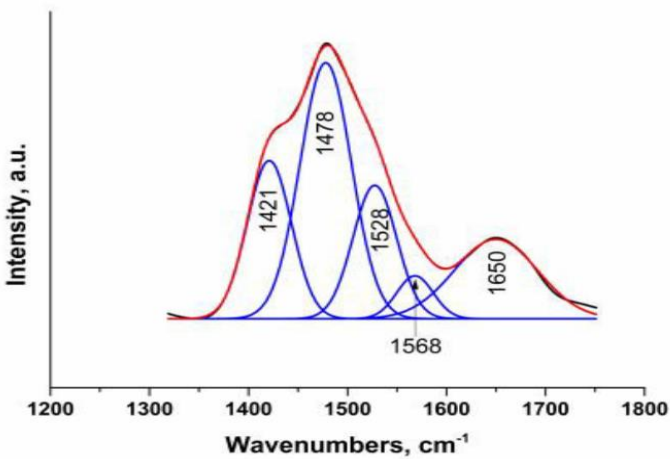
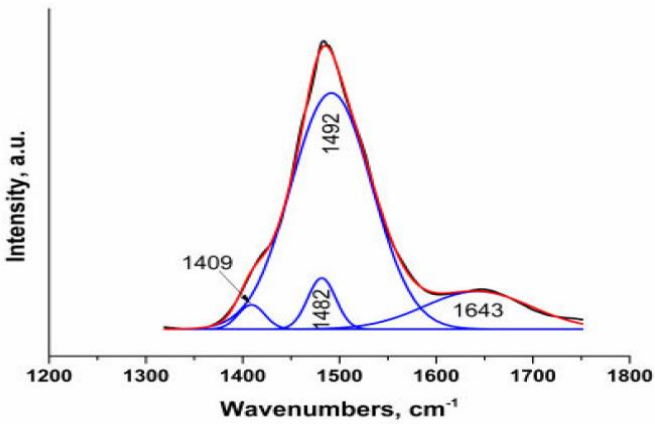
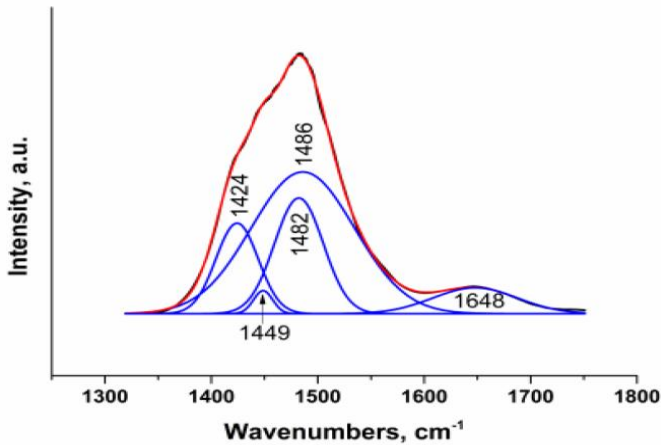
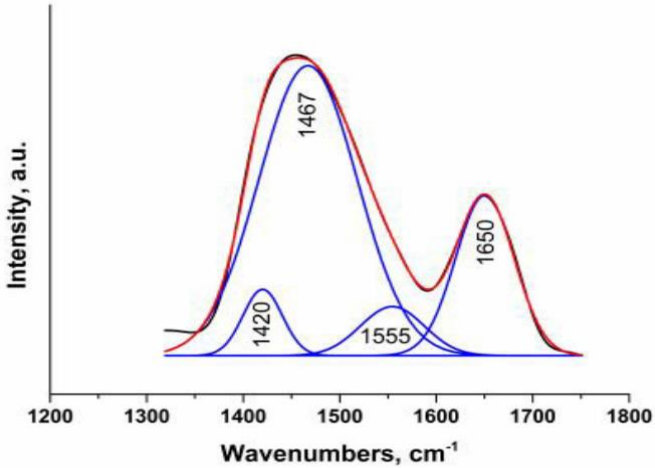
Композит	Разлагане на ИЧ-спектри в областта 1320 - 800 cm^{-1}
80BG0/20G	 The IR spectrum for 80BG0/20G shows a broad peak around 1000-1100 cm^{-1} and a smaller peak around 800-900 cm^{-1}. The deconvolution peaks are labeled at 868, 953, 1046, 1107, 1129, and 1224 cm^{-1}.
80BG1/20G	 The IR spectrum for 80BG1/20G shows a broad peak around 1000-1100 cm^{-1} and a smaller peak around 800-900 cm^{-1}. The deconvolution peaks are labeled at 861, 947, 1078, and 1197 cm^{-1}.
80BG2/20G	 The IR spectrum for 80BG2/20G shows a broad peak around 1000-1100 cm^{-1} and a smaller peak around 800-900 cm^{-1}. The deconvolution peaks are labeled at 873, 958, 1029, 1080, and 1187 cm^{-1}.
80BG3/20G	 The IR spectrum for 80BG3/20G shows a broad peak around 1000-1100 cm^{-1} and a smaller peak around 800-900 cm^{-1}. The deconvolution peaks are labeled at 919, 956, 1023, 1073, and 1079 cm^{-1}.

Таблица 12. ИЧ-спектри на композити 80BG/20G в интервала 1750 - 1350 cm^{-1} , след *in vitro* теста в разтвор на SBF за период от 12 дни при статични условия.

Композит	Разлагане на ИЧ-спектри в областта 1750 - 1320 cm^{-1}
80BG0/20G	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm^{-1} 1421, 1478, 1528, 1568, 1650
80BG1/20G	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm^{-1} 1409, 1482, 1492, 1643
80BG2/20G	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm^{-1} 1424, 1449, 1482, 1486, 1648
80BG3/20G	 Intensity, a.u. Wavenumbers, cm^{-1} 1420, 1467, 1555, 1650

От представените резултати в **Табл. 12** са отчетени четири области за $\nu_3 \text{CO}_3^{2-}$: 1430 - 1410 cm^{-1} , 1460 - 1430 cm^{-1} , 1500 - 1460 cm^{-1} и 1530-1500 cm^{-1} . Позициите, на споменатите ивици за А- и В-тип CO_3HA , са както следват:

- 1) А-тип CO_3HA , в който CO_3^{2-} йони изместват OH^- групи ($\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{OH}^-$) при 1467 cm^{-1} .
- 2) В-тип CO_3HA , при който CO_3^{2-} йони са заменени с PO_4^{3-} ($\text{CO}_3^{2-} \rightarrow \text{PO}_4^{3-}$), при 1409, 1420, 1421, 1424, 1449, 1478, 1482, 1486, 1492, 1568, 1643, 1649 и 1650 cm^{-1} .

