

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН

СӘТБАЕВ УНИВЕРСИТЕТІ

Институт металлургии и промышленной инженерии

Кафедра Инженерной физики

Чекиева Аружан Сунгатолдакызы

Синтез гидроксиапатита кальция и его применение для получения биологически растворимых матриц на основе полимерных волокон

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Специальность 7М05301 Прикладная и инженерная физика

Алматы 2021

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К.И.Сатпаева

Институт металлургии и промышленной инженерии

УДК 66.086.2

На правах рукописи

Чекиева Аружан Сунгатолдақызы

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

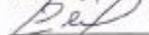
На соискание академической степени магистра

Название диссертации: Синтез гидроксипатита кальция и его применение
для получения биологически растворимых
матриц на основе полимерных волокон

Направление подготовки: 7M05301 – Прикладная и инженерная физика

Научный руководитель

Доктор PhD

 Р.Е.Бейсенов

«__» _____ 2021 г

Рецензент

Доктор PhD

 Ч.Б.Даулбаев

«21» 06 2021 г



Нормоконтроль

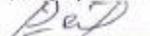
Магистр естественных наук,
тьютор

 А.У.Толенова

«__» _____ 2021 г

ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой ИФ
доктор PhD

 Р.Е.Бейсенов

«__» _____ 2021 г

Алматы 2021

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ
КАЗАХСТАН

СӘТБАЕВ УНИВЕРСИТЕТІ

Институт металлургии и промышленной инженерии

Кафедра Инженерной физики

7M05301 – Прикладная и инженерная физика

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой ИФ
Д-р философии (PhD)
 Р.Е.Бейсенов
«_____» _____ 2019 г.

ЗАДАНИЕ
на выполнение магистерской диссертации

Магистранту Чекиевой Аружан Сунгатолдакызы

Тема: Синтез гидроксипатита кальция и его применение для получения биологически растворимых матриц на основе полимерных волокон
Утверждена приказом *руководителя по университету №435–М от «03» декабря 2019г.*

Срок сдачи законченного проекта «11» июня 2021 г.

Исходные данные к диссертационной работе: Синтез гидроксипатита кальция из яичной скорлупы.

Перечень подлежащих разработке в магистерской диссертации вопросов:

- а) Выполнить обзор литературных источников по методам синтеза гидроксипатита кальция и методу электроформирования волокон;*
- б) Синтезировать гидроксипатит кальция из биологически отходного материала – яичной скорлупы, провести рентгенофазовый анализ синтезированного порошка, изучить морфологию поверхности порошка с помощью сканирующего электронного микроскопа;*
- в) Применить синтезированный порошок для получения композитных пленок методом электроформирования волокон;*

Рекомендуемая основная литература:

1. Moulton S.E., Wallace G.G. 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems // Journal of Controlled Release. 2014. Vol. 193. P. 27–34.

2. Kwee B.J., Mooney D.J. Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering // *Current Opinion in Biotechnology*. 2017. Vol. 47. P. 16–22.
3. Mao A.S., Mooney D.J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015. Vol. 112, № 47. P. 14452–14459.
4. Laurencin C.T., Khan Y. Regenerative engineering // *Sci Transl Med*. 2012. Vol. 4, № 160. P. 160ed9.
5. Giannitelli S.M. et al. Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering // *Acta Biomater*. 2014. Vol. 10, № 2. P. 580–594.

ГРАФИК
подготовки магистерской диссертации

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю и консультантам	Примечание
Анализ имеющейся литературы по теме исследования	01.10.2020-01.01.2021	
Синтез гидроксиапатита кальция из яичной скорлупы	01.01.2021-01.03.2021	
Применить синтезированный гидроксиапатит кальция для получения композитных пленок методом электроформирования	01.03.2021-01.06.2021	
Провести рентгенофазовый анализ, изучить морфологию поверхности синтезированных порошков	01.06.2021-01.08.2021	
Результаты исследования и их обсуждение	01.08.2021-01.11.2021	

Подписи

консультантов и нормоконтролёра на законченную магистерскую диссертацию с указанием относящихся к ним разделов диссертации

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф. (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Нормоконтролер	Магистр естественных наук, тьютор А.У.Толенова		

Научный руководитель

 Р.Е.Бейсенов

Задание принял к исполнению магистрант

 А.С.Чекиева

Дата

« » 20 г.

АҢДАТПА

Бұл жұмыста кальций гидроксипатитін (ГАП) кальций карбонатының биогенді көздерін, атап айтқанда тауық жұмыртқасының қабығындағы кальцитті синтездеу мүмкіндігі қарастырылады. ГАП ұнтағы сулы ерітіндіден қондыру әдісімен синтезделді. Бұл синтез әдісі бізге 95% тазалықтағы ГАП ұнтақтарын алуға мүмкіндік берді. Тәжірибелік жұмыс кезінде ультрадыбыстық өңдеу уақыты бөлшектерді ұзақ мерзімді термиялық өңдеуден гөрі біркелкілікпен қамтамасыз ететіндігі анықталды. Синтезделген ГАП ұнтағы полимерлі талшықтар негізінде биологиялық еритін қабықшаларды алу үшін қолданылды. Қабықшалар электроформалау әдісімен алынды. Препарат, атап айтқанда амоксициллин әр түрлі концентрацияда қабықшалардың ерітіндісіне қосылды. Эксперименттік жұмыс қабықшалардың қалыңдығы дәрілік зат концентрациясына байланысты болатындығын көрсетті. Сканерлеуші электронды микроскопия (SEM) және рентгендік дифракция (XRD) ГАП және қабықшаларды сипаттау үшін қолданылды.

АННОТАЦИЯ

В данной работе рассматривается возможность синтеза гидроксиапатита кальция (ГАП) с использованием биогенных источников карбоната кальция, а именно кальцита в скорлупе куриного яйца. Порошки ГАП были синтезированы методом осаждения из водного раствора. Данный метод синтеза позволил получить порошки ГАП с чистотой 95%. В ходе экспериментальных работ было обнаружено, что время обработки ультразвуком обеспечивает частицам однородности больше, чем длительная термообработка. Синтезированный порошок ГАП был применен для получения биологически растворимых пленок на основе полимерных волокон. Пленки были получены методом электроформирования. В раствор пленок в разных концентрациях был добавлен лекарственный препарат, в частности амоксициллин. Экспериментальные работы показали, что толщина пленок зависит от концентрации лекарственного вещества. Сканирующая электронная микроскопия (SEM) и рентгеновская дифракция (XRD) были применены для исследования характеристик ГАП и пленок.

ABSTRACT

In this paper, we consider the possibility of synthesizing calcium hydroxyapatite (HAP) using biogenic sources of calcium carbonate, namely calcite in the shell of a chicken egg. HAP powders were synthesized by precipitation from an aqueous solution. This synthesis method allowed us to obtain HAP powders with a purity of 95%. During experimental work, it was found that the ultrasonic treatment time provides particles with more uniformity than long-term heat treatment. The synthesized HAP powder was used to obtain biologically soluble films based on polymer fibers. Films were obtained by the method of electroforming. A drug, in particular amoxicillin, was added to the solution of films at different concentrations. Experimental work showed that the thickness of the films depends on the concentration of the drug substance. Scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD) were used to characterize HAP and films.

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	10
1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1	Биоматериалы, используемые в современной медицине и их свойства	11
1.2	Виды фосфатов кальция и их физико-химические свойства	13
1.3	Различные методы синтеза и области применения ГАП	17
1.3.1	Классификация методов осаждения из водного раствора	17
1.3.2	Композиты на основе ГАП	21
1.4	Метод электроспиннинга и его параметры	23
1.4.1	Процесс электроспиннинга	24
1.4.2	Параметры, влияющие на процесс электроспиннинга	26
2	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	32
2.1	Синтез ГАП	32
2.2	Получение композитных пленок с добавлением ГАП	32
2.3	Рентгенофазовый анализ	32
2.4	Метод сканирующей электронной микроскопии	33
3	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	34
3.1	Синтез ГАП	34
3.2	Получение пленок на основе полимерных волокон с добавлением ГАП	37
3.3	Рентгенофазовый анализ	39
3.4	Метод сканирующей электронной микроскопии	40
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	43
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	44

ВВЕДЕНИЕ

Данная диссертационная работа посвящена исследованию метода синтеза порошкообразного гидроксиапатита кальция, и его применению в композитных пленках, полученных методом электроформирования.

Актуальность темы. Ввиду актуальности биосовместимости материалов в медицине и охраны окружающей среды в последние годы стремительно растет объем исследований по созданию новых биоматериалов и улучшению характеристик существующих.

Гидроксиапатит $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, ГАП] является наиболее подходящим материалом для замены твердых тканей из-за его химического сходства с минеральными частями твердых тканей. Синтетические керамические материалы на основе Ca и P, особенно в составе трикальцийфосфата (ТКФ) и ГАП, используются в биомедицине. При имплантации они проявляют биологическое сродство и активность к окружающим тканям хозяина. Гидроксиапатит обладает множеством преимуществ: он биосовместим, остеокондуктивен, невоспалителен, нетоксичен, не иммуногенен и биологически активен. Еще одним преимуществом является то, что соотношение Ca/P в ГАП аналогично соотношению костей человека. Порошок гидроксиапатита может быть синтезирован различными способами, включая методы мокрого осаждения, гидротермальные методы, гидролиз, золь-гель и т.д. Но данная экспериментальная работа основана на синтезе ГАП из биогенных материалов, которые доступны в больших количествах в природном источнике или продукте биоотходов.

Применимость биоматериалов, полученных в лабораторных условиях, определяется такими характеристиками образцов, как их структура, состав и кристалличность: все эти параметры зависят от конкретных параметров синтеза. Гидроксиапатит обычно применяется для покрытий имплантатов, зубных цементов и зубных паст благодаря высокой биоактивности этого соединения и возможности создания композиционных материалов на его основе.

Цель работы. Целью данной работы является поиск оптимальных параметров синтеза кристаллического ГАП с использованием яичной скорлупы в качестве источника кальция, а также изучение свойств и характеристик синтезированных образцов.

1.1 Биоматериалы, используемые в современной медицине и их свойства

Многие ткани человека имеют ограниченную регенеративную способность, поэтому травмы и дегенерация обычно приводят к значительным повреждениям. Использование современных подходов таких как, адресная доставка лекарственных препаратов [1], тканевая инженерия [2], регенеративная медицина [3] и регенеративная инженерия [4], направленные на регенерацию поврежденных тканей и восстановление их функций позволит решить данные проблемы. Благодаря достижениям в области материаловедения, инженерии, биологии и химии был достигнут огромный прогресс в регенерации тканей с лучшей рекапитуляцией анатомических структур и функциональным восстановлением[5,6].

Традиционные терапевтические методы развились в направлении получения более эффективных методов лечения с учетом повышения специфичности и безопасности. В этой связи нанотехнологии становятся перспективным решением для разработки новых систем доставки контрастных веществ или лекарственных препаратов к конкретным мишеням [7]. Благодаря своим особым размерам наночастицы (НЧ) обладают более высокой селективностью и специфичностью к определенной мишени, а также высокой удельной площадью поверхности, способной к модификации поверхности, по сравнению с более крупными частицами, такими как микрочастицы [8]. Модификация поверхности наночастиц позволяет точно доставлять лекарственные препараты в клетки-мишени, такие как опухолевая ткань или бактерии. В дополнение к этим преимуществам НЧ способны выводиться через печень и почки, легче, чем частицы более крупного размера, демонстрируя надежную биосовместимость и, в некоторых случаях, способность к биологическому разложению.

Ввиду актуальности биосовместимости материалов в медицине и охраны окружающей среды в последние годы стремительно растет объем исследований по созданию новых биоматериалов и улучшению характеристик существующих. Новый биоматериал восстанавливает или заменяет поврежденную ткань путем прямого включения в этот проблемный орган с целью увеличения продолжительности жизни [9].

Биоматериал – это, как правило, синтетический или природный компонент, который вместе с клетками составляет целую или часть живой структуры или биомедицинского устройства (имплантаты, реагенты *in vitro* и т.д.) способного выполнять, заменять или усиливать естественную функцию, не вызывая каких-либо нежелательных токсических реакций на окружающие

ткани/кости (т. е. нетоксичный, нетромбогенный, неиммуногенный, не канцерогенный, не раздражающий материал). В принципе, любой материал, который вступает в контакт с биологической системой или становится ее неотъемлемой частью, может быть назван биоматериалом, а материал, приемлемый для биологической системы без неблагоприятных последствий или каких-либо побочных эффектов, называется биосовместимым.

Уильямс [10] определяет биоматериал следующим образом: «Биоматериал – это вещество, которое было сконструировано таким образом, чтобы принимать форму, которая сама по себе или как часть сложной системы используется для управления путем контроля взаимодействий с компонентами живых систем ходом любой терапевтической или диагностической процедуры в медицине человека или ветеринарии». Аналогично биосовместимость определяется как «способность биоматериала выполнять свою желаемую функцию по отношению к медицинской терапии, не вызывая каких-либо нежелательных местных или системных эффектов у пациента или получателя этой терапии» [11].

