

БИОЛОГИЯЛЫҚ ҮДЫРАЙТЫН ПОЛИМЕРЛЕР НЕГІЗІНДЕГІ КОМПОЗИТТЕР МЕН ҚОСПАЛАР ӨНДІРІСІ

8 лекция

КІРІСПЕ

Қазіргі биомедицина мен биотехнология салаларында биоактивті композиттер ерекше орын алады. *Бұл материалдар тірі ағзалармен биологиялық үйлесімді болып, тіндермен тікелей әрекеттесуге және регенерациялық процестерді белсендіруге қабілетті.*

Биоактивті композиттер — органикалық және бейорганикалық фазалардың үйлесімді қоспасы, олардың әрқайсысы материалдың *механикалық, биологиялық және химиялық* қасиеттеріне өз үлесін қосады.

Мақсат — тірі тіннің құрылымдық және функционалдық қасиеттеріне барынша ұқсас жасанды материал алу.



Биоактивті композиттердің мәні мен түрлері



БИОАКТИВТІЛІК ҰҒЫМЫ

Биоактивтілік – бұл материалдың тірі ағза тіндерімен химиялық немесе биохимиялық байланыс түзу қабілеті. Мұндай материалдар:

- жасуша адгезиясын, пролиферациясын және дифференциациясын ынталандырады;
- остеогенез және ангиогенез процестерін белсендіреді;
- қабынуға қарсы және антимикробтық әсер көрсетеді.



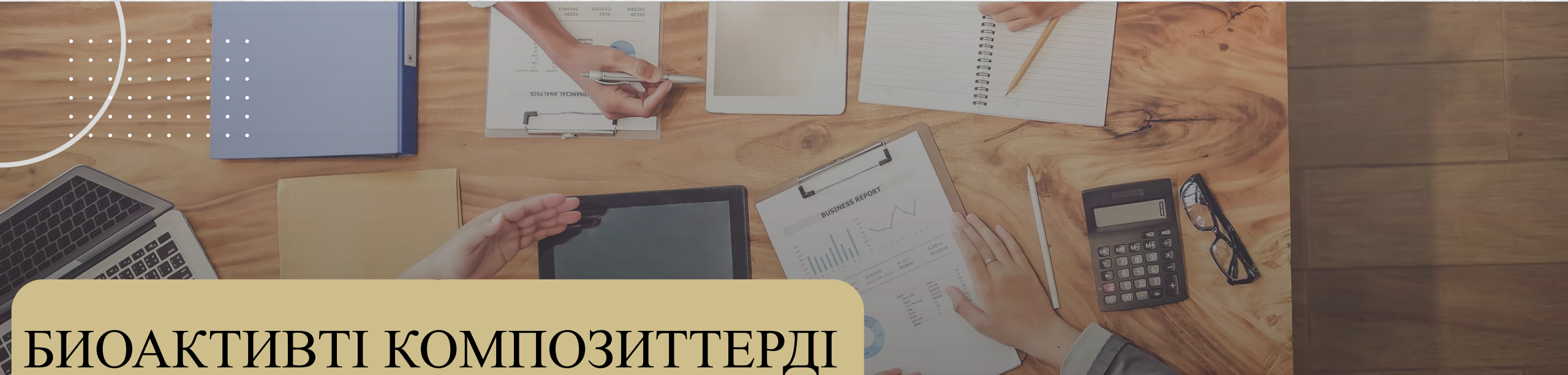
БИОАКТИВТІ КОМПОЗИТТЕРДІҢ ТҮРЛЕРІ

Түрі	Сипаттамасы
Полимер-наноқұрылымды композиттер	Хитозан, желатин, ПЛА + нанобөлшектер
Биостекло негізіндегі композиттер	$\text{SiO}_2\text{--CaO--P}_2\text{O}_5$ негізді шынылар
Гидроксиапатит-	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

БИОАКТИВТІ КОМПОЗИТТЕРДІ АЛУ ТЕХНОЛОГИЯСЫНЫҢ НЕГІЗГІ КЕЗЕҢДЕРІ

Биоактивті
композиттерді дайындау
көпсатылы үрдіс болып
табылады. Оның негізгі
кезеңдері:

- 1 Шикізатты таңдау және дайындау.**
Табиғи немесе синтетикалық полимерлер мен бейорганикалық қосылыстар таңдалады (мысалы, хитозан мен гидроксиапатит).
- 2 Компоненттерді араластыру.**
Физикалық (механикалық) немесе химиялық әдістермен біркелкі композиция түзіледі.
- 3 Қалыпқа келтіру (формалау)**
Бұл кезеңде электроспиннинг, құю немесе 3D биобаспа әдістері қолданылады.
- 4 Кептіру және термоөңдеу**
Материалдың құрылымдық тұрақтылығы қамтамасыз етіледі.
- 5 Стерилизация және биологиялық тестілеу.**
Композиттің цитоуыттылығын және биосәйкестігін тексеру жүргізіледі.



БИОАКТИВТІ КОМПОЗИТТЕРДІ АЛУ ӘДІСТЕРІ

Сол-гель әдісі

- Бұл әдіс бейорганикалық фаза түзу үшін кең қолданылады. Ол төмен температурада жүреді және наноқұрылымды өнім алуға мүмкіндік береді.

Электроспиннинг (электрлік иіру)

- Полимер ерітінділерінен наноөлшемді құрылымдар алу арқылы жасуша өсіруге арналған scaffold алынады.