На основа получените резултати може да се заключи, че се образува предимно В-тип CO_3HA . Той се отлага на повърхността на композитите 80BG/20G след престой от 12 дни в разтвор на 1.5 SBF при статични условия.

Обобщено казано, получените и изследвани от нас композитни материали в системата 80BG/20G показват, че те проявяват повишена *in vitro* биоактивност, което дава основание да се предположи, че биха могли успешно да се приложат в областта на костно-регенеративната медицина.

Разбира се, това по-надеждно може да се твърди след изследване на композитите с клетъчни култури.

SEM - EDX анализ на композити след теста за *in vitro* биоактивност

SEM изследването на получените композитни материали е извършено след престояване на образците в разтвор на 1,5 SBF в продължение на 12 дни. Данните са представени в **Табл. 13**. Както може да се види, повърхностната морфология при всеки отделен образец е различна.

Може да се предположи, че по повърхността на всички образци (80BG/20G) кристализира CO_3HA във вид на агломерати. Наблюдаваната морфология на повърхността е логична, защото процесът на формиране на кристалния апатитен слой е „степенен“ и зависи от времето на кристализация.

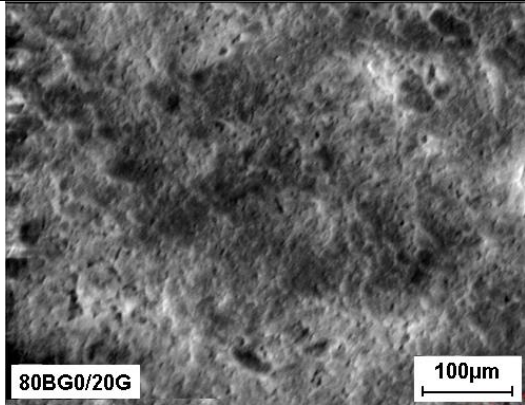
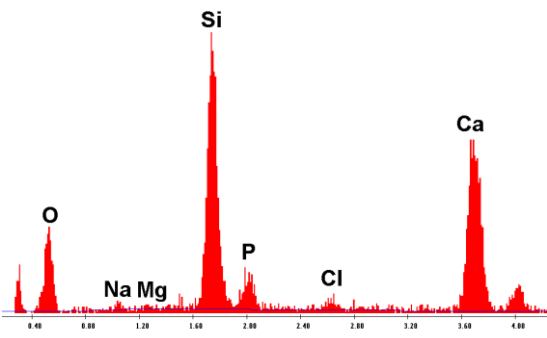
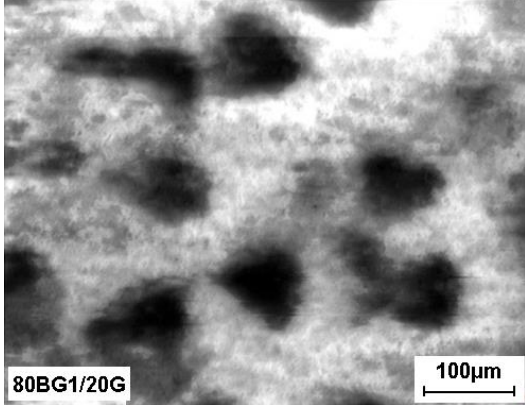
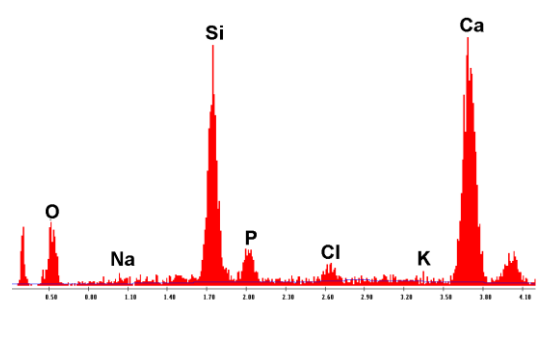
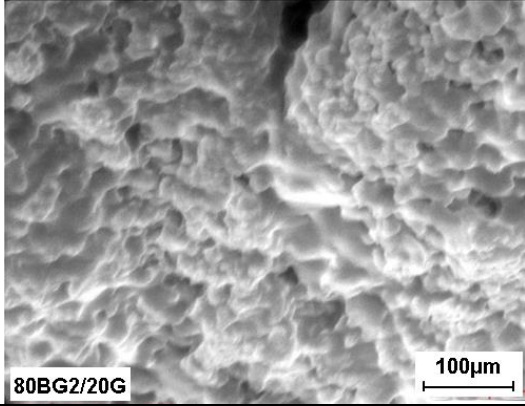
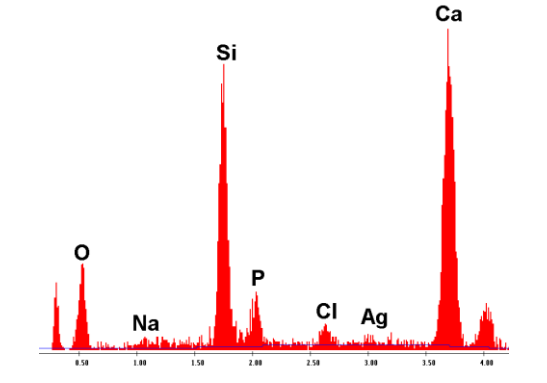
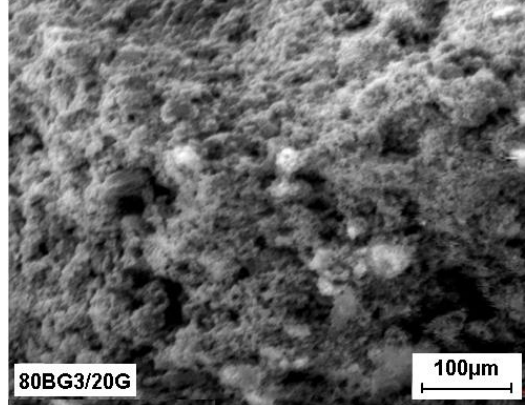
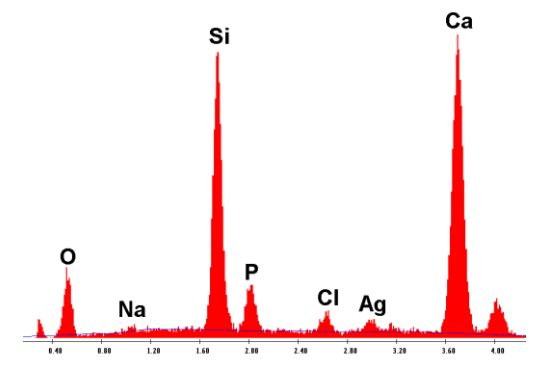
Във връзка с това, от SEM изображенията на 80BG/20G става ясно, че повърхността е покрита от плътен слой кристален CO_3HA , което показва, че минерализацията на композита продължава.

