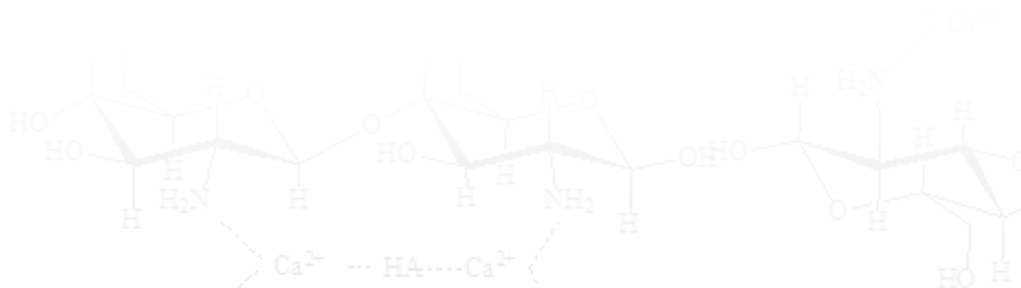


Н.Р. Вохидова
К.Х. Эргашев
С.Ш. Рашидова

СИНТЕЗ ГИДРОКСИАПАТИТА ХИТОЗАНА *BOMBUX MORI* И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В ПТИЦЕВОДСТВЕ



Издательство «Фан»
Ташкент 2024



УДК 546.41:636.6.08

ББК 24.122+46.8

В 79

Н.Р. Вохидова, К.Х. Эргашев, С.Ш. Рашидова

Синтез гидроксиапатита хитозана *Bombux mori* и его применение в птицеводстве. – Ташкент: Издательство «Фан». 2024. – 148 с.

Рецензенты:

Доктор химических наук, профессор **Акбаров Хамдам Икрамович**

Доктор ветеринарных наук, профессор **Элмуродов Бозорбой Актамович**

Монография посвящена синтезу и свойствам гидроксиапатита хитозана *Bombux mori*. Рассмотрены механизмы регулирования состава и структуры модифицированного природного полимера. Создан биоактивный и нетоксичный препарат, который эффективен для профилактики и лечения остеопороза, остеомалации кур.

Монография рассчитана для научных работников и студентов, специализирующихся в области высокомолекулярных соединений и ветеринарной медицины.

Монография рекомендована к печати решением
Ученого совета Института химии и физики полимеров АН РУз
Протокол №12 от 1 декабря 2023 года

ISBN 978-9943-19-695-7

© Н.Р. Вохидова, 2024
© Издательство «Фан», 2024

ПРЕДИСЛОВИЕ

Безопасные, нетоксичные биопрепараты на основе хитозана (ХЗ) и его производных широко используются в медицинской и ветеринарной практике. Са и Р - биологически важные элементы, образующие опорные системы живых организмов. Их дефицит способствует ослаблению костной системы, склонности к переломам и трещинам, остеопорозу, кариесу, изменению аппетита и веса, онемению, задержке роста и развития. В настоящее время заболевания, возникающие вследствие дефицита кальция и фосфора, в частности остеопороз, включены в перечень экономически значимых заболеваний.

С увеличением продолжительности жизни во всем мире число пожилых людей в каждом географическом регионе увеличивается, а количество переломов, как ожидается, к 2050 году достигнет 6,26 млн [1]. То есть потребность в Са²⁺ и фосфорсодержащих препаратах возрастает с каждым годом. По данным 2010 года, остеопорозом страдают 200 миллионов женщин и 120 миллионов мужчин во всем мире, причем с возрастом эта доля увеличивается. Заболеванию подвержена каждая третья женщина и каждый пятый мужчина старше 50 лет [2].

Принципиально важно изучить основы получения композитов хитозана (ХЗ) и гидроксиапатита (ГА), особенности их взаимодействия, установление химического состава и строения, комплексное изучение их свойств. Создание полимер-апатитовых препаратов, необходимых для поддержания баланса Са и Р, представляет фундаментальный и прикладной интерес. Данные препараты являются импортозамещающими и могут быть использованы для повышения продуктивности кур-несушек, а также для профилактики и лечения остеопороза и остеопороза.

Принципиально важным является исследование фундаментальных основ получения композитов хитозана с гидроксиапатитом, особенностей их взаимодействия, установление химического состава и структуры, комплексное изучение их свойств, создание полимер-апатитных препаратов с антимикробными и иммуномодулирующими свойствами, необходимыми в поддержке баланса кальция и фосфора в живых организмах.

Практическая значимость результатов исследования заключается в разработке способа получения полимерных композитов с регулируемым составом и размером наночастиц. Полученный композит – ХЗ/ГА отличается повышенной биологической активностью по сравнению с аналогами и рекомендован к применению для повышения живой массы и яйценоскости кур.

В связи с этим, целью настоящей монографии является систематизация и анализ важнейших результатов фундаментальных и прикладных исследований по получению хитозан-апатитов и их применению в медицине и ветеринарной медицине. Монография опубликована при финансовой поддержке Инновационного проекта ПЗ-202012254 - «Разработка технологии получения препаратов на основе металлокомплексов хитозана для профилактики и лечения остеопороза и остеомалыции кур».

Авторы выражают свою признательность сотрудникам организации - «*Dori vositalarini standartlash Ilmiy markazi*» за изучение медико-биологических свойств хитозана гидроксиапатита и будем рады принимать ваши замечания и предложения по представленной монографии.

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИХФП	Институт химии и физики полимеров
ГА	Гидроксиапатит
ГХЦ	Бактериальной целлюлозы <i>Gluconacetobacter xylinus</i>
ДКДГ	Дигидрат дикальцийфосфат
Жел	Желатин
КПФ	Пирофосфат кальция
Колл	Коллаген
КГА	Карбонатгидроксиапатит
МЦ	Метилцеллюлоза
Na-КМЦ	Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы
n-ГА	Наногидроксиапатит
ОМК	Органоминеральный нанокompозит
ОКФ	Ортокальцийфосфат
ПВС	Поливиниловый спирт
ТКФ	Трикальцийфосфат
ХЗ	Хитозан
ХТ	Хитин
Цел	Целлюлоза
АСМ	Атомно-силовой микроскоп
ВЗМО	Высшая занятая молекулярная орбиталь
ДТГ	Дифференциальная термогравиметрия
ИК	Инфракрасная спектроскопия
КТ	Компьютерная томография
ММ	Молекулярная масса
МТТ-тест	Колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток
НЧ	Наночастицы
НУ	Плотность костей (Hounsfield)
НСМО	Низшая свободная молекулярная орбиталь

ПЭТ	Позитронно-эмиссионная томография
РСА	Рентгеноструктурный анализ
СЭМ	Сканирующий электронный микроскоп
СФ	Спектрофотометр
СДА	Степень дезацетилирования
СЗ	Степень замещения
СК	Степень кристалличности
ТГ	Термогравиметрия
ТГП	Термогравиметрия по производной
УФ	Ультрафиолетовая спектроскопия
Cur	Куркумин
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationship</i>

ГЛАВА 1

КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ С ГИДРОКСИАПАТИТОМ. СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ (Обзор литературы)

- 1.1. Особенности химического взаимодействия хитозана
 - 1.2. Синтез и свойства гидроксиапатита кальция
 - 1.3. Получение композитов природных полимеров с гидроксиапатитом и их применение
 - 1.4. Методы получения композитов хитозана с гидроксиапатитом и их физико-химические свойства
 - 1.5. Предварительная схема действия биополимера ХЗ с гидроксиапатитом кальция
 - 1.6. Применение композитов хитозана с гидроксиапатитом в медицинской практике и ветеринарии
- Заключение к главе 1

1.1. Особенности химического взаимодействия хитозана

Хитин (ХТ) представляет собой линейный аминополисахарид, состоящий из звеньев N-ацетил-2-амино-2-дезоксид-Д-гликопиранозы, который действует как внешний скелет и опоры кутикулы ракообразных и насекомых. Растворимое производное хитина - хитозан (ХЗ), представляет собой сополимер D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина [3, 4]. В зависимости от условий реакции деацетилирования степень деацетилирования хитозана может быть достигнута до 95%. Это объясняется тем, что ацетамидные группы находятся в транс-положении и невозможно полное замещение ацетамидных групп.

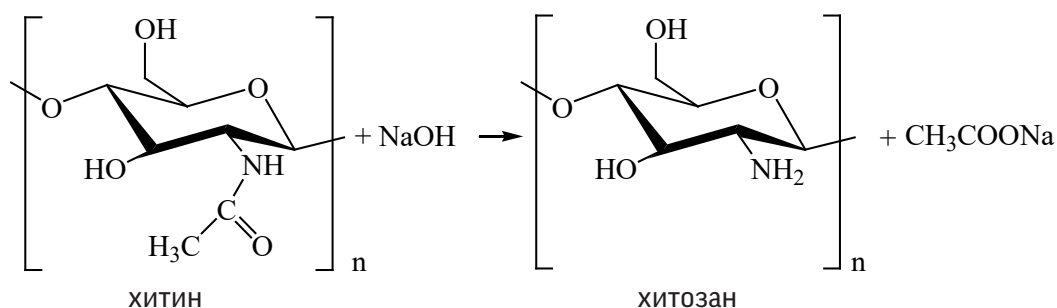


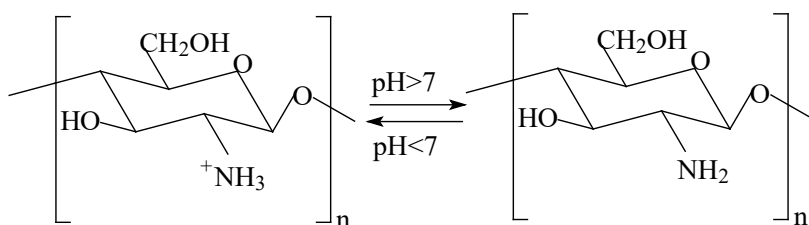
Рис. 1.1. Схема реакции получения хитозана из хитина

ХЗ является жесткоцепным полимером и композиционно неоднородным полисахаридом. Ему свойственна молекулярная полидисперсность, рН-зависимая растворимость и склонность к образованию Н-Н-связей. Именно эти способности хитозана обуславливают его уникальность и непредсказуемость.

Депротонированные аминогруппы в молекуле хитозана взаимодействуя с ионами d-металлов образуют хелаты и металлокомплексы [5, 6]. Наличие электронодонорных функциональных групп в макромолекуле ХЗ способствуют формированию внутри- и межмолекулярных водородных связей. Это позволяет ХЗ связывать органические соединения, в том числе и токсины.

Наличие водородных связей снижает растворимость хитозана, потому что водородные связи между ХЗ сильнее, чем водородные связи между ХЗ-растворитель. ХЗ набухает и растворяется в кислой среде, т.е. в органических и минеральных кислотах (уксус, оксалат, лимон, янтарь, соляная и т. д.).

Реакционная активность и физико-химические свойства ХЗ напрямую связаны со значением pH среды:



В кислой среде аминогруппы ХЗ протонируются, при значении выше, чем $\text{pH} = 6,5$ происходит фазовое разделение, и ХЗ выпадает в осадок [5].

Молекула ХЗ является хемоселективной, т.е. депротонированные аминогруппы, так же $-\text{OH}$ группы на атомах углерода С-3 и С-6-положении, позволяют ХЗ подвергаться реакциям нуклеофильного замещения S_N и присоединения A_N . Следует отметить, что варьируя условия синтеза, можно получить -N и -O производные ХЗ за счет $-\text{NH}_2$ и $-\text{OH}$ групп в макромолекуле (рис. 1.2) [6].

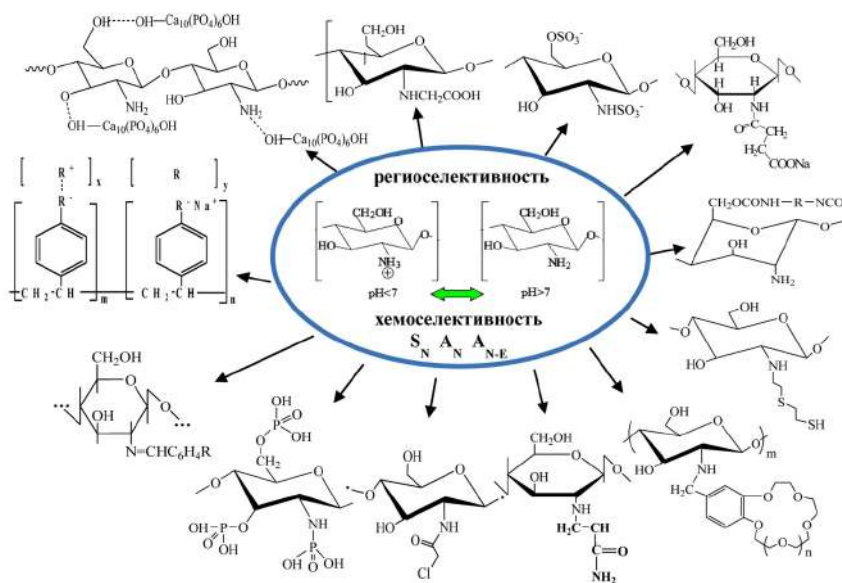


Рис. 1.2. Возможные химические реакции в присутствии хитозана

ХЗ обладает уникальными физико-химическими и биологическими свойствами, среди которых можно выделить его биосовместимость, антимикробное действие, иммуномодулирующее свойство и др. ХЗ также является противовирусным и фунгицидным, биодоступным, гипоаллергенным и безвредным природным полимером, который способствует регенерации тканей [7-9].

Применение хитозана, полученного из различных источников определяется уникальным сочетанием ряда физико-химических и биологических свойств:

- высокой реакционной способностью;
- биосовместимостью;
- биodeградируемостью;
- бактериостатичностью;
- иммуностимулирующей активностью;
- селективностью;
- превосходной сорбционной способностью водных растворов, растворителей переходных и особенно тяжелых металлов.

ХЗ используется в стоматологии для лечения гингивита и периодонтита, поскольку он восстанавливает соединительную мышечную ткань, покрывающую десны. ХЗ также используется в качестве искусственного заменителя кожи и не имеет побочных эффектов после имплантации ткани [10].

Неоценима роль функциональных биоматериалов в тканевой инженерии в медицине и ветеринарии. Биоматериалы должны отвечать ряду требований, в частности, сохранять форму и размер тканей, должны быть биоразлагаемыми, гипоаллергенными, иметь минимальные побочные эффекты и механически прочную пористую структуру, которая стимулирует рост тканей [9]. ХЗ обладает этими свойствами, его биodeградация, биодоступность, биоактивные свойства делают его эффективным биополимером, который можно использовать в тканевой инженерии, включая регенерацию кожи, костей, печени, нервов и мышц [11-16].

Из-за своих уникальных свойств, ХЗ применяется в более 80 отраслей народного хозяйства. Одним из достоинств ХЗ является возобновляемость, неограниченность и разнообразие источников его получения. ХЗ выделяют из панцирных, грибов, подмор пчел и др. источников [17].

В Узбекистане, где развито шелководальное производство потенциальным источником ХЗ являются куколки тутового шелкопряда *Bombyx mori*,

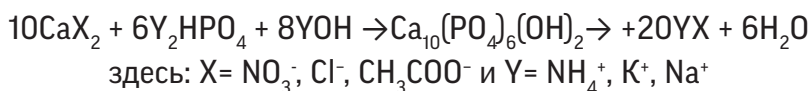
являющиеся отходами производств, ежегодное количество которых составляет до 15000 тонн/год. В этой связи, получение различных производных и модификаций ХЗ *Bombyx mori*, в частности, гидроксиапатита хитозана и исследование их физико-химических свойств, поиск путей их применения представляет фундаментально-прикладной интерес.

1.2. Синтез и свойства гидроксиапатита кальция

Гидроксиапатит (ГА) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ отличается от других фосфатов кальция изоморфизмом, термо- и химической стабильностью, стехиометрией состава и структурными свойствами, близкими к скелетам человека и живых организмов [18]. Существует несколько различных методов синтеза гидроксиапатита [19-22], наиболее распространенными из которых являются:

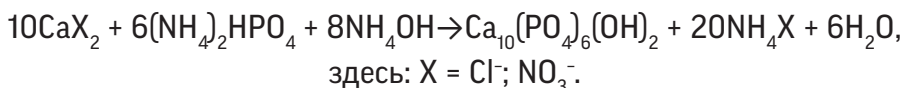
1) жидкофазный синтез (мокрый метод); 2) твердофазный синтез (сухой метод); 3) гидротермальный; 4) зол-гель; 5) гидролиз.

Многочисленные исследования показывают, что для получения высокодисперсного порошка ГА обычно описывается двусторонней реакцией обмена следующим образом (жидкофазный синтез):



Взаимодействие любых солей кальция и фосфата, состава целевого продукта реакции зависят от таких параметров, как значение pH, продолжительность синтеза, температура и молярное соотношение Ca/P в растворе. Образование ГА происходит при относительно низких температурах или в течение нескольких секунд, при перекристаллизации аморфного фосфата кальция в течение длительного времени при температурах выше 50°C. Обычно образуется нестехиометрический ГА - $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, где x зависит от условий синтеза [23, 24].

Например, для синтеза геля ГА водные растворы гидрофосфата аммония с солями кальция хранят в сильных условиях в течение 10 дней в сильнощелочной среде (pH=10-11) и промывают дистиллированной водой до pH=7,2-7,0 [25].



Если синтез проводится по схеме 2 в интервале pH=4-5, то можно получить смесь моноклинного сингонитового брушита ($\text{Ca}(\text{PO}_3\text{OH}) \times 2\text{H}_2\text{O}$) или брушита и триклин-сингонитового монетита ($\text{Ca}(\text{PO}_3\text{OH})$):



здесь: X= NO_3^- , Cl^- , CH_3COO^- ва Y= NH_4^+ , K^+ , Na^+

при 70-90°C в высоких температурах формируется ГА [26].