3D биопринтинг.

- Компьютерлік модельдеу арқылы күрделі құрылымды биоматериалдарды дәл басып шығару мүмкіндігі бар

Механохимиялық синтез.

- Ұнтақтарды жоғары энергиялы диірмендерде араластыру арқылы нанобөлшектердің біркелкі таралуына қол жеткізіледі.

Технологиялық сызба:

- 1 Хитозан 2% ерітіндісі (сірке қышқылында) дайындалады.
- 2 Гидроксиапатит ұнтағы енгізіліп, ультрадыбыстық араластырғышта диспергирленеді.
- 3 Алынған гель қалыпқа құйылып, – 40 °С-та мұздатылады.
- 4 Freeze-drying (лиофильдік кептіру) → кеуекті губка алынады.
- 5 Ca^{2+} ерітіндісімен иондық қатырту.
- 6 Стерилизациядан кейін scaffold биосынаққа жіберіледі.

Гидроксиапатит/Хитозан композиті мысалында

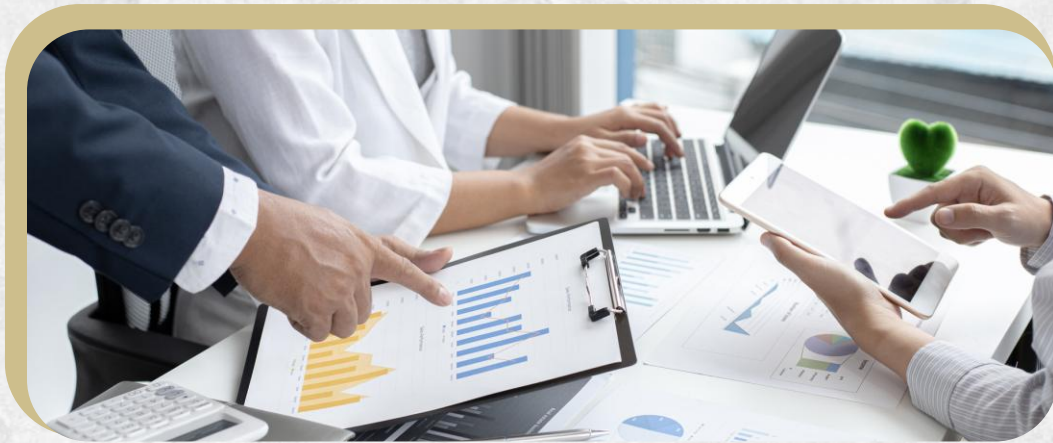
Гидроксиапатит пен хитозан негізіндегі биоактивті композит сүйек регенерациясында кеңінен қолданылады.

***Хитозан** — табиғи полисахарид, биосәйкестілігі және бактерияға қарсы қасиеті жоғары.

***Гидроксиапатит** ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) — сүйек тініне ұқсас минерал.

Бұл екі компонент біріктірілгенде жасушалардың адгезиясы артып, сүйек регенерациясы жылдам жүреді.

БИОАКТИВТІ КОМПОЗИТТЕРДІҢ АРТЫҚШЫЛЫҚТАРЫ МЕН БОЛАШАҒЫ



Биосәйкестілік
Биоыдырағыштық
Механикалық беріктік
Жасушалық белсенділікті
ынталандыру
Иммунологиялық қауіпсіздік



- 4D биопринтинг: уақыт өте келе форма өзгертетін интеллектуалды композиттер.
- Наногибридті биоактивті жүйелер: нанобөлшектер мен гендік материалдарды біріктіру.
- AI арқылы дизайн: жасуша–материал өзара әсерін модельдеу.
- Эко-биоматериалдар: табиғи полимерлер мен қалдық биомассадан алынған композиттер.

Қолдану салалары

Медицина: сүйек және тіс импланттары, жара таңғыштары;

Фармация: дәрілік заттарды біртіндеп босататын жүйелер;

Тін инженериясы: scaffold және жасуша тасымалдағыш ретінде;

Косметология: тері регенерациясы және тыртықтарды емдеу үшін.



Тамақ өнеркәсібі қалдықтарынан биоактивті гидроксиапатит /целлюлоза композиттерін «жасыл» синтезбен алу

Мақсаты: Бактериялық целлюлозаны пайдаланып, жұмыртқа қабығы мен одан алынған гидроксиапатит негізінде биоактивті композиттер алу.

Міндеттері:

- Жұмыртқа қабығынан гидроксиапатит синтездеу;
- Бактериялық целлюлозамен біріктіріп композит алу;
- Алынған материалды XRD, FTIR, SEM әдістерімен талдау;
- Биоактивтілік пен биосәйкестілікті анықтау.

Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials (2022) 32:4614–4626
<https://doi.org/10.1007/s10904-022-02462-2>



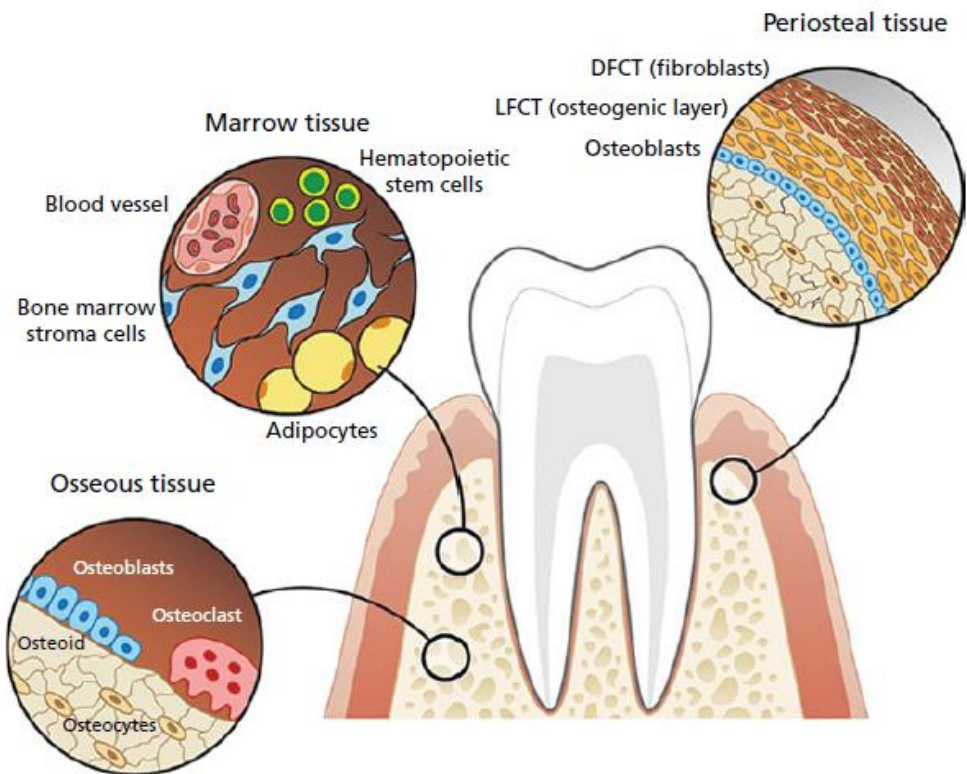
Green Synthesis of Bioactive Hydroxyapatite/Cellulose Composites from Food Industrial Wastes

Mohamed Abdelraof¹ · Mohammad M. Farag² · Zainab M. Al-Rashidy³ · Hanaa Y. A. Ahmed⁴ · Houssni El-Saied⁵ · Mohamed S. Hasanin⁵

Received: 20 May 2022 / Accepted: 1 August 2022 / Published online: 17 August 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

This work aimed at conversion of worthless industrial wastes to valuable product. Herein, bioactive composites based on bacterial cellulose (BC) and eggshell or eggshell-derived hydroxyapatite (HAp) were prepared by a green method using *Gluconacetobacter xylinum* bacteria. The effect of addition of eggshell (BC/Eg) and eggshell-derived HAp (BC/HAp-Eg) on the bacterial cellulose yield, biodegradation and biocompatibility was studied. For comparison, HAp derived from chemical precursors was synthesized (BC/HAp-ch). The resultant composites were characterized by XRD, FTIR, and SEM/EDX. Furthermore, the biodegradation and bioactivity were assessed in SBF, and the cell viability was studied against oral normal cells. The results showed that the productivity of BC applied HAp-derived eggshell (1.83 g/L) was higher than that of using (1.37 g/L). Interestingly, the eggshell was converted to $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ during incubation in the bacterial culture medium, while $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ was formed as a secondary phase when using either eggshell-derived HAp or chemically-derived. The in vitro bioactivity test in SBF showed that all composites were induced the formation of a bone-like apatite layer on their surface with Ca/P ratio, 1.49, 1.35, and 1.41 for BC/Eg, BC/HAp-ch, and BC/HAp-Eg, respectively, near to the ratio in the natural HAp. Finally, the in vitro cell viability test was confirmed good biocompatibility against the composites. However, at high sample concentration (250 $\mu\text{g/mL}$), BC/HA-Eg showed the higher cell viability (95.2%) than that of BC/Eg (80.5%) and BC/HA-ch (86.2%). In conclusion, eggshell waste could be used directly with bacterial cellulose to produce bioactive composites without the need to convert it to HAp which reduced the cost of production and thus has a higher economic return. Obviously, eggshell waste can act as calcium, organic matter source, pH preservation, nitrilizing agent along with potential instead of costly buffering agent in the BC culture medium and further for increased the BC production.



Гидроксипатит
($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) сүйек пен тіс
тіндерінің негізгі минералдық
компоненті болып табылады.

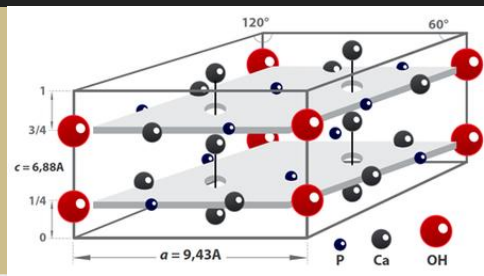
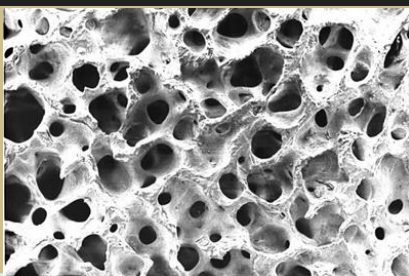
Биоактивтілік