При композита 80BG0/20G тя е дребнозърнеста, микропореста с наслагвания от HA кристали. Забелязва се също така, че за композита 80BG1/20G, слойт CO_3HA е по-плътен. Формират се макропори, които са около 100 μm в диаметър. От една страна, това дава основание да се предположи, че определена роля за това биха имали Ag^+ , които се отделят от стъклото в разтвора на SBF. Те по всяка вероятност „катализират“ нарастващата кристализация на CO_3HA и водят до образуването на макропори по повърхността на композитния материал. Но от друга страна при образците 80BG2/20G и 80BG3/20G, съответно с 2 и 4 wt.% Ag_2O в състав на стъклата, такива пори не се наблюдават. Тяхната структура е по-скоро зърнеста от натрупвания на HA. На места се образуват по-малки кристали, които са групирани в клъстери. Наблюдават се и папилообразни структури и струпвания на кристали в слоеве, които формират пори в дълбочина. Последните могат да се наблюдават и при образците 80BG2/20G и 80BG3/20G.

Интерес представляват данните от **Табл. 11**, в която са посочени количествата на основните компоненти на повърхностния слой, отложен върху повърхността на композитите, след престояването им в разтвор на 1,5 SBF в продължение на 12 дни.

Цифровите стойности на отношението Ca/P+Si показват, че при образците с 80BG2/20G и 80BG3/20G (съответно с 2 и 4 wt.% Ag_2O в състава на BG), слойт HA е такъв, какъвто в костната тъкан, т.е. получен е стехеометричен HA. С отношение равно на 1,67. Очевидно, както беше подчертано по-преди, Ag^+ биха могли да катализират процеса на отлагане на HA. Тази идея е особено интересна и се нуждае от допълнителни проучвания.

Таблица 13. SEM изображения с EDX на композити 80BG0/20G, 80BG1/20G, 80BG2/20G и 80BG3/20G при увеличение 200x (100µm) след теста за *in vitro* биоактивност в разтвор на SBF.

SEM	EDX
 80BG0/20G	
 80BG1/20G	
 80BG2/20G	
 80BG3/20G	

Количествата на отделните елементи, които се отчитат при EDX анализа (XL 30 ESEM) на повърхността на *in vitro* минерализираните BG в желатиновата матрица, са дадени в **Табл. 11**.

Таблица 11. Данни от EDX анализа показващи елементния състав на композитите.

Образци	Елементи, wt. %			Ca/P+Si
	Ca	P	Si	
80BG0/20G	30,33	4,79	25,66	1,00
80BG1/20G	36,54	4,46	20,96	1,2
80BG2/20G	39,22	4,85	19,88	1,6
80BG3/20G	42,32	5,06	20,20	1,67

В **заключение**, на основа получените данни може да се твърди, че композитните материали са *in vitro* биоактивни.

5. Изследване на *in vitro* биосъвместимост с MG-63 остеобластоподобни клетки

Клетъчни култури

За биологичните експерименти се използват човешки остеосаркомни клетки MG-63 (MG63, CRL-1427). Те са добре характеризирани и широко използвани за тестване на биоматериали. За да се ограничат промените във фенотипа, се използват пасажки между 10 и 15 клетки. MG-63 се поддържат в среда Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Lonza, Швейцария), съдържаща 10% фетален говежди серум (FBS, Lonza, Швейцария), 3.5 g/L глюкоза, 100 единици/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин, във влажна CO₂ атмосфера при 37 °C.

Третиране на MG-63 клетки със с BG и композити

Избраният от нас метод на култивиране е индиректен. При него се култивират клетки в монослой, след което в хранителната среда се включва даденият образец (стъкло или композит). Образците са в прахообразно състояние като в културалната течност се образува суспензия.

Клетъчна адхезия и сравнителна оценка на общата клетъчна морфология

За подробно характеризиране биосъвместимостта на синтезираните от нас стъкла и композити, проучваме адхезията на клетки MG-63 върху тези материали за период до 3 часа. Общата морфология на клетките, в присъствие на изследваните стъкла и композити, е представена на **фиг. 9** и **10**. Клетките се прикрепят добре при всички изследвани субстанции и са достатъчно разстлани.

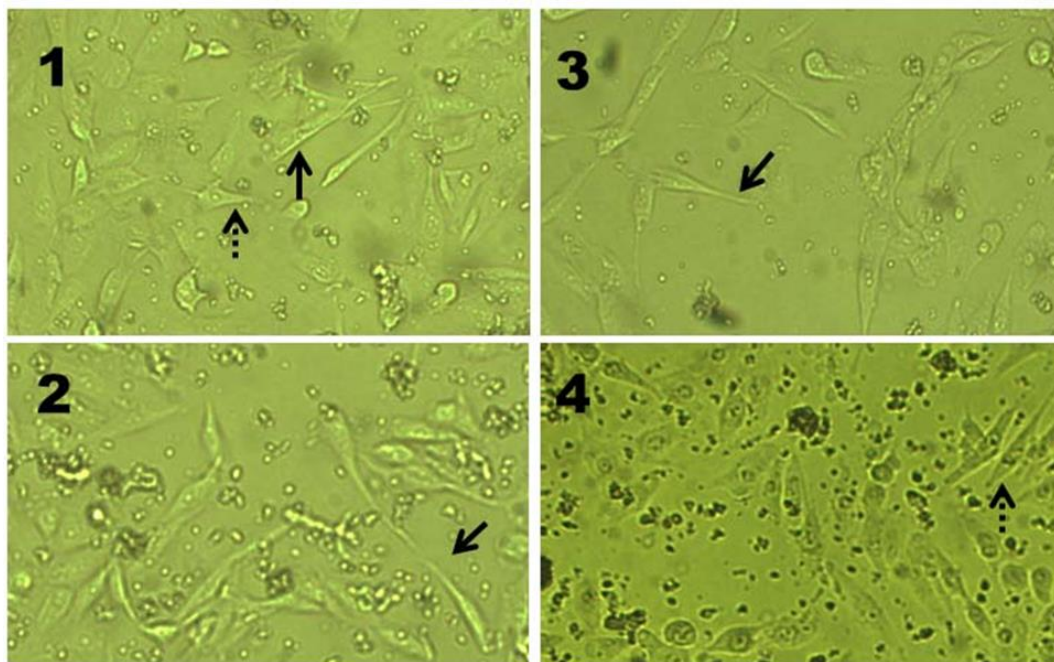
Клетъчната адхезия се потвърждава количествено с провеждането на МТТ анализ. Данните са представени в **Табл. 15**.

