

ВІДГУК

офіційного опонента доктора технічних наук, професора **Савчука Петра Петровича** на дисертацію **Ульянич Наталії Володимирівни** «Формування властивостей кальцій-фосфатної кераміки для регенеративної медицини» що подана до спеціалізованої вченої ради Д26.207.03 на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 05.02.01 – «Матеріалознавство»

Актуальність теми дисертації визначається перш за все тим, що використання імплантаційних матеріалів для усунення кісткових дефектів зараз набуває великих масштабів, як через збільшення захворювань кісткової тканини, так і завдяки розвитку медичних технологій відновлення тканин.

Дисертаційна робота присвячена вивченню можливостей створення імплантатів нового покоління, які здатні на клітинному рівні впливати на відновлення кісткової тканини завдяки структурним, фазовим змінам та легуванню кальцій-фосфатних матеріалів синтетичного походження, що є аналогами мінерального компоненту кісткової тканини. Актуальність роботи обумовлюється ще тим, що пропонуються досить прості не енерговитратні методи виготовлення новітніх біоматеріалів, які не тільки замінять високовартісні закордонні аналоги, але й підвищать якість операцій вітчизняної регенеративної медицини. Слід відзначити, що авторка при розробці матеріалів з новими фізико-хімічними властивостями чітко притримується принципу чистоти біоматеріалу і в своїй роботі використовує тільки остеотропні компоненти, які забезпечують високу біосумісність кінцевого продукту. На сьогодні недостатньо досліджень у даному напрямку і для отримання поліфазних та композитних біоматеріалів використовуються високовартісні енергозатратні технології з додаванням в композиції компонентів, які не є фізіологічними по відношенню до кісткової тканини.

Вищевідзначене обумовлює актуальність рецензованої роботи, яка присвячена розв'язанню важливої науково-прикладної проблеми отримання біоматеріалів для регенеративної медицини на базі досліджень наукових фізико-хімічних основ і удосконалення технологічних методів обробки синтезованого осаду нестехіометричного гідроксиапатиту розчинами органічних кислот, легування його кремнієм, створенням наноструктурованої композитної кераміки та створенням біосумісної антибактеріальної поверхні з гідроксиапатиту на титанових імплантатах.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами

Тема дисертаційної роботи відповідає двом пріоритетним напрямам «Нові речовини і матеріали» і «Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань» відповідно до Закону України № 2519-IV від 09.10.2010 р. та напряму наукових досліджень Інституту проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України «Прогресивні матеріали і технології, наноматеріали, біомедичне матеріалознавство, матеріали водневої енергетики, надлегкі конструкційні матеріали», затвердженому Постановою Бюро ВФТПМ НАН України від 16.05.2019 р., пр.№ 8. Дисертація є узагальненням наукових результатів, отриманих за участю автора при виконанні науково-дослідних тем в рамках відомчого замовлення Інституту проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України та конкурсних проєктів, де авторка дисертаційної роботи була відповідальним виконавцем десяти проєктів в період з 2015 до 2021 року.

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, достовірність отриманих результатів

Наукові положення та отримані висновки в дисертаційній роботі є достатньо обґрунтованими і відзначаються достатньою новизною, що підтверджується застосуванням стандартних та сучасних методів досліджень

основних фізико-хімічних властивостей. Проведені дослідження підтверджені визначеними біологічними властивостями в доклінічних дослідженнях на стовбурових клітинах, клітинах крові та після імплантації розроблених біоматеріалів в кісткову тканину.

Наукова новизна одержаних результатів

Наукова новизна, сформульована у вступі (стор. 26) і полягає у наступному:

1. Вперше показано, що при обробці осаду нестехіометричного гідроксиапатиту аскорбіновою кислотою, а також при легуванні його кремнієм, виділяється фаза α -трикальційфосфату в температурному інтервалі 800 -1100 °С, яка, згідно з літературними даними, виділяється при температурі відпалу вище 1250 °С, це дає змогу отримати більш активну трифазну кераміку в температурному інтервалі 800 - 1100 °С.
2. Вперше виявлено, що на фазоутворення після відпалу в інтервалі температур 800 - 1300 °С осаду нестехіометричного гідроксиапатиту, обробленого органічними кислотами, впливає тип кислоти. Обробка осаду аскорбіновою кислотою сприяє утворенню трифазної кальцій-фосфатної кераміки (ГАП , β -ТКФ, α -ТКФ) в інтервалі температур 800-1300 °С, а при обробці лимонною кислотою трифазна кальцій-фосфатна кераміка утворюється тільки при 1100 °С.
3. Вперше встановлено, що введення тонкодисперсного колоїдного діоксиду кремнію до осаду нестехіометричного гідроксиапатиту, приводить до утворення трифазної кальцій-фосфатної кераміки (ГАП , β -ТКФ, α -ТКФ) в інтервалі 800 - 1200 °С, а оптимізований за структурою, фазовим складом та адсорбційними властивостями матеріал має виражені остеоіндуктивні властивості, що підтверджено доклінічними дослідженнями.
4. Вперше показано, що розроблений композиційний наноструктурований матеріал з трифазної кальцій-фосфатної кераміки, армованої голкоподібними частинками β -ТКФ, для збереження об'єму матеріалу в процесі заміщення кістковою тканиною, може індукувати розвиток кісткових клітин за рахунок

сполучення більш розчинних наночастинок сфероїдної форми і менш розчинних частинок голчатої структури, та завдяки створеній системи пор від нано- до макророзміру, що сполучаються між собою і поступово збільшуються під впливом фізіологічної рідини, ефективно заміщуватись повноцінною кістковою тканиною. Біологічні властивості матеріалу підтверджені доклінічними дослідженнями.

5. Вперше встановлено, що покриття, нанесені мікроплазмовим напиленням на титанові імплантати, з гідроксиапатиту, легованого сріблом, та покриття з гідроксиапатиту, на яке нанесені наночастинки срібла плазмовим диспергуванням у вакуумі, мають майже однаковий антибактеріальний вплив на відомі збудники госпітальних гнійно-запальовальних захворювань.

Практичне значення отриманих результатів

Авторкою визначено технологічні параметри модифікування синтезованого нестехіометричного гідроксиапатиту та оптимальну температуру його термообробки з метою отримання кальцій-фосфатної кераміки з контрольованою резорбцією та здатністю до заміщення.

Розроблено і отримано принципово нову наноструктуровану композиційну кальцій-фосфатну кераміку, яка завдяки високій біоактивності та здатності зберігати свій об'єм в кістковому дефекті до повного заміщення, може використовуватись як самостійно, так і в якості основи для культивування кісткових клітин в регенеративній медицині.

Дослідження кальцій-фосфатної кераміки, легової кремнієм перспективне для використання в інженерії кісткової тканини. Попередні дослідження його використання в сполученні з плазмою крові, збагаченої тромбоцитами, показали не тільки виражені остеоіндуктивні властивості, але й сприяння утворенню хрящової тканини, що дуже перспективно для відновлення суглобів.

Отримано антибактеріальні покриття методом мікроплазмового напилення гідроксиапатиту, легованого сріблом, та покриття з гідроксиапатиту, на яке нанесені наночастинки срібла плазмовим

диспергуванням у вакуумі. Мікробіологічні дослідження з використанням тест-штамів відомих збудників госпітальних гнійно-запалювальних захворювань - грамнегативних (*Escherichia coli* та *Pseudomonas aeruginosa*) та грампозитивних (*Staphylococcus aureus*) бактерій проведені ДП "Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України" відповідно до стандартів ДСТУ ISO 10993 показали, що обидва типи покриттів чинять антибактеріальний вплив на всі досліджені патогенні тест-культури мікроорганізмів.

Базуючись на дослідженнях нестехіометричного гідроксиапатиту в композиції з аскорбіновою кислотою, створена БАД «Остеїн» для нормалізації мінерального обігу в організмі.

По розробленим матеріалам та покриттям отримано Сертифікати відповідності технічному регламенту №753 щодо медичних виробів згідно з вимогами ISO 13485, які дають дозвіл на використання в клініках України №UA.TR.039.1204, №217 та №UA.TR.039.1380, №229.