Гидроксиапатит получали из нитрата кальция и гидрофосфата аммония в водном растворе при соотношениями Ca/P=1,31 и 1,64 соответственно после 48 часов реакции [27]. Физико-химические свойства этих образцов сравнивали с гидроксиапатитом, полученным при соотношении Ca/P=1,56. Результаты рентгеноструктурного анализа показали наличие в этих соотношениях фаз, соответствующих и ГА и β-фосфату кальция.

При синтезе ГА важно обращать внимание на кристаллическую и аморфную структуру его состава. Первая твердая фаза, образующаяся при быстром перемешивании водных растворов солей, содержащих ионы Ca^{2+} и PO_4^{3-} , образует аморфные фосфаты кальция (АФК). АФК представляют собой термодинамически нестабильные соединения, которые, если не хранить в сухих условиях или с добавлением стабилизатора, спонтанно превращаются в кристаллические ортофосфаты кальция, то есть апатиты кальция [28].

Одно из особых свойств апатитов кальция это - их растворимость в кислых средах. При описании степени диссоциации происходят химические изменения со всеми ионами, которые во время диффузии через слой Нернста, химический состав поверхности апатита во время процессов плавления, сорбции и разложения, начальные стадии пористости, ионной сорбции, поверхностной диффузии и специфические эффекты на разложение [29].

Материалы на основе фосфата кальция, такие как гидроксиапатит (ГА), трикальцийфосфат (ТКФ) и карбонат-замещенный карбонат-гидроксиапатит (КГА), обладают эффективными биологическими свойствами, высокой адсорбцией белка, хорошей функцией остеокластов и образованием остеобластов в тканях, клетки участвуют в регенерации кости [30].

Были проведены исследования по созданию композиции, близкой к костной ткани, на основе композиций ГА с такими полимерами, как хитозан, коллаген, желатин. В результате могут быть решены некоторые керамические свойства гидроксиапатита, такие как его внутренняя хрупкость, степень структуры и миграция частиц из мест их проживания. Исследования пред-

ложили создание биоконпозитов для биологически активных и биоразлагаемых искусственных костей и дефицита костной ткани [31]. Отмечено, что основным компонентом костной ткани является ГА (более 75%), его карбонатные группы составляют около 4% [32-34], по другим данным - 7% [35].

При изучении биологических и синтетических апатитов во всех случаях наблюдается интенсивная ассимиляция ортофосфат-аниона (PO_4^{3-}) в ИК-спектрах. Карбонатные группы, составляющие КГА, расположены на гексагональной оси, которая удерживает группы -ОН (обмен А-типа) или (PO_4^{3-}) группы (обмен В-типа). Для этой ткани характерны смешанные АВ-типы [36-37].

Природа фосфатов кальция разнообразна, их список очень широк и немного выше мольного соотношения, соответствующего $\text{Ca/P}=1,67$, что приводит к образованию фосфатов кальция, которые при взаимодействии с водой дают сильно щелочную среду ($\text{Ca/P}>1,67$). Это также приводит к образованию нерастворимых нестабильных композитов при взаимодействии с водой или физиологическими жидкостями ($\text{Ca/P}<1,67$) [38].

В дополнение к материалам на основе ГА были разработаны регенерирующие или полностью рассасывающиеся материалы. Они основаны на использовании пористой резорбированной матрицы, несущей белки и костные клетки в тканевой инженерии.

Фосфаты кальция при соотношении $\text{Ca/P}<1,67$ включают трикальций-фосфат ($\text{ТКФ}-\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), пирофосфат кальция ($\text{КПФ}-\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), полифосфат кальция ($[(\text{Ca}(\text{PO}_3)_2)_n]$), карбонат гидроксиапатит ($\text{КГА}, \text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5, \text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2, \text{K}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$) [39].

Ме-ГА был синтезирован путем замены Са в кальциевом ГА металлами, такими как Zn, Cu, Mg и показано, что более эффективные по биологической активности являются $\text{Ca}_{10-x-z}\text{Me}_z(\text{HPO}_4)_y(\text{PO}_4)_{4-y-6}(\text{OH})_2$, $\text{Ca}_{10-x-z}\text{Cu}_z(\text{HPO}_4)_y(\text{PO}_4)_{4-y-6}(\text{OH})_2$, содержащие 1% Cu [40].

Однако также было синтезировано соединение $\text{Ag Ca}_{(10-x)}\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{(2-x)}$, $x=0,3$ (Ag-ГА, $\text{Ca/P}=1,616$). Обеспечивает антибактериальные свойства, когда нанесенный на поверхность имплантата. Соотношения Са, Р, О, Ag в композите составили $\text{Ca/P}-2,25\pm 0,25$, $(\text{Ca}+\text{Ag})/\text{P}-2,12\pm 0,22$ [41].

В целом биоконпозиты, содержащие ортофосфат кальция (CaPO_4), являются основным сырьем и решением при разработке современных технологий создания гибридных биоматериалов для медицины. Желательно получить компаунд с полимерами, чтобы придать биоконпозитам на основе фосфата кальция эластичные свойства и повысить их биодоступность.

1.3. Получение композитов природных полимеров с гидроксиапатитом и их применение

В последние годы проведены огромное количество исследований по композитным материалам и биодобавкам, улучшающие физико-химические и биологические свойства костной ткани, по профилактике и лечению остеопороза. К таким композиционным материалам относятся ХЗ-ГА, коллаген(Колл)-ГА, Колл-ХЗ-ГА, Колл-биостекло, ХЗ-желатин(Жел), Колл-фибрин, ГА-белок, фибрин-апатит и т.д. [42, 43]. Композиты фосфата кальция, ГА, трикальцийфосфатов с комплексом ХЗ-желатина синтезированы в мольных соотношениях 100/0, 90/10, 70/30, 50/50, 30/70, 10/90, 0/100. Эти композиты на основе биополимеров, содержат $\geq 75\%$ наночастиц (НЧ) фосфата кальция и имеют структуру с пористостью $\approx 95\%$ [44].

Изучено влияние желатина и ГА на физико-химические свойства их композитов. Обнаружено, что с увеличением количества желатина растворимость и пластичность композита повышается, а увеличение количества фосфата кальция, в свою очередь, привело к их снижению. Механически прочные и биоразлагаемые композиты желатин-ГА были рекомендованы для применения в ортопедической тканевой инженерии [26].

В водном растворе при 37°C синтезирован органоинеральный нанокompозит (ОМК) ГА кальция - $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-}[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_x(\text{OH})_{3-x}(\text{OCH}_3)_n]\text{-H}_2\text{O}$ с метилцеллюлозой (МЦ) $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_2(\text{OH})_{3-x}(\text{OCH}_3)_x]$. Агломераты нанокристаллов ОКМ были получены при взаимодействии ГА длиной 150 нм и диаметром 30 нм с молекулами МЦ размером 200–500 нм. Улучшение свойств имплантата на основе синтезированной ОКМ способствует снижению вероятности миграции ГА в окружающие ткани за счет связывания НЧ ГА с макромолекулами МЦ. Кроме того, ОКМ на основе полисахаридов значительно увеличивают растворимость ГА и повышают эффективность имплантации [45-46].

Исследованы физико-химические свойства и микроструктура композитов, полученных на основе ХЗ-желатина и наполнителей различного химического состава фосфатно-кальциевых материалов - ГА, ТКФ, КГА и ортокальцийфосфата (ОКФ). Полученные гранулированные материалы являются эластичными, пористостью 80%, размером пор ≤ 300 мкм, и рекомендуется использовать в медицине в качестве пористых материалов, так же при приготовлении покрытий ГА на титановых имплантатах [47].

Также были получены композиты, состоящие из ГА-желатина (Жел) и ГА-Жел-Ag, исследованы их пористость и биоактивность испытана в условиях *in vivo*. Изучены морфология, фазовый состав и химические взаимодействия поверхностей компонентов. В ИК-спектрах обнаружено ионно-координационные, электростатические взаимодействия между ГА и Жел, а также ионами Ag^+ и Жел. Когда композит ГА-Жел-Ag вводили в костный дефект, он проявлял высокую биосовместимость, антибактериальные и остеокондуктивные свойства [48].

Изучено взаимодействие смесей $CaCl_2$ и ХЗ-поливинилового спирта (ПВС) (50:50) и их физико-химические свойства. Согласно рентгеновских спектров выявлено химическое взаимодействие ХЗ-ПВС с $CaCl_2$ и установлено увеличение механической прочности пленок. Композиты рекомендуются для применения в биомедицинской практике и пищевой упаковки [49-50].

Получены композиты ГА и ХЗ/ПВС со стабильным содержанием в соотношениях 1:1, 1:3, 3:1. Глутаровый альдегид и глицерин использовались в качестве сшивающего агента и пластификатора. Полученные композиты были использованы для стимуляции роста и обновления костной ткани [51].

Варьированием условий синтеза могут быть получены композиты коллаген-ГА, содержащие Ca/P-1,67 с регулируемой степенью пористости, плотности и механических свойств. Взаимосвязь между концентрацией Ca^{2+} и свойствами композитов была изучена в пористых структурных композитах, состоящих из ХЗ-коллагена и минерализованного ХЗ-коллагена-ГА [52-54]. Авторами получены композиты ХЗ-коллаген-фосфат кальция с пористостью $\leq 23\%$, содержащие 26-30% коллагена. Для получения микросфер ХЗ-фосфата кальция вместо ГА были получены $CaCl_2$ и NaH_2PO_4 в соотношении Ca/P=2:1 [55].

Композиты микрочастиц на основе ХЗ-Кол, связанные с алюминатом кальция, были предложены в качестве одонтобластоподобного материала стволовых клеток пульпы зуба. Биомембрану получали путем смешивания геля коллагена с раствором ХЗ (2:1) и последующего добавления биоактивного алюминатного цемента кальция в качестве минеральной фазы. Биологическую активность образцов контролировали в течение 7, 14 и 28 дней [56].

Методом электрохимического осаждения получены ПВС-апатитные покрытия на титановых подложках, содержащих электролиты $CaCl_2$ и NaH_2PO_4 . В зависимости от условий апатит-полимерные покрытия содержат $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$, $Ca(OH)_2$, аморфный $Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O$ и ГА - $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Работа [57] рекомендована для покрытия поверхности титановых имплантатов.

Синтезирован композит на основе бактериальной целлюлозы *Glucanacetobacter xylinus* (ГХЦ) и ГА, морфология пленок изучен с помощью СЭМ. Обнаружено, что кристаллы ГА были расположены монодисперсно в микрофибриллах ГХЦ. Выявлено, что в композите ГХЦ/ГА между органическими и неорганическими компонентами образуются 50-56% межфазной электростатической связи, 40-46% Вандера-Вальса, 2-7% водородных связей. Наличие электростатических связей между фосфатом кальция и бактериальной целлюлозой было изучено путем моделирования. Установлено, что энергия взаимодействия фосфата кальция с бактериальной целлюлозой зависит от химической структуры ГА и морфологии фосфата кальция [58-60].

Получены композиты натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) с ГА и изучены их физико-химические свойства. Установлено, что карбоксильные группы (-COO⁻) Na-КМЦ взаимодействуют с ионами Ca²⁺ апатита. Обнаружено, что ГА равномерно распределено в полимерной матрице [61].

Авторами получен композит на основе ХЗ-ГА-крахмал и изучены его свойства по сравнению с композитом ХЗ-ГА. Результаты исследования композита ХЗ-ГА-крахмал показали, что между -ОН и -NH₂ группами ХЗ и -ОН группами крахмала и ГА образуются водородные связи [62]. Также фиброин шелка используется в качестве эффективней матрицы и антимикробного агента в тканевой инженерии. Было показано, что композиты на его основе, суспендированные с фосфатами кальция, обладают биоразлагаемостью в живых тканях [63].

Таким образом, в настоящее время проводятся многочисленные исследования по получению композитов на основе высокомолекулярных соединений и минеральных солей.

1.4. Методы получения композитов хитозана с гидроксиапатитом и их физико-химические свойства

В литературе [64], существуют несколько методов синтеза композитов ХЗ-ГА, в частности, метод синтеза нанокompозитов одинаковой микроструктуры в условиях «*in situ*» [64-65], метод осаждения [66], синтез методом электроспиннинга [67-71], получение гибридных композитов [72, 73], метод испарения растворителя [74], химический метод в условиях «*in situ*» [75, 76], замораживание и лиофилизация [77, 78], комбинированное спекание и

замораживание, методы сушки [79], статистический сбор электроэнергии [80], обычный метод смешивания и нагрева [81], биомиметический метод [82–84], низкотемпературный, влажный химический метод [46], метод термического разделения фаз [85], метод двойной мембранной диффузии [86], электрохимическое осаждение и электрохимическое соединение [87–89], электрофоретическое осаждение [90, 91], смешение природного ГА с ХЗ [92], метод двусторонней диффузии [93] и т. д. (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Способы получения композитов хитозана с гидроксиапатитом

№	Способ получения	Исходные компоненты, ХЗ/ГА, (Ca/P=1,67)	Ссылки
1	Простая « <i>in situ</i> » гибридизация: получают соли Ca^{2+} и $-\text{PO}_4^{3-}$ в соотношении Ca/P=1,67 и растворяют в уксусной кислоте, при перемешивании добавляют порошок ХЗ. Смесь осаждается в щелочной среде при pH=9-10, образуя гель. Затем конечный продукт промывают и сушат.	$\text{ХЗ}/\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O} + \text{KH}_2\text{PO}_4$	[72]
2	Композитные мембраны были приготовлены методами литья в растворитель и испарения. приготовили раствор ХЗ (4 масс.%) и по каплям добавляли на раствор наноГА (10 масс.%). Смесь перемешивали в течение 5 часов при комнатной температуре. Гомогенную смесь заливали в стеклянную пластинку и медленно распределяли до образования однородной жидкой пленки, затем сушили при различных температурах (30-90°C) для испарения растворителя. Далее композитные мембраны нейтрализовали погружением в 0,1М раствор NaOH. Полученные мембраны неоднократно промывали в деионизированной воде и сушили при 50°C.	$\text{ХЗ}/\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O} + (\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	[74]

3	Химический метод в условиях « <i>in situ</i> »: Гидрогелевые мембраны ХЗ погружали в 10 мл раствора соли кальция при 37 °С и pH = 7,4 на 2 часа. Сначала его сушили в растворе Na ₂ HPO ₄ , после чего полученный продукт сушили на воздухе при 37°С.	ХЗ/CaCl ₂ + Na ₂ HPO ₄	[76]
4	Двухслойные каркасы ГА/ХЗ: подобные каркасы были изготовлены путем помещения каркасов ГА в цилиндрические силиконовые формы и добавлением 3 масс.% раствора ХЗ. Формы замораживали и лиофилизировали до полного удаления замерзшего растворителя. Затем двухслойные каркасы ГА/ХЗ нейтрализовали с 0,1 М раствором гидроксида натрия, замораживали и лиофилизировали. Полученные двухслойные каркасы ГА ХЗ стерилизовали этиленоксидом. Таким образом, получены каркасы из ГА и двухслойные каркасы из ГА/ХЗ	ХЗ + ГА (H ₃ PO ₄ /Ca(OH) ₂)	[79]
5	Синтез соосаждения в условиях « <i>in situ</i> » с использованием процесса электропрядения: Синтез ГА проводят в присутствии полимеров типа ХЗ, ПВС для получения волокон	ХЗ/H ₃ PO ₄ + Ca(OH) ₂	[85]
		ХЗ/Ca(CH ₃ COO) ₂ + (NH ₄) ₂ HPO ₄ /NH ₄ OH	[71]
		KH ₂ PO ₄ /CaCl ₂ /EDTA+ ХЗ/ПВС	[69]
6	Биомиметический метод основан на получении биоматериала, соответствующего костному составу.	ХЗ/CaCl ₂ + NaH ₂ PO ₄ + фосфат ХЗ	[82]
		ХЗ/CaCl ₂ + Na ₂ HPO ₄	[83]
		ХЗ/Ca(CH ₃ COO) ₂ + NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O and ХЗ/CaCl ₂ + (NH ₄) ₂ HPO ₄	[84]

7	Метод двойной диффузии (замораживание и лиофилизация): Минерализация хитозановых губок осуществлялась в диффузионной камере, состоящей из двух частей, разделенных круглым отверстием в центре, куда заливается ХЗ. При pH=7,4 были получены забуференные растворы солей Ca^{2+} и $-\text{PO}_4^{3-}$ с соотношением $\text{Ca}/\text{P}=1,67$. Диффузию через ХЗ осуществляли в разные промежутки времени - от 4 до 48 ч.	$\text{XЗ}/\text{CaCl}_2 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$	[86]
		$\text{XЗ} + \text{CaCl}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	[77]
8	Электрофоретическое осаждение: суспензию на основе ХЗ и солей Ca^{2+} и $-\text{PO}_4^{3-}$ при соотношении $\text{Ca}/\text{P}=1,67$ доводят до pH=9-10 и осаждают с использованием различных металлических электродов.	$\text{XЗ} + \text{ГА}$ $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}/$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$	[88]
		$\text{XЗ} + \text{ГА}$	[81]
		$\text{XЗ}/\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O} +$ NaH_2PO_4	[89]
9	Метод осаждения (замораживание и лиофилизация): Суспензию на основе ХЗ и солей Ca^{2+} и $-\text{PO}_4^{3-}$ при соотношении $\text{Ca}/\text{P}=1,67$ доводят до pH=10-11 и осаждают. Образцы лиофилизируют и сушат замораживанием.	$\text{XЗ} + \text{CaCl}_2 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$	[94]
		$\text{XЗ} + \text{CaO} - 51.91\%;$ $\text{P}_2\text{O}_5 - 38.25\%; \text{MgO} -$ $0.60\%; \text{Na}_2\text{O} - 2.84\%.$	[95]
		$\text{XЗ} + \text{CaCl}_2/\text{NaH}_2\text{PO}_4$	[96]
		$\text{XЗ}/\text{H}_3\text{PO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$	[97]
		$\text{XЗ} + \text{нано-ГА}$	[78]
		$\text{XЗ}/\text{CaCl}_2 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$	[98]
		$\text{XЗ} + \text{ГА} (\text{H}_3\text{PO}_4 +$ $\text{Ca}(\text{OH})_2)$	[99]
		$\text{XЗ}/\text{CaCl}_2 + \text{KH}_2\text{PO}_4$	[100]
		$\text{XЗ}/\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 +$ NaH_2PO_4	[101]
		$\text{XЗ} / \text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{CaCl}_2 /$ этанол	[102]
$\text{XЗ} + \text{КГА} + (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	[42]		
10	Одностадийное соосаждение: смесь ХЗ и CaCl_2 титруют раствором NaH_2PO_4 при $\text{Ca}/\text{P}=1,67$ и осаждают в щелочных условиях.	$\text{XЗ}/\text{CaCl}_2 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$	[103]

11	Метод осаждения: Суспензию, состоящую из ХЗ и солей Ca^{2+} и $-\text{PO}_4^{3-}$ при $\text{Ca/P}=1,67$, осаждают при $\text{pH}=10-11$.	ХЗ + ГА	[64]
		ХЗ + ГА	[104]
		$\text{ХЗ}/\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O} + (\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	[105]
		ХЗ + нано ГА	[106]
12	Метод смешивания	ХЗ + нативный ГА/ CaO/ZnO	[94]
		ГА смешивают с раствором ХЗ	[107]
13	Метод лиофильной сушки: Композитный каркас ХЗ/декстран/нано-ГА был синтезирован методом смешивания. смесь формовали, замораживали для замораживания растворителя и лиофилизировали при -90°C в течение 48 ч для получения пористых каркасов.	ХЗ/декстран + $n\text{ГА}((\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}/\text{NaH}_2\text{PO}_4))$	[108]

Как свидетельствуют литературные источники, композиты ХЗ/ГА были синтезированы из 1М растворов CaCl_2 и KH_2PO_4 при соотношении $\text{Ca/P} = 1,67$, используемых вместо ГА, и в основном, с помощью низкомолекулярного раствора ХЗ $\text{СДА} \geq 90\%$. Гранулы получают осаждением ХЗ/ГА с 5-7% NaOH , промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции, замораживают и сушат [100].