Биосәйкестік

Остеокондуктивтілік

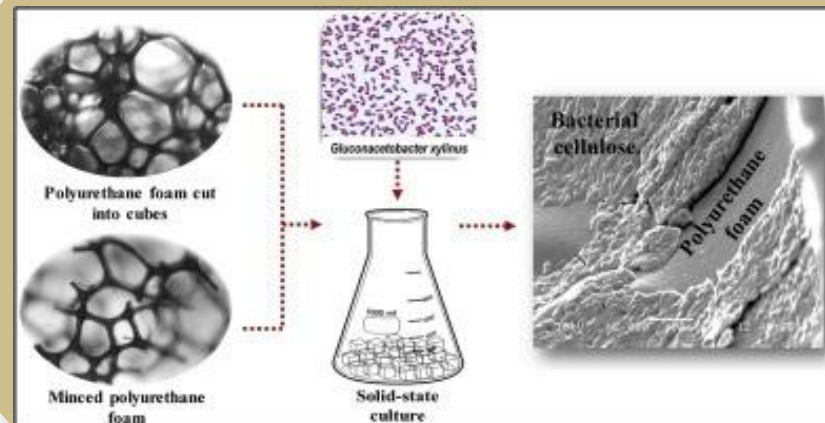
Сынғыштығы мен төмен механикалық беріктігі
оны қолдануды шектейді. Бұл кемшілікті жою үшін
гидроксипатитті табиғи немесе синтетикалық
полимерлермен біріктіру арқылы **композиттер**
алынады.

МАТЕРИАЛДАР МЕН ӘДІСТЕР



Жұмыртқа қабығы жуылып, кептіріліп,
900°C-та күйдірілді → CaO алынды.
CaO мен H₃PO₄ әрекеттесіп
гидроксиapatит түзілді.

Гидроксиapatит алу процесі



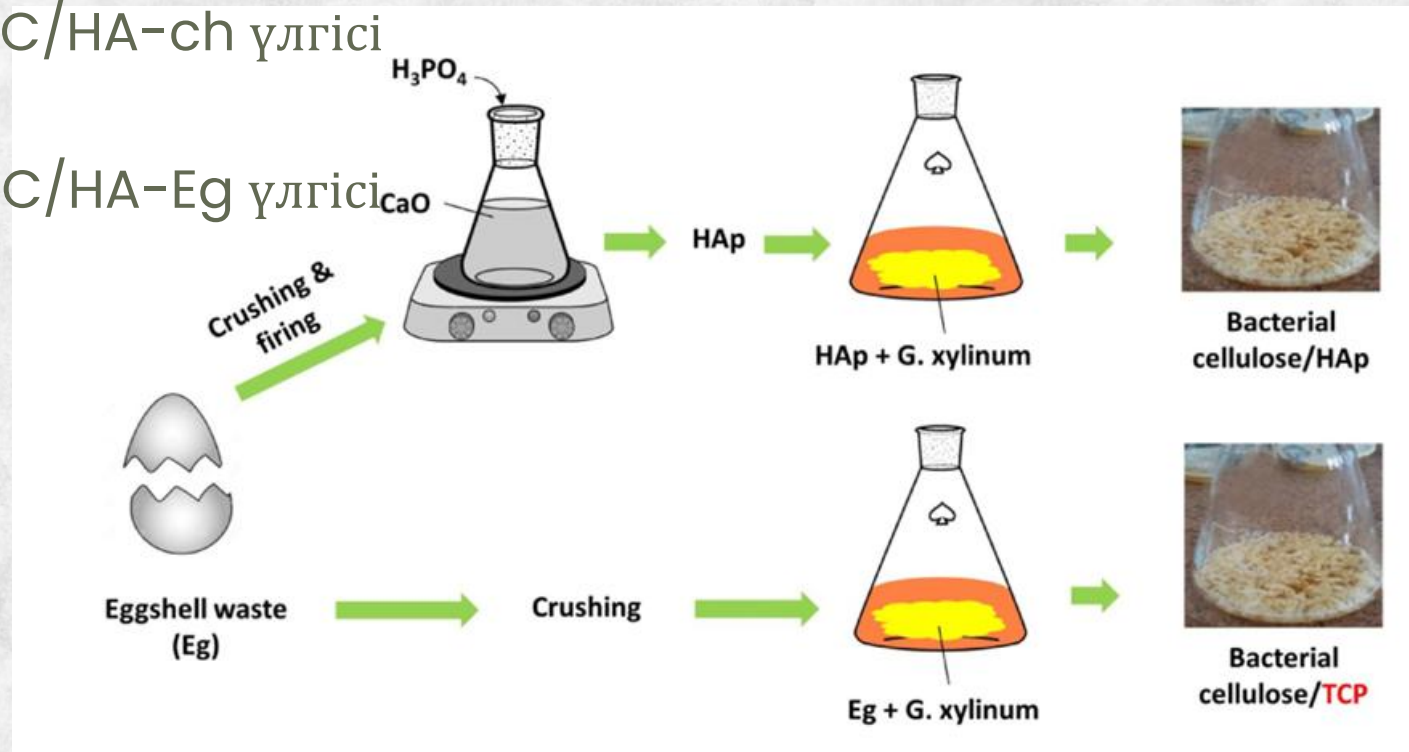
Бактериялық целлюлоза
(*Gluconacetobacter xylinum* штамы)
стандартты ГС (Hestrin–Schramm)
қоректік ортасында өсірілді.