Повнота викладу основних результатів дисертації в опублікованих працях

Результати досліджень по дисертації опубліковані в 23 наукових працях, з яких 2 монографії, 5 статей - у фахових з технічних наук вітчизняних та закордонних виданнях, які індексуються наукометричними базами даних "Scopus" та ін., 7 тез доповідей у збірниках відповідних наукових конференцій та отримано 5 патентів України на корисну модель.

Оцінка змісту дисертації, її завершеність в цілому

Дисертаційна робота складається зі вступу п'яти розділів, висновків, списку використаних джерел і 2 додатків. Загальний обсяг дисертації складає 6,7 авторських аркушів, що включає 51 рисунок, 8 таблиць. Список використаних літературних джерел складається із 171 найменувань. Автореферат дисертації містить 27 сторінок тексту, в тому числі список із 23 робіт, опублікованих за темою дисертації. Об'єм та структура дисертаційної

роботи відповідає вимогам, що пред'являються МОН України до кваліфікаційних робіт на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 05.02.01 – Матеріалознавство.

У **вступі** належним чином обґрунтовано актуальність проблеми, сформульовано мету та задачі дослідження, визначено об'єкт, предмет та методи досліджень, відображено наукову новизну і практичну цінність роботи, наведено відомості щодо апробації роботи та публікації за темою дисертації із зазначенням особистого внеску здобувача.

Перший розділ присвячено аналізу сучасного стану і шляхів розвитку матеріалознавства в області біоактивних біоматеріалів з фосфатів кальцію, їх властивостей і можливості використання в сучасному напрямку медицини – регенеративній медицині. Узагальнено основні вимоги до матеріалів, які можуть бути носіями (scaffold) для клітин при створенні інноваційних біомедичних тканино-інженерних продуктів. Розглянуті перспективні методи отримання біоматеріалів з остеоіндуктивними властивостями. Розглянуті питання іонних заміщень в структурі гідроксиапатиту, їх впливу на властивості, зокрема увага приділена легуванню біоактивної кераміки кремнієм та сріблом. Приділено увагу антибактеріальним покриттям з кальційфосфатної кераміки на титанових імплантатах, нанесених мікроплазмовим напиленням. На підставі аналізу всіх цих даних сформульовані мета і визначені завдання дослідження.

У **другому розділі** представлено основні експериментальні методики, використані в роботі та наведені відомості по вихідним реагентам і синтезу фосфатів кальцію. Описано технологічні процеси обробки осаду нестехіометричного гідроксиапатиту органічними кислотами та введення в осад тонкодисперсного колоїдного діоксиду кремнію та водного розчину солі срібла. Описано методи отримання антибактеріальних покриттів та методи досліджень модифікованих кальційфосфатних матеріалів.

У **третьому розділі** наведено чіткі дані по вперше отриманим особливостям та закономірностям впливу змін рН осаду нестехіометричного гідроксиапатиту від 7

до 4 з застосуванням розчинів органічних кислот на фазові перетворення, параметри ґратки, розчинність та сорбційні властивості після термообробки нестехіометричного ГАП в інтервалі 800-1300°C.

На відміну від усталених даних, узагальнених у роботах Т. Каназави, З.З. Зимана, С.В. Дорожкіна, С.М. Данильченка та ін., згідно з якими послідовність фазових перетворень при підвищенні температури відпалу виглядає наступним чином: нестехіометричний гідроксиапатит при температурі відпалу вище 800°C внаслідок розкладання переходить в двофазну кераміку з гідроксиапатиту та β -ТКФ, а при відпалі при температурах понад 1150°C β -трикальційфосфат переходить в α -трикальційфосфат, авторкою встановлено, що після обробки осаду нестехіометричного гідроксиапатиту аскорбіновою та лимонною кислотами має місце інша послідовність фазоутворення при відпалі. З наведених діаграм на рис. 3.6 чітко впливає, що при обробці осаду нестехіометричного гідроксиапатиту аскорбіновою кислотою утворюється трифазна кальційфосфатна кераміка, де фаза α -ТКФ присутня після відпалу у всьому температурному інтервалі 800-1300°C.