Таблица 15. Клетъчна адхезия на MG-63 остеобласти в присъствие на стъкла и композити, измерена на 3-тия час.

Стъкла, A 540nm		Композити, A540nm	
BG0	0.477±0.115	80BG0/20G	0.622±0.121
BG1	0.511±0.210	80BG1/20G	0.597±0.093
BG2	0.453±0.097	80BG2/20G	0.574±0.089
BG3	0.471±0.101	80BG3/20G	0.555±0.173

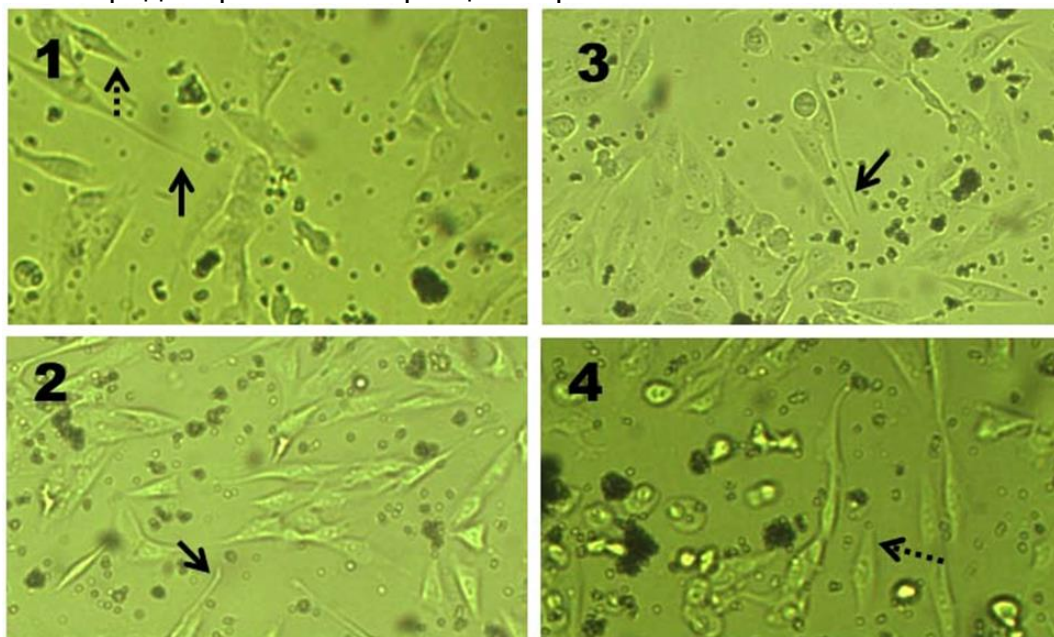
Резултатите показват, че не се наблюдава достоверна разлика по отношение на спонтанната клетъчна адхезия в присъствието на изследваните стъкла и композити до 3-тия час, като цялостната клетъчна морфология е нормална.

Изводът, който може да се направи е, че добавянето на сребро съдържащи BG в желатиновите композитни материали не оказва влияние върху клетъчната адхезия.



Фигура 9: Обща морфология на MG-63 клетки, растящи в контакт със серията стъкла BG за 3 часа. 1: BG0; 2: BG1; 3: BG2; 4: BG3. С прекъснати стрелки е отбелязано формирането на ламелиподии, а с непрекъснати – образуването на филоподии. Увеличение 400х.

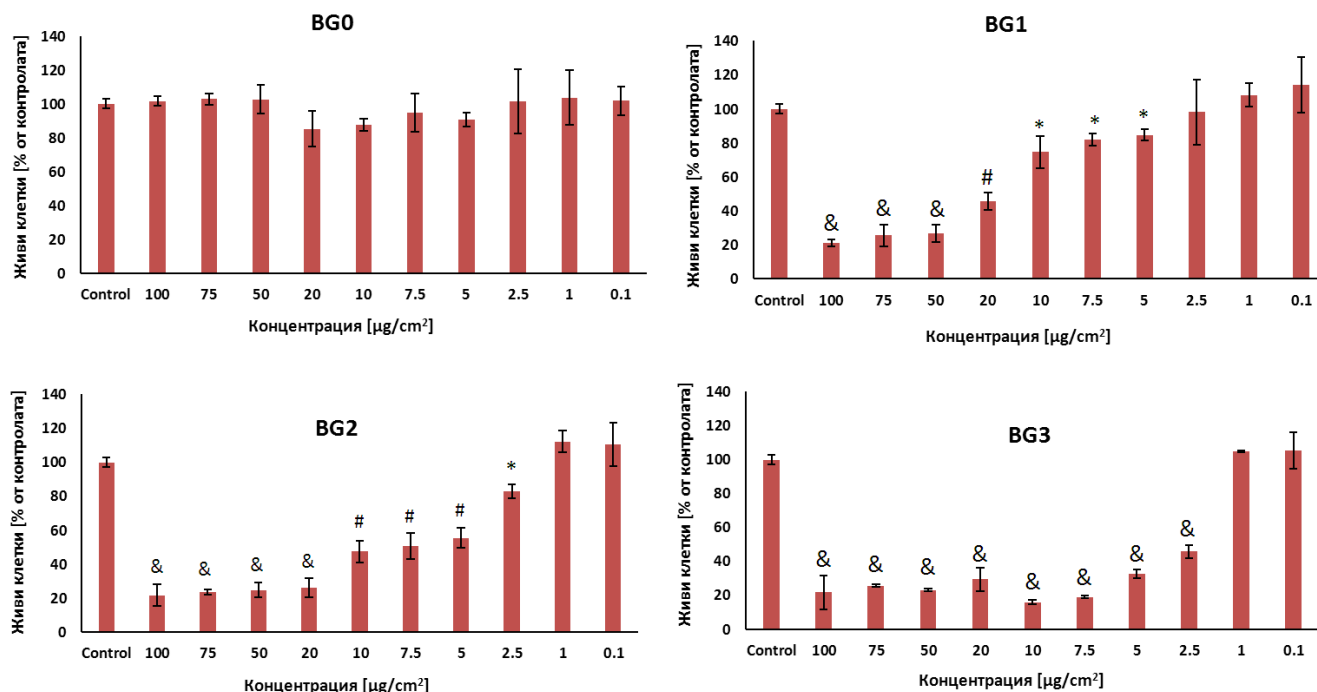
От **фиг. 9** и **10** се вижда, че адхезията е добра в присъствие на стъклата (BG0, BG1, BG2, BG3) и композитите (80BG0/20G, 80BG1/20G, 80BG2/20G, 80BG3/20G). Също така се наблюдават, неравномерно разпределени и формиращи се в клетъчната среда агрегати от образците с различна големина.