Композиты ХЗ/ГА и ХЗ/дигидрат дикальцийфосфата (ДКДГ) были синтезированы методом мембранной диффузии [94] и изучены их физико-химические свойства. Для этого раствор ХЗ и CaCl_2 помещали в полупроводниковую мембрану и погружали в раствор фосфата. Через некоторое время полученную суспензию высушили замораживанием. Содержание органических и неорганических веществ определяли с помощью термогравиметрического анализа (ТГА). Согласно СЭМ исследованиям показано, что композиты образуют пористую структуру. Содержание неорганических веществ в гибридном композите ХЗ составляло 35-45%. Рентгеноструктурным анализом выявлено образование кристаллов ГА и ДКДГ в полимерной матрице.

На водяной бане при соотношении $\text{Ca/P}=1,67$ и 40°C к раствору Na_2HPO_4 интенсивно перемешивая добавляли смеси ХЗ и CaCl_2 . Затем смесь осаж-

дали 1М раствором NaOH, промывали дистиллированной водой и сушили при низком давлении. Были синтезированы ХЗ/ГА при мольном отношении 30/70, 50/50, 70/30, 85/15 и идентифицированы ИК-спектроскопией, рентгеноструктурным и термическим анализами образцов. Определена, что термическая стабильность композитов сохраняется при 200°C [103].

В данной работе [95] получены два типа ГА: в порошковом состоянии, нагретом до 400°C (содержание: CaO-51,9%; P₂O₅-38,3%; MgO-0,6%; Na₂O-2,8%) и 700°C. Образцы в виде нагретого порошка при С (содержание: CaO-52,3%; P₂O₅-38,7%; MgO-0,6%; Na₂O-2,1%) и сравниваются их свойства. Композиты в порошкообразном состоянии ГА взаимодействовали с микрокристаллическими ХЗ различной молекулярной массы в массовых соотношениях от 9÷1 до 1÷9.

Волокно из композита ХЗ-ГА может быть получено методом коагуляции. Для этого раствор ХЗ-NaH₂PO₄ коагулируют в специальной ванне, заполняют ионы кальция до однородности, а затем реагируют раствором NaOH с образованием ГА в волокнистой матрице. Было показано, что механические свойства волокна зависят от концентрации NaH₂PO₄ (0,03 М) в растворе ХЗ-NaH₂PO₄ [102].

В инженерии для улучшения их биоактивных, химических и механических свойств костной ткани были разработаны несколько типов полимерных и биокерамических материалов, таких как композиты ГА с различными полимерами. Это способствует улучшению ряда керамических свойств ГА: внутренней хрупкости, структуры и смещения частиц с их местоположения. Преимущество гибридных композитов ГА состоит в том, что полимеры обладают способностью эффективно взаимодействовать с тканью, окружающей костную ткань [109].

Также был получен силиконапатит на основе Na₂SiO₃ и изучено его взаимодействие с хитозаном. Установлено, что ГА - [Ca_{10-x}Na_x(PO₄)_{6-x}(CO₃)_x(OH)₂] распределяется как НЧ в матрице ХЗ. Исследовано влияние ММ ХЗ на физико-химические свойства и термическую стабильность нанокompозитов ХЗ-ГА при 600 и 1000°C [84].

Синтезированы композиты на основе ГА и ХЗ для применения их в костной инженерии. Изучено влияние условий синтеза на получение нанокристаллических структур апатита. Было обнаружено, что ГА и ХЗ образуют относительно стабильный состав в соотношении 50/50. Потеря карбонат-ионов

А-типа в ГА происходит выше 700°C. Показано, что можно получить непористый типа А путем обработки при 1100°C и, таким образом, быть ближе к химическому составу здоровой костной ткани [98].

Для определения оптимального состава композита был синтезирован пористый структурный композит, состоящий из микрокристаллического ХЗ (МКХЗ), ГА и β-трикальцийфосфата (β-ТКФ) с хорошими сорбционными свойствами. В ходе исследования были получены композиты МКХЗ-β-ТКФ-ГА в различных соотношениях, а их химический состав подтвержден на основании ИК-спектров. Согласно РФА-анализ порошка фосфата кальция, они имеют значительную аморфную структуру при 2θ 10°, 20°, а также ХЗ/β-ТКФ демонстрирует полностью аморфную структуру. Анализ МКХЗ/β-ТКФ показал очень высокое содержание ионов Ca²⁺ и фосфата при соотношении 2:1, соответственно [104].

Таким образом, получение наноструктур ХЗ-ГА является более простым способом, и изучение морфологию ХЗ и ХЗ-ГА позволяет увидеть нерегулярные, пористые нанокомпозиты с более распределенной площадью поверхности. Тем не менее, рентгеноструктурный и ИК-спектральный анализ подтвердили, что ГА имеет высококристаллическую и непористую структуру [110].

1.5. Предварительная схема действия биополимера ХЗ с гидроксиапатитом кальция

В зависимости от соотношений исходных компонентов и условий синтеза авторы предложили некоторые механизмы образования апатитов и фосфатов хитозана. Ионы Ca²⁺ играют важную роль во взаимодействии ХЗ с ГА [62] (рис. 1.3). По мнению авторов, ионы Ca²⁺ появляются на поверхности кристаллов ГА и прочно удерживают структуру за счет электростатических связей. Следовательно, ХЗ образует поперечную связь между -NH₂ и ионами Ca²⁺ ГА [64, 111-112].

Взаимодействие свободных (C-NH₂) и протонированных (C-NH₃⁺) аминогрупп хитозана с раствором ГА характеризуется следующим образом:

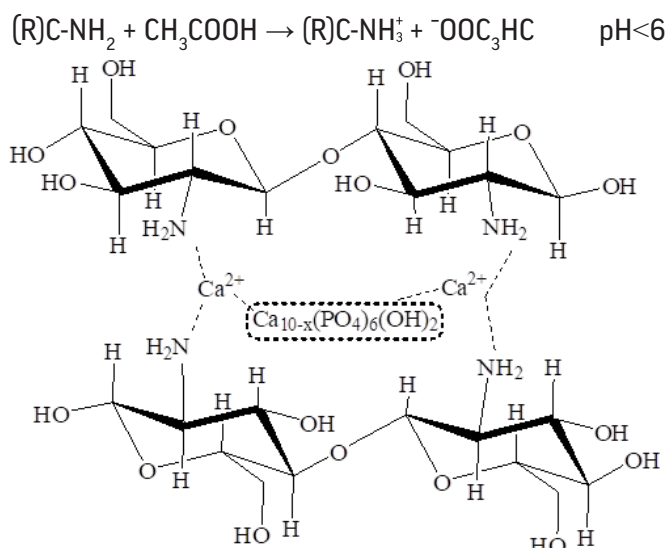


Рис 1.3. Координационные связи между $-NH_2$ групп ХЗ и ионов Ca^{2+} ГА [64, 111-112]

Присутствие в реакционной смеси ионов кальция и фосфата приводит к образованию композитов ХЗ/ГА за счет электростатического взаимодействия между $C-NH_3^+$ и Ca^{2+} , PO_4^{3-} и/или $C-Ca^{2+}$ и $C-PO_4^{3-}$ [72, 113]. Он также образует водородные связи между группами $-OH$ и $-NH_2$ хитозана и группами $-OH$ на поверхности ГА [74, 108, 110, 113] (Рис. 1.4.).

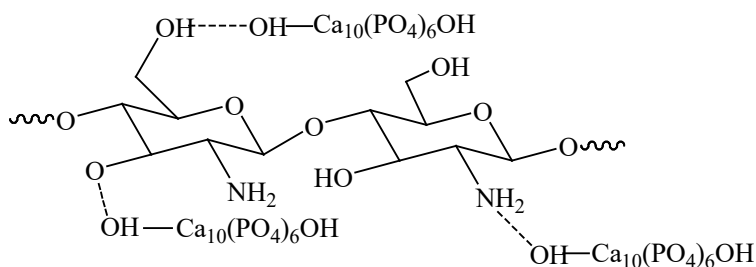


Рис. 1.4. Электростатические взаимодействия и водородные связи между ХЗ-ГА [74, 108, 110, 113]

В ИК-спектроскопии функциональными группами ХЗ являются метилен- CH_2 , амино- NH_2 , метилол $-CH_2OH$ и аминометилен $-CH_2NH_2$. ИК-спектры образцов ХЗ-ГА показывают, что изменения в группах амида I и амида II в хитозане указывают на взаимодействие между ХЗ и ГА. К ним относятся водородные связи между группами $-NH_2$ и $-OH$ и взаимодействия между

-NH₂ и Ca²⁺. Чем больше аминогруппы ХЗ движутся в направлении уменьшения длин волн, тем сильнее взаимодействие водородных связей и молекул между этими группами [114]. Изучением взаимодействия компонентов в комплексе ХЗ и β-ТКФ/ГА было высказано предположение о взаимодействии Ca²⁺ и фосфат-ионов с аминогруппами ХЗ [104] (рис. 1.5).

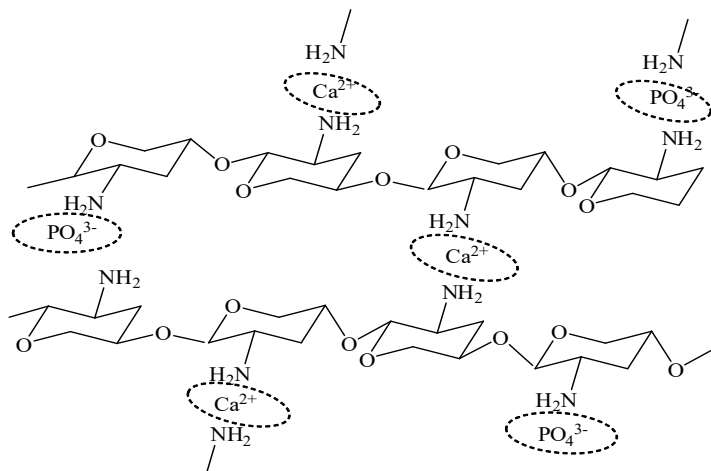


Рис. 1.5. Взаимодействие ионов Ca²⁺ и фосфат-ионов и аминогруппами ХЗ [104]

Было показано, что ионы Ca²⁺, расположенные на поверхности ГА, могут взаимодействовать свободными гидроксильными и аминогруппами ХЗ, тогда как анионы фосфата могут связываться с частично протонированными аминогруппами с помощью донорно-акцепторных (ионно-координационных) связей [109] (рис. 1.6).

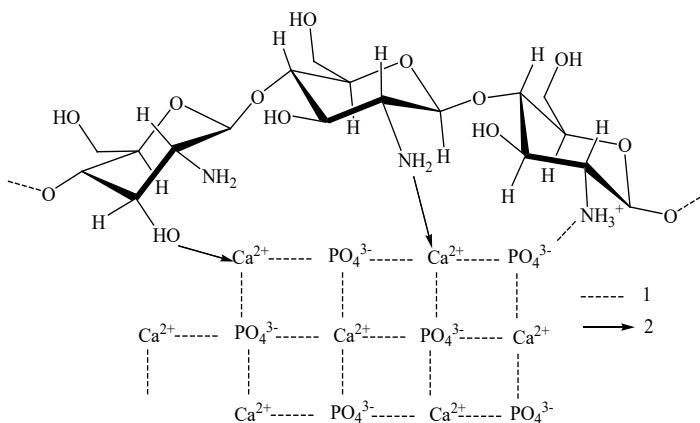


Рис. 1.6. Донорно-акцепторные взаимодействия между функциональных групп макромолекул ХЗ и ГА [109]

Таким образом, авторами установлено, что макромолекула ХЗ может взаимодействовать с ГА посредством донорно-акцепторных (ионно-координационных) связей, ионных, водородных связей между -ОН- и -NH₂-группами хитозана и -ОН-группами на поверхности ГА, а также с помощью электростатических взаимодействий и др. В настоящее время существуют различные предположения о механизме взаимодействия хитозана с гидроксиапатитом.

Ионы кальция взаимодействуют посредством аминогрупп ХЗ, образуя координационную связь. Показано, что при взаимодействии ионов кальция с электронодонорными функциональными группами ХЗ происходит их адсорбция в макромолекулу. Механизм адсорбции ионов металлов хитозаном зависит от ряда факторов таких, как рН раствора, молекулярно-массовые характеристики ХЗ: молекулярная масса (ММ) и степень деацетилирования (СДА), размер частиц, пористость и др. На наш взгляд, в растворах ХЗ и ГА, наличие ионов кальция, фосфатных, гидро- и дигидрофосфатных ионов, а также аминогрупп -NH₃⁺ способствует формированию электростатических связей между поликатионами и низкомолекулярными противоионами. В свою очередь, наличие -ОН групп в структуре ХЗ и ГА приводит к образованию Н-Н связей. Эти рассуждения хорошо согласуются с литературными данными [6]. Результаты исследований показывают, что взаимодействие ХЗ с гидроксиапатитом происходит при рН<7. Известно, что ХЗ в разбавленных растворах органических и минеральных кислот находится в солевой форме, что затрудняет взаимодействие аминогрупп с катионами металлов. В выбранных условиях получения композитов ХЗ с Ca²⁺ рН реакционной системы во всех случаях составляет рН<7, что исключает предположение о взаимодействии ионов Ca²⁺ с функциональной группой -NH₃⁺.

Результаты показали, что взаимодействие макромолекулы хитозана с молекулой гидроксиапатита осуществляется за счет электростатических взаимодействий и происходит образование водородных связей между функциональными группами ХЗ (-NH₃⁺) и ГА (-HPO₄²⁻, -PO₄³⁻) [9].

Анализ литературы показывает, что химическая природа исходных реагентов, порядок их добавления в реакционную смесь и продолжительность синтеза являются важными факторами, влияющими на состав конечного продукта и характер взаимодействия «полимер - низкомолекулярное соединение».

1.6. Применение композитов хитозана с гидроксиапатитом в медицинской практике и ветеринарии

Известно, что кость имеет композитную природу и состоит из 69% фосфата кальция, 21% коллагена (полимера), 9% воды и 1% других компонентов, которые образуют очень сложную микроструктуру, что очень затрудняет создание структуры с аналогичными высокими механическими свойствами [115, 116]. В целом ортофосфаты кальция ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) важны для здоровья человека и млекопитающих. Потому что ортофосфаты кальция составляют их кальцинированные ткани (кости, зубы, перья) и патологическую (вызванную различными заболеваниями, связанными с дефицитом Ca и P) неорганическую часть [117-118]. Кроме того, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ является основным источником фосфора и используется для производства кормов, удобрений, моющих средств, различных фосфорных химикатов. Наноструктурные кристаллические ортофосфаты кальция, особенно в форме апатитов, играют важную роль в формировании тканей, образуя основные неорганические строительные блоки костей скелета и зубов. Эти сложные структуры образуют несколько десятков и сотен нанометровых кристаллов биологического апатита. Этот процесс осуществляется под строгим контролем биоорганических матриц [119] (табл. 1.2).