Бактериялық целлюлоза алу

Композиттер дайындау

Бактериялық целлюлоза өсірілетін ортаға келесі компоненттер қосылды:

- жұмыртқа қабығы ұнтағы; → BC/Eg үлгісі
- химиялық жолмен алынған гидроксиапатит; → BC/HA-ch үлгісі
- жұмыртқа қабығынан алынған гидроксиапатит. → BC/HA-Eg үлгісі



6-сурет. Жұмыртқа қабығынан алынған гидроксиапатит негізінде композиттерді синтездеу сызбалық көрінісі.

In vitro биодеградация және биоактивтілік сынағы

In vitro жағдайда сүйек түзілу белсенділігі композит үлгілерінің бетінде гидроксил-карбонатталған апатит (HCA) түзілуін бақылау үшін жасанды дене сұйықтығында (SBF) зерттелді.

Үлгілер SBF ерітіндісі бар ыдысқа салынып, 37°C температурада және $\text{pH} = 7.4$ жағдайында 1, 3, 7 және 14 күн бойы инкубацияланды.

Белгіленген уақыт өткен сайын, инкубациялық ортаға үлгілерден бөлінген иондардың концентрациясы арнайы түстік талдау жиынтығы (**SPECTRUM**, Египет) көмегімен өлшенді.

Үлгілердің бетінде түзілуі мүмкін гидроксиапатит қабатын зерттеу үшін сканерлеуші электрондық микроскоп (**SEM**) және энергиялық дисперсиялық рентгендік анализ (**EDX**) әдістері қолданылды.



МТТ тесті арқылы цитоуыттылықты бағалау

ОЕС жасушалары 96 ұяшықты планшетке егілді және композиттердің әртүрлі концентрацияларымен өңделді: 15.63, 31.25, 62.5, 125 және 250 $\mu\text{г}/\text{мл}$.



Барлық үлгілер 5% CO_2 атмосферасында, 37°C температурада 24 сағат бойы инкубацияланды.



Инкубация соңында әр ұяшыққа 5 мг/мл МТТ ерітіндісі енгізіліп, тағы 4 сағат бойы 37°C-та ұсталды.

МТТ тесті ВС/Еg, ВС/НА-ch және ВС/НА-Еg композиттерінің қалыпты ауыз қуысы эпителий жасушаларына (ОЕС) әсерін анықтау үшін қолданылды.

XRD талдау нәтижелері

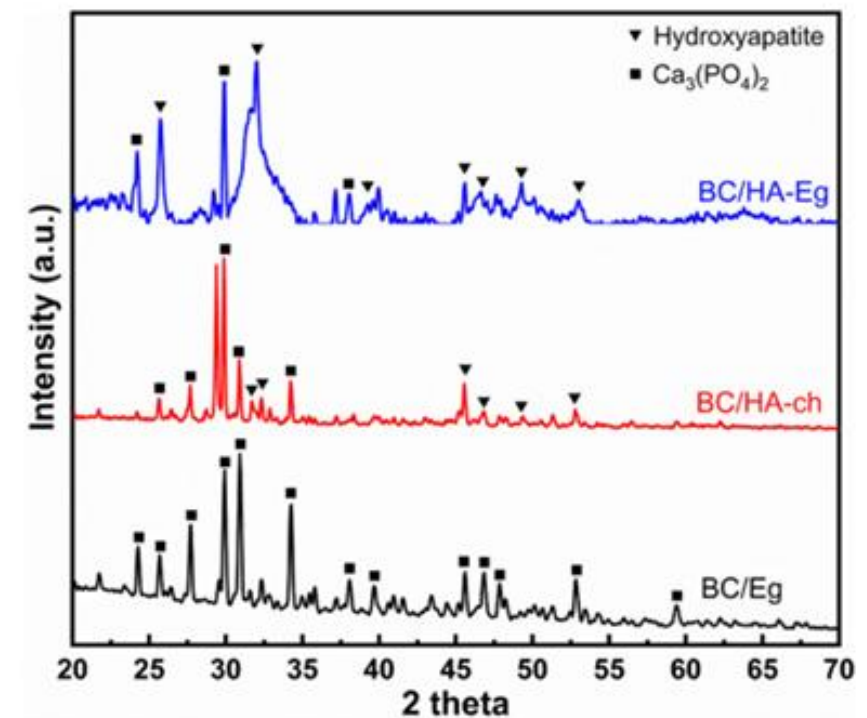
Sample	pH		Reducing sugar (g/L)		Cellulose Yield (g/L)	Increase (I) or decrease (D) ratio in Cellulose yield (%)
	Initial	Final	Initial	Final		
HS (control)	6.1	4.9	20	5.6	1.22	–
Eggshell (0.1%)	6.2	7.2	20	8.8	1.37	12.29 (I)
Eggshell-HAp (0.1%)	6.3	7.1	20	5.7	1.83	50 (I)
Chemical-HAp (0.1%)	6.2	7.1	20	7.2	1.84	50.8 (I)

- XRD үлгілері гидроксиапатиттің түзілуін растады.
- Негізгі шыңдар $2\theta = 25.9^\circ, 31.8^\circ, 32.9^\circ, 34.1^\circ, 39.9^\circ, 46.7^\circ$.
- Жұмыртқа қабығынан алынған үлгі (HAp-Eg) жоғары кристалдылық көрсетті.