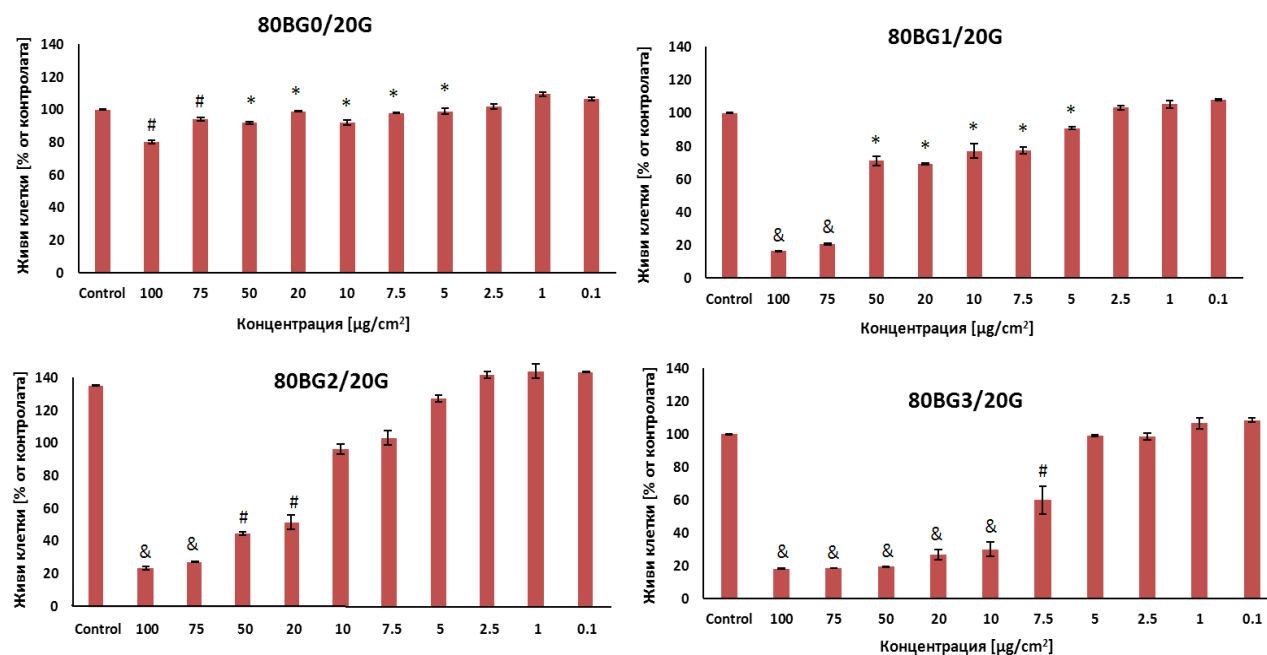
Фигура 10: Обща морфология на MG-63 клетки, растящи в контакт със серията композити 80BG/20G за 3 часа. 1: 80BG0/20G; 2: 80BG1/20G; 3: 80BG2/20G; 4: 80BG3/20G. С прекъснати стрелки е отбелязано формирането на ламелиподии а с непрекъснати – образуването на филоподии. Увеличение 400х.

Оценка на биологичния ефект на стъкла BG и композити 80BG/20G върху MG-63 клетки

За да се оцени потенциалното влияние на стъклата и композитните материали върху остеобластните клетки, се провежда МТТ анализ. Експериментите (n=24) се осъществяват върху пролифериращи клетки, които се поставят в среда и се третират с нарастващи концентрации на материалите (0.1 до 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) за 24 часа. Резултатите са представени на **фиг. 11** и **12**.



Фигура 11. Преживяемост (МТТ метод) на MG-63 клетки след третиране със стъкла (BG0, BG1, BG2 и BG3) за 24 часа. * $p < 0.05$; # $p < 0.033$, & $p < 0.001$ спрямо контролата.



Фигура 12. Преживяемост (МТТ метод) на MG-63 клетки след третиране с композитни материали 80BG/20G за 24 часа. * $p < 0.05$; # $p < 0.037$, & $p < 0.001$ спрямо контролата.

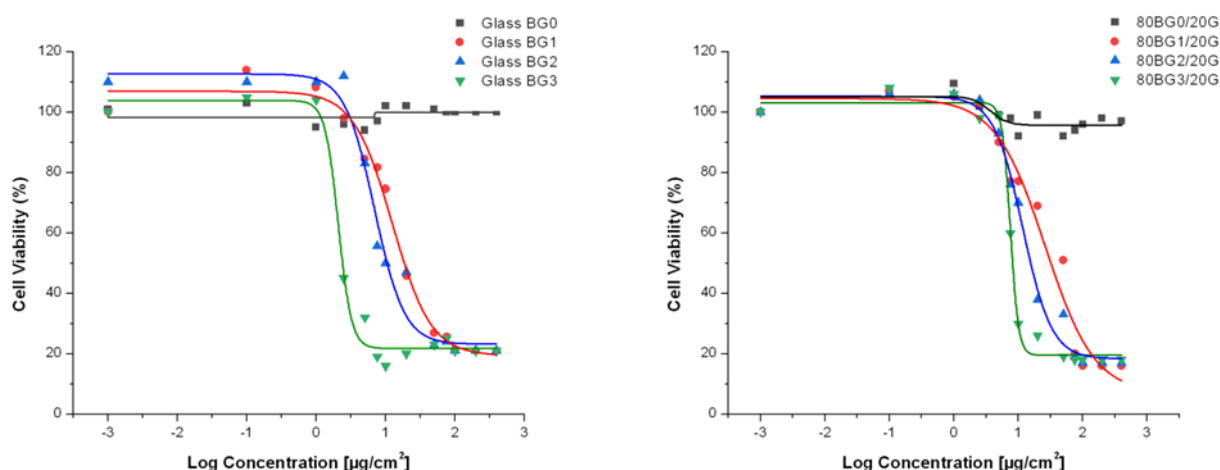
Преживяемостта на клетките в проценти се оценява спрямо контролните клетки.