Биоматериалы используются в стоматологии, хирургии и доставке лекарств. Каждый имплантируемый материал должен быть биосовместимым, а это означает, что воспаление или реакция инородного тела не должны возникать в живой системе и ткани. В свою очередь, фосфат кальция широко используется в регенерации костной ткани, поскольку он обладает остеокондуктивными, а в некоторых случаях и остеоиндуктивными свойствами. Фосфаты кальция являются биосовместимыми, поскольку они могут растворяться в жидкостях организма и присутствуют в больших количествах в твердых формах.

Гидроксиапатит (ГАП), представляющий собой естественную форму фосфата кальция, нашел широкое применение в регенерации костной ткани [12]. Химическая формула ГАП – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ с соотношением Ca/P 1,67 [13,14]. ГАП может быть получен естественным образом, однако различные ионы и вакансии образуют дефектные структуры. Поэтому ГАП, применяемый в реальных исследованиях или клинических приложениях, получают синтетическим путем [15]. Стехиометрические структуры могут иметь как моноклинную, так и гексагональную фазы, но в биологических средах они принимают гексагональную фазу, которая является более стабильной структурой [16,17]. ГАП является наиболее стабильным фосфатом кальция с низкой растворимостью в физиологических средах, определяемых температурой, pH, жидкостями организма и т. д. [18,19], а поверхность ГАП может выступать в качестве места зарождения костных

минералов в жидкостях организма [20,21]. Кроме того, ГАП не вызывает воспалительных реакций при клиническом применении [22].

1.2 Виды фосфатов кальция и их физико-химические свойства

Фосфаты кальция – это минералы, состоящие из катионов кальция и анионов фосфата. Они известны как основной неорганический материал который содержится в 60% всех природных человеческих костей (Таблица 1). Существование фосфатов кальция в костных тканях было впервые открыто в 1769 году, а в 1800-х годах фосфаты кальция, существующие в костных тканях, были подразделены на различные категории (Рисунок 1) [23,24]. С 1900-х годов синтетические фосфаты кальция активно изучаются для клинического применения [25–27]. После этого появились костные цементы, каркасы, имплантаты и методы покрытия с использованием фосфатов кальция, а некоторые из них были коммерциализированы [28–30]. Так же, были изучены свойства фосфатов кальция для применения их в регенеративной медицине.

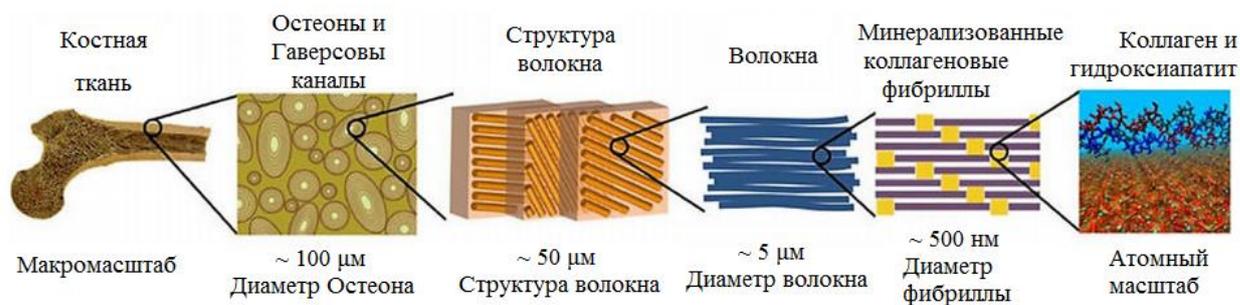


Рисунок 1 – Иерархическая структура костной ткани от макромасштабного скелета до наноразмерного коллагена и ГАП [31]

Свойства фосфатов кальция влияют на биологическую активность, такую как адгезия, пролиферация и образование новых костных тканей в остеобластах. Для проявления этих биоактивных свойств важны деградация и высвобождение ионов в фосфатах кальция [32]. Эти явления повышают локальную концентрацию ионов кальция и фосфата и стимулируют образование костных минералов на поверхности фосфатов кальция. Фосфаты кальция играют важную роль в адгезии клеток и формировании тканей, влияя на адсорбцию белков внеклеточного матрикса на поверхности [33,34]. Их свойства также влияют на регенерацию костной ткани, воздействуя на новообразованные костные минералы [35].

Твердые ткани позвоночных состоят в основном из неорганических соединений (Таблица 1), в совокупности называемых биологическим апатитом. Апатит является общим термином для кристаллических минералов

и может быть представлен формулой $M_{10}(ZO_4)_6X_2$. Каждый компонент (M, ZO_4 и X) в формуле может быть заменен большим количеством различных ионов, перечисленных ниже [36]:

$M = Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, H^+, Na^+, K^+, Al^{3+}$, и.т.д.

$ZO_4 = PO_4^{3-}, AsO_4^{3-}, VO_4^{3-}, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, SiO_4^{4-}$, и.т.д.

$X = OH^-, F^-, Cl^-, Br^-, O_2^-, CO_3^{2-}$, и.т.д.

Таблица 1 – Типичные значения состава неорганической фазы кальцифицированных тканей взрослого человека [37]

Состав	Эмаль	Дентин	Кость	Гидроксиапатит
Кальций [мас. %]	36.5	35.1	34.8	39.6
Фосфор [мас. %]	17.7	16.9	15.2	18.5
Ca/P (молярное отношение)	1.63	1.61	1.71	1.67
Натрий [мас. %]	0.5	0.6	0.9	–
Магний [мас. %]	0.44	1.26	0.72	–
Калий [мас. %]	0.08	0.05	0.03	–
Карбонат [мас. %]	3.5	5.6	7.4	–
Фторид [мас. %]	0.01	0.06	0.03	–
Хлорид [мас. %]	0.3	0.01	0.13	–
Пирофосфат [мас. %]	0.022	0.1	0.07	–
Общее количество неорганических веществ [мас. %]	97	70	65	100
Общее количество органических веществ [мас. %]	1.5	20	25	–
Вода [мас. %]	1.5	10	10	–
Продукты воспламенения	β -ТКФ + ГАП	β -ТКФ + ГАП	ГАП + CaO	ГАП

Наиболее распространенным апатитом, встречающимся в природе, является кальций фосфатный апатит, где M и ZO_4 являются Ca^{2+} и PO_4^{3-} соответственно. Когда X равен OH^- (то есть $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$; стехиометрическое молярное отношение Ca/P равно 1,67), апатит называют гидроксилapatитом [38], традиционно также называемым гидроксиapatитом (ГАП).

Стехиометрический ГАП относится к гексагональной кристаллической системе [39] и имеет две основные кристаллические плоскости: плоскость a и плоскость c (Рисунок 2). Широко распространено мнение, что плоскость a богата ионами кальция и, следовательно, положительно заряжена, тогда как плоскость c богата фосфатными и гидроксидными ионами и, следовательно, отрицательно заряжена [40,41]. То есть поверхности ГАП проявляют анизотропные свойства [41]. Заметим, что поверхностный ионный состав (а следовательно, и поверхностный заряд) ГАП в водной среде изменяется в зависимости от ионного состава среды из-за ионного обмена [42] и постепенного растворения [43].

ГАП является биоактивным (остеокондуктивным); таким образом, ГАП обладает способностью стимулировать рост костной ткани вдоль ее поверхности при размещении вблизи жизнеспособной костной ткани или дифференцированных костеобразующих клеток [44]. ГАП является одним из многих типов ортофосфатов кальция, перечисленных в таблице 2 [45], и некоторые другие фосфаты кальция, которые показывают более высокую растворимость, чем ГАП, также используются в стоматологии и медицине [45,46].

Биологический апатит – это нестехиометрическая форма ГАП, содержащая микро-ионы и дефицитный Ca^{2+} . Следовые ионы включают положительно заряженные ионы (такие как Mg^{2+} , Na^+ и K^+) и отрицательно заряженные ионы (такие как CO_3^{2-} , Cl^- и F^-), а наиболее распространенным замещающим ионом является карбонат (CO_3^{2-}), который может заменить OH^- и PO_4^{3-} соответственно [39]. В зависимости от типа твердой ткани биологический апатит имеет различную морфологию кристаллов. Например, в костной ткани оси c кристаллитов (около $50 \text{ нм} \times 25 \text{ нм} \times 4 \text{ нм}$ [47]) параллельны расширяющимся коллагеновым волокнам, что приводит к раскрытию плоскостей a на поверхности костной ткани (Рисунок 2). Напротив, в зубной эмали более крупные кристаллиты (около $100 \text{ нм} \times 25 \text{ нм} \times 70 \text{ нм}$ [48]) образуют эмалевые призмы, простирающиеся от дентино-

эмалевого соединения, в результате чего образуются с плоскости, преимущественно параллельные поверхности эмали.

Таблица 2 – Основные фосфаты кальция и их свойства [44]

Молярное соотношение Са/Р	Химическая формула	Название	Растворимость в воде при 25 °С (г/л)	Диапазон стабильности рН при 25 °С
0.5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Моногидрат монокальцийфосфата	~18	0-2
0.5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Безводный монокальцийфосфат	~17	^a
1.0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Дигидрат дикальцийфосфата (брушит)	~0.088	2-6
1.0	CaHPO_4	Дикальцийфосфат безводный (монетит)	~0.0048	^a
1.2-2.2	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (n = 3–4.5)	Аморфный кальций фосфат	^b	~5-12 ^c
1.33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Октакальцийфосфат	~0.0081	5.5-7
1.5	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	α -Трикальцийфосфат	~0.0025	^d
1.5	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	β -Трикальцийфосфат	~0.0005	^d
1.5-1.67	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_6 \cdot x(\text{OH})_2$ (0 < x < 1)	Гидроксиапатит с дефицитом кальция	~0.0094	6.5-9.5
1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Гидроксиапатит	~0.0003	9.5-12
2.0	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	Тетракальцийфосфат (гильгенштокит)	~0.0007	^d

^a Стабильна при температуре выше 100°С.

^b Не может быть точно измерено.

^c Всегда метастабильна.

^d Эти соединения не могут быть осаждены из водных растворов.

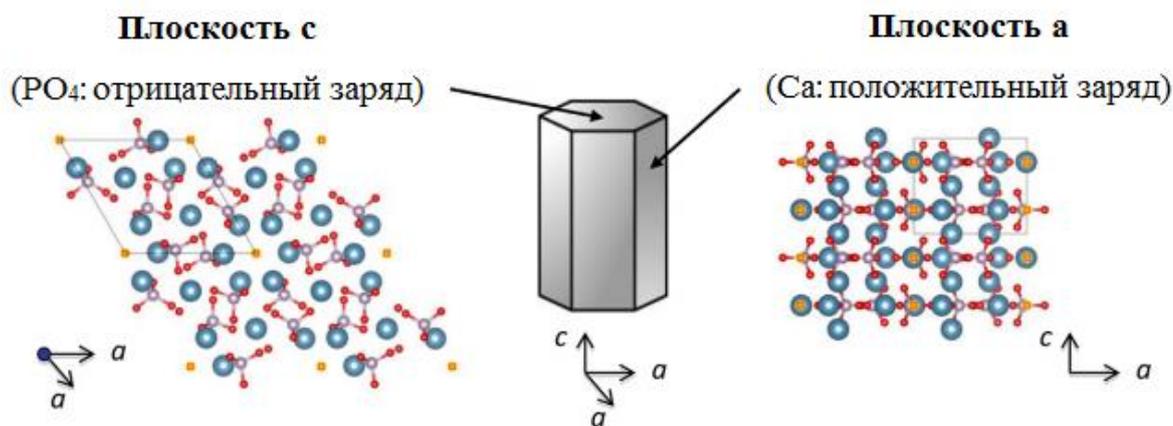


Рисунок 2 – Кристаллическая структура [49] и схематическая иллюстрация стехиометрического гидроксиапатита (ГАП). ГАП содержит в своей структуре как катионы, так и анионы и обладает высоким средством к органическим молекулам. Синие, белые, красные и желтые сферы – это Ca, P, O и OH соответственно. Источник: Momma и Izumi [50]

1.3 Различные методы синтеза и области применения ГАП

ГАП и композиты на его основе синтезируются осаждением из водного раствора, сухим и высокотемпературным методами из фосфатных и кальциевых предшественников, а также из недорогих природных биопластов. Биопласты включают костные ткани позвоночных, яичную скорлупу и морские раковины. Свойства конечного продукта зависят от типа используемого прекурсора и используемых методов синтеза.

1.3.1 Классификация методов осаждения из водного раствора

Методы осаждения из водного раствора можно классифицировать как: метод осаждения, золь-гель метод, гидротермальный метод, микроволновый метод и сонохимический метод. Эти методы обеспечивают высокий выход ГАП с идеальной структурой, текстурой и морфологией.

Метод осаждения

Осаждение является широко используемым методом синтеза ГАП. Способ включает постепенное перемешивание прекурсоров (удельное молярное соотношение), контролируемым образом и непрерывное перемешивание в течение определенного периода. Щелочной pH должен поддерживаться добавлением кислоты/основания и при комнатной или умеренно высокой температуре. После выдерживания реакционной смеси в течение определенного времени (выдержки) полученный осадок должен быть отделен центрифугированием, за которым следует многократная промывка водой для удаления непрореагировавших компонентов. Позже осадок сушат

в духовке при определенной температуре и времени, чтобы получить высушенные наночастицы ГАП, а затем измельчают, чтобы получить порошкообразный ГАП. Структура и свойства ГАП зависят от соотношения Са/Р, капельного добавления прекурсоров, температуры, рН и добавления специфических диспергаторов [51].