Таблица 1.2

Применение препаратов на основе гидроксиапатит-хитозановых композитов

№	Состав исходных компонентов	Область применения	ссылки
1	ХЗ/ГА	Композит ХЗ/ГА исследовался во многих областях: инженерия костной ткани, стоматология, ветеринария.	[120-123]
2	ХЗ/ГА=50:50 (Ca/P-1,67)	Костные имплантаты, то есть для профилактики и лечения остеопороза	[124]
3	ХЗ/ГА	При хроническом пародонтите (инфекционно-воспалительном заболевании зубов)	[125]

4	ХЗ/ГА и β -трикальцийфосфат/ ХЗ	ХЗ/ГА используется для лечения остеопороза, а β -трикальцийфосфат/ХЗ используется для остеопластики в стоматологии.	[126, 127]
5	Композиты пористо-структурные ХЗ/КГА и ХЗ/ГА	Костная имплантация, восстановление кости	[70, 128, 129]
6	Композиты, состоящие из ХЗ, КГА, тетракальцийфосфата, карбоната аммония и ГА	Используются в качестве имплантатов и костно-трехмерных материалов для инженерии костных дефектов.	[130]
7	Композиция, содержащая ХЗ/ Ag/ГА-повиаргол	Ортопедический микроимплантат	[131]
8	Композит ХЗ/фосфат кальция	Костная инженерия	[132]
9	ХЗ/ ГА/Ag	В качестве антибактериального средства (микроорганизмы <i>E. Coli</i> ATCC 25922)	[133]
10	ГА/ХЗ/Ag-повиаргол	Ортодонтические микроимплантаты	[107]
11	ХЗ/ нано ГА	Костная инженерия	[80]
12	Электропрядение волокон нано-ГА/ХЗ и композита на основе полимолочной кислоты	Лечение стандартизированных дефектов свода черепа у крыс	[134]
13	ХТ/ГА	Инженерия костных дефектов	[135]
14	3D ХЗ/ГА и ГА/ХТ композит	Костная имплантации в костной инженерии	[136, 137]
15	ХЗ/Колл/ГА	Костная регенерация	[65, 97, 138]
16	ХЗ/нано-ГА и ХЗ/ крахмал / нано-ГА	Для профилактики и лечения остеопороза регенерация кости, вызванная остеопорозом, инженерия костной ткани	[78, 105, 139, 140]
17	Апатитовые трансплантаты с покрытием ХЗ	В инженерии костной ткани	[77]
18	Трансплантат ГА/ХЗ	Костные и костно-хрящевые дефекты.	[79]
19	ХЗ/Колл/ГА	При восстановлении кости, трансплантации и лечении дефектов распознавания костей.	[141, 142]
20	Естественный ГА/ХЗ	Для лечения сложных костных дефектов	[92]

21	Гидрогели ХЗ/ГА и ХЗ/фосфат кальция	Способствовать формированию и росту костей при лечении костных дефектов	[143]
22	ХЗ/ГА	Композиты предложены в качестве биоматериалов для восстановительной стоматологии, тканевой инженерии для альвеолярной кости и пародонтальной трансплантации для комплексного стоматологического лечения	[144]
23	ХЗ/ГА и ХЗ/ГА/ поликапролатон	В области тканевой инженерии зубов	[145, 146]
24	ХЗ/ГА нанокompозит	В зубных пломбах	[147]
25	ХЗ/ фосфат кальция с	Композиты подходят для использования в качестве регулирующего агента для покрытия пульпы при кариесе зубов	[148]
26	ХЗ/ГА	Поверхность титанового имплантата покрыта	[149]
27	ХЗ/ГА	Композит ХЗ/ГА предназначен для эмалирования зубов и герметизации поврежденных поверхностей эмали	[150, 151]
28	ХЗ/ нано ГА	Рекомендуется для использования в инженерии костной ткани	[152]
29	ХЗ/ГА+полибутилсукцинат, стволовые клетки мезенхимы костного мозга, коллаген, альгинат, инсулин и др.	Костная имплантации	[153]
30	ХЗ/ГА углеродные нанотрубки	Предлагается в качестве искусственных костей.	[154]
31	Пористые и блочные композиционные материалы из наночастиц монтмориллонита и гидроксипатита из хризотила, хитиновых наночастиц и нановолокон на основе ХЗ.	Тканевая инженерия и трансплантология	[155]
32	ХЗ-ГА	Инженерия костной ткани	[156]
33	КГА/ХЗ	В медицине (плавление КГА в изотоническом растворе увеличивает с увеличением концентрации ХЗ)	[157]

34	ХЗ/ГА/магнетит	Пролиферация клеток и рост костей	[158]
35	ХЗ	В стоматологической хирургии	[159]
36	ГА/Колл	Инженерия костной ткани	[160]
37	ХЗ/ГА	Используется при внутренних переломах костей	[161]
38	ХЗ/Колл	Инженерия костной ткани, при заболеваниях, связанных с дефектами костей	[162]
39	ХЗ/ фосфат кальция	Костная имплантации	[163]
40	ХЗ/трикальций, монокальций и дикальцийфосфат	В ветеринарной практике (остеопороз и остеомалация)	[164, 165]

Проведена огромная работа по препаратам на основе ГА и разработаны различные фосфаты для решения проблем, связанных с дисбалансом Ca/P в живых организмах. В основном, для улучшения их физико-химических свойств используются природные и искусственные полимеры [42].

Один из таких природных полимеров, хитозан, имеет особое значение благодаря хорошему формированию матрицы и антибактериальным свойствам. Материалы, используемые для заполнения костных дефектов, должны иметь 4 основных свойства: остеокондукцию, остеоиндукцию, остеоинтеграцию и остеогенез. Все эти свойства присутствуют в ХЗ, самое главное, его соединения с ГА и другими фосфатами кальция отличаются высокой биологической деградацией, биоактивностью, антибактериальными свойствами при коррекции дефектов клеток костной ткани [166-169]. Протонированные свободные аминогруппы в ХЗ гарантируют, что он легко взаимодействует с ДНК, белками, липидами, заряженными органическими веществами или синтетическими полимерами, и придают ХЗ вышеуказанные свойства. Эти свойства ХЗ увеличивают возможность применения в сочетании с различными неорганическими и органическими соединениями в инженерии костной ткани [170, 171].

Обнаружено, что нанокompозиты ГА с коллагеном состоят из микроструктурированной пористой системы, напоминающей кость. Однако существуют проблемы со стоимостью коллагена, его связыванием с костным коллагеном и гибкостью. Введение ГА в матрицу ХЗ значительно увеличивает его остеокондуктивные и механические свойства [172]. Специфические свой-

ства ХЗ, включая его биодegradацию, биологическую гибкость, вязкость и противомикробные свойства, делают его идеальной полимерной матрицей для ГА [173].

Заключение к главе 1

Анализ литературы показывает, что несмотря на то, что по композитам ХЗ/ГА проводится огромное количество исследований, недостаточна информация о химической кинетике, молекулярно-массовых характеристиках ХЗ и влиянии мольных соотношений ХЗ/ГА на состав, морфологию и свойства композита. В связи с этим, изучение возможности получения композитов ХЗ/ГА на основе хитозана *Bombux mori* и их использования в ветеринарной практике представляет научно-практический интерес.

ГЛАВА 2

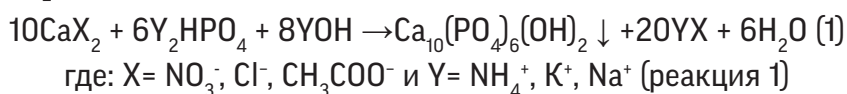
СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХИТОЗАНА *BOMBUX MORI*, ГИДРОКСИАПАТИТА КАЛЬЦИЯ И ИХ КОМПОЗИТОВ

- 2.1. Синтез гидроксиапатита кальция и его идентификация
 - 2.2. Влияние продолжительности синтеза на формирование гидроксиапатита кальция
 - 2.3. Получение композитов ХЗ/ГА варьированием параметров синтеза в условиях «*in situ*»
 - 2.4. Взаимодействие хитозана *Bombux mori* с гидроксиапатитом кальция в водных растворах
 - 2.5. Влияние макролекул ХЗ *Bombux mori* на формирование стехиометрического гидроксиапатита кальция в условиях «*in situ*»
 - 2.6. Изучение влияния соотношений ХЗ/ГА на размер формирующихся частиц в условиях «*in situ*» и «*ex situ*»
 - 2.7. Исследование размерных характеристик синтезированных образцов ГА и композитов ХЗ/ГА
 - 2.8. Спектроскопические исследования композитов хитозана с гидроксиапатитом
 - 2.9. Рентгеноструктурный анализ композитов ХЗ/ГА
 - 2.10. Влияние продолжительности процесса на морфологию композитов гидроксиапатита хитозана *Bombux mori*
 - 2.11. Термические характеристики композитов на основе хитозана *Bombux mori* и гидроксиапатита
 - 2.12. Теоретический аспект взаимодействия хитозана с гидроксиапатитом
- Заключение к главе 2

СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛАВА 2 ХИТОЗАНА *WOMBUX MORI*, ГИДРОКСИАПАТИТА КАЛЬЦИЯ И ИХ КОМПЗИТОВ

2.1. Синтез гидроксиапатита кальция и его идентификация

Согласно многочисленным исследованиям, реакция получения высокодисперсного порошка гидроксиапатита протекает по следующей схеме [23, 30, 38]:



Взаимодействие солей кальция с фосфатами и получение тех или иных продуктов реакции зависит от pH раствора, температуры, продолжительности реакции, а также от мольного и массового соотношения Ca/P в реакционной системе. Образование гидроксиапатита происходит в течение нескольких минут и при относительно низкой температуре $<50^\circ\text{C}$ в течение длительного времени в процессе перекристаллизации аморфного фосфата кальция. В итоге формируется нестехиометрический гидроксиапатит кальция (ГА) – $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, где значение x зависит от условий синтеза.

Образованный осадок выделен декантацией и лиофильно высушен. Полученный порошок исследован элементным анализом и рентгенографическим анализом (рис. 2.1).

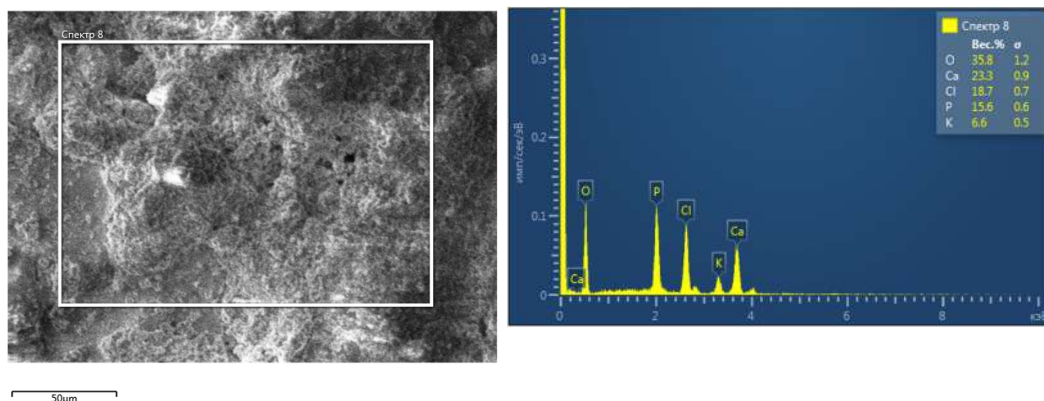


Рис. 2.1. Спектральный и элементный анализы гидроксиапатита кальция

Результаты элементного анализа показывают, что гидроксиапатит состоит из смеси фосфатов кальция. Однако в составе апатита существует 23,3

масс.% Са и 15,6% Р, то есть массовое соотношение Са/Р составляет 1,5. Возможно, это связано с тем, что при декантации осадка в растворе остаются частично растворимые фосфаты, гидрофосфаты и ионы кальция.

Данные рентгеноструктурного анализа подтверждают полученные результаты (рис. 2.2).

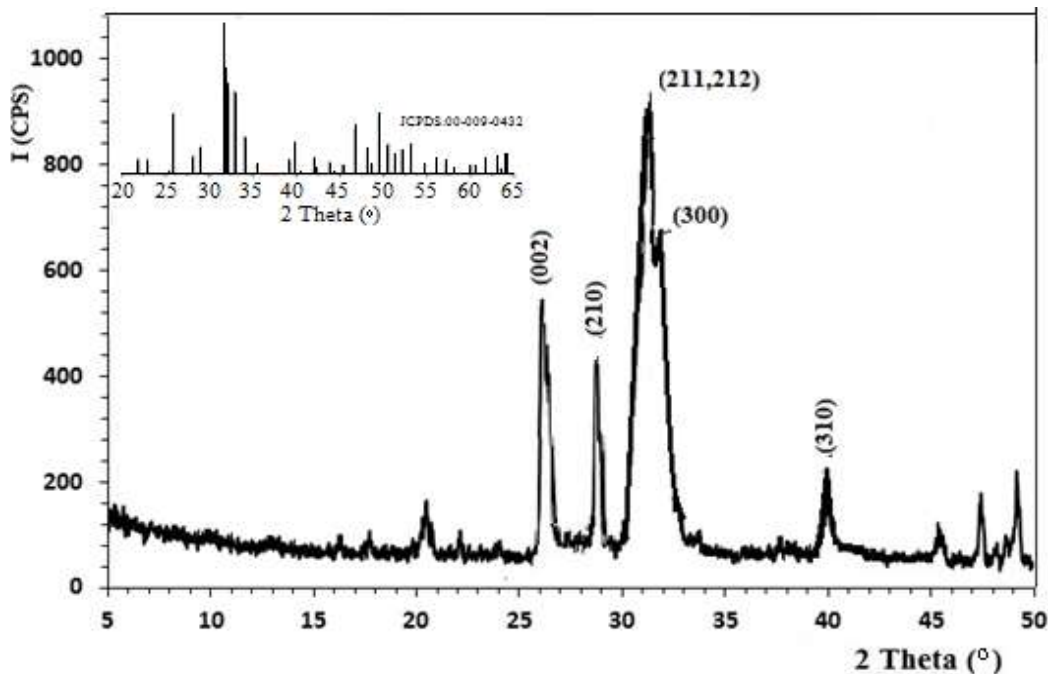


Рис. 2.2. Дифрактограмма гидроксиапатита кальция

Результаты XRDA анализа ГА показывают, что при 2θ 26,48° (002), 27,29° (210), 30,21° (210), 32,42° (300), 32,92° (202) и 40,53° (310) наблюдаются характерные пики гидроксиапатита. Особенно, пики в областях 2θ 30-34° (211, 212, 300), являются характеризующимися пиками, соответствующими межплоскостным расстояниям ГА с гексагональной сингонией (JCPDS-N°-00-09-0432) [9].

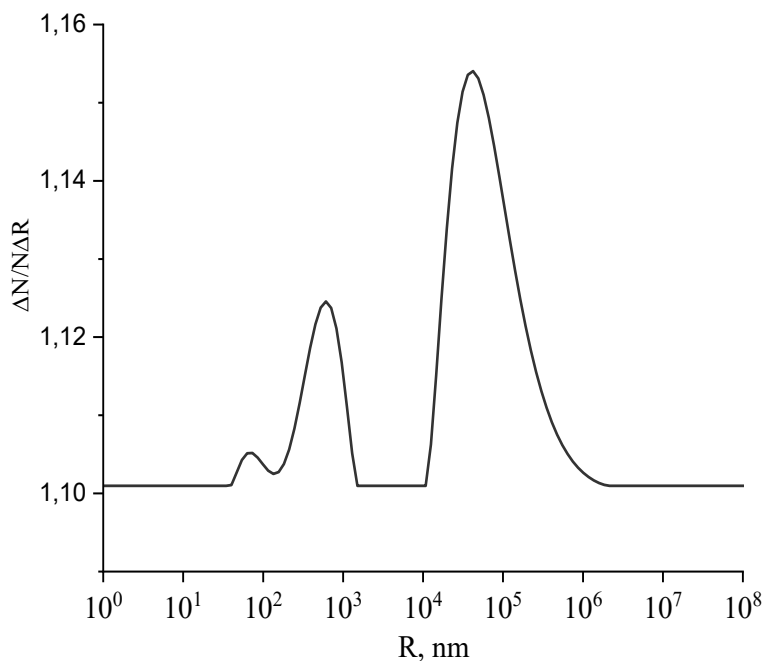
По формуле Дебая-Шеррера $D=0,89\lambda/(\beta_{1/2}\cos\theta)$ рассчитан средний размер кристаллитов. Полученные результаты показывают, что при взаимодействии хлорида кальция с гидрофосфатом калия образуется гидроксиапатит кальция, средний размер кристаллитов, который составляет 30 нм (табл.2.1).

Некоторые параметры кристаллитов гидроксиапатита

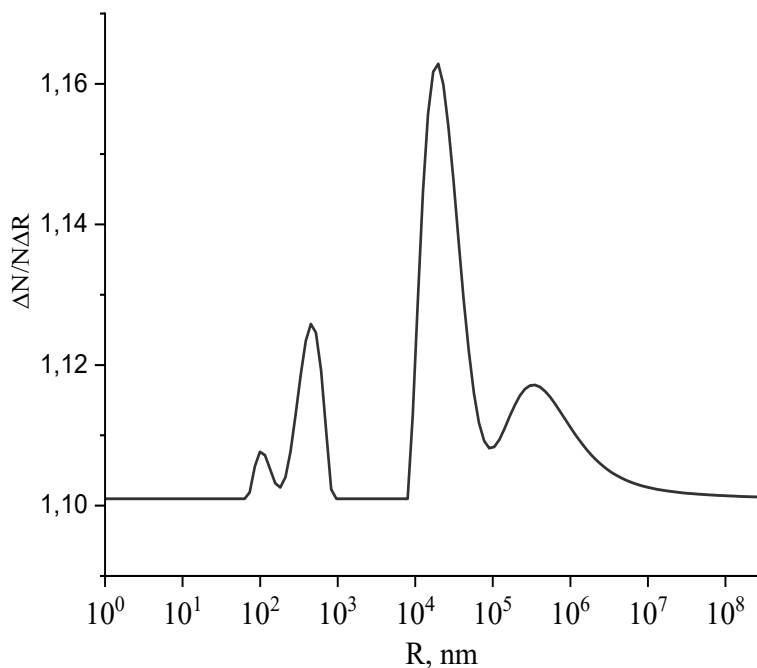
№	Индексы Мюллера Параметры	(002)	(210)	(212)	(300)	(202)	(310)
		1	2 θ , °	26,48	27,29	30,21	32,42
2	d, nm	3,36	3,26	2,95	2,75	2,71	2,22
3	b	0,0069	0,0035	0,0035	0,00523	0,00523	0,00523
4	D, nm	20,42	40,3	40,67	27,3	27,35	27,9
D _{сред} = 30 nm							

Результаты XRDA анализа кристаллов ГА хорошо согласуются с литературными данными [9, 98, 156].

