

ВІДГУК

офіційного рецензента на дисертаційну роботу

Анни Олександрівни Синиці

«Вплив модифікування магнетитом на особливості структуроутворення та властивості біомедичних композитів гідроксиапатит/магнетит/хітозан», що подається на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 132 «Матеріалознавство», технічні науки (13 Механічна інженерія).

Актуальність теми дисертаційної роботи

Представлена до захисту дисертаційна робота А.О. Синиці присвячена вирішенню важливої проблеми сучасної України, яка перебуває в стані війни – створенню потрійного композиційного матеріалу на основі біогенного гідроксиапатиту / магнетиту / хітозану, призначеного для регенерації та лікування ушкодженої кісткової тканини. В роботі висвітлені результати вивчення впливу магнетитової складової в гідроксиапатит-хітозановій матриці на формування структури композиційного матеріалу, його фізико-хімічні властивості та біосумісність у фізіологічному розчині, який моделює внутрішнє середовище організму людини. Визначенню вплив отриманих композитів на життєдіяльність живих клітин в умовах *in vitro*.

Головні вимоги до матеріалів-замінників кісткової тканини пов'язані з їх остеоіндуктивними властивостями, здатністю резорбувати в живому організмі з контрольованою швидкістю, відсутністю токсичних продуктів розкладу і механічною міцністю, яка забезпечує тимчасову підтримку в ураженій ділянці та сприяє васкуляризації. Вибір за основу композиційного матеріалу гідроксиапатиту біогенного (БГА) походження обумовлений його ефективністю при лікуванні дефектів кісткової тканини в ортопедії, травматології та стоматології. Головними перевагами використання гідроксиапатиту для створення композиційного матеріалу медико-біологічного призначення є біосумісність, фізико-хімічні властивості та низька собівартість.

Дисертаційна робота Синиці А.О. є продовженням проведених в 90-х роках в Інституті проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевича НАН України розробок біокомпозитів на основі біогенного гідроксиапатиту та випробувань імплантатів *in vivo*, які показали високу кісткоутворюючу роль в процесах остеогенезу, біосумісність з кістковими та м'язотканинними структурами, відсутність негативного впливу на окремі частини кісткової системи. Композити на основі БГА у вигляді гранул та блоків були успішно використані для заповнення кісткових порожнин у пацієнтів з пухлиноподібними захворюваннями кінцівок.

Дисертаційна робота Синиці А.О. була виконана в рамках науково-дослідних робіт Держбюджетної тематики Інституту проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевича НАН України: III-7-22 «Дослідження закономірностей формування структури та властивостей біокомпозитів медичного призначення», № держреєстрації 0122U000385, 2022-2024 рр; II-14-

21 «Дослідження адсорбційних властивостей та поведінки *in vitro* композитів медичного призначення на основі біогенного гідроксиапатиту, модифікованого магнетитом та хітозаном», № держреєстрації 012U111938, 2021-2022 рр; III-8-19 «Нові композиційні матеріали медичного призначення на основі гідроксиапатиту модифікованого магнетитом із хітозаном та бактеріцидними добавками», № держреєстрації 011U100508, 2019-2021 рр.

На сьогоднішній день даною проблематикою займаються в Інституті хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, в Медичному інституті Сумського державного університету, в Харківському національному університеті ім. В. Н. Каразіна, Інституті металофізики ім. Г. В. Курдюмова НАН України тощо.

Отже, розробка заміника кісткової тканини та його використання для регенерації ушкоджень та поранень постраждалого цивільного населення та військових є пріоритетним завданням сучасного матеріалознавства, хірургічної та реабілітаційної медицини в Україні.

Практична значимість роботи

В ході виконання дисертаційної роботи було проведено розробку нових композиційних матеріалів на основі біогенного гідроксиапатиту, до складу якого введено хітозан і магнетит, отриманий методами хімічного синтезу. Визначено вплив співвідношення складових композиту на морфологію, швидкість резорбції, магнітні властивості матеріалів.