Важливим є те, що при такому розчиненні у трьохфазній кераміці виникають нанопори, які сприяють різкому підвищенню адсорбційної активності біоматеріалу (рис.3.13), яка і необхідна для взаємодії матеріалу з фізіологічним середовищем.

Виявлено суттєві відмінності впливу аскорбінової і лимонної кислот на властивості отриманих матеріалів, відпалених у вказаному інтервалі температур. Визначено їх оптимальні властивості (фазовий склад, температура відпалу, адсорбційна активність) для використання в пластиці кісткових дефектів.

Інший, дуже важливий результат, пов'язаний із дослідженням впливу легування кремнієм на фазові зміни та фізико-хімічні і біологічні властивості кальцій-фосфатної кераміки. Зокрема показано, що легування кремнієм за методом, вибраним дисертанткою, теж приводить до утворення трифазної кальційфосфатної кераміки після відпалу в інтервалі температур 800-1200°C. Визначено, що

найбільшою здатністю до взаємодії з кістковою тканиною має кальцій-фосфатна кераміка відпалена при температурі 850°C.

Для визначення достовірності вибраного методу оцінки біоактивності матеріалу були проведені порівняльні дослідження біологічних властивостей кальційфосфатної кераміки відпаленої при 800°C та 850°C. Дослідження їх поведінки в кістковому дефекті показали, що матеріал з кращими адсорбційними властивостями володіє вираженими остеоіндуктивними властивостями, що підтверджує висновок результатів досліджень.

Проведено випробування, оптимальної за результатами досліджень кальцій-фосфатної кераміки, легованої кремнієм, в якості носія живих клітин. При культивуванні стовбурових клітин на гранулах кальцій-фосфатної кераміки, легованої кремнієм, визначено, що їх диференціація в кісткові клітини відбувається більш фізіологічно у порівнянні зі стандартним протоколом отримання кісткових клітин зі стовбурових клітин, а комбінація цього матеріалу з плазмою крові, збагаченою тромбоцитами, сприяє значному пришвидшенню заміщення матеріалу повноцінною кістковою тканиною, що є важливим при створенні біоактивних матеріалів для регенеративної медицини.

Четвертий розділ роботи присвячено дослідженню композитної біоактивної кераміки зі складовими різної розчинності та структурою пор від нано до макророзміру. Особливостями цього біоматеріалу є те, що при його створенні було використано всі фактори, що впливають на активну взаємодію з фізіологічним середовищем: наноструктурованість, висока біосумісність всіх компонентів, їх різна розчинність, що сприяє еволюції порової структури після взаємодії з біологічним середовищем, комбінація наночастинок трифазної кальційфосфатної кераміки з армуючими її голчастими частинками чистого β -ТКФ, який має меншу розчинність, ніж інші складові і створює об'ємний каркас для утворення по всьому об'єму дефекту кісткової тканини.

Слід відмітити, що всі складові отримані методами хімічного синтезу з водних розчинів солей кальцію і фосфату без довготривалих високотемпературних відпалів,

що здешевлює собівартість матеріалу, який може бути отриманий в достатній кількості. Наглядно показано зміни в структурі композиту під впливом рідин, що імітують фізіологічне середовище, які збільшують не тільки макропори, але й зберігають наноструктурованість.

Важливо, що прогнозовані властивості повністю підтверджені біологічними дослідженнями (рис. 4.3) де показано, що регенерація кісткової тканини відбувається по всьому об'єму дефекту і новоутворена кісткова тканина добре інтегрована з гранулами. В процесі заміщення матеріалу достовірно зменшується його доля в дефекті і збільшується кількість повноцінної кісткової тканини (табл. 4.2).

В **п'ятому розділі** представлені результати досліджень антибактеріальних властивостей поверхонь покриттів з гідроксиапатиту, легованого сріблом, нанесеного мікроплазмовим напиленням на титанову основу, та з гідроксиапатиту на яку нанесені наночастинки срібла плазмовим диспергуванням у вакуумі. Показано, що антибактеріальні властивості покриття, нанесеного мікроплазмовим напиленням з гідроксиапатиту, легованого сріблом, не поступаються антибактеріальним властивостям поверхні з наночастинками срібла, нанесених плазмовим диспергуванням в вакуумі. Антибактеріальні властивості створюються за рахунок біосумісного срібла, яке не має негативного впливу на регенеративні процеси на відміну від антибіотиків.