DLS-исследования растворов гидроксиапатита показывают, что в растворах ГА при Ca/P-1,67 моль.% имеются частицы с размерами от 600 нм до 6,6 микрона с полимодальным распределением, а при Ca/P-1,35 моль.% размер частиц укрупняется до 19 микронов (рис.2.3).



а



б

Рис.2.3. Размер и распределение частиц ГА в растворе:
а) Ca/P-1,67 б) Ca/P-1,35 моль. %

Результаты DLS-измерений показывают, что характер распределения частиц ассиметричен, что свидетельствует о формировании частиц различной формы и размера. Также установлено, что при Ca/P-1,67 частицы имеют сравнительно мелкие размеры, чем при Ca/P-1,35 моль.%. Вероятно, это связано с образованием стехиометрического апатита кальция при Ca/P-1,67, что способствует взаимокомпенсации противоположно заряженных ионов и формированию наиболее компактных частиц. А при Ca/P-1,35 моль. % количество несвязанных (электростатически невзаимодействующих) ионов будет больше, и возможно, приведет к укрупнению (агломерации) частиц.

2.2. Влияние продолжительности синтеза на формирование гидроксиапатита кальция

Синтез проводили при интенсивном перемешивании в течение 1 часа со скоростью 1400 об/мин и температуре $40 \pm 2^\circ\text{C}$, исходное соотношение Ca/P

1,35 и 1,67 моль. %. Синтезированные образцы гидроксиапатита кальция и их композиты ХЗ/ГА исследованы методом эмиссионного полуколичественного спектрального анализа - МП 003:2015 (V категория точности). Настоящая методика распространяется на руды и минералы для определения массовых долей 54 элементов методом эмиссионного полуколичественного спектрального анализа в диапазонах содержаний от 1×10^{-5} до 3%.

Известно, что получение стехиометрического гексагонального ГА является продолжительным процессом, который требует нескольких суток. В связи с этим, поиск путей сокращения продолжительности синтеза и разработка способа синтеза нанокристаллического ГА в присутствии полимеров представляет научный интерес. Синтез ГА проведен в условиях «*ex situ*» (рис.2.4).

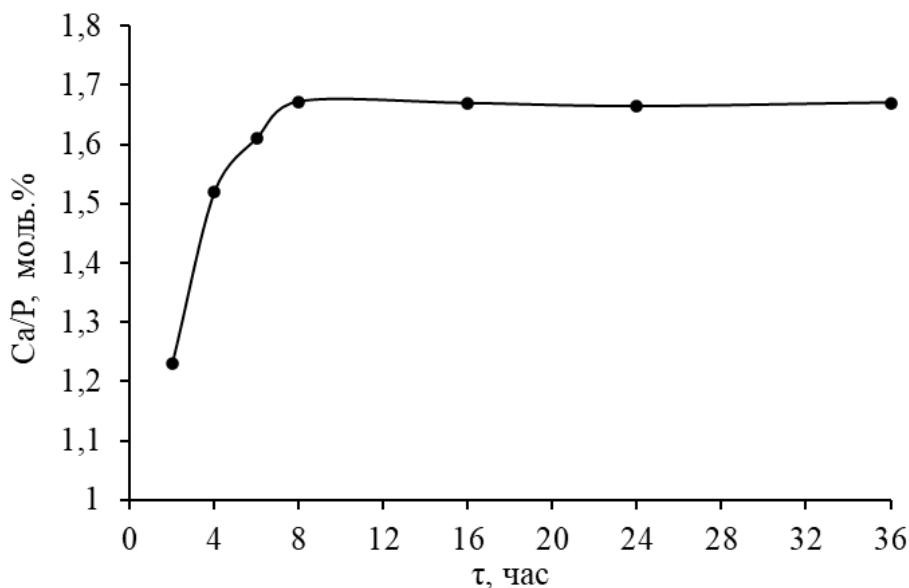


Рис. 2.4. Влияние продолжительности синтеза на формирование гидроксиапатита кальция в условиях «*ex situ*»

Результаты показывают, что в течении 0-8 часов при исходном соотношении Са/Р-1,67 моль.%, в полученных образцах соотношение Са/Р достигает от 1,23 до 1,65 моль.%. После 8 часов образуются образцы гидроксиапатита, содержащие в своем составе Са/Р-1,67 моль.% и при дальнейшем увеличении времени синтеза до 36 часов это соотношение не меняется.

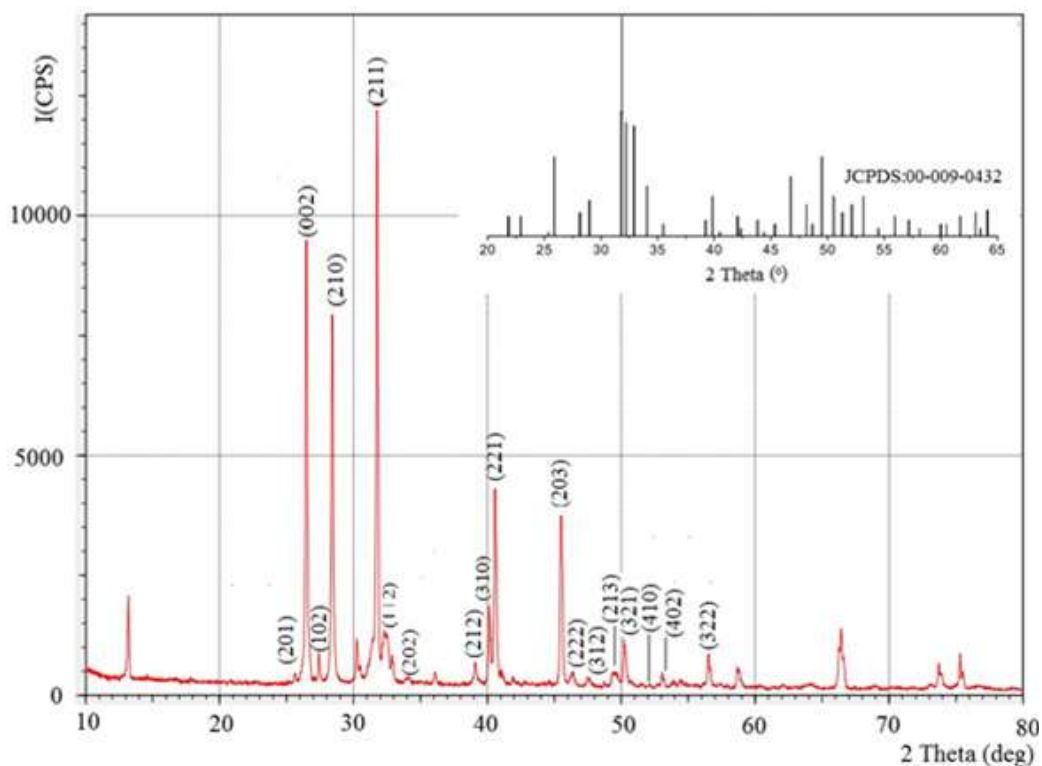


Рис. 2.5. Дифрактограмма гидроксиапатита кальция, исходное соотношение Ca/P=1,67 моль.%; τ -8 ч.

Данные свидетельствуют при 2θ 26,51°; 26,80°; 27,45°; 28,44°; 28,68°; 31,32°; 31,48°; 31,79°; 32,10°; 32,32°; 32,52°; 32,90°; 39,12°; 40,16°; 40,60°; 45,53°; 50,25°; 56,53° и 58,73° наблюдаются характерные пики гидроксиапатита. Особенно ярко выражены пики при 2θ 26-47° и подтверждают образование кристаллического ГА (Ca/P=1,67 моль. %).

Микроскопические исследования образцов гидроксиапатита кальция

Результаты АСМ-исследования морфологии порошков ГА, полученных при Ca/P-1,67 моль. % показывают на топографическом снимке, что в выбранных условия синтеза (τ =8 часов) образуются мелкодисперсные НЧ ГА с размерами от 50 до 300 нм и агрегаты до 6 мкм. По амплитудному снимку видно, что в системе формировались частицы ГА от 0,3 до 10 мкм, образованные вследствие агломерации НЧ.

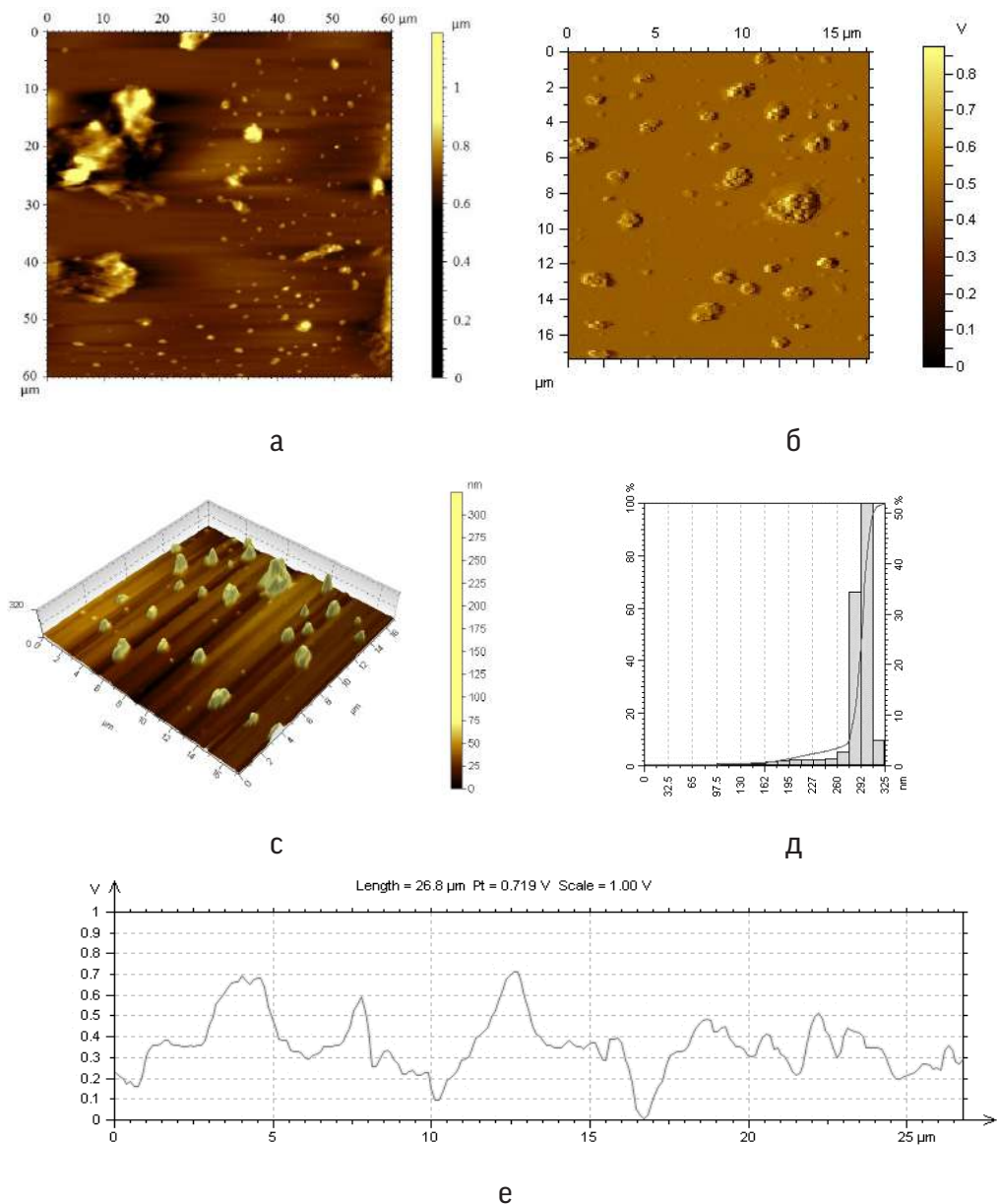


Рис.2.6. Топографический (а), амплитудный (б) и фазовый (с) АСМ-снимки порошков гидроксипатита кальция, гистограмма распределения (д) и шероховатость поверхности (е)

Фазовый снимок свидетельствует, что частицы ассиметричны и кристаллиты росли больше в z направлении. Шероховатость поверхностей частиц показывает, что частицы полидисперсны. Эти выводы способствовали исследованию амплитудных снимков частиц (рис.2.7).

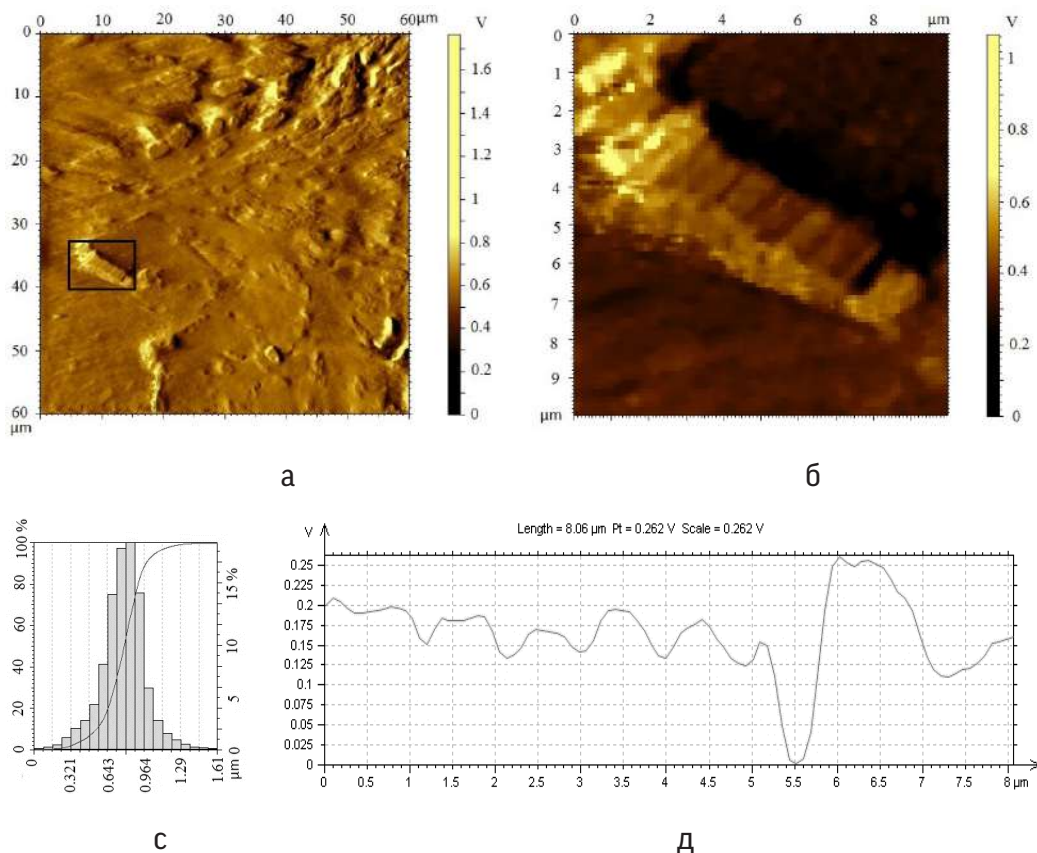


Рис.2.7. Амплитудные АСМ-снимки порошков ГА (а, б), гистограмма распределения (с) и шероховатость поверхности (д)

Выявлено, что в системе формируются частицы пластинчатой формы с дефектами (а, б). Обнаружено, что нанопластины расположены упорядоченно и формируют агрегаты размерами до 10 мкм. По шероховатости видно, что пластинки имеют дефекты (д, при 5,5 мкм). Эти данные согласуются с литературными данными [174].

Оптические снимки показывают, что частицы и формы ГА кальция различны (рис.2.8).

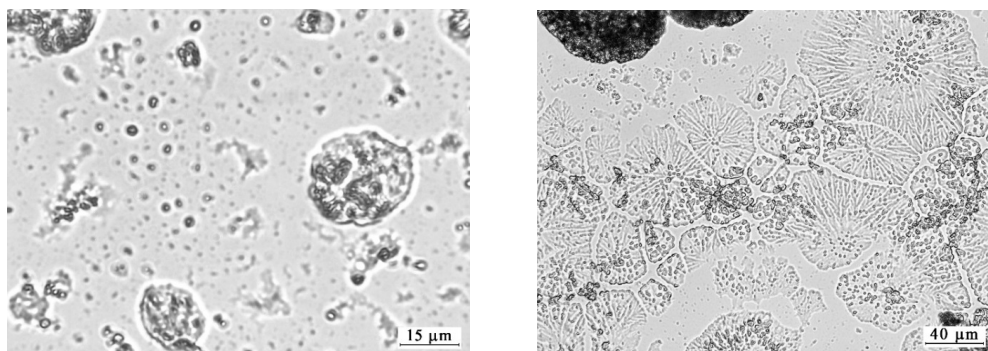


Рис. 2.8. Оптические снимки гидроксиапатита кальция при Са/Р-1,67 моль. %

Частицы полидисперсны и распределены полимодально. На снимках при масштабе 40 мкм можно видеть формирования агрегатов ГА.

УФ-спектроскопические исследования образцов ГА

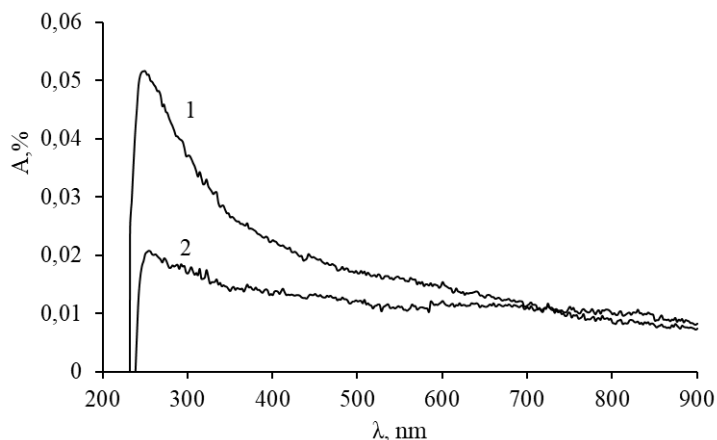


Рис. 2.9. УФ-спектры гидроксиапатита кальция, полученного при Са/Р: 1) 1,67 2) 1,35 моль. %

Видно, что при 238-400 нм наблюдается широкая полоса поглощения $\pi \rightarrow \pi^*$ связей PO_4^{3-} ($-\text{P}=\text{O}$) групп (рис. 2.9). Отметим, что при получении композитов с хитозаном *Bombux mori* эти полосы поглощения накладываются на полосы поглощения его амино- и ацетамидных (из остатка хитина) групп.