Основными преимуществами этого метода являются низкая температура реакции, низкая стоимость, простота эксплуатации, мелкие частицы и высокая чистота. Недостатками являются образование неоднородных частиц и агломерация. Точный контроль технологических параметров, таких как температура, рН, медленное добавление прекурсоров, время процесса и многократные промывки улучшает чистоту в целом [52,53].

Золь-гель метод

Золь-гель метод используется для производства керамики уже более двух десятилетий. Метод минерализации золь-гель процесса использует прекурсоры из соответствующих металлоорганических соединений в растворе. Методы синтеза пористого ГАП из золь-геля в условиях мягкой химии имеют значительно более низкие, чем у традиционного метода, температуры [54,55]. Крупномасштабное внедрение золь-гель процесса имеет ограничения из-за высоких затрат, часто используемых алкоксидных прекурсоров, а также трудоемких процедур [56]. Во время золь-гель образования потребность в повышенной температуре и рН, смеси природных прекурсоров и химических веществ влияют на чистоту конечного продукта. В дальнейшем контроль нескольких параметров при образовании ГАП может привести к получению вторичной фазы СаО, Са₂Р₂О₇, Са₃(РО₄)₂ и СаСО₃ [57–59].

Гидротермальный метод

Другим широко используемым методом получения ГАП является гидротермальный метод, который включает химические реакции между предшественниками кальция и фосфата при температуре и давлении выше, чем у окружающей среды. Этот метод протекает в присутствии или отсутствии нескольких органических растворителей, поверхностно-активных веществ, диспергаторов, шаблонов и т. д., которые влияют на структуру ГАП. Обычно реакции происходят внутри автоклава или сосуда под давлением. Как правило, этот метод сочетается с другими традиционными методами, такими как осаждение и золь-гель методы. Сообщается, что гидротермальный метод может обеспечить высококристаллический и стехиометрический ГАП [60]. Морфологией, кристалличностью и

пористостью ГАП можно управлять, правильно контролируя давление и температуру реакционного сосуда [61].

Микроволновый метод

Традиционные методы синтеза ГАП имеют несколько недостатков, таких как высокая стоимость, высокая температура и давление. Микроволновое (МВ) облучение служит источником быстрого нагрева и позволяет синтезировать моодисперсные наночастицы ГАП за короткое время. Кроме того, МВ методы являются энергоэффективными и дают воспроизводимые результаты с высокой кристалличностью. Этот метод также интегрирован с традиционными методами для быстрого синтеза ГАП и повышения производительности [62]. Моодисперсная иерархическая микросфера ГАП играет важную роль в доставке лекарств.

Сонохимический метод

Сонохимический метод является очень быстрым и энергоэффективным, который использует ультразвуковое излучение для синтеза ГАП. Сообщается, что при увеличении времени воздействия ультразвуковых волн образуются небольшие стержневидные наночастицы ГАП с равномерным распределением частиц по размерам [63]. Кроме того, ультразвуковые волны индуцируют фазовый переход при синтезе.

Синтез ГАП из биологического материала

Вышеупомянутые методы требуют как кальциевых, так и фосфатных прекурсоров для получения наночастиц ГАП. В большинстве случаев для уменьшения образования примесей предпочтительна чистая форма прекурсоров. Однако природные биоресурсы, такие как яичная скорлупа, костные ткани различных животных/рыб/птиц, раковины водных существ, немногие водные растения и некоторые промышленные отходы, могут быть использованы в качестве источника предшественника кальция. Замещение природных ресурсов не только снижает стоимость, но и обеспечивает эффективный способ переработки отходов и извлечения ценных соединений. Кроме того, естественно экстрагированный ГАП имитирует особенности человеческой костной ткани и, следовательно, биосовместим и биологически активен. Естественно экстрагированный или синтезированный ГАП является нестехиометрическим из-за наличия микроэлементов и, таким образом, напоминает химический состав человеческой костной ткани [64]. Поэтому естественно экстрагируемый ГАП играет важную роль в биомедицинских приложениях, таких как ортопедические и зубные имплантаты [53].

Костные ткани млекопитающих от таких животных, как корова, верблюд, лошадь и свинья, используются в качестве природного ресурса для извлечения ГАП. В частности, широко использовались костные ткани крупного рогатого скота из-за их физико-химического сходства с апатитом человеческой костной ткани. Как правило, первым этапом извлечения ГАП из костных тканей крупного рогатого скота является предварительная обработка, включающая резку, промывку и очистку кипятком для удаления грязи, жировых белков, костных кабачков и мягких тканей в течение определенного периода [65]. Иногда для удаления прилипших компонентов используют органические растворители, такие как хлороформ, ацетон, поверхностно-активные вещества и растворы щелочей. Второй этап – прокаливание очищенных костных тканей в печи при очень высокой температуре для полного удаления органических соединений и синтеза определенного структурного ГАП [66].

Свойства ГАП зависят от температуры прокаливания и времени, используемого в процессе синтеза. В целом, увеличение температуры прокаливания дает чистый, высококристаллический, большой размер кристаллита с менее пористым ГАП.

Увеличение потребления рыбы приводит к образованию значительного количества отходов, таких как рыба чешуя и костные ткани, которые являются значительным источником кальция, фосфатов и карбонатов [67]. Получение ГАП из этих отходов снижает общую стоимость процесса синтеза и уменьшает количество образующихся твердых отходов. Подобно предварительной обработке бычьих костных тканей, рыбы костные ткани и чешуя также должны быть предварительно обработаны, чтобы удалить плоть и мусор, присутствующие в них. Позже предварительно обработанные рыбы костные ткани подвергают кальцинации.

Яичная скорлупа имеется в изобилии. Яичная скорлупа в основном состоит из карбоната кальция ($\approx 94\%$) [68], который может быть использован в качестве заменителя кальция при синтезе ГАП. Поэтому в данной работе были использованы отходы яичной скорлупы в качестве источника кальция для синтеза высокочистого нанокристаллического порошка ГАП. Данный метод синтеза состоит из очистки яичной скорлупы и прокаливания сырой скорлупы с образованием CaO , превращения CaO в Ca(OH)_2 , реакцию между Ca(OH)_2 и подходящим предшественником фосфора для получения трикальцийфосфата (ТКФ). В конце концов, реакция между ТКФ и CaO дает наночастицы ГАП.

Костные ткани и раковины, описанные выше, играют роль замены предшественников для синтеза ГАП. В отличие от этого, различные части растительных источников не заменяют предшественников, но различные биомолекулы, существующие в растительном экстракте, влияют на размер ГАП. Биомолекулы, полученные из различных растительных источников, таких как пектин [69–71], могут помочь в контроле кристаллической структуры, размера и морфологии ГАП.

1.3.2 Композиты на основе ГАП

Для повышения механической прочности, биосовместимости и биоактивности или обеспечения некоторых специфических свойств ГАП покрывают или легируют природными органическими (хитозан, коллаген, желатин, фибрин, альгинат, агарозу и целлюлозу) или неорганическими соединениями (Fe, Pb, Zn и Ce) [72]. Те же методы, описанные выше, используются для синтеза композитов ГАП.

ГАП, покрытый органическими соединениями

Один из природных биополимеров – хитозан обладает хорошей биodeградируемостью, хорошей стойкостью в щелочных условиях и хорошей растворимостью в растворах органических кислот. Таким образом, композит, состоящий из ГАП-хитозана, имеет множество биомедицинских применений, таких как ортопедические, остеокондуктивные, стоматологические и лекарственные средства доставки. Пистон и другие [73] продемонстрировали превосходную биоактивность композита хитозан-ГАП-магнетит по сравнению с голым хитозаном и композитом хитозан-ГАП. Композит готовили методом титрования. Аналогичным образом были синтезированы различные композиты, такие как хитозан-ГАП, Mg-хитозан-ГАП, Zn-хитозан-ГАП, Sr-хитозан-ГАП и Si-хитозан-ГАП, и сообщалось об их применении в несущих конструкциях костной ткани [74].

Коллаген – это волокнистый белок, который в изобилии содержится во внеклеточных матрицах позвоночных животных. Композит коллаген-ГАП обладает превосходной механической прочностью с хорошими биологическими характеристиками и остеоиндукцией. Сообщалось, что пористая структура позволяет использовать их в качестве наполнителей костных дефектов и носителей контролируемого высвобождения лекарств непосредственно в костную ткань [75]. Цитотоксичность и антибактериальная эффективность гентамицин-ГАП-коллагенового композита, полученного методом титрования, была исследована Осима и другими [76] и было доказано, что этот нанокомпозит является хорошим кандидатом для предотвращения начальных костных инфекций. Аналогично эффективность различных антибиотиков, нагруженных композитом

коллаген-ГАП, была изучена Эгавой и другими [77] для лечения остеомиелита золотистого стафилококка у крыс.

Другой биополимер, целлюлоза, также широко используется для получения композитов с ГАП, поскольку целлюлоза и ее производные обладают хорошей механической прочностью, биосовместимостью, химической стабильностью, нетоксичностью, низкой стоимостью и простыми методами изготовления с регулируемой пористостью [78]. Применение костно-тканевой инженерии и адсорбционная способность белка ГАП-целлюлозного нанокompозита, синтезированного сонохимическим методом, были изучены в работах [79] и [72] соответственно. Аналогично сообщалось об антибактериальной активности композита оксид графена/ГАП/целлюлоза, полученного сонохимическим методом [80].

ГАП, покрытый неорганическими соединениями

Помимо вышеупомянутых биополимеров, ГАП может быть покрыт тяжелыми металлами для повышения специфических свойств, таких как антибактериальная активность, биоминерализация, костеобразование и адсорбционная способность. Например, ГАП, покрытый серебром (ГАП-Ag), усиливает антибактериальную активность. В работе [81] продемонстрировали повышенную антибактериальную активность против *E. coli* и *S. aureus* легированного серебром ГАП-альгината, полученного методом осаждения. Аналогичные результаты показали и другие исследователи [82,83].

ГАП, покрытый магнитными наночастицами, такими как магнетит, гематит используется в качестве магнитно извлекаемых адсорбентов и улучшает адсорбционную способность для удаления различных загрязняющих веществ, присутствующих в сточных водах. Например, ГАП, покрытый композитом Fe_3O_4 , полученным химическим осаждением, обладал лучшей адсорбционной способностью, чем ГАП для удаления ионов свинца [84]. Точно так же имеются сообщения об удалении урана [85], кадмия и цинка [86], свинца и метиленового синего красителя [87], эриохромного черного-Т красителя [88] и парабенов [89] с помощью магнитно-легированных композитов ГАП.

Покрытие ГАП цинком усиливает пролиферацию остеобластов, которая имеет много биомедицинских применений. ГАП, покрытый Zn, был получен золь-гель методом в работе [90]. Увеличение концентрации ионов Zn усиливает антибактериальную активность композита ГАП с покрытием Zn, полученного методом осаждения [91]. Показано, что нанокompозит ГАП-Ag-ZnO, полученный методом осаждения, обладает хорошей антибактериальной активностью и биосовместимостью. Несколько примеров композитов ГАП с органическим/неорганическим покрытием и их применения приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Композиты ГАП с органическим/неорганическим покрытием и их применение

Композит	Метод синтеза	Применение	Ссылка
ГАП-хитозанмагнетит	Осаждение	Инженерия костной ткани – Рост костей	[73]
ГАП-коллаген Гентамицин	Осаждение	Инженерия костной ткани – цитотоксичность и антибактериальная эффективность	[76]
ГАП-целлюлоза	Сонохимический метод	Инженерия костной ткани – Минерализация остеобластоподобных клеток	[79]
ГАП-Альгинат серебра	Осаждение	Инженерия костной ткани – Антибактериальная активность	[81]
ГАП покрытый Fe ₃ O ₄	Осаждение	Восстановление окружающей среды – Удаление свинца	[84]
ГАП покрытый Zn	Осаждение	Инженерия костной ткани – Антибактериальная активность	[91]

1.4 Метод электроспиннинга и его параметры

Электроспиннинг – очень старая техника, изобретенная в 1897 году Рэлеем [92]. В 1700-х годах на воде наблюдались электростатические эффекты. В начале 20-го века Кули и Мортон смогли получить электропряденные волокна. Вращающийся электрод был добавлен в установку электроспиннинга Кули. Пряжа была произведена методом электропрядения в 1930 году Формальсом без фильеры. Он запатентовал процесс и аппарат [92–95]. После этого Формальс получил патент на получение композитных волокон из нескольких полимеров другим методом электростатического получения полимерных волокон.

Капля раствора полимера помещается в сильное электрическое поле. Тейлор изучал форму капли в 1969 году. Капля образует конус со струями, выбрасываемыми из вихрей. Этот конус позже был назван «конусом

Тейлора». Кроме того, были изучены факторы, влияющие на стабильность волокна, такие как электрическое поле, скорость потока и условия эксперимента [96–98].