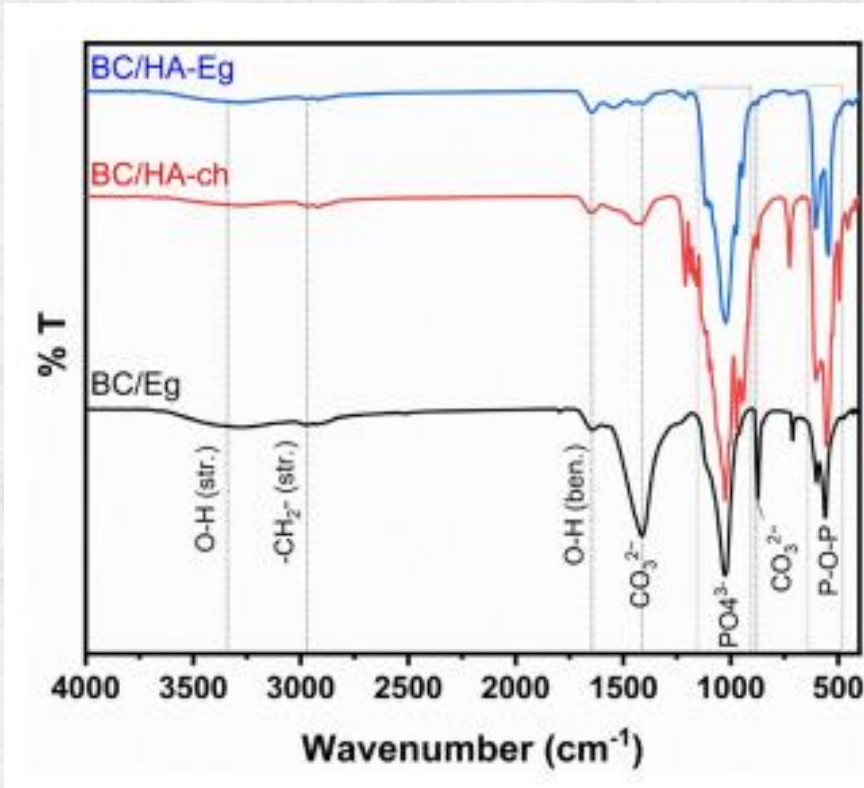
- ВС/НА композиттерінде шың қарқындылығы азайған → HAp целлюлозаға енген.
- Барлық үлгілер таза және наноқұрылымды фазаға ие.

	0.025	0.05	0.1	0.25	0.5	0.75	HS (control)
Eggshell concentration (%)							
pH							
Initial	6	6.2	6.2	6.2	6.4	6.6	6.1
Final	6.4	6.7	7	7.1	7.4	7.4	4.9
Reducing sugar (g/L)							
Initial	20	20	20	20	20	20	20
Final	6.7	5.7	8.8	7.6	10.2	9.7	5.6
Cellulose yield (g/L)	1.21	1.23	1.37	1.24	1.03	0.91	1.22
Eggshell-derived HAp concentrations (%)							
pH							
Initial	6	6.3	6.2	6.5	6.4	6.6	6.1
Final	6.4	6.7	7.2	7.1	7.3	7.3	4.9
Reducing sugar (g/L)							
Initial	20	20	20	20	20	20	20
Final	8.5	5.7	5.7	5.5	5.9	7.8	5.6
Cellulose yield (g/L)	1.48	1.94	1.83	1.91	1.68	1.03	1.22
Eggshell-derived HAp concentrations (%)							
pH							
Initial	6	6.2	6.2	6.3	6.5	6.6	6.1
Final	6.4	6.3	7.1	7.1	7.4	7.1	4.9
Reducing sugar (g/L)							
Initial	20	20	20	20	20	20	20
Final	6.2	6.6	7.2	9.4	6.8	7.3	5.6
Cellulose yield (g/L)	1.77	2.14	1.84	1.45	0.96	0.81	1.22

XRD талдау нәтижелері



FT-IR



BC/Eg, BC/HA-ch және
BC/HA-Eg композиттерінің
FT-IR спектрі

FT-IR спектрінде BC негізіндегі композиттердің негізгі функционалдық топтары анықталды. 3274, 2970 және 1642 см⁻¹ аймағындағы жолақтар целлюлозадағы O-H және -CH₂- топтарының тербелісіне сәйкес келеді.