Както вече беше споменато, МТТ тестът включва оценка на митохондриалната дехидрогеназна активност и е широко използван за проучване цитотоксичния ефект на различни видове агенти върху клетъчни линии. МТТ се метаболизира от митохондриалните ензими на живите клетки до пурпурна формаза нова сол и абсорбцията е пропорционална на броя живи клетки.

В резултат на проведеното изследване се установява, че третирането с BG0 и 80BG0/20G, в целия концентрационен диапазон, не води до промяна в преживяемостта на клетките. Това показва, че приложеното стъкло и композитен материал не са токсични, за разлика от стъклата и композитите съдържащи сребро. Най-силно изразен цитотоксичен ефект се наблюдава в концентрационния интервал от 2.5 до 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ за BG3. Токсичният ефект намалява, когато BG3 е включен в композит (80BG3/20G). Всички BG/Ag показват наличие на цитотоксичност в различни концентрационни интервали както следва: BG1 (20-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) < BG2 (10-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) < BG3 (2.5-100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (фиг. 11 и 12).

Композитите, съдържащи 20 wt% желатин, показват намалена цитотоксичност, дължаща се на намаленото съдържание на стъклата, респективно на среброто в композитните материали. Използвайки получените данни, определяме, т.нар. средна инхибираща концентрация IC_{50} (концентрация, предизвикваща 50 % инхибиране на даден параметър, напр. растеж на клетки) за стъклата и композитите.

Резултатите са показани на **фиг. 13** и обобщени в **Табл. 16**.



Фигура 13. Оценка на IC_{50} в остеобластни MG-63 клетки след 24 часа третиране със стъкла и композитни материали.

Таблица 16. Изчислени стойности на IC_{50} за MG-63 клетки след 24 часа третиране със стъкла и композитни материали.

Съкла	IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	Композити	IC_{50} [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]
BG0	нетоксично	80BG0/20G	нетоксично
BG1	12.47	80BG1/20G	60.04
BG2	6.93	80BG2/20G	11.71
BG3	2.08	80BG3/20G	7.52

Проведеният МТТ анализ при използване на MG-63 клетъчна линия, ясно показва, че стъклата и композитите, в чиито състав е включено сребро, притежават токсичен ефект и не могат да бъдат използвани за създаването на биосъвместими материали в концентрации по-високи от IC_{50} (**Табл. 16**). По тази причина, всички последващи експерименти, са осъществени с концентрации до 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ BG0, BG1, 80BG0/20G и 80BG1/20G.

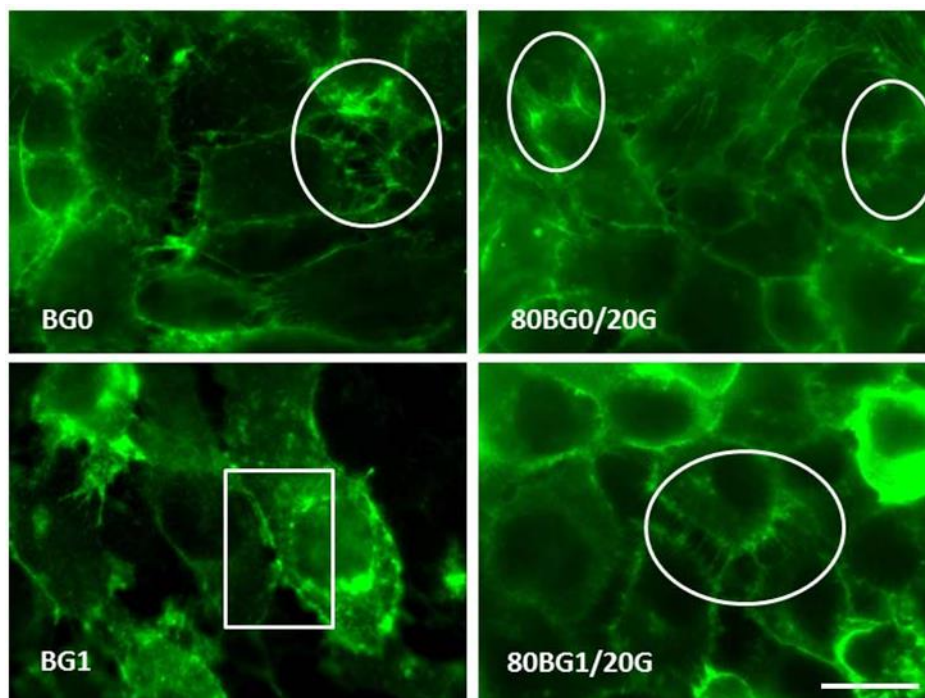
Имунофлуоресценция за F-актин и междуклетъчни контакти

Следваща стъпка в изследванията е да се провери, дали използването на $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ от стъклата BG0, BG1 и композитите 80BG0/20G, 80BG1/20G, ще повлияе клетъчния растеж и морфология при по-продължително третиране. За целта MG63 клетките, поставени в среда за остеобластна диференциация, се третират за 3 дни и общата морфология се визуализира чрез имунофлуоресценция за актин (FITC-фалоидин).

Резултатите са представени на **фиг. 14**. Те показват формиране на типичната клетъчна морфология (елипси), поддържаща се от характерната организация на клетъчния цитоскелет и специализирани адхезивни структури, които присъстват на границата на взаимодействието между две съседни клетки и екстрацелуларния матрикс (ECM). Междуклетъчните „плътни“ контакти (tight junctions) служат като бариера, възпрепятстваща преминаването на йони и малки молекули между клетките. Освен това те разделят плазмента мембрана на базолатерална и апикална повърхност и предотвратяват дифузията на мембранните липиди и гликопротеини между отделните региони, осигурявайки различието на мембранните компоненти в тези региони. Адхерентните контакти и дезмосомите осигуряват здрава адхезия между клетките, свързвайки цитоскелетните елементи, а с базалната мембрана повечето клетки взаимодействат чрез така наречените полу-дезмозоми, еквивалент на фокалните адхезионни контакти. Те от своя страна са свързани с актиновите филаменти от клетката в местата на контакт с ECM. Оцветяването за F-актин показва правилно формиране на всички клетъчни контакти при третиране с BG0, 80BG0/20G и 80BG1/20G (**фиг. 14**, елипси) за разлика от BG1 (**фиг. 14**, правоъгълник).

Остеобластите показват не само добра адхезия, правилно формиране на цитоскелет, но и развитие на типичната за тях асиметрично-разстлана морфология.