В той же час необхідно відзначити **зауваження** до рецензованої роботи, а саме:

1. В літературному огляді авторка, посилаючись на відповідні джерела відмічає, що при характеристиці фосфатів кальцію співвідношення Ca/P має важливе значення, але в роботі не вказано, яким чином визначалось співвідношення Ca/P в осадах нестехіометричного гідроксиапатиту, що використовувались для модифікування.
2. При створенні композитної кераміки, використано голчасті частинки β -трикальційфосфату для збереження об'єму імплантату в кістковому дефекті

до його повного заміщення кістковою тканиною. Відповідно до літературних даних, наведених дисертанткою, голчасті кристали гідроксиапатиту мають ще меншу розчинність і вищу міцність, можливо в деяких клінічних випадках було б доцільно замінити голчасті частинки β -трикальційфосфату на аналогічні з гідроксиапатиту.

3. Зважаючи на остеоіндуктивні властивості кальцій-фосфатної кераміки, легованої кремнієм, логічно було продовжити ці дослідження нанесенням покриттів з кальцій-фосфатної кераміки, легованої кремнієм на титанові імплантати.

4. Зважаючи на те, що адсорбційна активність модифікованої кальцій-фосфатної кераміки, після витримки в оцтово-ацетатному буфері, збільшується вдвічі (231,6 мг/л проти 115,1 г/л) в порівнянні з адсорбційною активністю немодифікованої кальцій-фосфатної кераміки, та враховуючи високу біоактивність цих матеріалів, доцільно було б звернути увагу на використання такого матеріалу в якості носія лікарських засобів, що не менш актуально для пролонгованого локалізованого вивільнення ліків.

5. Пункт 3 наукової новизни представлено як новітню методику, що є неприйнятним, хоча фактично автор позиціонує новий спосіб оцінки здатності біоматеріалу до резорбції. Також цей спосіб рекомендується запатентувати як об'єкт права промислової власності.

6. Розділ 5 роботи представлено як методи створення покриттів, хоча об'єктивно це нові способи отримання матеріалів, що підсилило б вагомість отриманих практичних результатів.

Зауваження не знижують загальну позитивну оцінку наукових та практичних результатів дисертаційної роботи.

Загальний висновок щодо роботи

На підставі вищенаведеного, слід відмітити, що дисертаційна робота Ульянич Наталії Володимирівни є завершеним науковим дослідженням, в

якому вирішена важлива науково-прикладна задача в області матеріалознавства біоматеріалів, яка полягає у виявленні впливу технологічних параметрів обробки синтезованого осаду нестехіометричного ГАП розчинами органічних кислот та легування його кремнієм на фізико-хімічні та біологічні властивості отриманої КФК; впливу наноструктурування та композиції біосумісних компонентів різних за розчинністю на остеогенні властивості створеного біоматеріалу; впливу методу введення срібла на анантибактеріальні властивості покриттів з біоактивної кераміки, що надалі дозволить науково-обгрунтовано отримувати нові біоматеріали зі заздалегідь заданими фізико-хімічними та біологічними властивостями і структурою.

Автореферат повною мірою відображає зміст та основні положення дисертаційної роботи, а робота загалом за своїм обсягом, актуальністю, науковим рівнем, новизною, а також достовірністю і практичною цінністю отриманих результатів повністю відповідає вимогам пунктів 9, 10 «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» (постанова Кабінету міністрів України від 24.07.2013, №567) та Вимогам до оформлення дисертації (Наказ МОН України від 03.02.2017, №40), а автор дисертації – Ульянчич Наталія Володимирівна, заслуговує на присудження їй наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 05.02.01 «Матеріалознавство».

Офіційний опонент,

професор кафедри матеріалознавства Луцького
національного технічного університету
доктор технічних наук, професор

П.П. Савчук



ПІДПИС ЗАСВІДЧУЮ:
Учений секретар
ЛУЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО
ТЕХНІЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ
доц. А.Земко