Одержані композиційні матеріали пройшли успішне цитотоксичне випробування в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ (*Акт випробування зразків композиційних матеріалів біогенний гідроксиапатит / магнетит / хітозан, наданий Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ*) та були визнані перспективними для подальших досліджень і використання у відновній хірургії Клінікою неврології та нейроортопедії "Time+" (*Акт огляду зразків композиційних матеріалів біогенний гідроксиапатит / магнетит / хітозан, наданий Клінікою неврології та нейроортопедії "Time+" від 15.08.2023 р.*). Згідно результатів тестування, отримані композити були рекомендовані для подальших досліджень в якості магніточувливих матеріалів, перспективних для застосування в ортопедії та травматології.

Матеріали дисертаційної роботи були використані в навчальному процесі Кафедрою фізичної терапії та ерготерапії Національного університету фізичного виховання і спорту України (*Акт впровадження результатів наукових досліджень в освітній процес кафедри фізичної терапії та ерготерапії, наданий Національним університетом фізичного виховання і спорту України від 04.09.2023 р.*).

Оцінка змісту та завершеності дисертаційної роботи

Дисертаційна робота О.А. Синиці складається із вступу та п'яти розділів, загальних висновків, списку літературних джерел та додатків. Загальний обсяг роботи складає 222 сторінки, об'єм основного тексту – 191 сторінка, список використаних джерел – 221 найменування. В Додатках А-В

представлені Акти біомедичного випробування зразків композитів та використання матеріалів дослідження в освітньому процесі. В Додатках Г-Д наведено перелік публікацій дисертанта, в яких викладено основні результати дослідження, та представлені тези конференцій, на яких було проведено апробацію отриманого матеріалу.

У **вступі** проведено обґрунтування актуальності дисертаційної роботи, сформувано мету та завдання дослідження, надано опис предмету, об'єкту та методів дослідження, висвітлено наукову новизну та практичне значення отриманих результатів.

В **першому** розділі проведено огляд літературних першоджерел за темою дослідження. Розглянуто структуру кісткової тканини та перелічено головні вимоги до біоматеріалів – замінників кісткової тканини. Наведено приклади використання гідроксиапатиту для відновлення кісткової тканини. Проведено критичний аналіз перспективності використання біогенного гідроксиапатиту в біомедицині, його переваги, недоліки та джерела отримання. Висвітлено методи синтезу магнітних наночастинок, охарактеризовано їх структуру та магнітні властивості. Дано характеристику хітозану. Розглянуто приклади використання композиційних матеріалів на основі гідроксиапатиту, хітозану та наночастинок магнетиту в біомедичних дослідженнях. Проведено обґрунтування вибору напрямків дослідження.

В **другому розділі** надано опис методів синтезу біогенного гідроксиапатиту (БГА) та магнетиту, а також схему отримання порошкових композитів БГА/магнетит/хітозан. Розглянуто фізико-хімічні методи дослідження композитних матеріалів і їх складових; наведено алгоритми розрахунку ряду параметрів, які характеризують структуру та властивості отриманих композитів.

Третій розділ дисертаційної роботи присвячений дослідженню впливу хімічних методів синтезу частинок магнетиту на його структуру та властивості. Охарактеризовано порошки магнетиту, синтезовані методами хімічного осадження хлоридів феруму при додаванні гідроксиду амонію та гідразину, і термічного розкладу оксалатів феруму у вуглеводневому та нітратному середовищах. Методом РФА підтверджено формування частинок магнетиту за всіх умов проведення процесу фазоутворення, та показано збільшення ступеня кристалічності порошку при термічному розкладі оксалатів феруму. Методом ІЧ спектроскопії досліджено функціональні групи на поверхні частинок магнетиту. Морфологічні дослідження порошків магнетиту свідчать про сферичну форму частинок з розміром 23-34 нм при хімічному осадженні, і 33-84 нм при термолізі. Питома поверхня та значення пікнометричної густини магнетиту зменшуються при збільшенні тривалості процедури хімічного осадження. Намагніченість насичення порошків магнетиту та їх коерцитивна сила знижуються при збільшенні тривалості синтезу методом хімічного осадження. Водночас, термічний розклад оксалатів заліза дає змогу на порядок збільшити намагніченість насичення порошків магнетиту. Дослідження цитотоксичності частинок магнетиту в діапазоні

концентрацій 1 мг/мл - 1 мкг/мл, проведені за допомогою вимірювання метаболічної активності (МТТ-аналізу) на клітинах нирок великої рогатої худоби Мадіна-Дарбі (MDBK) та на клітинах нирок собак Мадіна-Дарбі (MDCK) показало відсоток життєздатності клітин обох видів понад 80 %, що свідчить про відсутність цитотоксичної дії порошків.