Электроспиннинг производит волокна с очень низкими скоростями по сравнению с обычными методами прядения. Обычное прядение дает пряжу со скоростью 200-1500 м/мин, в то время как электроспиннинг – только со скоростью 30 м/мин [92,93,99,100]. Поэтому до 1990 года очень немногие отрасли промышленности интересовались техникой электроспиннинга для производства волокон. Прядение расплава было наиболее предпочтительным методом получения волокон с использованием природных и синтетических полимеров. Однако этот метод не позволяет получать волокна диаметром в нанометровом диапазоне [93,99,101].

В настоящее время использование электропряденных нановолокон, изготовленных методом электроспиннинга, приобретает все больший интерес для широкого круга потенциальных применений [92,99].

1.4.1 Процесс электроспиннинга

Электроспиннинг – это технология прядения, которая представляет собой уникальный подход, использующий электростатические силы для получения тонких волокон из полимерных растворов или расплавов, и полученные таким образом волокна имеют более тонкий диаметр (от нанометра до микрометра) и большую площадь поверхности, чем те, которые получены в результате обычных процессов прядения. Кроме того, для генерации электроспиннинга необходимо постоянное напряжение в диапазоне нескольких десятков кВ. Этот процесс в основном основан на принципе, что сильные электрические силы отталкивания преодолевают более слабые силы поверхностного натяжения в заряженной полимерной жидкости [102].

В настоящее время существуют две стандартные установки электроспиннинга – вертикальная и горизонтальная. С расширением этой технологии несколько исследовательских групп разработали более сложные системы, которые могут производить более сложные нановолокнистые структуры более контролируемым и эффективным образом [103,104]. Электроспиннинг проводят при комнатной температуре с атмосферными условиями. Типичная установка аппарата метода электроспиннинга показана на рисунке 3 (а и б). Система электроспиннинга состоит из трех основных компонентов: высоковольтного источника питания, фильеры (например, наконечника пипетки) и заземленной собирающей пластины (обычно металлического экрана, пластины или вращающейся оправки) и использует

источник высокого напряжения для введения заряда определенной полярности в раствор полимера или расплав, который затем ускоряется в направлении коллектора противоположной полярности [105,106]. Большая часть полимеров растворяется в некоторых растворителях перед процессом электроспиннинга, а когда он полностью растворяется, образует полимерный раствор. Затем полимерная жидкость вводится в капиллярную трубку для электроспиннинга. Однако некоторые полимеры могут испускать неприятные или даже вредные запахи, поэтому процессы следует проводить в камерах, имеющих систему вентиляции [107]. В процессе электроспиннинга раствор полимера, удерживаемый его поверхностным натяжением на конце капиллярной трубки, подвергается воздействию электрического поля, и благодаря этому электрическому полю на поверхности жидкости индуцируется электрический заряд. Когда приложенное электрическое поле достигает критического значения, электрические силы отталкивания преодолевают силы поверхностного натяжения. В конце концов заряженная струя раствора выбрасывается из кончика конуса Тейлора, и в пространстве между кончиком иглы и коллектором происходит неустойчивое и быстрое взбивание струи, что приводит к испарению растворителя, оставляя после себя полимер [108–110]. Струя устойчива только на кончике фильеры, и после этого начинается нестабильность. Таким образом, процесс электроспиннинга представляет собой упрощенную технику формирования волокон.

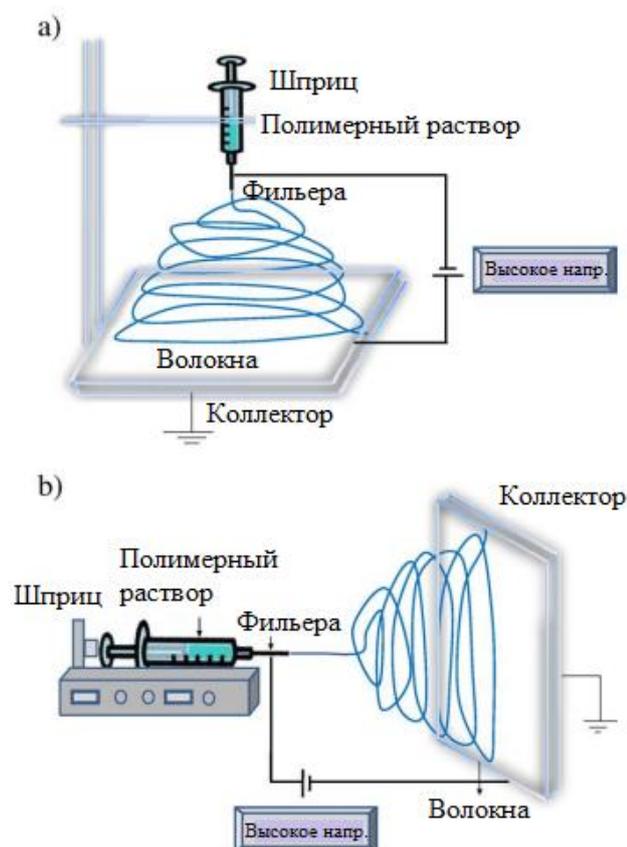


Рисунок 3 – Принципиальная схема установки устройства электропрядения (а) вертикальная установка и (б) горизонтальная установка устройства электропрядения [92]

1.4.2 Параметры, влияющие на процесс электроспиннинга

Процесс электроспиннинга управляется многими параметрами, которые в широком смысле подразделяются на параметры раствора, параметры процесса и параметры окружающей среды. Параметры раствора включают вязкость, проводимость, молекулярную массу и поверхностное натяжение, а параметры процесса включают приложенное электрическое поле, расстояние от наконечника до коллектора и подачу или расход. Каждый из этих параметров существенно влияет на морфологию волокон, полученных в результате электроспиннинга, и при правильном манипулировании этими параметрами можно получить нановолокна нужной морфологии и диаметра [111]. В дополнение к этим переменным параметры окружающей среды включают влажность и температуру окружающей среды, которые играют значительную роль в определении морфологии и диаметра электропряденных нановолокон [112].

Параметры раствора

Концентрация

В процессе электроспиннинга для образования волокон требуется минимальная концентрация раствора. Было обнаружено, что при низкой концентрации раствора получается смесь гранул и волокон, и по мере увеличения концентрации раствора форма гранул изменяется от сферической до веретенообразной и, наконец, образуются однородные волокна с увеличенными диаметрами из-за более высокой вязкостной стойкости [113–118]. Для процесса электроспиннинга должна быть оптимальная концентрация раствора, так как при низких концентрациях вместо волокон образуются гранулы, а при высоких концентрациях образуются более крупные волокна из-за невозможности поддерживать поток раствора на кончике иглы [119]. Исследователи попытались найти связь между концентрацией раствора и диаметром волокна и обнаружили степенную зависимость, согласно которой увеличение концентрации раствора увеличивает диаметр волокна при электроспиннинге желатина [117,120]. Поверхностное натяжение раствора и вязкость также играют важную роль в определении диапазона концентраций, из которых можно получить непрерывные волокна в процессе электроспиннинга [113].

Молекулярная масса

Молекулярная масса полимера оказывает значительное влияние на реологические и электрические свойства, такие как вязкость, поверхностное натяжение, проводимость и диэлектрическая прочность [118]. Это еще один важный параметр раствора, влияющий на морфологию электропряденого волокна, и, как правило, в процессе электроспиннинга используются высокомолекулярные полимерные растворы, поскольку они обеспечивают желаемую вязкость для получения волокна. Было замечено, что слишком низкомолекулярный раствор образует гранулы, а не волокна, а высокомолекулярный раствор дает волокна с большим средним диаметром. Молекулярная масса полимера отражает количество переплетений полимерных цепей в растворе, таким образом, вязкость раствора.

Вязкость

Вязкость раствора играет важную роль в определении размера и морфологии волокон при прядении полимерных волокон. Установлено, что при очень низкой вязкости отсутствует непрерывное волокнообразование, а при очень высокой вязкости затруднен выброс струй из раствора полимера, поэтому существует требование оптимальной вязкости для процесса электроспиннинга. При электроспиннинге вязкость раствора играет важную роль в определении диапазона концентраций, из которых могут быть получены непрерывные волокна. Для раствора с низкой вязкостью

преобладающим фактором является поверхностное натяжение, и образуются только гранулы, в то время как выше критической концентрации получается непрерывная волокнистая структура, на морфологию которой влияет концентрация раствора [121].

Поверхностное натяжение

Поверхностное натяжение играет решающую роль в процессе электропрядения. Волокна могут быть получены без гранул за счет снижения поверхностного натяжения раствора нановолокна. Различные растворители могут способствовать различному поверхностному натяжению. Как правило, высокое поверхностное натяжение раствора тормозит процесс электроспиннинга из-за нестабильности струй и образования распыленных капель [122]. Образование капель, гранул и волокон зависит от поверхностного натяжения раствора, и более низкое поверхностное натяжение прядильного раствора позволяет электроспиннингу происходить при более низком электрическом поле [118].

Проводимость/плотность поверхностного заряда

Полимеры в основном являются проводящими, за редким исключением диэлектрических материалов, и заряженные ионы в растворе полимера оказывают большое влияние на формирование струи. Проводимость раствора в основном определяется типом полимера, используемым растворителем и наличием ионизируемых солей. Установлено, что с увеличением электропроводности раствора происходит значительное уменьшение диаметра электропряденных нановолокон, тогда как при низкой электропроводности раствора происходит недостаточное удлинение струи электрической силой для получения однородного волокна, а также могут наблюдаться гранулы. В работе [123] было показано, что высокопроводящие растворы чрезвычайно нестабильны в присутствии сильных электрических полей, что приводит к резкой нестабильности изгиба, а также к широкому распределению диаметра. Как правило, электропряденные нановолокна с наименьшим диаметром волокна могут быть получены с наивысшей электропроводностью, и было обнаружено, что уменьшение размера волокон происходит из-за повышенной электропроводности. Было замечено, что радиус струи изменяется обратно пропорционально кубическому корню электропроводности раствора [118,124–131].

Параметры процесса

Приложенное напряжение

В процессе электроспиннинга решающим элементом является приложенное к раствору напряжение. Только после достижения порогового напряжения происходит формирование волокна, которое вместе с электрическим полем индуцирует необходимые заряды на растворе и инициирует процесс электроспиннинга. Уже экспериментально доказано, что форма инициирующей капли изменяется в зависимости от условий вращения (напряжения, вязкости и скорости подачи) [124]. Существует небольшой спор о поведении приложенного напряжения в процессе электроспиннинга. Ренкер и Чун показали, что при электроспиннинге полиэтиленоксида влияние электрического поля на диаметр волокна незначительно [132]. Исследователи предположили, что при приложении более высоких напряжений происходит большой выброс полимера, и это способствует образованию волокна большего диаметра. Другие авторы сообщают, что увеличение приложенного напряжения (т. е. увеличение напряженности электрического поля) увеличивает электростатическую силу отталкивания на струе жидкости, что в конечном счете способствует сужению диаметра волокна. В большинстве случаев более высокое напряжение вызывает большее растяжение раствора из-за больших колумбовых сил в струе, а также более сильного электрического поля, и эти эффекты приводят к уменьшению диаметра волокна, а также к быстрому испарению растворителя из волокон. При более высоком напряжении также существует большая вероятность образования гранул [113,118,133–139][34,12,33,35- 39,17]. Аналогичное поведение приложенного напряжения на диаметре волокна наблюдали также Ларрондо и Мэнли [140–142]. Они показали уменьшение диаметра волокна примерно вдвое за счет удвоения приложенного электрического поля. Таким образом, напряжение влияет на диаметр волокна, но уровень значимости изменяется в зависимости от концентрации раствора полимера и расстояния между наконечником и коллектором [143].

Скорость подачи/Расход

Расход полимера из шприца является важным технологическим параметром, так как он влияет на скорость струи и скорость переноса материала. Более низкая скорость подачи более желательна, так как растворитель получит достаточно времени для испарения [144]. Всегда должен быть минимальный расход прядильного раствора. Было замечено, что диаметр волокна и диаметр пор увеличиваются с увеличением расхода полимера в случае полистирольных волокон (ПС) и при изменении расхода морфологическая структура может быть незначительно изменена. В нескольких исследованиях систематически изучалась взаимосвязь между подачей раствора или расходом на морфологию и размер волокна. [127,135].

Высокие скорости потока приводят к образованию граунл из-за отсутствия надлежащего времени сушки до достижения коллектора [130,144–146].

Типы коллекторов

Одним из важных аспектов процесса электроспиннинга является тип используемого коллектора. В этом процессе коллектор служит проводящей подложкой, где собираются нановолокна. Как правило, алюминиевая фольга используется в качестве коллектора, но из-за трудности переноса собранных волокон и необходимости выравнивания волокон для различных применений другие коллекторы, такие как проводящая бумага, проводящая ткань, проволочная сетка [147], штифт [148], параллельный или сетчатый стержень [112], вращающийся стержень, вращающееся колесо [149], жидкий нерастворитель, такой как коагуляционная ванна метанола [150] и другие, также являются распространенными типами коллекторов в настоящее время. Для получения выровненных нановолокон используется несколько типов расщепленных электродов, и обычно такие коллекторы состоят из двух проводящих подложек, разделенных пустотным зазором, где осаждаются выровненные нановолокна [112,151–153].