Както може да се види от **фиг. 14**, след 3 дни на култивиране, клетките MG-63 са добре свързани и напълно разстлани, показващи плоска форма и типична морфология (централно сферично тяло с цитоплазмено удължаване от централната област във всички посоки и прилепване към повърхността на материала). Съседните клетки образуват многобройни връзки една с друга. След 3 дни на култивиране, MG-63 формират плоски, многослойни пластове, покриващи повърхността на материала. Не се наблюдават цитотоксични отговори от страна на клетките за времето на култивиране.



Фигура 14. Формиране на клетъчен цитоскелет (зелено), фокални адхезионни комплекси и междуклетъчни контакти (обозначени с елипси) от MG63 клетки на третия ден от култивирането им в присъствие на $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ BG0, BG1, 80BG0/20G и 80BG1/20G. F-актин е визуализиран с FITC- фалоидин (зелено). Маркер = 50 μm .

Ализарин S оцветяване за минерализация

Способността на костната тъкан да регенерира е много голяма в сравнение с всеки друг вид тъкан. Това е така благодарение на способността на клетките на костния мозък да се диференцират в остеобласти и остеокласти. От остеобластите се изисква, да създават нова минерализирана костна тъкан, докато остеокластите са необходими за ремоделиране на новообразуваната кост.

Ефективността на даден биоматериал е свързана със способността му да насърчава диференциацията и минерализацията в костната тъкан. За да проверим, дали стъклата BG0, BG1 и композитите 80BG0/20G, 80BG1/20G притежават тази способност, ние изследваме възможността на клетките MG-63 да диференцират в остеостимулираща среда и присъствие на посочените образци.

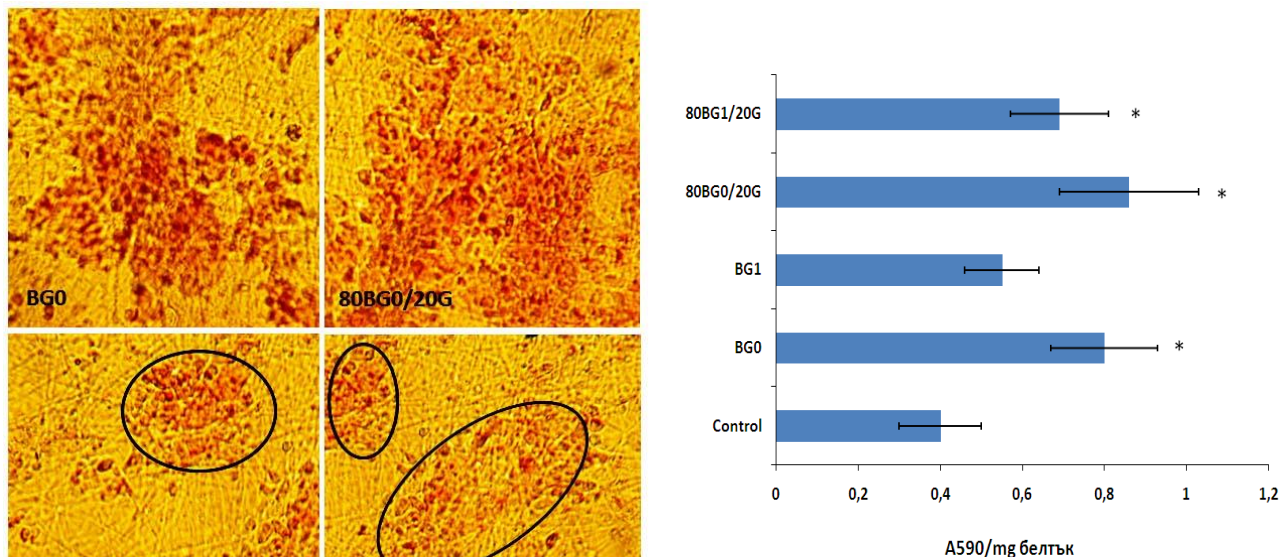
Във всички MG-63 клетки се наблюдават калциеви нодули (възловидни образувания), които се формират в следствие на индуцирана от стъклата или композитните материали диференциация.

За да се оцени, дали се наблюдава разлика във формирането на нодулите, ализариновото червено е екстрахирано и резултатите са нормализирани спрямо общото количество на белъка във всяка проба.

Резултатите показват, че йоните, освободени от BG и 80BG/20G допълнително стимулират клетъчната минерализация, както се потвърждава от оцветяването и количественото определяне (**фиг. 15**).

Установява се, че минерализацията под въздействието на BG0 и 80BG0/20G е достоверно увеличена 2 пъти по отношение на контролата, в която минерализацията е обусловена само от остеогенната среда. При образците BG1 и 80BG1/20G също се наблюдава тенденция за увеличаване на минерализацията, но в по-малка степен.

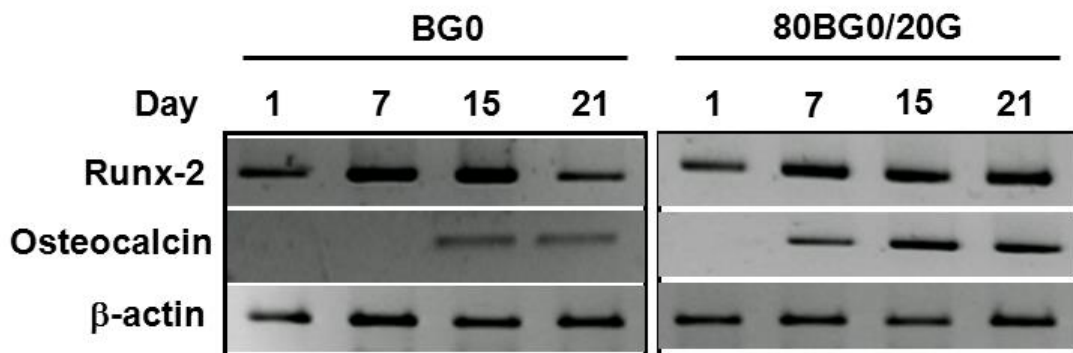
Резултатите от оцветяването с Alizarin Red S показват, че експозицията със Ag^+ йони може по-скоро да насърчава, отколкото да компрометира остеогенната диференциация на MG-63 клетките. Вероятно Ag^+ повишат минерализацията чрез промяна в експресията на специфични гени, свързани с костното образуване.