Четвертий розділ присвячений вивченню фізико-хімічних та структурних властивостей біокомпозитів на основі гідроксиапатиту, модифікованих магнетитом (99/1, 95/5, 75/25 і 50/50 мас. %) різних типів при вмісті хітозану 10 % від маси магнетиту. За даними РФА до фазового складу композитів входять гідроксиапатит, магнетит і хітозан. При формуванні композиту в кристалічній ґратці БГА відбуваються заміщення катіонів Ca^{2+} на катіони Fe^{2+} , про що може свідчити зменшення розміру кристалітів, а також об'єму кристалічної ґратки пропорційно збільшенню магнетитової складової. Згідно результатів морфологічного дослідження, порошки композитів представлені округлими агломератами, розмір яких залежить від вмісту магнетитової складової. Встановлено, що з підвищенням вмісту магнетиту у складі композитів спостерігається збільшення значення питомої поверхні, пікнометричної густини та механічних властивостей (міцності на стиск та розтяг, модулю пружності, загальної пористості, об'єму пор). Механічні властивості композитів гідроксиапатит/хітозан/магнетит співвідносяться з міцністю губчастих кісток людини, що робить досліджувані композити перспективними матеріалами для заміщення ненавантажених ділянок кісткової тканини. Показано, що магнітні властивості композитів, модифікованих магнетитом (терм.), є на порядок вищими, ніж у композитів, модифікованих магнетитом (хім.), що пов'язано з характеристиками вихідних порошків магнетиту. Для всіх композитів спостерігається рівномірний розподіл частинок за розміром.

П'ятий розділ присвячено вивченню поведінку композитів на основі біогенного гідроксиапатиту, модифікованого магнетитом та хітозаном, в умовах *in vitro*. Досліджено цитотоксичність і стійкість порошкових композитів в модельному фізіологічному розчині за термостатичних умов впродовж 2, 10, 16 та 31 діб. Встановлено, що під час взаємодії композитів з фізіологічним розчином відбувається резорбція матеріалу, що підтверджено зміною рН середовища, втратою маси, збільшеннями площі питомої поверхні, зміною морфології та зменшенням розміру частинок. При цьому, змін у фазовому складі композитів після взаємодії з фізіологічним розчином не виявлено. Встановлено, що процес резорбції найінтенсивніше відбувається в перші 2 доби за рахунок активного виділення в розчин катіонів Ca^{2+} та аніону PO_4^{3-} . На 15-16 добу експерименту спостерігається поступове сповільнення швидкості розчинення композиту. Збільшення вмісту магнетиту призводить зростання резорбції композитів. Зокрема, при застосуванні магнетиту, отриманого хімічним осадженням, швидкість резорбції становить 2,5-5,3 мас.% за добу, що в 3,5-7,5 разів вище у порівнянні з біогенним гідроксиапатитом і в 1,2-2 рази вище у порівнянні з композитами на основі магнетиту, отриманого термічним розкладом в азотному середовищі.

Встановлено відсутність цитотоксичності композитів щодо ліній клітин MDCK та MDBK, особливо в низьких та середніх концентраціях, оскільки відсоток життєдіяльності клітин складав понад 80% для всіх композитів, незалежно від складу та типу використаного магнетиту, що є важливою передумовою для подальших клінічних випробувань та успішного впровадження композитів у медичну практику.