Расстояние от наконечника до коллектора

Расстояние между наконечником и коллектором было рассмотрено как еще один подход к контролю диаметров и морфологии волокон. Было обнаружено, что требуется минимальное расстояние, чтобы дать волокнам достаточное время для высыхания до достижения коллектора, в противном случае на расстояниях, которые либо слишком близки, либо слишком далеки, наблюдались гранулы [117,136,154]. Влияние расстояния от наконечника до коллектора на морфологию волокон не столь существенно, как другие параметры, и это наблюдалось при электроспиннинге желатина [117], хитозана [154], и поли (винилиденфторида). Таким образом, между наконечником и коллектором должно быть оптимальное расстояние, благоприятствующее испарению растворителя из нановолокон.

Параметры окружающей среды

Помимо параметров раствора и обработки, существуют также параметры окружающей среды, которые включают влажность, температуру и т. д. Были проведены исследования по изучению влияния параметров окружающей среды (например, температуры и влажности) на процесс электроспиннинга. В работе [129] было исследовано влияние температуры на электроспиннинг волокон полиамида-6 в диапазоне от 25 до 60°C и обнаружили, что с повышением температуры происходит выход волокон с

уменьшенным диаметром волокон, и они связали это снижение диаметра со снижением вязкости растворов полимеров при повышенных температурах. Существует обратная зависимость между вязкостью и температурой. Исследовано изменение влажности при прядении растворов полистирола и показано, что при увеличении влажности на поверхности волокон появляются мелкие круглые поры, дальнейшее увеличение влажности приводит к объединению пор [155]. Было обнаружено, что при очень низкой влажности летучий растворитель может быстро высыхать, так как испарение растворителя происходит быстрее. В результате процесс электроспиннинга может продолжаться всего несколько минут, прежде чем кончик иглы засорится [124]. Также было высказано предположение, что высокая влажность может способствовать разряду электропряденых волокон [112,156]. Следовательно, помимо параметров раствора и обработки, параметры окружающей среды также влияют на процесс электроспиннинга.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Синтез ГАП

Исходными материалами для синтеза ГАП была использована яичная скорлупа (Алматинская область), ортофосфорная кислота (85 %, Лабофарма). 20 г яичной скорлупы обжигалась в муфельной печи при температуре 950°C в течение 2 ч в атмосфере воздуха. Полученный в результате обжига порошок смешивался с водным раствором ортофосфорной кислоты (6%) при непрерывном перемешивании (Магнитная мешалка, 150 об/мин, С-MAG HS 7 ИКАМАГ). Далее осадок подвергался ультразвуковой обработке в течение 30-45 мин (Ультразвуковая ванна, 32 кГц, Bandelin Sonorex). Завершающим этапом синтеза ГАП была 48 часовая сушка образцов при комнатной температуре.

2.2 Получение композитных пленок с добавлением ГАП

Для получения композита на основе ГАП и полимера был использован метод электроспиннинга. Полиакрилонитрил (ПАН, средняя молекулярная масса 1,500,000, Sigma Aldrich), диметилформамид (ДММФ, 99,9%, Лабофарма) были использованы для полимерного раствора. ПАН (0,5 г) растворяли в диметилформамиде (4,5 мл) в течение 30 минут на магнитной мешалке (150 об/мин). В качестве добавки к композитным пленкам был использован амоксициллин (Nemofarm, 0,25/0,45 г), поскольку он является наиболее эффективным антибиотиком для лечения апикального периодонтита. ГАП и амоксициллин добавляли после полного растворения полимера. Было изготовлено четыре вида раствора для электроспиннинга с разными концентрациями ГАП, ПАН и амоксициллин, в два из них был добавлен порошок ГАП (0,5 г) и амоксициллин в двух разных концентрациях. Смесь перемешивали на магнитной мешалке до получения однородного раствора. Полученным раствором заполняли медицинский шприц (5 мл). Процесс формирования волокон проводили при комнатной температуре, напряжение составляло 15кВ, а скорость потока 1,5 мл/ч.

2.3 Рентгенофазовый анализ

Химическую структуру и фазовую чистоту порошков ГАП исследовали с помощью рентгеновского дифрактометра типа Дрон-4. Дифракционные картины регистрировались в диапазоне 2θ от -100° до 168° ; размер минимального шага перемещения блока обнаружения был установлен как 0,001.

2.4 Метод сканирующей электронной микроскопии

Для получения изображения поверхности пленок с высоким пространственным разрешением использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) японской компании «JEOL», марки JSM-6490LA. Порошки ГАП наблюдались при увеличении 0,55 кХ, а композитные пленки при 1,9 кХ при напряжении 15 кВ.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Синтез ГАП

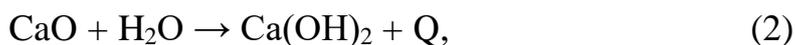
В данной работе порошки ГАП были синтезированы методом осаждения из водного раствора ортофосфорной кислоты (H_3PO_4) и оксида кальция. В качестве источника кальция была выбрана яичная скорлупа, так как она на 95% состоит из кальцита – CaCO_3 . Остальная его часть состоит из органического компонента, т. е. нескольких слоев переплетенных белковых волокон, а также различных минеральных солей (<1%), расположенных на белковых волокнах так же, как кальцит. Синтез нанокристаллического ГАП включает поэтапное приготовление осадка. Предварительно яичную скорлупу, содержащую CaCO_3 , тщательно промывали дистиллированной водой и кипятили в воде в течение 2 ч. Очищенную и высушенную яичную скорлупу измельчали в мелкий порошок. Полученный порошок (20 г) отжигали в течение 3 ч при температуре 900-1000°C (Рисунок 4). При нагревании CaCO_3 диссоциирует с образованием CaO и CO_2 :



Рисунок 4 – Синтез CaO : прокаливание яичной скорлупы в печи

При отжиге органический компонент яичной скорлупы выгорает, а остаток содержит CaO с низким ($\leq 1\%$) содержанием примесей. После этого полученный оксид кальция (2 г) немедленно (при $\sim 100^\circ\text{C}$) смешивали с дистиллированной водой и оставляли смесь до полного охлаждения (Рисунок

5) В этой реакции CaO превращается в Ca(OH)₂, как показано в приведенном ниже уравнении.



где Q – тепло, выделяющееся в реакции.



Рисунок 5 – Синтез ГАП: Перемешивание оксида кальция с водным раствором ортофосфорной кислоты на магнитной мешалке

Гидроксид кальция Ca(OH)₂ титровали раствором ортофосфорной кислоты H₃PO₄ (6 %) при комнатной температуре для получения гидроксиапатита (3). Количество кислоты добавляется в зависимости от стехиометрических соотношений. В этот момент наблюдалось образование осадков. Реакция для этого процесса выглядит следующим образом.



Полученный осадок подвергали ультразвуковому воздействию с частотой 32 кГц в течение 30-45 мин для обеспечения равномерного размера кристаллов гидроксиапатита (Рисунок 6). Затем раствор разливали на чашки Петри и сушили в течение 48 часов при комнатной температуре, что способствовало завершению образования осадка (Рисунок 7).



Рисунок 6 – Ультразвуковая обработка образцов

Следует отметить, что весь процесс получения гидроксиапатита требует разного времени, которое зависит от концентрации исходных компонентов, а сам процесс не требует особых условий. В данной работе конечный продукт (порошкообразный ГАП) был готов через 48 ч. Готовые образцы были измельчены в агатовой ступке для дальнейших исследований. Подробная информация о процедуре смешивания и приготовления порошка представлена в таблице 4. Порошки были названы как ГАП1, ГАП2, ГАП3 и ГАП4 соответственно.

Таблица 4 – Условия синтеза порошков ГАП

Образцы	Температура и время обжига, T °C, t ч	Масса CaO, г	H ₂ O, мл	Мешалка, t мин	Время ультразвуковой обработки, t мин	H ₃ PO ₄ , %	ГАП, %
ГАП 1	950, 3	4	80	60	30	6	95
ГАП 2	950, 3	4	80	60	30	6	95
ГАП 3	950, 3	4	80	60	45	6	95
ГАП 4	950, 3	4	80	60	45	6	95



Рисунок 7 – Образцы ГАП после 48 часовой сушки

3.2 Получение пленок на основе полимерных волокон с добавлением ГАП

Порошки ГАП были применены для получения пленок на основе полимерных наноразмерных волокон с добавлением лекарственного препарата. Пленки были получены методом электроспиннинга, установка которой показана на рисунке 8. Установка электроспиннинга состояла из источника высокого напряжения, шприцевого насоса и заземленного коллектора.

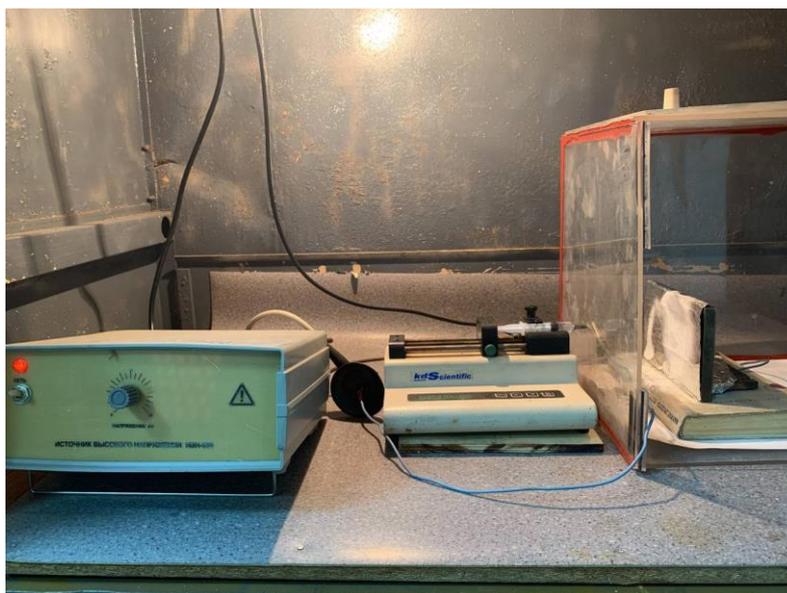


Рисунок 8 – Установка устройства электроспиннинга

Полиакрилонитрил (ПАН) и диметилформаид (ДММФ) были использованы для приготовления полимерного раствора. Полимер растворяли в выбранном растворителе, постоянно мешая на магнитной мешалке в течение 30 минут. Было приготовлено 4 раствора, концентрации которых приведены в таблице 5. В растворы образцов постепенно добавляли порошок ГАП и полусинтетический антибиотик широкого спектра действия группы пенициллинов – амоксициллин в двух концентрациях, и перемешивали до получения однородного раствора. Раствор полимера ПАН/ГАП/Амоксициллин загружали в пластиковый шприц (5 мл), оснащенный металлической иглой. Игла была подключена к источнику высокого напряжения (15 кВ). Раствор постоянно подавался с помощью шприцевого насоса со скоростью потока 1,5 мл/ч. Коллектор располагался на расстоянии 15 см от кончика иглы. Алюминиевая фольга была использована в качестве коллектора. Для всех образцов применялись одинаковые условия процесса электроспиннинга. Электроформирование волокон проводили при комнатной температуре. Пленка, полученная методом электроспиннинга показана на рисунке 9.

Таблица 5 – Состав растворов для электроформирования

Образцы	ПАН, г	Растворитель, мл	ГАП, г	Амоксициллин, г
Образец 1	0.5	4.5	-	0.25
Образец 2	0.5	4.5	0.5	0.25
Образец 3	0.5	4.5	-	0.45
Образец 4	0.5	4.5	0.5	0.45

Полученные композитные пленки были исследованы методами рентгеновской дифракции (XRD) и сканирующей электронной микроскопии (SEM).



Рисунок 9 – Пленка на основе ПАН/ГАП/Амоксициллин

3.3 Рентгенофазовый анализ

Для изучения структурных характеристик образцов применяли метод рентгенографии. Конечной целью исследования было определение фазового состава. Фазовый состав исследуемых образцов ГАП определяли путем сравнения результатов рентгеноструктурного анализа исследуемых образцов с данными JCPDS (Объединенный комитет по стандартам порошковой дифракции) номер 96-900-2219.

На рисунке 10 изображена рентгенограмма образца ГАП4. Все дифракционные пики соответствуют гексагональной структуре синтезированного ГАП. Дифракционная картина данного образца была совместима с моноклинной фазой гидроксиапатита (ICSD 34457) и не было выявлено никаких вторичных фаз, кроме гидроксиапатита. Чистота содержания ГАП в данном образце составляет 95%, поскольку на рентгенограмме не наблюдается пиков примесей, таких как гидроксид или фосфатов кальция. В образце ГАП4 в небольшом количестве присутствует рентгеноаморфная фаза.