Фигура 15. Оцветяване с ализариново червено за минерализация. MG-63 клетки диференцират за 15 дни в присъствие на $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ стъкла BG0 и BG1 или композити 80BG0/20G и 80BG1/20G. Калцифицираните нодули (елипси) се появяват в яркочервен цвят (увеличение $\times 200$ ред 1, $\times 100$ ред 2). В дясната част на фигурата е представено количествено определяне на минерализацията, нормализирано спрямо тоталния клетъчен белтък. * $p < 0.05$ спрямо контролата ($n=3$).

За установим как се променят протеините, участващи в диференциацията на MG-63 клетките, ние изследваме Runx-2 (Runt-related transcription factor 2) и остеокладин. Runx-2 е ключов транскрипционен фактор, свързан с остеобластната диференциация.

Имуно-блот анализ за Runx-2 и остеокладин е показан на **фиг. 16**.



Фигура 16. Имуно-блот анализ за Runx-2 и остеокладин в диференциращи MG-63 клетки.

Анализът чрез имуно-блот (**фиг. 16**) показва повишено количество на Runx-2 след 7-я ден от третирането с BG0, и то остава такова и на 15-я ден. При третиране с 80BG0/20G, Runx-2 се запазва висок до 21-я ден. Това увеличение в белтъка Runx-2 е съпроводено и с увеличение на остеокалцина. Последният се повишава на 15-я ден за BG0 и още на 7-я ден за 80BG0/20G. Тези резултати показват, че BG0 и 80BG0/20G могат да предизвикат остеогенна диференциация.

Изводи

1. Синтезирани са SGBG в системата $70\text{SiO}_2\text{-}25\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$ с включени 1, 2 и 4 wt% Ag_2O . След термично третиране при 600°C за 6 часа се доказва, че с повишаване съдържанието на Ag_2O кристализират биоактивни фази, което е указание за евентуално катализиращо влияние на среброто върху формирането на тези съпътстващи биоактивни фази.
2. Получени са композитни материали със състав 80BG/20G. Те, заедно със SGBG проявяват много добра *in vitro* биоактивност в разтвор на 1,5 SBF, което е указание за възможността да бъдат използвани в костно-регенеративната медицина.
3. В резултат на проведеня анализ на SGBG и композитите се установява, че полученият НА е от вида $\text{B-CO}_3\text{HA}$. Този факт доказва, че след *in vitro* теста за биоактивност в 1,5 SBF на повърхността на образците се образува костоподобен CO_3HA , който е известен като биоапатит.
4. Стъклата и композитите, в чиито състав е включено сребро, притежават токсичен ефект върху изследваната клетъчна линия (MG63) и не могат да бъдат използвани за създаването на биосъвместими материали в концентрации по-високи $1\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$.
5. Стъклата и композитите, съдържащи до $1\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Ag_2O стимулират клетъчната минерализация и остеогенната диференциация на MG-63 клетките.

Заключения

Целта определена за настоящото изследване е постигната. Получени и охарактеризирани са серия желатин-съдържащи композитни материали на база SGBG в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$, притежаващи висока биоактивност и биосъвместимост.

Приноси

На основа на проведените изследвания по темата на дисертационния труд, могат да бъдат извадени следните приноси:

1. За първи път е проведено пълно, систематично изследване на SGBG в системата $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ с относително ниско съдържание на Ag_2O (до 4 wt%) като е доказано наличието на кристални, биоактивни фази (НА и Wt) след термично третиране на образците при 600°C в продължение на 6 часа.
2. За пръв път е доказано, че среброто (в SGBG и композитните желатин-съдържащи материали) има пряко катализиращо влияние върху *in vitro* биоактивността на образците, което не е констатирано в научната литература до момента.
3. Създадени са нови стъкла и композитни материали, съдържащи сребро, които могат да бъдат използвани в костно-регенеративната медицина.

Списък на публикациите по дисертацията

- 1) T. Dimova, L. Radev, I. Michailova, „Bioactive glasses and glass-ceramics in the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ system”, Industrial Technologies, Vol. IV (1), (2017), ISSN 13149911
- 2) T. Dimova, L. Radev, I. Michailova, „Sol-gel glasses in the $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Ag}_2\text{O}$ system: composition, properties and medical application”, Industrial Technologies, Vol. IV (1), (2017), ISSN 13149911
- 3) L. Radev, I. Michailova, D. Zaimova, T. Dimova, „In vitro bioactivity of Silver containing sol-gel glasses: FTIR analysis”, Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR), Vol – 3, Issue – 4, (2017), pages 316 – 323, ISSN: 2454-1362,
- 4) L. Radev, O. Kersten, I. Michailova, , T. Dimova, D. Zaimova „In vitro bioactive Gelatin/Silver containing sol-gel glasses composites: FTIR and SEM analysis”, Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR), Vol – 3, Issue – 7, (2017), pages 175 – 184, ISSN: 2454-1362

Благодарности

Специални благодарности на моите ръководители доц. д-р Лъчезар Радев, проф. д-р Маргарита Апостолова, които ме учеха, съветваха и отделяха от времето си за мен в личен и професионален план.

Благодаря на всички колеги от лабораториите и звената, в които работихме по дисертационния труд:

- 1) ХТМУ – София, Факултет Химични технологии, катедра „Основи на химичната технология“ и катедра „Полимерно инженерство“.
- 2) ХТМУ – София, Факултет по металургия и материалознание, където беше осъществен XRD-анализа. Специални благодарности на доц. д-р Ирена Михайлова.
- 3) БАН – Институт по молекулярна биология "Акад. Румен Цанев", където беше извършен микробиологичния анализ. Благодаря на целия екип, с който работи проф. д-р М. Апостолова, за техния изключителен професионализъм.
- 4) Anhalt University of Applied Sciences – Fachbereich 6, Elektrotechnik, Maschinenbau und Wirtschaftsingenieurwesen – Кьотен, Германия, където бяха анализирани образците посредством SEM-EDX. Специални благодарности на Prof. Dr. Otto Kersten както и на Stephan Weide, които ми предоставиха възможност и ме научиха да работя с микроскопска техника.
- 5) Anhalt University of Applied Sciences – Fachbereich 7 – Angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik - Кьотен, Германия. Благодаря на Prof. Dr. Georg Heup и на неговия екип за оказаната помощ на различни етапи от работата.
- 6) Благодарности за финансовата подкрепа от страна на МУ-Варна и DAAD.

Най-вече благодаря на моите скъпи родители и приятели, които ми помагаша, насърчаваха ме и се молеха за мен. Благодарна съм, че ви имам и винаги сте ми опора във всичко.

„За всичко имам сила и всичко мога чрез Онзи, Който ме подкрепя.“ (Фил. 4:13)