Ступінь обґрунтування та достовірності наукових положень, висновків і рекомендацій

При виконанні експериментальної частини роботи дисертантом використано комплекс сучасних фізико-хімічних методів дослідження, зокрема, рентгенофазового аналізу, інфрачервоної спектроскопії, термально-гравіметричного аналізу, фотоколориметрії, сканувальної електронної мікроскопії та енергодисперсійної спектроскопії. Було проведено визначення питомої поверхні (БЕТ), магнітних та механічних властивостей композитів. Проведено тестування цитотоксичності, резорбції композиту в модельному фізіологічному розчині, який імітує біологічне середовище.

Результати експериментального дослідження, наукові положення та висновки є достатньо обґрунтованими і не суперечать стану розвитку сучасної наукової думки. Висновки, що сформульовані в роботі, узгоджуються з класичними уявленнями щодо отримання та властивостей порошків і композитів на основі гідроксиапатиту і добре корелюють з результатами світових досліджень процесів формування біосумісних композиційних матеріалів, призначених для відновлення і регенерації кісткової тканини.

Основні наукові результати та їх наукова новизна

До найбільш вагомих науково-практичних результатів, отриманих при виконанні даної роботи, можна віднести наступні:

1. Отримано композиційний матеріал на основі гідроксиапатиту з покращеними механічними властивостями, який пройшов тестування щодо цитотоксичності, та був рекомендований фаховими установами Національної академії наук України для подальшої розробки в якості замітника кісткової тканини.
2. Показано вплив методу синтезу частинок магнетиту на структуру та властивості нанокompозиту на основі біогенного гідроксиапатиту, модифікованого хитозаном. Зокрема, введення до складу композиту на основі гідроксиапатиту магнетиту, отриманого методом хімічного осадження протягом 5 хв в кількості від 1 до 50 мас.%, збільшує швидкість резорбції у 3,5-7,5 рази, порівняно з чистим біогенним гідроксиапатитом і в 1,2-2 рази порівняно з композитами, що містять магнетит, отриманий термолізом.
3. Вперше встановлено, що магнетит, отриманий методом осадження протягом 5 хв, у 7 разів підвищує механічні властивості композиційних матеріалів

БГА/магнетит/хітозан у порівнянні з чистим біогенним гідроксиапатитом, та у 3 рази – у порівнянні з композитами, що містять магнетит, отриманий термолізом. Механічні властивості одержаних композитів відповідають міцності губчастих кісток людини.

4. На основі експериментальних досліджень показано можливість керування структурою та властивостями композиційних матеріалів на основі гідроксиапатиту в широкому діапазоні масових співвідношень біогенного гідроксиапатиту та магнетиту (99/1, 95/5, 75/25, 50/50), що дає змогу оптимізувати властивості композиту та рекомендувати його для створення нових магніточутливих матеріалів медичного призначення.

Повнота викладення результатів дисертаційної роботи в публікаціях

Основний зміст дисертаційної роботи Синиці А.О. викладений у 18 наукових працях, серед яких 7 статей у фахових виданнях, з яких одна стаття категорії Q2, одна стаття категорії Q3, дві статті категорії Q4, одна стаття категорії B2 та дві статті в міжнародних журналах. Апробацію матеріалів було проведено на 11 міжнародних і вітчизняних конференціях з міжнародною участю.

На підставі аналізу опублікованих автором робіт можна стверджувати, що матеріали дисертації достатньо повно висвітлені у наукових виданнях, пройшли апробацію і є достовірними та науково-обґрунтованими.

Зауваження до дисертаційної роботи та запитання до дисертанта

1. Принципове питання, яке виникає при розгляді складу композиту на основі гідроксиапатиту, модифікованого хітозаном і магнетитом, стосується доцільності введення до складу заміника кісткової тканини магнітного матеріалу. Незважаючи на те, що використаний в дослідженні магнетит не проявляє цитотоксичності, а введення навіть незначної його домішки в структуру композиту значною мірою збільшує механічну міцність останнього, наявність феримагнітного матеріалу в організмі людини може привести до непередбачуваних негативних наслідків. Не виключена магнітна взаємодія між магнетитом і феритином – складової тканини крові. Очікуваними є складності при проходженні флюорографії, рентгенівських досліджень, томографії. Можлива реакція магніточутливих датчиків на намагнічену кісткову тканину; виникають ризики впливу на організм людини температури, магнітного поля тощо. Тому запропоновану в дисертаційній роботі систему гідроксиапатит / хітозан / магнетит можна розглядати як модельну, а її дослідження – як алгоритм для розробки інших, більш безпечних, композитних матеріалів на основі гідроксиапатиту, призначених для регенерації кісткової тканини.