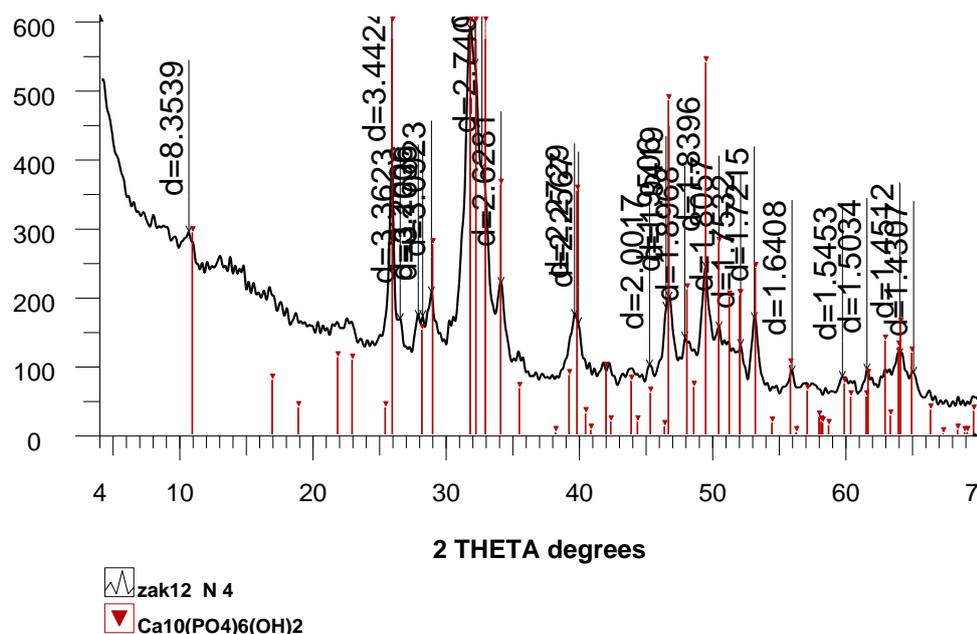
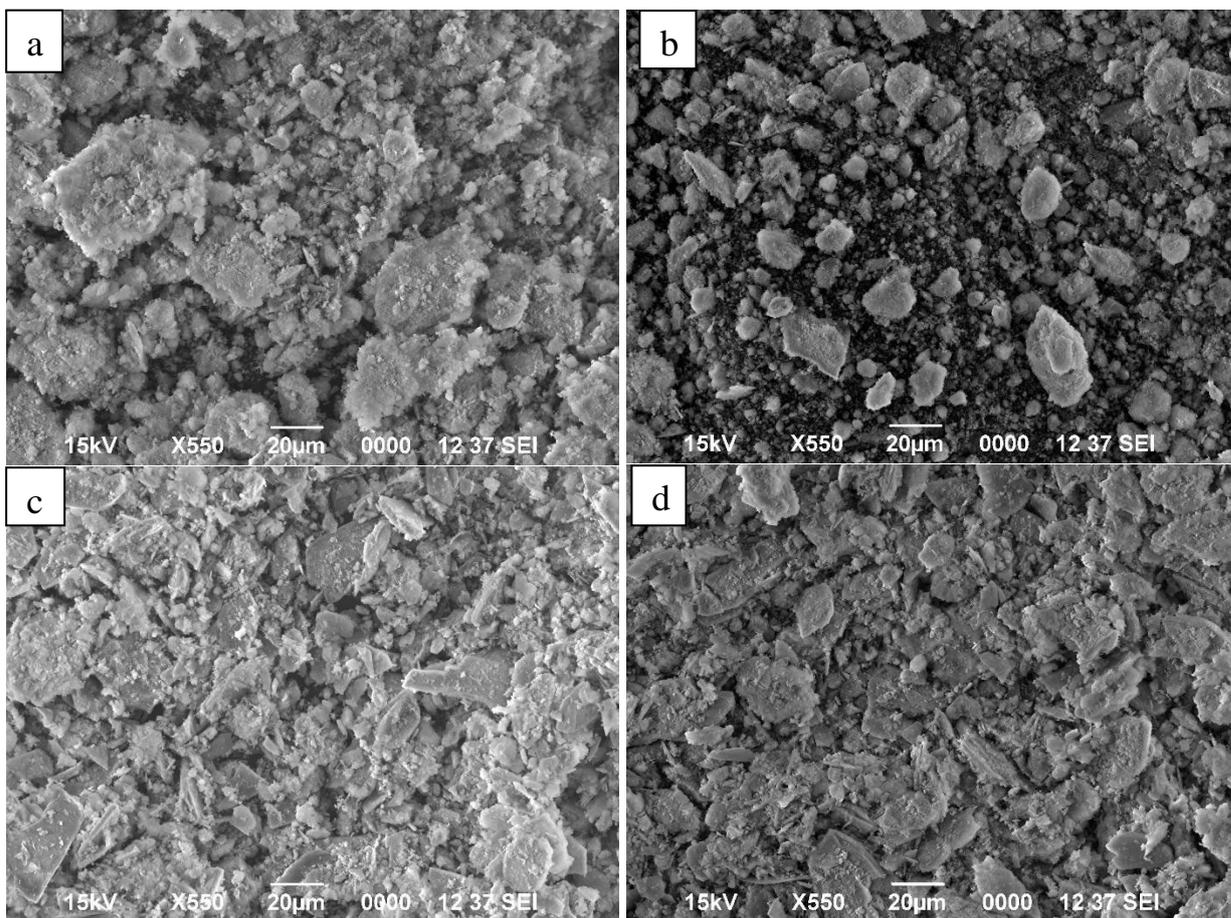


Рисунок 10 – Рентгенограмма образца ГАП 4

3.4 Метод сканирующей электронной микроскопии

Для определения морфологических особенностей полученных образцов применяли сканирующую электронную микроскопию (СЭМ) с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6490LA (JEOL).

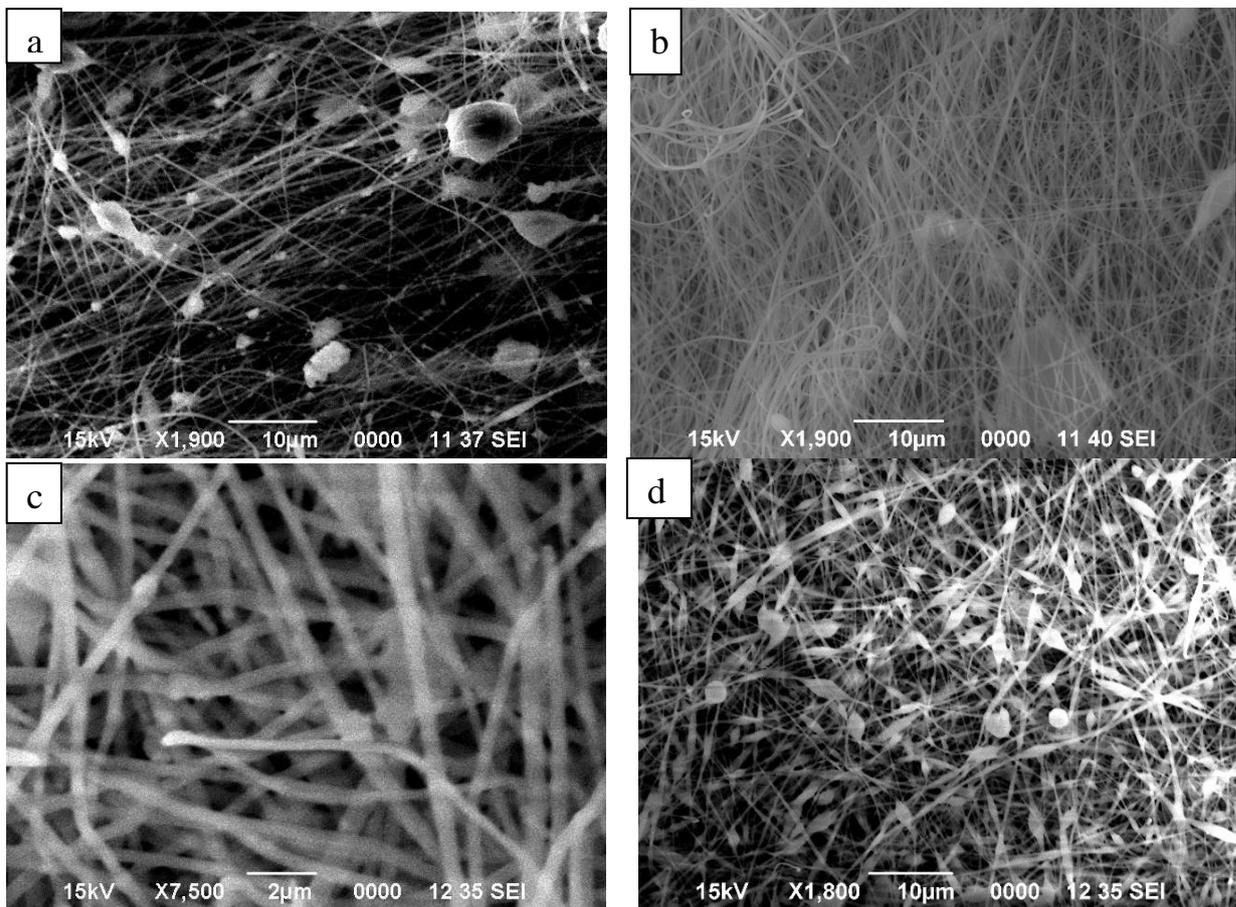
СЭМ изображения синтезированного порошка гидроксиапатита показаны на рисунке 11. Изображения сделаны с увеличением 550×. Данные СЭМ показывают, что средний размер частиц ГАП в синтезированных образцах составляет около 5 мкм. Время ультразвуковой обработки ГАП1 и ГАП2 (рисунок 11 а, в соответственно) составляет 30 мин. Порошки данных образцов подвергались дополнительной термообработке. Образцы ГАП3 и ГАП4 (рисунок 11 с, d соответственно) обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 45 мин, то есть на 15 мин дольше чем первые два образца порошков ГАП. Сравнивая данные полученные от сканирующего электронного микроскопа можно заключить, что однородности частиц порошка ГАП можно достичь путем длительной обработки ультразвуком, чем дополнительной термообработкой порошков.



a – ГАП 1; b – ГАП 2; c – ГАП 3; d – ГАП 4

Рисунок 11 – Снимки SEM образцов гидроксиапатита кальция

Изображения полученных композитных пленок показаны на рисунке 12. Толщина волокон данных пленок варьируется от 200 до 400 нм. В составе образцов 1 и 3 (Рисунок 12 а, с соответственно) отсутствует порошок ГАП, концентрация лекарственного препарата разная (0,25 г и 0,45 г). В составе образцов 2 и 4 (Рисунок 12 б, д соответственно) концентрация лекарственного препарата так же не одинаковая (0,25 г и 0,45 г), но имеется одинаковое количество порошка ГАП (0,5 г). Была установлена прямая зависимость между концентрацией лекарственного препарата и толщиной волокон пленок, то есть чем больше концентрация амоксициллина, тем больше толщина волокон. На рисунке 12 d можно заметить образование узлов, которое связано с относительно большой концентрацией лекарственного препарата в растворе. Тем самым, оптимальным вариантом из четырех образцов является образец 2, который изображен на рисунке 12 б.



а – Образец 1; б – Образец 2; в – Образец 3; д – Образец 4
Рисунок 12 – Снимки SEM полимерных волокон

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной диссертационной работе представлен метод химического осаждения для синтеза чистого, стехиометрического и стабильного порошка ГАП с использованием биологически отходного материала – яичной скорлупы и ортофосфорной кислоты. Яичная скорлупа была подвержена термической обработке при 950°C, затем ее титровали водным раствором ортофосфорной кислоты с последующей ультразвуковой обработкой. Было установлено, что состав и концентрация реагентов, порядок и скорость перемешивания, температура и время эксперимента, сильно влияют на процесс кристаллизации и химический состав синтезированного порошка. Условия, использованные в работе, оказались благоприятными для получения моноклинного гидроксипатита высокой фазовой чистоты со средним размером кристаллитов около 4-6 мкм.

Синтезированный порошок ГАП использовался для получения композитных пленок на основе полимерных волокон, ГАП и лекарственного препарата методом электроспиннинга.