2.3. Получение композитов ХЗ/ГА варьированием параметров синтеза в условиях «in situ»

Для синтеза композитов ХЗ/ГА в условиях «in situ» использованы уксусноводный раствор ХЗ, 1М водные растворы CaCl_2 и KH_2PO_4 . Приготовляют

2%-ный раствор ХЗ и колбу помещают на магнитную мешалку, затем интенсивно перемешивают со скоростью до 500 об/мин. После чего раствор, содержащий $\text{ХЗ} + \text{CaCl}_2 + \text{KH}_2\text{PO}_4$, закапывают в раствор NaOH (рис. 2.10). При этом происходит совместное осаждение реакционной смеси, где осадок в этом щелочном растворе хранится в течение 8 часов. По времени гранулы ХЗ/ГА декантируют из щелочного раствора и промывают бидистиллированной водой до $\text{pH}=7$ и сушат в установке по лиофильной сушке при -50°C . Полученные гранулы ХЗ-ГА промывают бидистиллированной водой до $\text{pH}=7$, высушивают до постоянной массы в установке по лиофильной сушке марки ALPHA 1-2 LD plus (Германия) (рис. 2.11) [9, 175].

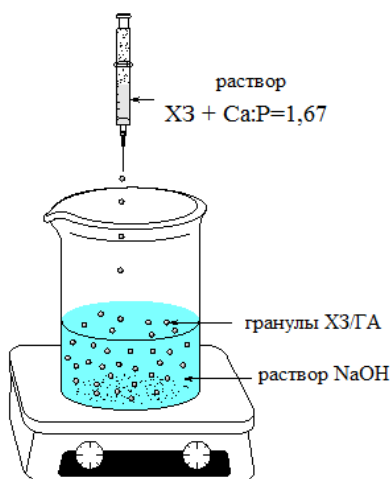


Рис. 2.10. Процесс получения гидроксиапатита хитозана *Bombyx mori* в условиях «in situ»



а



б

Рис. 2.11. Сформованные влажные (а) и лиофильно высушенные (б) гранулы ХЗ/ГА=70:30 масс.% на основе хитозана *Bombyx mori*

Таблица 2.2

Влияние массового соотношения (%) компонентов на состав композита хитозана *Bombux mori* с гидроксипатитом (ХЗ-ГА); ХЗ (ММ=200000, СДА=85%), $t=40\pm 2^\circ\text{C}$

№	Соотношение ХЗ/ГА, масс.%	ХЗ, г	ГА, г	рН раствора ХЗ $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_5$ - ГА $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$ (H ₂ O)	N _{общ} , %	Ca ²⁺ , %	Зольность*, %	Зольность, %
		Исходное соотношение Са/Р=1,67 моль.%						
1	ХЗ	1	-	3,26	8,27	-	3,62	-
2	ГА	-	1	4,72	-	20,15	100	60
3	ХЗ/ГА 90:10	0,9	0,1	3,10	7,12	1,98	13,01	6,02
4	80:20	0,8	0,2	3,09	6,71	3,83	27,74	12,1
5	70:30	0,7	0,3	3,08	5,55	5,89	36,45	18,2
6	60:40	0,6	0,4	3,06	4,60	7,23	41,59	24,4
7	50:50	0,5	0,5	2,97	4,10	9,16	59,85	30,9
8	40:60	0,4	0,6	2,91	3,13	10,60	61,20	36,6
9	30:70	0,3	0,7	2,84	2,89	12,68	68,60	42,5
10	20:80	0,2	0,8	2,82	2,50	15,07	76,61	48,4
11	10:90	0,1	0,9	2,80	1,21	17,55	95,21	54,4

* при расчете 100%-ной зольности ГА

Из результатов видно (табл.2.2), что с повышением содержания ГА в реакционной смеси рН раствора незначительно снижается от 3,10 до 2,80. Возможно, это связано с объемом кислоты, выделившейся при образовании водонерастворимой соли кальция. С уменьшением содержания ХЗ в реакционной смеси закономерно снижается содержание общего азота. Уменьшение содержания общего азота от 7,12 до 1,21% по сравнению с исходным хитозаном (N_{общ}=8,27%) приводит к уменьшению растворимости ХЗ и снижению растворимости целевого продукта.

С увеличением содержания ионов кальция (Ca²⁺) в исходной реакционной смеси от 10 до 90 масс.%, его содержание в композите увеличивается от 1,98 до 17,55%, так же повышается зольность композитов в диапазоне 13,01÷95,21% соответственно. При Ca²⁺ >50% в реакционной смеси образуются малорастворимые композиты, что представляет прикладной интерес в ветеринарной и медицинской практике для получения костных имплантатов.

2.4. Взаимодействие хитозана *Bombyx mori* с гидроксиапатитом кальция в водных растворах

Взаимодействие макромолекул ХЗ с ГА в водных растворах исследовано титрометрическим и вискозиметрическим методами. Для этого приготовлены по 10 мл 1% растворов исходных компонентов - ХЗ и ГА в 0,1N HCl. В раствор ХЗ добавляли расчетное количество ГА при сохранении соотношения Ca/P=1,67 моль.% (рис. 2.12-2.14).

Результаты свидетельствуют, что увеличение содержания ГА в системе приводит к снижению значения pH среды от 1,8 до 1,6. Вероятно, это связано с выделением кислоты при взаимодействии солей кальция и калия:

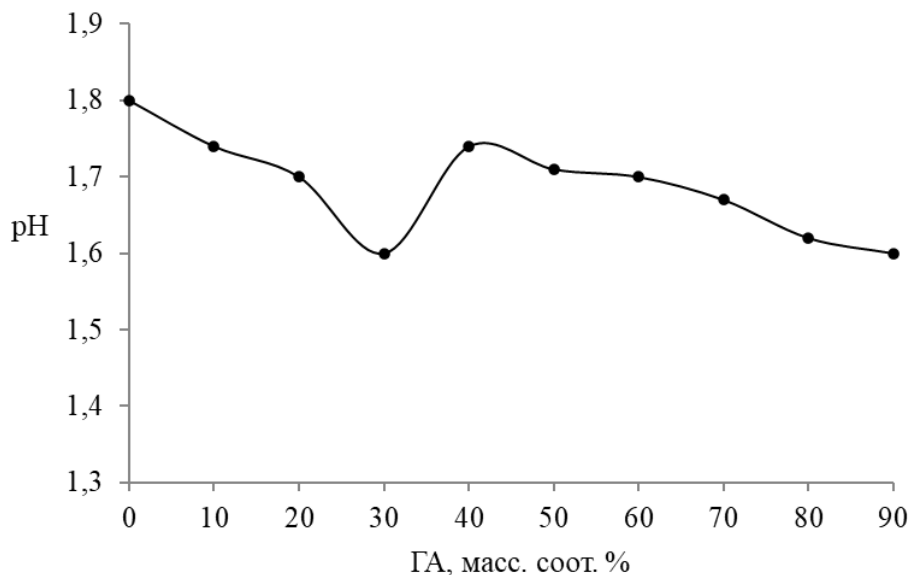
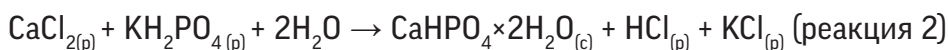


Рис. 2.12. Зависимость значения pH раствора от масс.% в соотношении ХЗ/ГА



Минимальное значение pH наблюдается при ХЗ/ГА=70:30 масс.%. Из кривых кондуктометрического титрования видно, что при повышении масс.% ГА от 10 до 90%, электропроводность раствора повышается от 110,2 до 146,0 мS/cm (рис. 2.13).

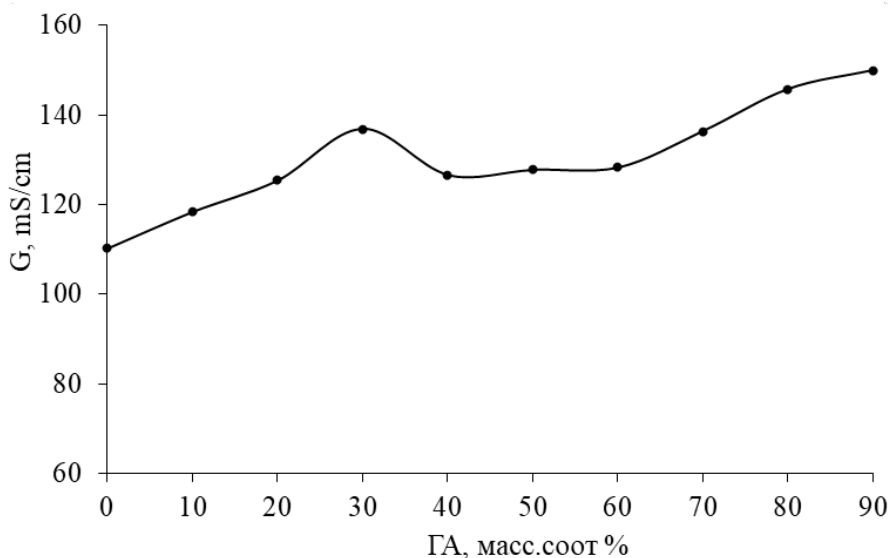


Рис. 2.13. Зависимость электропроводности растворов композитов от масс.% в соотношении ХЗ/ГА

Следует отметить, что при ХЗ/ГА=70:30 масс.% наблюдается скачок в кривых титрования. Вероятно, это объясняется тем, что при получении композитов ХЗ с ГА образуются соли натрия и калия, т.е. сильные низкомолекулярные электролиты. Возможно, при ХЗ/ГА=70:30 масс. % происходит максимальное взаимодействие и HCl образуется относительно больше, чем в других соотношениях, которая способствует увеличению электропроводности раствора (реакция 2.). Отметим, что при концентрации ГА 40÷60 масс.% электропроводность растворов композитов уменьшается, однако, при соотношении ХЗ/ГА=20:80 масс.% монотонно повышается. По-видимому, это связано с повышением количества низкомолекулярные электролитов в реакционной смеси [175].

Проведены вискозиметрические исследования растворов композитов, полученных при различных массовых соотношениях ХЗ/ГА (рис. 2.14). Результаты показывают, что при соотношении ХЗ/ГА=70:30 масс.% композит обладает относительно высокой вязкостью.

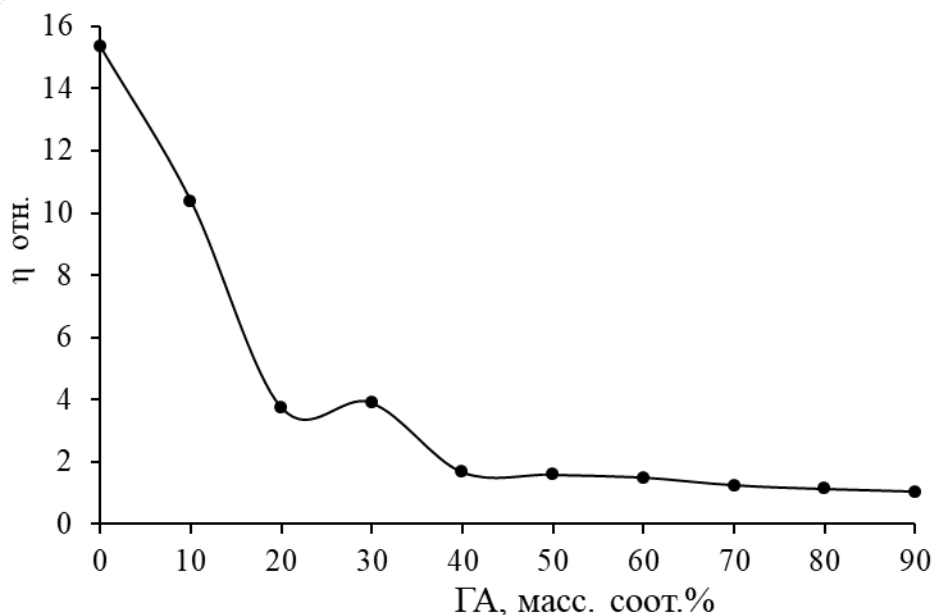


Рис. 2.14. Зависимость относительной вязкости растворов композитов от масс.% в соотношении ХЗ/ГА

Возможно, это связано с введением в систему низкомолекулярных противоионов, что приводит к разрушению межмолекулярных водородных связей и изменению конформации макромолекул ХЗ. При повышении содержания ГА от 40% и больше, вязкость раствора монотонно снижается соответственно, приближаясь к единице.

2.5. Влияние макролекул ХЗ *Bombyx mori* на формирование стехиометрического гидроксиапатита кальция в условиях «*in situ*»

Исследовано влияние ММ ХЗ *Bombyx mori* на образование композита ХЗ/ГА (рис. 2.15). С этой целью на начальном этапе синтеза композита ХЗ/ГА в растворах ХЗ (СДА-80%) в различных ММ наблюдалось изменение pH реакционной смеси.

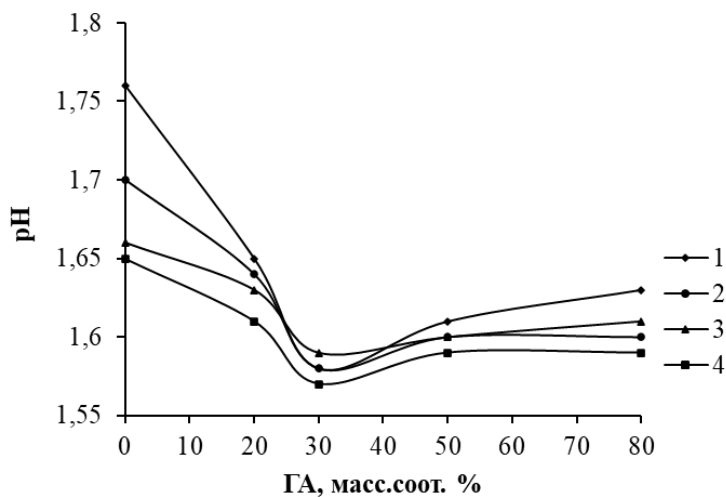


Рис. 2.15. Зависимость рН растворов от содержание ГА при различных ММ ХЗ и СДА=80%: 1) 290000; 2) 200000; 3) 78000; 4) 26000

В исследуемых интервалах ММ ХЗ, снижение значения рН происходит при ХЗ/ГА=70:30 масс.%, т.е. в этом соотношении происходит максимальное взаимодействие.

Исследовано влияние СДА ХЗ *Bombyx mori* на взаимодействие с ГА и физико-химические свойства композитов. Для этого синтезированы образцы ХЗ/ГА=80:20, 70:30, 50:50 и 20:80 масс.% с хитозанами различной СДА-90% (ММ 77000); СДА-80% (ММ 78000); СДА-70% (ММ 71000).

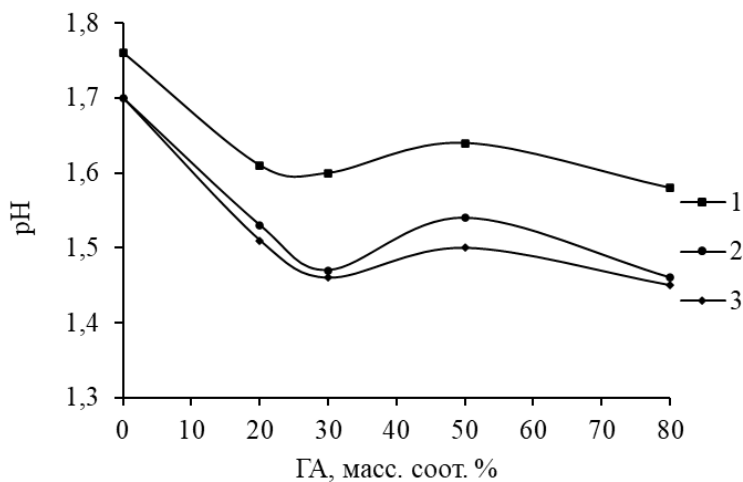


Рис. 2.16. Влияние СДА ХЗ на значение рН растворов композитов ХЗ/ГА, растворитель 0,1Н НСІ 1) СДА-90%; 2) СДА-80%; 3) СДА-70%

Результаты свидетельствуют, что в условиях «*in situ*» независимо от значения СДА, снижение значения рН происходит при ХЗ/ГА=70:30 масс.%, т.е. в этом соотношении происходит максимальное взаимодействие и соответственно выделяется относительно больше HCl по реакции 2.

Видно, что независимо от значения СДА снижение значения рН происходит при ХЗ/ГА=70:30 масс.%, т.е. в этом соотношении наблюдается повышение относительной вязкости раствора композита.

С целью изучения химической природы взаимодействия ХЗ с ГА композиты гидроксиапатита с ХЗ *Bombyx mori* (ММ-200000, СДА-85%) изучены кондуктометрическим титрованием (рис. 2.17). Видно, что в кривых кондуктометрического титрования исходного ХЗ и ГА наблюдаются 3 области титрования, характеризующие объемы щелочи, израсходованной на титрование: 1) растворителя - HCl ; 2) функциональных групп ХЗ (V_2-V_1) и ГА (V_3-V_2); 3) избыток щелочи в растворе. Следует отметить, что при титровании растворов композитов во втором участке образуются две области титрования, что показывает формирование нового вещества - композита ХЗ/ГА.