2. В роботі йде мова про утворення композиту, в зв'язку з чим виникає ряд питань. Чи можна вважати суміш порошків гідроксиапатиту, хітозану та магнетиту композитом? Сформулюйте, будь ласка, що таке, на Вашу думку

«композит»? За рахунок яких сил гідроксиапатит, хітозан і магнетит мають утворювати єдину композиційну структуру?

3. Чим запропонований Вами метод синтезу магнетиту осадженням хлоридів феруму з додаванням розчину гідроксиду амонію відрізняється від традиційного методу синтезу магнетиту сумісним осадженням неорганічних солей в слабо лужному середовищі (див. *Schwertmann U. Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization / U. Schwertmann, R. M. Cornell // 2th, Compl. Rev. and Ext. Ed.. Wiley-VCH : Weinheim, 2000*)?

4. При описі кристалічної структури композитів (Таблиця 4.1, С. 112-113; Таблиця 4.5, С. 137; Таблиця 5.2, С. 167; Таблиця 5.5, С. 179) дисертант плутає поняття «розмір частинок», «розмір кристалітів» і «параметри елементарної комірки», а також одиниці вимірювання (ангстрєми або нанометри). Розмір первинних частинок, або кристалітів, або область когерентного розсіювання доменів (ОКР) розраховується за рівнянням Дебая-Шеррера за даними РФА по відбиттю від характеристичних площин мінеральної фази. Розрахунок параметрів елементарної комірки теж проводиться за даними РФА з урахуванням типу кристалічної решітки мінеральної фази за відповідним рівнянням. В даній роботі головною (за вмістом) фазою є гідроксиапатит, який кристалізується в гексагональній сингонії, отже має два характеристичних параметри кристалічної решітки: a і c . Заміщення катіонів кальцію на катіони феруму дійсно призводять до зменшення параметрів елементарної комірки гідроксиапатиту та її об'єму. При цьому об'єм елементарної комірки треба було розраховувати за рівнянням для гексагональної сингонії, а не кубічної. Реальний розмір частинок (полікристалів) і агрегатів оцінюють методами електронної мікроскопії або розраховують за даними седиментаційного аналізу чи інших методів.

5. При інтерпретації результатів термогравіметричного аналізу (ТГ-ДТА) на стор. 115 йдеться про те, що випаровування адсорбційної води проходить майже до 440 °С, що є невірним. Стандартною температурою видалення адсорбційно-зв'язаної води вважається 105 °С, що покладено в основу підготовки реактивів для хімічного аналізу, але на практиці граничною температурою цього процесу вважається 130 °С. В цілому, при описі результатів ТГ-ДТА зразків композитів (стор. 114-115 і стор. 137-139) слід було виділити основні ефекти, які характеризують перетворення індивідуальних складових композиту під впливом температури, та порівняти їх інтенсивність і температуру для матеріалу композиту. Наприклад, для чистого гідроксиапатиту характерні три термoeфекти: 1. Втрата адсорбованої води ~130 °С; 2. Видалення структурної води до 280 °С; 3. Реакція двох молекул однозаміщеного дігідрофосфату кальцію з утворенням пірофосфату кальцію та води при 450 °С. Для хітозану характерні: 1. Видалення адсорбованої води в діапазоні 47–100 °С; 2. Початок деструкції чистого хітозану при 247 °С і його повний розклад з втратою маси при 450 °С. Під впливом температури змінюється також структура магнетиту: до 220 °С в кристалічній решітці окиснюється Fe^{2+} і магнетит переходить в «гама» модифікацію Fe_2O_3 – магеміт, а після 650 °С – в поліморфну «альфа»

модифікацію Fe_2O_3 – гематит. Отже, яким чином змінюються перелічені термoeфекти при ТГ-ДТА аналізі композитів?