Результаты исследований, полученные с помощью рентгеновской дифракции, показывают, что синтезированные материалы являются однофазными и представляют собой гидроксипатит с чистотой 95%. Из анализа SEM установлено, что однородности частиц порошка ГАП можно достичь путем длительной обработки ультразвуком, чем дополнительной термообработкой порошков.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moulton S.E., Wallace G.G. 3-dimensional (3D) fabricated polymer based drug delivery systems // *Journal of Controlled Release*. 2014. Vol. 193. P. 27–34.
2. Kwee B.J., Mooney D.J. Biomaterials for skeletal muscle tissue engineering // *Current Opinion in Biotechnology*. 2017. Vol. 47. P. 16–22.
3. Mao A.S., Mooney D.J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015. Vol. 112, № 47. P. 14452–14459.
4. Laurencin C.T., Khan Y. Regenerative engineering // *Sci Transl Med*. 2012. Vol. 4, № 160. P. 160ed9.
5. Giannitelli S.M. et al. Current trends in the design of scaffolds for computer-aided tissue engineering // *Acta Biomater*. 2014. Vol. 10, № 2. P. 580–594.
6. Pina S., Oliveira J.M., Reis R.L. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: a review // *Adv Mater*. 2015. Vol. 27, № 7. P. 1143–1169.
7. Siddiqui I.A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy // *Ann N Y Acad Sci*. 2015. Vol. 1348, № 1. P. 20–31.
8. *Biomaterials Science - 3rd Edition* [Electronic resource]. URL: <https://www.elsevier.com/books/biomaterials-science/ratner/978-0-08-087780-8> (accessed: 21.04.2021).
9. Billiet T. et al. A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, № 26. P. 6020–6041.
10. Williams D.F. On the nature of biomaterials // *Biomaterials*. 2009. Vol. 30, № 30. P. 5897–5909.
11. Williams D.F. On the mechanisms of biocompatibility // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29, № 20. P. 2941–2953.
12. Yoshikawa H., Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics // *J Artif Organs*. 2005. Vol. 8, № 3. P. 131–136.
13. Dorozhkin S.V., Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates // *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002. Vol. 41, № 17. P. 3130–3146.
14. Mouriño V., Boccaccini A.R. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds // *Journal of The Royal Society Interface*. Royal Society, 2010. Vol. 7, № 43. P. 209–227.
15. Markovic M., Fowler B.O., Tung M.S. Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material // *J Res Natl Inst Stand Technol*. 2004. Vol. 109, № 6. P. 553–568.
16. Calderín L., Stott M.J., Rubio A. Electronic and crystallographic structure of apatites // *Phys. Rev. B*. American Physical Society, 2003. Vol. 67, № 13. P. 134106.
17. White T.J., Dong Z.L. Structural derivation and crystal chemistry of apatites: 1 // *Acta Cryst B*. International Union of Crystallography, 2003. Vol. 59, № 1. P. 1–16.

18. Ramselaar M.M.A. et al. Biodegradation of four calcium phosphate ceramics; in vivo rates and tissue interactions // *J Mater Sci: Mater Med.* 1991. Vol. 2, № 2. P. 63–70.
19. Rapacz-Kmita A. et al. FTIR and XRD Investigations on the Thermal Stability of Hydroxyapatite During Hot Pressing and Pressureless Sintering Processes // *Journal of Molecular Structure - J MOL STRUCT.* 2005. Vol. 744. P. 653–656.
20. Samavedi S., Whittington A.R., Goldstein A.S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior // *Acta Biomater.* 2013. Vol. 9, № 9. P. 8037–8045.
21. Bohner M., Lemaître J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? // *Biomaterials.* 2009. Vol. 30, № 12. P. 2175–2179.
22. Patel N. et al. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules // *J Mater Sci Mater Med.* 2002. Vol. 13, № 12. P. 1199–1206.
23. Nicholson W. *A Dictionary of Practical and Theoretical Chemistry: With Its Application to the Arts and Manufactures, and to the Explanation of the Phaenomena of Nature... : with Plates and Tables.* Richard Phillips, 1808. 900 p.
24. ART XI.--On the occurrence of Fluor Spar, Apatite and Chon - ProQuest [Electronic resource]. URL: <https://search.proquest.com/openview/e54da6f9f43e80e68624116ddbda658/1?pq-origsite=gscholar&cbl=42401> (accessed: 21.04.2021).
25. Wells H.G. Pathological Calcification // *J Med Res.* 1906. Vol. 14, № 3. P. 491–525.
26. Albee F.H. STUDIES IN BONE GROWTH: TRIPLE CALCIUM PHOSPHATE AS A STIMULUS TO OSTEOGENESIS // *Ann Surg.* 1920. Vol. 71, № 1. P. 32–39.
27. Schram W.R., Fosdick L.S. Stimulation of healing in long bones by use of artificial material // *J Oral Surg (Chic).* 1948. Vol. 6, № 3. P. 209–217.
28. Norman M.E. et al. An in-vitro evaluation of coralline porous hydroxyapatite as a scaffold for osteoblast growth // *Clin Mater.* 1994. Vol. 17, № 2. P. 85–91.
29. Dekker R.J. et al. Bone tissue engineering on calcium phosphate-coated titanium plates utilizing cultured rat bone marrow cells: a preliminary study // *J Mater Sci Mater Med.* 1998. Vol. 9, № 12. P. 859–863.
30. Friedman C.D. et al. BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction // *J Biomed Mater Res.* 1998. Vol. 43, № 4. P. 428–432.
31. Nair A.K. et al. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone: 1 // *Nature Communications.* Nature Publishing Group, 2013. Vol. 4, № 1. P. 1724.
32. *Advances in Calcium Phosphate Biomaterials* | Besim Ben-Nissan | Springer [Electronic resource]. URL: <https://www.springer.com/gp/book/9783642539794> (accessed: 21.04.2021).

33. Fujii E. et al. Selective protein adsorption property and characterization of nano-crystalline zinc-containing hydroxyapatite // *Acta Biomater.* 2006. Vol. 2, № 1. P. 69–74.
34. Tsapikouni T.S., Missirlis Y.F. Protein–material interactions: From micro-to-nano scale // *Materials Science and Engineering: B.* 2008. Vol. 152, № 1. P. 2–7.
35. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphates // *J Mater Sci.* 2007. Vol. 42, № 4. P. 1061–1095.
36. AOKI H. Medical applications of hydroxyapatite // *Ishiyaku Euro America.* 1994. P. 13–74.
37. Bose S., Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review // *Acta Biomater.* 2012. Vol. 8, № 4. P. 1401–1421.
38. Pasero M. et al. Nomenclature of the apatite supergroup minerals // *European Journal of Mineralogy.* Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 2010. P. 163–179.
39. Elliott J.C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam [The Netherlands]; New York: Elsevier, 1994.
40. Aoki H. Surface Design and Functions of Hydroxyapatite // *Hyomen Kagaku.* 1989. Vol. 10, № 2. P. 96–101.
41. Kawasaki T. Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing // *Journal of Chromatography A.* 1991. Vol. 544. P. 147–184.
42. Somasundaran P., Wang Y.H.C. Surface Chemical Characteristics and Adsorption Properties of Apatite // *Adsorption on and Surface Chemistry of Hydroxyapatite* / ed. Misra D.N. Boston, MA: Springer US, 1984. P. 129–149.
43. Suzuki T. et al. Surface instability of calcium phosphate ceramics in tissue culture medium and the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent animal cells // *J Biomed Mater Res.* 1997. Vol. 34, № 4. P. 507–517.
44. *Biomaterials Science - 2nd Edition* [Electronic resource]. URL: <https://www.elsevier.com/books/biomaterials-science/ratner/978-0-08-047036-8> (accessed: 21.04.2021).
45. Dorozhkin S.V. Amorphous calcium (ortho)phosphates // *Acta Biomater.* 2010. Vol. 6, № 12. P. 4457–4475.
46. Suzuki O. Octacalcium phosphate: osteoconductivity and crystal chemistry // *Acta Biomater.* 2010. Vol. 6, № 9. P. 3379–3387.
47. Weiner S., Wagner H.D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations // *Annual Review of Materials Science.* 1998. Vol. 28, № 1. P. 271–298.
48. Daculsi G. et al. Length and shape of enamel crystals // *Calcif Tissue Int.* 1984. Vol. 36, № 5. P. 550–555.
49. Hughes J.M., Cameron M., Crowley K.D. Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites // *American Mineralogist.* GeoScienceWorld, 1989. Vol. 74, № 7–8. P. 870–876.

50. Momma K., Izumi F. VESTA 3 for three-dimensional visualization of crystal, volumetric and morphology data // *Journal of Applied Crystallography*. 2011. Vol. 44, № 6. P. 1272–1276.
51. Ma G. Three common preparation methods of hydroxyapatite // *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2019. Vol. 688. P. 033057.
52. Li Y.H. et al. Characteristics and preparation of nanometer hydroxyapatite in medical science // *J. Clin. Rehabil. Tiss. Eng. Res.* 2008. Vol. 12. P. 8143–8146.
53. Mohd Pu'ad N.A.S. et al. Synthesis method of hydroxyapatite: A review // *Materials Today: Proceedings*. 2020. Vol. 29. P. 233–239.
54. Greenwald A.S. et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications // *J Bone Joint Surg Am.* 2001. Vol. 83-A Suppl 2 Pt 2. P. 98–103.
55. Siddharthan A., Seshadri S.K., Kumar T.S.S. Influence of microwave power on nanosized hydroxyapatite particles // *Scripta Materialia*. 2006. Vol. 55, № 2. P. 175–178.
56. Velu G., Gopal B. Preparation of Nanohydroxyapatite by a Sol–Gel Method Using Alginic Acid as a Complexing Agent // *Journal of the American Ceramic Society*. 2009. Vol. 92, № 10. P. 2207–2211.
57. Hsieh M.F. et al. Phase purity of sol-gel-derived hydroxyapatite ceramic // *Biomaterials*. 2001. Vol. 22, № 19. P. 2601–2607.
58. Eshtiagh-Hosseini H., Housaindokht M.R., Chahkandi M. Effects of parameters of sol–gel process on the phase evolution of sol–gel-derived hydroxyapatite // *Materials Chemistry and Physics*. 2007. Vol. 106, № 2. P. 310–316.
59. Abinaya Sindu P. et al. Green synthesis of Si-incorporated hydroxyapatite using sodium metasilicate as silicon precursor and in vitro antibiotic release studies // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017. Vol. 175. P. 163–172.
60. Zhang H., Zhang M. Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios // *Materials Chemistry and Physics*. 2011. Vol. 126, № 3. P. 642–648.
61. Fihri A. et al. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis // *Coordination Chemistry Reviews*. 2017. Vol. 347. P. 48–76.
62. Kalita S.J., Verma S. Nanocrystalline hydroxyapatite bioceramic using microwave radiation: Synthesis and characterization // *Materials Science and Engineering: C*. 2010. Vol. 30, № 2. P. 295–303.
63. Utara S., Klinkaewnarong J. Effect of sonication time on the characteristics of nanophase hydroxyapatite crystals synthesised by the sol–gel technique // *Micro & Nano Letters*. 2015. Vol. 10, № 1. P. 1–4.
64. Akram M. et al. Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources // *J Mater Sci*. 2014. Vol. 49, № 4. P. 1461–1475.

65. Hosseinzadeh E. et al. Fabrication of a hard tissue replacement using natural hydroxyapatite derived from bovine bones by thermal decomposition method // *Int J Organ Transplant Med*. 2014. Vol. 5, № 1. P. 23–31.
66. Sun R.-X. et al. Physicochemical and biological properties of bovine-derived porous hydroxyapatite/collagen composite and its hydroxyapatite powders // *Ceramics International*. 2017. Vol. 43, № 18. P. 16792–16798.
67. Mohd Pu'ad N.A.S. et al. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources // *Heliyon*. 2019. Vol. 5, № 5. P. e01588.
68. Kumar G.S., Thamizhavel A., Girija E.K. Microwave conversion of eggshells into flower-like hydroxyapatite nanostructure for biomedical applications // *Materials Letters*. 2012. Vol. 76. P. 198–200.
69. Gopi D. et al. Novel banana peel pectin mediated green route for the synthesis of hydroxyapatite nanoparticles and their spectral characterization // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2014. Vol. 118. P. 589–597.
70. Gopi D., Kanimozhi K., Kavitha L. Opuntia ficus indica peel derived pectin mediated hydroxyapatite nanoparticles: Synthesis, spectral characterization, biological and antimicrobial activities // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2015. Vol. 141. P. 135–143.
71. Begum Y.A., Deka S.C. Green synthesis of pectin mediated hydroxyapatite nanoparticles from culinary banana bract and its characterization // *Acta Alimentaria*. 2017. Vol. 46, № 4. P. 428–438.
72. Fu L.-H. et al. Sonochemical synthesis of cellulose/hydroxyapatite nanocomposites and their application in protein adsorption: 1 // *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 8, № 1. P. 8292.
73. Pistone A. et al. Engineering of Chitosan-Hydroxyapatite-Magnetite Hierarchical Scaffolds for Guided Bone Growth // *Materials (Basel)*. 2019. Vol. 12, № 14.
74. Ran J. et al. Comparisons among Mg, Zn, Sr, and Si doped nano-hydroxyapatite/chitosan composites for load-bearing bone tissue engineering applications // *Mater. Chem. Front*. 2017. Vol. 1, № 5. P. 900–910.
75. Kołodziejska B., Kaflak A., Kolmas J. Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review: 7 // *Materials*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 13, № 7. P. 1748.
76. Oshima S. et al. Fabrication of Gentamicin-Loaded Hydroxyapatite/Collagen Bone-Like Nanocomposite for Anti-Infection Bone Void Fillers // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, № 2.
77. Egawa S. et al. Efficacy of Antibiotic-Loaded Hydroxyapatite/Collagen Composites Is Dependent on Adsorbability for Treating Staphylococcus aureus Osteomyelitis in Rats // *J Orthop Res*. 2020. Vol. 38, № 4. P. 843–851.