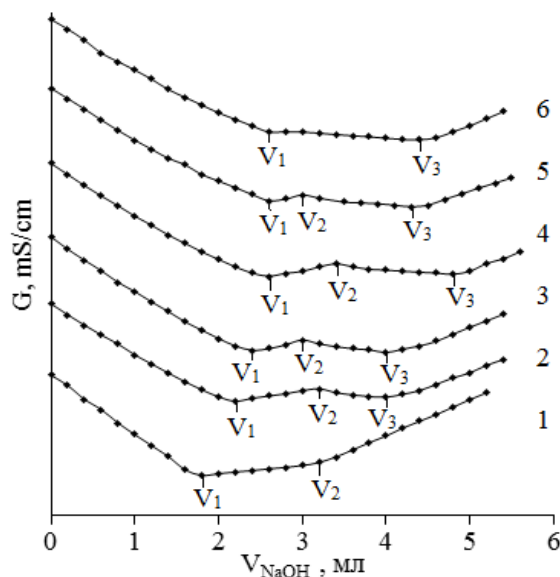


Рис. 2.17. Кондуктометрическое титрование растворов: 1) ХЗ *Bombyx mori*; 2) ХЗ/ГА=80:20; 3) 70:30; 4) 50:50; 5) 20:80 масс.%; 6) ГА

Согласно результатам титрования нами рассчитаны содержание связанных и несвязанных - свободных аминогрупп (NH_3^+), а также их степень связывания с низкомолекулярными противоионами (табл. 2.3).

Таблица 2.3

Массовая доля связанных и несвязанных аминогрупп в макромолекулах хитозана и его композитов с гидроксиапатитом кальция

№	Образцы, масс.%	NH_3^+ (своб), %	NH_3^+ (связ), %	Степень связывания, %
1	ХЗ	6,53	-	-
2	ХЗ/ГА=80:20	4,67	1,86	29
3	70:30	2,75	3,78	58
4	50:50	3,73	2,80	43

Повышение количества гидроксиапатита в реакционной смеси способствует увеличению степени связывания макромолекул с противоионами от 29 до 71%, что хорошо согласуется с данными элементного анализа и ИК-спектроскопии. Следует отметить, что при ХЗ/ГА=70:30 масс.% доля связанных аминогрупп составляет 3,78%, а степень связывания равна к 58%. Эти значения примерно в 2 раза больше, чем в соотношении ХЗ/ГА=80:20.

Исследована электропроводность растворов полученных композитов ХЗ/ГА (рис. 2.18).

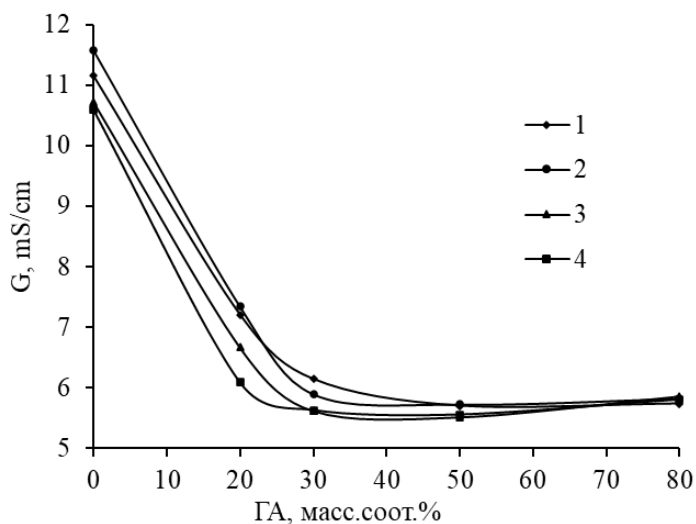


Рис. 2.18. Зависимость электропроводностей растворов ХЗ/ГА в различных соотношениях: 1) ММ (ХЗ) 290000; 2) ММ (ХЗ) 200000; 3) ММ (ХЗ) 78000; 4) ММ (ХЗ) 26000

Идентичное поведение кривых свидетельствует, что в растворах композитов отсутствуют свободные и протонированные ионы, вследствие чего

электропроводность их растворов снижается и остается неизменной. Это связано с тем, что до сушки растворы композитов промывают до pH=7. В таком значении pH аминогруппы ХЗ полностью депротонируются и стабилизируют кристаллы ГА. Выявлено, что композиты, лиофильновысушенные и очищенные промыванием от непрореагировавших ионов, образуют стабильный коллоидный раствор.

2.6. Изучение влияния соотношений ХЗ/ГА на размер формирующихся частиц в условиях «*in situ*» и «*ex situ*»

Формирование гидроксиапатита кальция, получение композитов на его основе и их состав, зависит от различных факторов, таких как скорость и продолжительность перемешивания, время выдержки реакционной системы в щелочи, температура синтеза, соотношение Са/Р, полимер/ГА и др. Из литературы известно, что для формирования стехиометрического ГА необходимо, как минимум, 2 суток [176]. Нами обнаружено, что время выдержки реакционной системы в щелочи и проведение процесса в условиях «*in situ*» заметно влияют на мольное соотношение Са/Р в композитах и на их размерные характеристики. Эти факторы являются основными, так как свойства этих композитов в итоге зависят от содержания Са/Р и их размера. В связи с чем, нами изучено влияние перечисленных факторов (табл. 2.4).

Таблица 2.4

Влияние продолжительности синтеза на формирование ГА в условиях «*ex situ*» и «*in situ*». ММ (ХЗ)=140000, СДА(ХЗ)=82%, Са/Р=1,35 и 1,67 моль.%, τ-3 часа

№	Образцы	1	2	3	4	5
		Са	Р	К	Na	Са/Р, моль.% в композите
массовая доля в %						
Исходное количество Са/Р в реакционной среде составляет 1,67 моль.%						
1	ГА	19	12	<0,1	4	1,23
2	ХЗ/ГА 20:80	12	6	<0,1	0,1	1,60
3	ХЗ/ГА 50:50	8,5	4	<0,1	0,1	1,65
4	ХЗ/ГА 70:30	6	3	<0,1	0,1	1,60
Исходное количество Са/Р в реакционной среде составляет 1,35 моль.%						
7	ХЗ/ГА 20:80	12	7,1	<0,1	0,1	1,36
8	ХЗ/ГА 50:50	8	4,6	<0,1	0,08	1,40
9	ХЗ/ГА 70:30	6	3,5	<0,1	0,06	1,38
10	ХЗ/ГА 80:20	3,9	2,5	0,1	0,08	1,26

Результаты показывают, что в условиях «*ex situ*» и продолжительности синтеза 3 часа, соотношение Са/Р в ГА составляет 1,23 моль.%, а в условиях «*in situ*» (в присутствии биополимера хитозана) соотношение Са/Р составляет 1,60-1,65 моль.%. Т.е., присутствие ХЗ стимулирует формирование гидроксипатита кальция, однако, все-таки не образуются образцы гексагонального апатита. При исходном количестве Са/Р-1,35 моль.%, в течение 3 ч формируются апатиты аморфного типа с содержанием Са/Р-1,33±0,06 моль.% [176]. Возможно, это связано с образованием растворимых солей кальция и фосфатов.

Нами изучено влияние продолжительности синтеза ГА в условиях «*ex situ*» и «*in situ*» при исходном соотношении Са/Р=1,67 моль.% (табл. 2.5).

Таблица 2.5

Влияние продолжительности синтеза на формирование ГА в условиях «*ex situ*» и «*in situ*». ММ (ХЗ)=200000, СДА(ХЗ)=80%, Са/Р=1,67 моль.%

№	Образцы	1	2	3	4	5
		Са	Р	Na	К	Са/Р, моль%
		массовая доля в %				
1	ГА (8 ч)	16,8	7,8	0,1	<0,1	1,672
2	ХЗ/ГА 20:80 8	15,5	7,2	0,4	<0,1	1,671
3	ХЗ/ГА 50:50 8	9,25	4,3	0,06	<0,1	1,670
4	ХЗ/ГА 70:30 8	6,88	3,2	0,01	<0,1	1,669
5	ГА (16 ч)	17,2	8	0,06	<0,1	1,669
6	ХЗ/ГА 20:80 16	15,53	7,22	0,05	<0,1	1,670
7	ХЗ/ГА 50:50 16	10,75	5	0,05	<0,1	1,669
8	ХЗ/ГА 70:30 16	7,7	3,6	<0,01	<0,1	1,661
9	ГА (24 ч)	18	8,4	0,3	<0,1	1,664
10	ХЗ/ГА 20:80 24	16,13	7,5	0,15	<0,1	1,670
11	ХЗ/ГА 50:50 24	10,92	5,08	0,03	<0,1	1,669
12	ХЗ/ГА 70:30 24	7,74	3,6	0,02	<0,1	1,670
13	ГА (36 ч)	18,28	8,5	0,2	<0,1	1,670
14	ХЗ/ГА 20:80 36	16,15	7,5	0,1	<0,1	1,672
15	ХЗ/ГА 50:50 36	10,75	5	0,03	<0,1	1,669
16	ХЗ/ГА 70:30 36	7,85	3,65	0,02	<0,1	1,670

Результаты свидетельствуют, что при интенсивном перемешивании со скоростью 1400 об/мин, практически во всех образцах, полученных в течение 8-16-24-36 часов, соотношение Са/Р составляет 1,67 моль.%, как в присутствии, так и в отсутствии полимера. Содержание металлов, указанных в табл. 2.5, в составе гидроксиапатита кальция допускается в приведенных концентрациях.

Таким образом, регулируя условия синтеза, независимо от соотношений ХЗ/ГА нам удалось получить кристаллический стехиометрический ГА, как в условиях «*ex situ*», так и в условиях «*in situ*». Синтез композитов с заданными свойствами, разработка инструментов регулирования их состава и структуры представляет фундаментально-прикладной интерес.

Нами синтезирован и идентифицирован стехиометрический гексагональный гидроксиапатит кальция при Са/Р-1,67 моль.%. Разработан новый экспресс-способ синтеза ГА в условиях «*in situ*» и «*ex situ*» и обнаружено, что в присутствии макромолекул ХЗ формируются наночастицы от 20 до 720 нм.

Известно, что частицы стехиометрического гексагонального ГА формируются в течение 24-48 часов. Эмиссионным элементным анализом, рентгеноструктурным, микроскопическими, спектральными методами установлено, что при интенсивном перемешивании со скоростью 1400 об/мин, практически во всех образцах ХЗ/ГА, полученных в течение 8-16-24-36 часов, в системе формируется стехиометрический ГА, т.е. соотношение Са/Р составляет 1,67 моль.% как в условиях «*ex situ*», так и в условиях «*in situ*». Показано, что разработанный способ позволяет получать композиты хитозана и гидроксиапатита с регулируемым составом, морфологией, кристалличностью.

2.7. Исследование размерных характеристик частиц синтезированных образцов ГА и композитов ХЗ/ГА

Размерные характеристики порошков ГА и композитов ХЗ/ГА исследованы в растворах и в твердом виде (пленки). Результаты DLS-исследований показывают, что размеры частиц ГА отличаются в зависимости от продолжительности синтеза. В растворах ГА, синтезированных за 8-16-24-36 часов, наблюдаются субмикро- и крупнокристаллические монодисперсные частицы. Отметим, что образцы ГА представляют собой весьма тонкий порошок средней крупности (39-110 мкм) (табл.2.6).

Видно, что с увеличением времени синтеза частицы ГА укрупняются от 38 микрона до 110 микрон. Возможно, это объясняется агломерацией частиц минерала.

Таблица 2.6

Размер и распределение частиц ГА в растворах, полученных в отсутствие (а) и присутствии (б) хитозана в течение 8-36 ч.

Образцы	8 ч	16 ч	24 ч	36 ч
	d, мкм			
ГА	0,6 (11%) 38 (89%)	48 (100%)	50 (100%)	110 (100%)
ХЗ/ГА=70:30	0,56 (10%) 6,6 (8%) 56 (82%)	0,1 (3%) 0,72 (21%) 3 (4%) 54 (73%) 660 (9%)	0,1 (16%) 1 (34%) 40 (60%)	0,4 (17%) 26 (83%)
ХЗ/ГА=50:50	0,07 (4%) 0,34 (25%) 28 (71%)	0,07 (3%) 0,42 (30%) 50 (67%)	0,32 (15%) 28 (85%)	0,34 (19%) 30 (73%) 100 (8%)
ХЗ/ГА=20:80	0,14 (6%) 18 (94%)	0,02 (2%) 0,34 (17%) 26 (81%)	0,05 (2%) 0,4 (12%) 40 (86%)	0,37 (15%) 16 (85%)

При проведении синтеза в условиях «*in situ*» независимо от соотношений ХЗ/ГА, в системе формируются наноразмерные частицы от 20 нм до 720 нм, также интервал размера микрочастиц сужается в 2-3 раза. Следует отметить, что в присутствии ХЗ увеличивается дисперсность частиц. (рис.2.19).

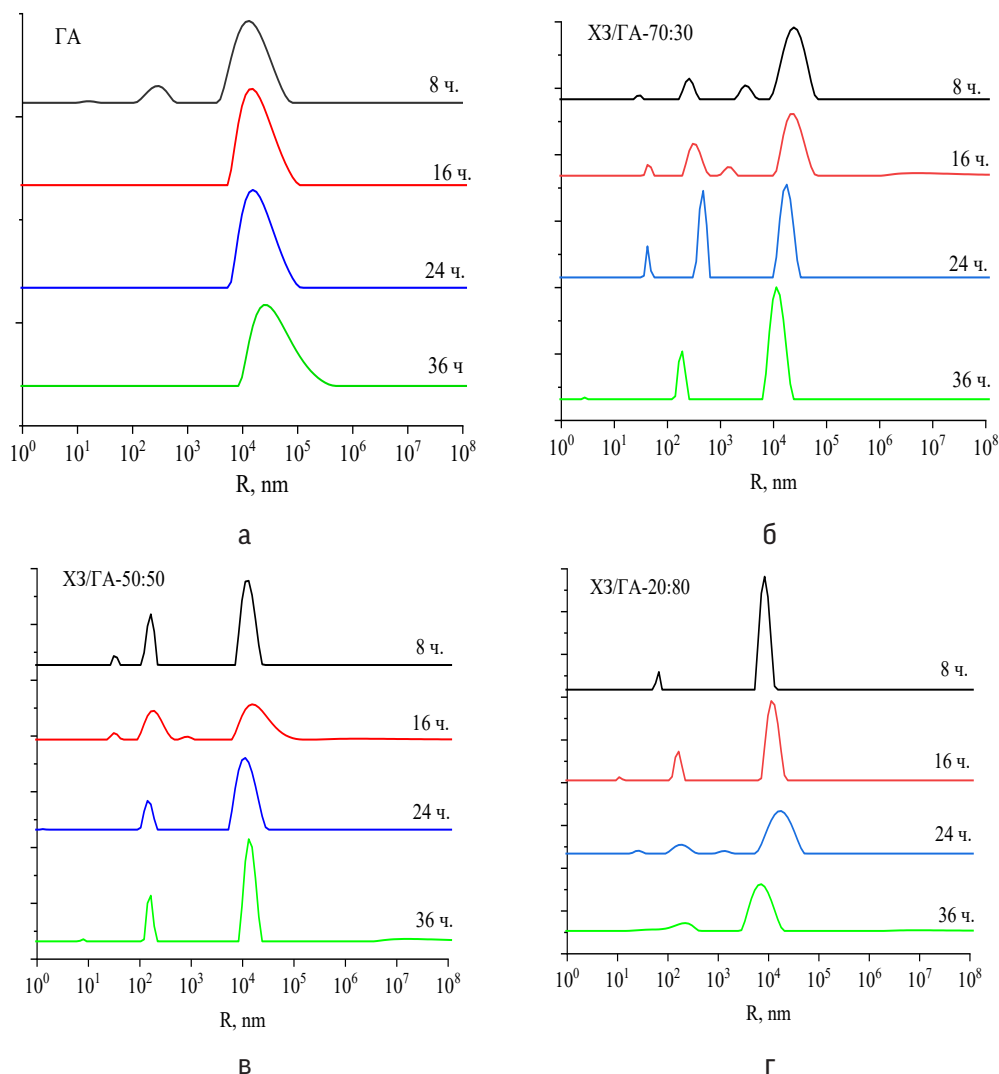


Рис.2.19. Влияние продолжительности синтеза на размеры частиц гидроксиапатита в отсутствие (а) и присутствии хитозана (б, в, г)

В условиях «*ex situ*», т.е. в отсутствие ХЗ, с повышением продолжительности времени синтеза размер частиц увеличивается, возможно, это связано с агрегацией частиц ГА. В то же время, в условиях «*in situ*» присутствие хитозана приводит к формированию частиц в диапазоне вплоть до нм. Следует отметить, что в отличие от «*ex situ*», в условиях «*in situ*» увеличение времени синтеза приводит к уменьшению размера частиц, что является важным. Вероятно, это связано со стабилизирующим эффектом макромолекул ХЗ, которые сначала участвуют в образовании комплекса с низкомолекулярными противоионами (-OH , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), затем предотвращают агрегацию частиц при формировании кристаллов ГА при $\text{pH} > 7$.

2.8. Спектроскопические исследования композитов хитозана с гидроксиапатитом

Спектрофотометрия является эффективным методом контроля за степенью очистки веществ, идентификации и установлением структуры веществ и др. В связи с этим, нами проведены сравнительные УФ-спектроскопические исследования ХЗ, ГА и композитов на их основе.

В УФ-спектре ХЗ наблюдаются характерные полосы поглощения аминок- и ацетамидных групп при длинах волн 240-285 нм, которые связаны $n-p^*$ электронными переходами азота и кислорода (рис. 2.20, 1 кривая). Из литературных источников известно, что данные полосы поглощения ГА появляются при $\lambda_{\max} = 230-240$ нм, а полосы поглощения фосфата кальция наблюдаются при $\lambda_{\max} = 230-260$ нм [177] и при $\lambda_{\max} = 275$ нм [178-179].