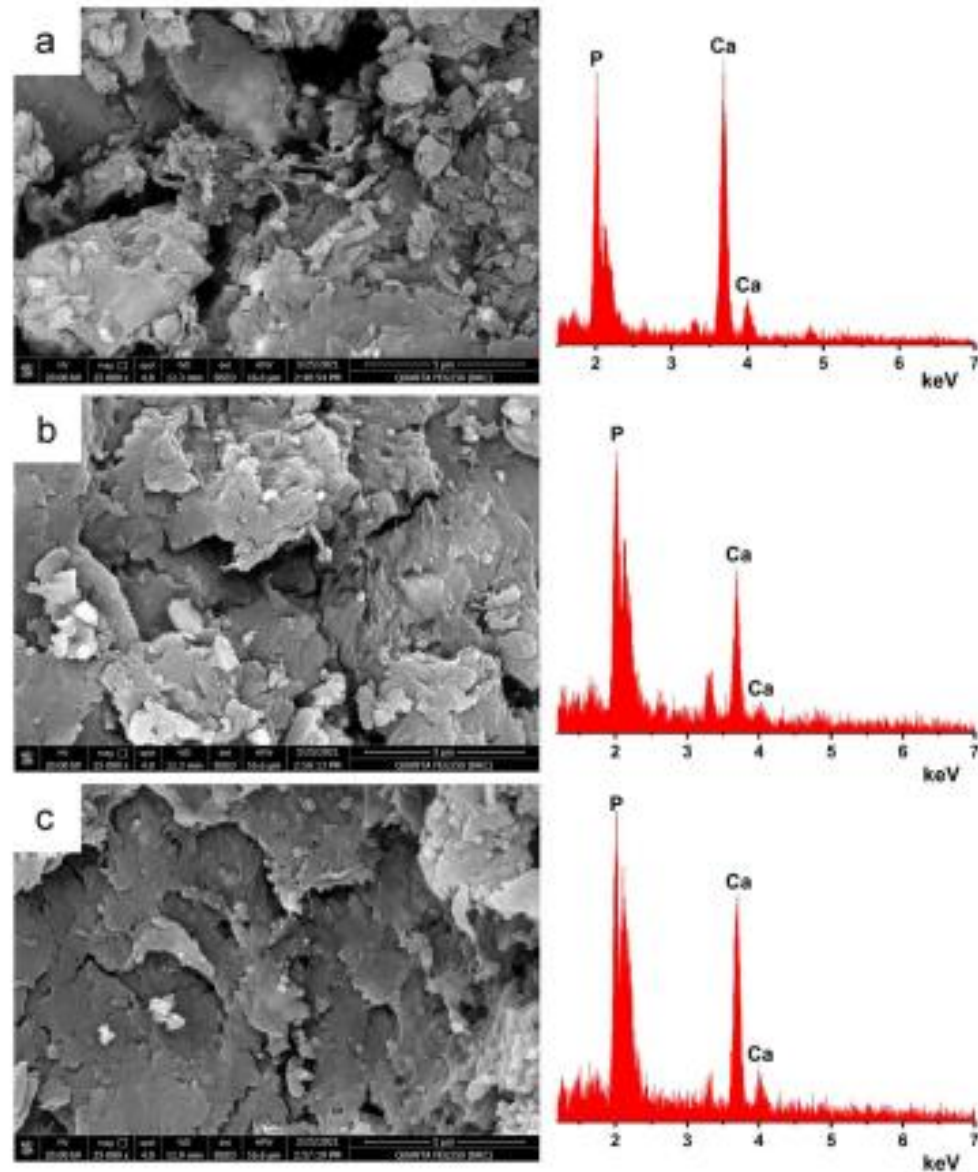
900–1150 см⁻¹ аралығындағы PO₄³⁻ топтарына тән жолақтар BC/HA-ch және BC/HA-Eg үлгілерінде айқын бөлінген, бұл енгізілген HAp-тың жақсы кристалдануын көрсетеді. Ал BC/Eg үлгісінде бұл жолақ әлсіз, HAp-тың нашар кристалдануын көрсетеді.

875 және 1415 см⁻¹ жолақтар CO₃²⁻ топтарына тән және BC/Eg үлгісінде айқынырақ байқалды, бұл жұмыртқа қабығындағы карбонат иондарының болуына байланысты. 561 және 600 см⁻¹ аймағындағы жолақтар P-O-P байланыстарына сәйкес келеді.

SEM/EDX

- SEM микросуреттері барлық композиттердің біркелкі морфологияға ие екенін көрсетті. BC/Eg үлгісінде бастапқы жұмыртқа қабығында фосфат иондары болмағанына қарамастан, EDX нәтижесінде фосфор шыңы анықталды. Бұл Ca^{2+} иондарының өсірілетін ортадағы фосфатпен әрекеттесіп, Са-фосфат кристалдарын түзуімен түсіндіріледі.
- In-situ синтез жұмыртқа қабығын кальций-фосфатқа айналдыруға мүмкіндік беріп, механикалық араластыру әдісінен артық болды. EDX арқылы анықталған Са/Р қатынасы BC/Eg үшін 1.35 болып, HAp-қа (1.67) жақын болды, ал BC/HA-ch және BC/HA-Eg үлгілерінде сәйкесінше 0.56 және 0.83 болды.

Fig. 4 SEM coupled with EDX analysis of **a** BC/Eg, **b** BC/HA-ch, and **c** BC/HA-Eg composites



SEM және EDX талдауы: а) ВС/Еg, b) ВС/НА-сh, және с) ВС/НА-Еg композиттері

In Vitro Bioactivity Test

Дайындалған композиттердің in vitro деградациясы және биоактивтілігі SBF-та 30 күн бойы сіңіру арқылы зерттелді. Бұл әдіс материалдың тірі тінге адгезия қабілетін бағалауда кеңінен қолданылады. Биосәйкестіліктің негізгі көрсеткіші — SBF-та сіңірілгенде материал бетінде сүйек тәрізді апатит кристалдарының түзілуі.

SEM/EDX анализі нәтижесінде барлық композит бетінде жаңа апатит кристалдары қалыптасқаны анықталды. BC/HA-ch және BC/HA-Eg үлгілерінде гидроксиапатиттің типтік кристалл пішіні көрінді, ал BC/Eg үлгісінде бұл айқын байқалмады. EDX спектрлерінде BC/HA-ch және BC/HA-Eg беттерінде кальцийдің мөлшері сіңірілгеннен кейін артқаны көрінді, ал BC/Eg-де өзгеріс аз болды.