6. При розгляді магнітних властивостей композитів варто було підкреслити головні відмінності типу магнетизму залежно від методу синтезу (розміру частинок магнетиту, отриманих кожним з методів). Наприклад, хід кривих намагніченості композиту, до складу якого введено хімічно-синтезований магнетит (Рис. 4.18), свідчить про те, що частинки магнетиту суперпарамагнітні і, отже, мають реальний розмір менше 20 нм. Натомість, магнетит, отриманий термічним методом, належить до феримагнетиків, про що свідчить наявність петлі гістерезису на кривій намагніченості (Рис. 4.32), а реальний розмір частинок перебільшує 20 нм. При цьому очевидно, що намагніченість насичення композиту прямо пропорційна вмісту в його складі єдиного компонента з магнітними властивостями – магнетиту.

7. На стор. 48 дано опис зміни структури та властивостей магнетиту під впливом температури, який не є коректним. Цитую: *«Першою фазою є температура Вервея, де перехід Вервея коливається від 0 до 119 К. На цій фазі магнетит перетворюється з напівпровідникової в металеву фазу. Другою фазою є температура Кюрі, яка коливається від 120 до 840 К. Третя фаза - коли температура перевищує 840 К, де частинки поведуться як парамагнітний метал [100]»*. В точці Вервея (-150 °С) кубічна решітка магнетиту трансформується в орторомбічну. В точці Кюрі магнетиту (585 °С для природного, 572 °С для синтезованого) його феримагнітні властивості стрибкоподібно змінюються на парамагнітні. В жодному разі магнетит залишається оксидом, а не «металом».

8. Яку інформацію отримують при аналізі інфрачервоних спектрів? Як Ви вважаєте, чи є коректним робити висновок про фазовий склад і структуру зразка на підставі даних ІЧ спектроскопії?

9. Звертає на себе увагу, що переважна більшість публікацій, на які посилається дисертант, були опубліковані більше ніж п'ять років тому. Як це узгоджується з новизною та актуальністю роботи?

Водночас, наведені зауваження не впливають на цілком позитивну оцінку дисертаційної роботи та не знижують високого рівня досягнутих у роботі наукових результатів.

Загальні висновки щодо дисертаційної роботи

Дисертаційна робота Синиці А.О. *«Вплив модифікування магнетитом на особливості структуроутворення та властивості біомедичних композитів гідроксиапатит/магнетит/хітозан»* є завершеним комплексним дослідженням, в якому здобувачем одержано нові наукові і науково-практичні результати в галузі матеріалознавства, і які ефективно вирішують наукову і прикладну задачу розробки композиційного матеріалу – імітатора кісткової тканини на основі гідроксиапатиту, модифікованого хітозаном і магнетитом.

Дисертаційна робота Синиці А.О. відповідає спеціальності 132 «Матеріалознавство». Дисертація присвячена розробці перспективних матеріалів із заданим складом, структурою та властивостями. В роботі запропоновано метод синтезу композиту на основі гідроксиapatиту та надано фізико-хімічну характеристику отриманого матеріалу; досліджено його механічні властивості та біосумісність.

Дисертаційна робота за обсягом виконаних досліджень, новизною та науковою значимістю отриманих результатів та їх рівнем повністю відповідає вимогам Наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 р. «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», та вимогам, передбаченими пунктом 25 «Про внесення змін до деяких постанов Кабінету Міністрів України з питань підготовки та атестації здобувачів наукових ступенів», затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 19 травня 2023 року № 502, а її автор – *Синиця Анна Олександрівна* – заслуговує присудження їй наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 132-Матеріалознавство.

Рецензент:

Провідний науковий співробітник
Відділу функціональної кераміки на основі
рідкісних земель (відділ № 51)
Інституту проблем матеріалознавства
ім. І.М. Францевича НАН України,
Д.х.н., с.н.с.

Олена ЛАВРИНЕНКО

Підпис д.х.н. О.М. Лавриненко засвідчую
Вчений секретар Інституту проблем матеріалознавства
ім. І.М. Францевича НАН України
канд.фіз.-мат.наук, с.д.



Денис МИРОНЮК