78. Fu L.-H. et al. Microwave-Assisted Hydrothermal Synthesis of Cellulose/Hydroxyapatite Nanocomposites // *Polymers (Basel)*. 2016. Vol. 8, № 9.
79. Bayir E. et al. Production of hydroxyapatite–bacterial cellulose composite scaffolds with enhanced pore diameters for bone tissue engineering applications // *Cellulose*. 2019. Vol. 26, № 18. P. 9803–9817.
80. Yahia I.S., Shkir Mohd., Keshk S.M.A.S. Physicochemical properties of a nanocomposite (graphene oxide-hydroxyapatite-cellulose) immobilized by Ag nanoparticles for biomedical applications // *Results in Physics*. 2020. Vol. 16. P. 102990.
81. Zhou Q. et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles-doped hydroxyapatite/alginate microparticles with promising cytocompatibility and antibacterial properties // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2020. Vol. 585. P. 124081.
82. Wang J. et al. Synthesis of silver–hydroxyapatite composite with improved antibacterial properties // *Vacuum*. 2018. Vol. 152. P. 132–137.
83. Shen J. et al. Carboxylated chitosan/silver-hydroxyapatite hybrid microspheres with improved antibacterial activity and cytocompatibility // *Materials Science and Engineering: C*. 2017. Vol. 78. P. 589–597.
84. Vahdat A., Ghasemi B., Yousefpour M. Synthesis of hydroxyapatite and hydroxyapatite/Fe₃O₄ nanocomposite for removal of heavy metals // *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*. 2019. Vol. 12. P. 100233.
85. El-Maghrabi H.H. et al. Magnetically modified hydroxyapatite nanoparticles for the removal of uranium (VI): Preparation, characterization and adsorption optimization // *Journal of Hazardous Materials*. 2019. Vol. 378. P. 120703.
86. Feng Y. et al. Adsorption of Cd (II) and Zn (II) from aqueous solutions using magnetic hydroxyapatite nanoparticles as adsorbents // *Chemical Engineering Journal*. 2010. Vol. 162, № 2. P. 487–494.
87. Wang Y. et al. Removal of Pb(II) and methylene blue from aqueous solution by magnetic hydroxyapatite-immobilized oxidized multi-walled carbon nanotubes // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017. Vol. 494.
88. Sahoo J.K. et al. Magnetic hydroxyapatite nanocomposite: Impact on eriochrome black-T removal and antibacterial activity // *Journal of Molecular Liquids*. 2019. Vol. 294. P. 111596.
89. Ghasemi E., Sillanpää M. Ultrasound-assisted solid-phase extraction of parabens from environmental and biological samples using magnetic hydroxyapatite nanoparticles as an efficient and regenerable nanosorbent // *Mikrochim Acta*. 2019. Vol. 186, № 9. P. 622.
90. Negrila C.C. et al. Development of Zinc-Doped Hydroxyapatite by Sol-Gel Method for Medical Applications // *Molecules*. 2018. Vol. 23, № 11.

91. Ofudje E.A. et al. Synthesis and characterization of Zn-Doped hydroxyapatite: scaffold application, antibacterial and bioactivity studies // *Heliyon*. 2019. Vol. 5, № 5. P. e01716.
92. Bhardwaj N., Kundu S.C. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique // *Biotechnol Adv.* 2010. Vol. 28, № 3. P. 325–347.
93. Teo W.E., Ramakrishna S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies // *Nanotechnology*. 2006. Vol. 17, № 14. P. R89–R106.
94. Han J. et al. Bio-functional electrospun nanomaterials: From topology design to biological applications // *Progress in Polymer Science*. 2019. Vol. 91. P. 1–28.
95. Pal K. et al. Nanofibers as new-generation materials: From spinning and nanospinning fabrication techniques to emerging applications // *Applied Materials Today*. 2019. Vol. 17. P. 1–35.
96. Ghorani B., Tucker N. Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology // *Food Hydrocolloids*. 2015. Vol. 51. P. 227–240.
97. Niu B. et al. Recent advances of electrosprayed particles as encapsulation systems of bioactives for food application // *Food Hydrocolloids*. 2020. Vol. 99. P. 105376.
98. Patil J.V. et al. Electrospinning: A versatile technique for making of 1D growth of nanostructured nanofibers and its applications: An experimental approach // *Applied Surface Science*. 2017. Vol. 423. P. 641–674.
99. Pillay V. et al. A Review of the Effect of Processing Variables on the Fabrication of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Applications // *Journal of Nanomaterials*. 2013. Vol. 2013. P. 1–22.
100. Angel N. et al. Effect of processing parameters on the electrospinning of cellulose acetate studied by response surface methodology // *Journal of Agriculture and Food Research*. 2020. Vol. 2. P. 100015.
101. Saleem H. et al. Recent advances in nanofibrous membranes: Production and applications in water treatment and desalination // *Desalination*. 2020. Vol. 478. P. 114178.
102. Chew S.Y. et al. The role of electrospinning in the emerging field of nanomedicine // *Curr Pharm Des.* 2006. Vol. 12, № 36. P. 4751–4770.
103. Kidoaki S., Kwon I.K., Matsuda T. Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26, № 1. P. 37–46.
104. Stankus J.J. et al. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix // *Biomaterials*. 2006. Vol. 27, № 5. P. 735–744.
105. Liang D., Hsiao B.S., Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications // *Adv Drug Deliv Rev.* 2007. Vol. 59, № 14. P. 1392–1412.

106. Sill T.J., von Recum H.A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29, № 13. P. 1989–2006.
107. Huang C.-F., Chang F.-C. Comparison of hydrogen bonding interaction between PMMA/PMAA blends and PMMA-co-PMAA copolymers // *Polymer*. 2003. Vol. 44, № 10. P. 2965–2974.
108. Electrically driven jets // *Proc. R. Soc. Lond. A*. 1969. Vol. 313, № 1515. P. 453–475.
109. Yarin A.L., Koombhongse S., Reneker D.H. Bending instability in electrospinning of nanofibers // *Journal of Applied Physics*. 2001. Vol. 89, № 5. P. 3018–3026.
110. Adomavičiūtė E., Milašius R. The Influence of Applied Voltage on Poly(vinyl alcohol) (PVA) Nanofibre Diameter // *Fibres & Textiles in Eastern Europe*. 2007. № Nr 5-6 (64). P. 69--72.
111. Chong E.J. et al. Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution // *Acta Biomater*. 2007. Vol. 3, № 3. P. 321–330.
112. Li D., Xia Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? // *Advanced Materials*. 2004. Vol. 16, № 14. P. 1151–1170.
113. Deitzel J.M. et al. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles // *Polymer*. 2001. Vol. 42, № 1. P. 261–272.
114. Liu H., Hsieh Y.-L. Ultrafine fibrous cellulose membranes from electrospinning of cellulose acetate // *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2002. Vol. 40, № 18. P. 2119–2129.
115. Ryu Y.J. et al. Transport properties of electrospun nylon 6 nonwoven mats // *European Polymer Journal*. 2003. Vol. 39, № 9. P. 1883–1889.
116. McKee M.G. et al. Correlations of Solution Rheology with Electrospun Fiber Formation of Linear and Branched Polyesters // *Macromolecules*. 2004. Vol. 37, № 5. P. 1760–1767.
117. Ki C.S. et al. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution // *Polymer*. 2005. Vol. 46, № 14. P. 5094–5102.
118. Haghi A.K., Akbari M. Trends in electrospinning of natural nanofibers // *physica status solidi (a)*. 2007. Vol. 204, № 6. P. 1830–1834.
119. Sukigara S. et al. Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning—part 1: processing parameters and geometric properties // *Polymer*. 2003. Vol. 44, № 19. P. 5721–5727.
120. Zeng J. et al. Poly-L-lactide nanofibers by electrospinning – Influence of solution viscosity and electrical conductivity on fiber diameter and fiber morphology // *e-Polymers*. 2003. Vol. 3, № 1.
121. Doshi J., Reneker D.H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers // *Journal of Electrostatics*. 1995. Vol. 35, № 2. P. 151–160.
122. Hohman M.M. et al. Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications // *Physics of Fluids*. American Institute of Physics, 2001. Vol. 13, № 8. P. 2221–2236.

123. Hayati I., Bailey A.I., Tadros T.F. 1987b Investigations into the mechanism of electrohydrodynamic spraying of liquids 2. Mechanism of stable jet formation and electrical forces acting on a liquid cone // *J. Colloid Interface Sci.* P. 222–230.
124. Baumgarten P.K. Electrostatic spinning of acrylic microfibers // *Journal of Colloid and Interface Science.* 1971. Vol. 36, № 1. P. 71–79.
125. Fong H., Chun I., Reneker D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning // *Polymer.* 1999. Vol. 40, № 16. P. 4585–4592.
126. Huang L. et al. Engineered collagen–PEO nanofibers and fabrics // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.* 2001. Vol. 12, № 9. P. 979–993.
127. Zong X. et al. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes // *Polymer.* 2002. Vol. 43, № 16. P. 4403–4412.
128. Jiang H. et al. Optimization and Characterization of Dextran Membranes Prepared by Electrospinning // *Biomacromolecules.* 2004. Vol. 5, № 2. P. 326–333.
129. Mit-uppatham C., Nithitanakul M., Supaphol P. Ultrafine Electrospun Polyamide-6 Fibers: Effect of Solution Conditions on Morphology and Average Fiber Diameter // *Macromol. Chem. Phys.* 2004. Vol. 205, № 17. P. 2327–2338.
130. Zuo W. et al. Experimental study on relationship between jet instability and formation of beaded fibers during electrospinning // *Polym. Eng. Sci.* 2005. Vol. 45, № 5. P. 704–709.
131. Kim B. et al. Poly(acrylic acid) nanofibers by electrospinning // *Materials Letters.* 2005. Vol. 59, № 7. P. 829–832.
132. Reneker D.H., Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning // *Nanotechnology.* IOP Publishing, 1996. Vol. 7, № 3. P. 216.
133. Demir M.M. et al. Electrospinning of polyurethane fibers // *Polymer.* 2002. Vol. 43, № 11. P. 3303–3309.
134. Buchko C.J. et al. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. 1999.
135. Megelski S. et al. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers // *Macromolecules.* American Chemical Society, 2002. Vol. 35, № 22. P. 8456–8466.
136. Lee J.S. et al. Role of molecular weight of atactic poly(vinyl alcohol) (PVA) in the structure and properties of PVA nanofabric prepared by electrospinning // *Journal of Applied Polymer Science.* 2004. Vol. 93, № 4. P. 1638–1646.
137. Mo X.M. et al. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation // *Biomaterials.* 2004. Vol. 25, № 10. P. 1883–1890.
138. Katti D.S. et al. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004. Vol. 70, № 2. P. 286–296.

139. Pawlowski K.J. et al. Biomedical Nanoscience: Electrospinning Basic Concepts, Applications, and Classroom Demonstration // MRS Online Proceedings Library. 2004. Vol. 827, № 1. P. 171–182.
140. Larrondo L., Manley R.S.J. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties // Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition. 1981. Vol. 19, № 6. P. 909–920.
141. Larrondo L., Manley R.S.J. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. II. Examination of the flow field in an electrically driven jet // Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition. 1981. Vol. 19, № 6. P. 921–932.
142. Larrondo L., Manley R.S.J. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. III. Electrostatic deformation of a pendant drop of polymer melt // Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition. 1981. Vol. 19, № 6. P. 933–940.
143. Yördem O.S., Papila M., Menciloglu Y. Effects of electrospinning parameters on polyacrylonitrile nanofiber diameter: An investigation by response surface methodology // Materials & Design. 2008. Vol. 29. P. 34–44.
144. Yuan X. et al. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning // Polymer International. 2004. Vol. 53, № 11. P. 1704–1710.
145. Wannatong L., Sirivat A., Supaphol P. Effects of solvents on electrospun polymeric fibers: preliminary study on polystyrene // Polymer International. 2004. Vol. 53, № 11. P. 1851–1859.
146. Kim K.-H. et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration // J Biotechnol. 2005. Vol. 120, № 3. P. 327–339.
147. Wang X. et al. Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments // Polymer. 2005. Vol. 46, № 13. P. 4853–4867.
148. Sundaray B. et al. Electrospinning of continuous aligned polymer fibers // Appl. Phys. Lett. American Institute of Physics, 2004. Vol. 84, № 7. P. 1222–1224.
149. Xu C.Y. et al. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering // Biomaterials. 2004. Vol. 25, № 5. P. 877–886.
150. Ki C.S. et al. Electrospun three-dimensional silk fibroin nanofibrous scaffold // Journal of Applied Polymer Science. 2007. Vol. 106, № 6. P. 3922–3928.
151. Li D., Wang Y., Xia Y. Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays // Nano Lett. 2003. Vol. 3, № 8. P. 5.
152. Li D. et al. Collecting electrospun nanofibers with patterned electrodes // Nano Lett. 2005. Vol. 5, № 5. P. 913–916.
153. Jalili R., Morshed M., Ravandi S.A.H. Fundamental parameters affecting electrospinning of PAN nanofibers as uniaxially aligned fibers // Journal of Applied Polymer Science. 2006. Vol. 101, № 6. P. 4350–4357.
154. Geng X., Kwon O.-H., Jang J. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution // Biomaterials. 2005. Vol. 26, № 27. P. 5427–5432.

155. Casper C.L. et al. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process // *Macromolecules*. 2004. Vol. 37. P. 573–578.
156. Li M. et al. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering // *Biomaterials*. 2005. Vol. 26, № 30. P. 5999–6008.