Ca/P атомдық қатынасы SBF-та сіңіруден кейін BC/Eg үлгісінде 1.49 болып, гидроксиапатиттің стандарттық мәніне (1.67) жақын болды. BC/HA-ch және BC/HA-Eg үлгілерінде бұл қатынаста үлкен өзгерістер байқалды, бұл бактерия өсірілетін ортадағы фосфат иондарының тұндыруына байланысты.

pH мәні 14 күн ішінде барлық үлгілерде ұқсас динамика көрсетті: бастапқыда 7.40-тен төмендеп, 6.68–6.90 аралығына дейін жетіп, содан кейін қайта көтерілді.

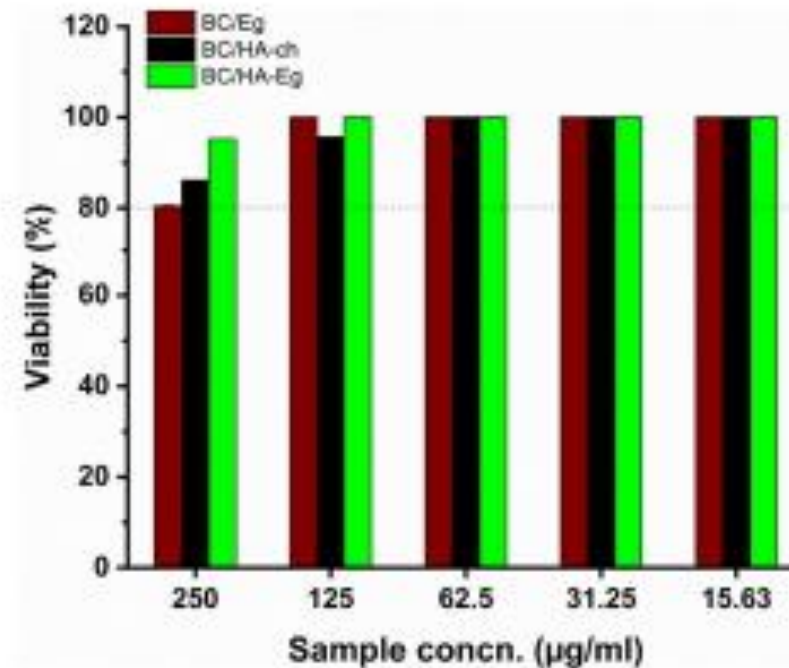
SBF-тегі кальций және фосфат иондарының концентрациялары 1 күннен кейін азайып, содан соң тербеліп тұрды. Бұл иондардың төмендеуі жаңа сүйек тәрізді апатит қабатының түзілуіне байланысты тұндырылу процесін білдіреді. Кейінгі өзгерістер тұндыру мен еру процестерінің қайталануымен түсіндіріледі.

Биосәйкестілік анализі

BC/HA-Eg, BC/HA-ch және BC/Eg композиттері 15.63–250 $\mu\text{g}/\text{мл}$ концентрацияда қалыпты ауыз эпителий жасушаларына (OEC) токсикалық әсер көрсетпеді, тірі жасуша саны 50%-дан жоғары болды.

250 $\mu\text{g}/\text{мл}$ концентрацияда BC/HA-Eg үлгісі ең жоғары тіршілік деңгейін (95.2%) көрсетті.

SEM/EDX талдауы композиттердің гидроксиапатит тұндырылуын жақсартқанын растады. Табиғи шығу тегі (мысалы, жұмыртқа қабығы) гидроксиапатитінің жоғары Ca/P қатынасы OEC жасушаларының өсуін қолдайды. Бұл кальцийдің жасуша рецепторлары арқылы реттелуіне және сүйекке ұқсас жаңа тіннің түзілуін ынталандыруға ықпал етеді.



BC/Eg, BC/HA-ch және BC/HA-Eg композиттерінің қалыпты ауыз жасушаларының тіршілік қабілеттілігін MTT әдісімен бағалау (in vitro).

Қорытынды

- Жұмыртқа қабығы қалдықтары, жұмыртқа қабығынан және химиялық жолмен алынған гидроксиапатит (НАр), сонымен қатар бактериялық целлюлоза (BC) негізіндегі биоактивті композиттер *G. xylinum* бактериясы көмегімен аграрлық қалдықтардан альтернативті қоректік ортада *in situ* дайындалды. Жұмыртқа қабығы буфер және арзан НАр көзі ретінде алғаш рет химиялық алдын ала өңдеусіз BC/НАр композит өндірісінде қолданылды.
- FTIR талдауы BC мен керамикалық толтырғыштардың негізгі функционалды топтарын көрсетті. SEM/EDX анализі композиттердің біркелкі морфологиясын растаса, SBF-та *in vitro* биоактивтілік сүйек тәрізді апатит қабатының түзілуін дәлелдеді. *In vitro* жасуша тіршілік қабілеттілігі тесті композиттердің жақсы биосәйкестілігін көрсетті, бұл оларды биомедициналық қолдануға жарамды етеді.
- Алдағы жұмыстарда BC/жұмыртқа қабығы композитінің жақсы биосәйкестілігіне сүйене отырып, жұмыртқа қабығын гидроксиапатитке айналдырмай, тікелей композит дайындау мүмкіндігі қарастырылады, бұл өндіріс шығындарын азайтады.