Видно, что полосы поглощения, характеризующие композиты ХЗ/ГА отличаются интенсивностью. С изменением массового соотношения ХЗ/ГА полосы поглощения отличаются разностью энергетических состояний, между которыми происходит переход. Исследования композитов хитозана с гидроксиапатитом кальция показывают, что в спектрах наблюдается наложение сигналов, т.е. полосы поглощения аминок- групп ХЗ и функциональных групп ГА практически накладываются, и происходит гипсохромный сдвиг и смещение полос поглощений.

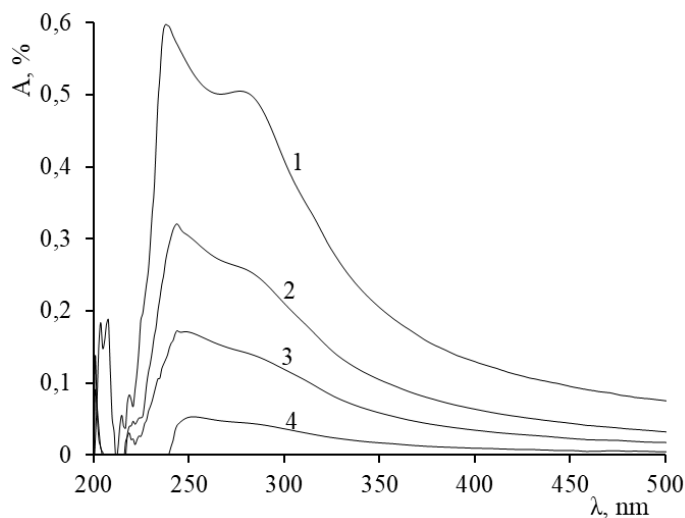


Рис. 2.20. УФ-спектры образцов ХЗ и композитов на их основе: 1) ХЗ; 2) ХЗ/ГА=80:20; 3) ХЗ/ГА=50:50; 4) ХЗ/ГА=20:80 масс. %

Смещение полос поглощения может быть связано, с взаимодействиями, происходящими под влиянием внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий. Эти смещения осуществляются в результате изменения разности между энергиями основного и возбужденного состояний. Если при изменении энергии основного и возбужденного состояний разность между ними не меняется, то соответствующая полоса в спектре не смещается, хотя в молекуле при этом могут произойти существенные изменения в распределении электронной плотности. Это может быть связано с изменением полярности макромолекул за счет взаимодействия. При некоторых соотношениях происходит скачкообразное изменение, которое может быть связано со стехиометрическими соотношениями компонентов [9].

Согласно методу Остромысленского-Жоба наблюдали изменение оптической плотности растворов ХЗ/ГА различных соотношений (рис. 2.21).

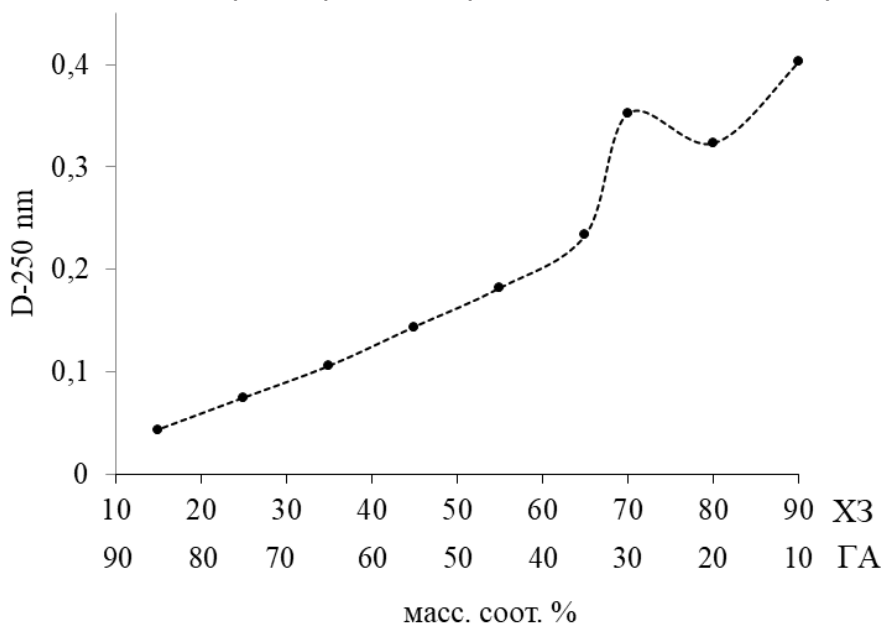


Рис. 2.21. Зависимость оптической плотности раствора композитов от соотношения ХЗ/ГА масс.%

Методом изомолярных соотношений выявлено, что при ХЗ/ГА=70:30 масс.% композит проявляет относительно высокую оптическую плотность. Возможно, это связано с тем, что при ХЗ/ГА=70:30 масс.% ионогенные функциональные группы ХЗ и ГА, такие как amino-, фосфат-ионы взаимокompенсуются в стехиометрическом соотношении.

Исследование взаимодействия хитозана разной ММ с гидроксиапатитом на основе УФ-спектров

Изучено изменение оптической плотности композитов ХЗ/ГА, полученных в присутствии ХЗ с ММ - 290000, 200000, 89000, 26000 и СДА=80%. Обнаружено, что зависимость оптической плотности от содержания ГА, масс.% имеет нелинейный характер. В исследуемых интервалах ММ ХЗ, оптическая плотность повышается при ХЗ/ГА=70:30 масс.%, что подтверждает ранее полученные данные (рис. 2.22).

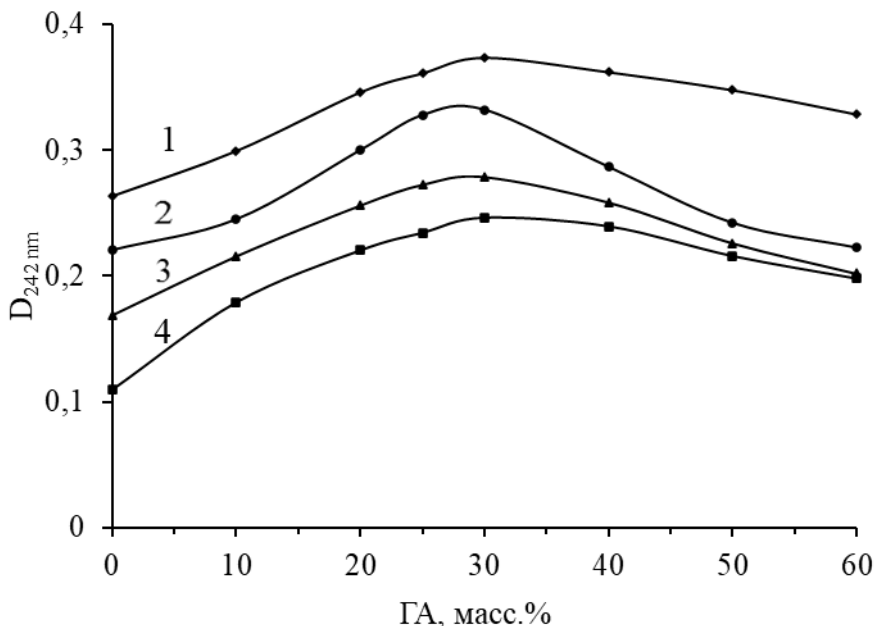


Рис. 2.22. Зависимость оптической плотности раствора композитов различного состава от содержания ГА: ХЗ (СДА=80 %): 1) ММ(ХЗ)=290000; 2)200000; 3)78000; 4)26000

Согласно изомолярным соотношениям Остромысленского-Жоба, можно сказать, что самая высокая оптическая плотность раствора указывает на то, что в этой точке ХЗ и ГА максимально взаимодействуют. В этом случае раствор становится мутным, и противоионы в ГА максимально взаимодействуют с макрокаатионом ХЗ.

ИК-Фурье спектроскопические исследования композитов ХЗ/ГА

Структура композитов изучена ИК-Фурье спектроскопическим методом. В ИК-спектре ХЗ наблюдается широкая полоса в области волновых чисел

3368-3289 cm^{-1} , которая относится к валентным колебаниям $-\text{OH}$ и $-\text{NH}_2$ - групп, а также при 2921-2877 cm^{-1} проявляются колебания $-\text{CH}_2$ групп (рис. 2.23) [175,180].

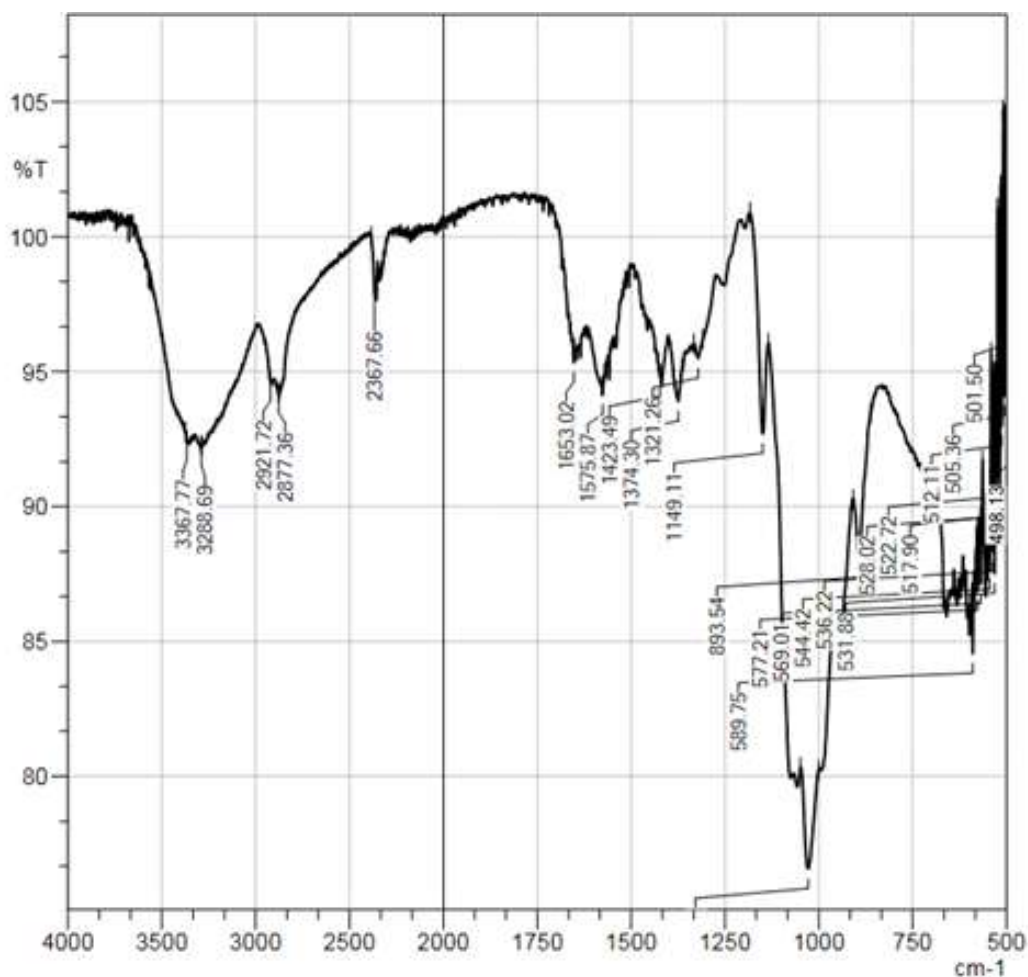


Рис. 2.23. ИК-Фурье спектры образца X3 *Bombux mori*

В области 1653-1575 cm^{-1} наблюдаются деформационные колебания NH_2 - групп, а в области 1423-1321 cm^{-1} $-\text{OH}$, $-\text{CH}$ -групп, при 1150-1070 cm^{-1} проявляются валентные колебания эфирных связей $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$.

Структура полос в областях 1700-920 cm^{-1} для образцов X3 и X3-ГА существенно различается. ИК-спектры всех полученных образцов X3-ГА идентичны и характеризуются полосами поглощения при 1150-920 и 561-602 cm^{-1} , относящимся к антисимметричным валентным и деформационным колебаниям связей $\text{P}-\text{O}$ в фосфатной группе (PO_4^{3-}) [40, 157] (рис.2.24).

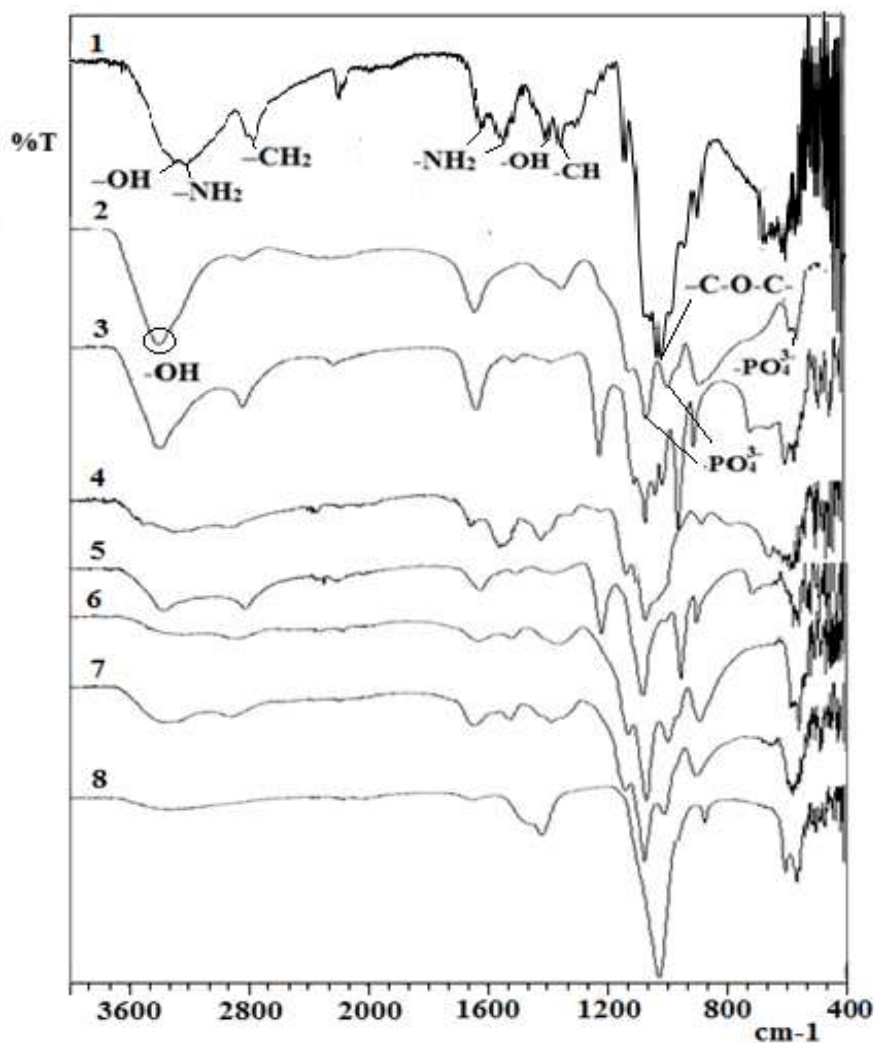


Рис. 2.24. ИК-Фурье спектры образцов 1) ХЗ. 2) ГА ($\text{CaCl}_2 + \text{KН}_2\text{PO}_4$; $\text{Ca/P}=1,67$) 3) ХЗ/ГА=10:90; 4) 30:70; 5) 40:60; 6) 60:40; 7) 70:30; 8) 90:10 масс.%

Следует отметить, что в ИК-спектре образца ХЗ/ГА=70:30 масс.% появляются интенсивные полосы поглощения карбоната А-типа при 1425 см^{-1} и карбоната В-типа при $879,54 \text{ см}^{-1}$. В спектрах образцов с разными соотношениями ХЗ/ГА полосы поглощения OH^- (ХЗ) и PO_4^{3-} ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ групп перекрываются при 1027 и 1120 см^{-1} (табл. 2.7) [9].

В отличие от ИК-спектра ХЗ/ГА=70:30 масс.% в спектре композита ХЗ/ГА=10:90 масс.% появляется ярко выраженная полоса поглощения карбоната В-типа. Также отметим, что в спектрах образцов ХЗ/ГА=10:90 масс.% проявляются характерные полосы функциональных групп хитина и ХЗ в виде раз-

мытого небольшого плеча. Вероятно, это связано с повышением содержания фосфатных ионов в образцах (рис. 2.24).

Таблица 2.7

Отнесение частот в ИК-спектрах ХЗ, ГА и ХЗ/ГА

ХЗ		ГА		ХЗ/ГА
Частота в см ⁻¹	Отнесение полос	Частота в см ⁻¹	Отнесение полос	Частота в см ⁻¹ и Отнесение полос
660	-ОН	405	(PO ₄) ³⁻	480 (PO ₄) ³⁻
1150-1020	- С-О-С-	470	(PO ₄) ³⁻	561-602 P-O,
1250	- С-О-С-	610, 570	(PO ₄) ³⁻	879 (CO ₃) ²⁻ ,
1420	-СН	630-650	-ОН.....О	950-970 (PO ₄) ³⁻
1423	-ОН,	715-740	-P-O-P-	1018-1063, 1140-1050 - С-О-С-, (PO ₄) ³⁻
1590-1550	амид-II	870	(CO ₃) ²⁻	1150-920 P-O
1635-1620	амид-I	970	(PO ₄) ³⁻	1409-1425 -ОН, -СН
1635-1575	NH ₂	1050, 1100	(PO ₄) ³⁻	1620-1630 амид-I
2921-2877	-СН ₂	1540, 1458	А-тип КГА	3161- 3273 NH ₂
3289	NH ₂	1454, 1420	В-тип КГА	3350-3390 -ОН
3368	-ОН	3570	-ОН.....О	

Проведены сравнительные ИК-спектроскопические исследования композитов ХЗ/ГА=70:30, полученных из ХЗ с СДА-80% и различной ММ (рис. 2.25).

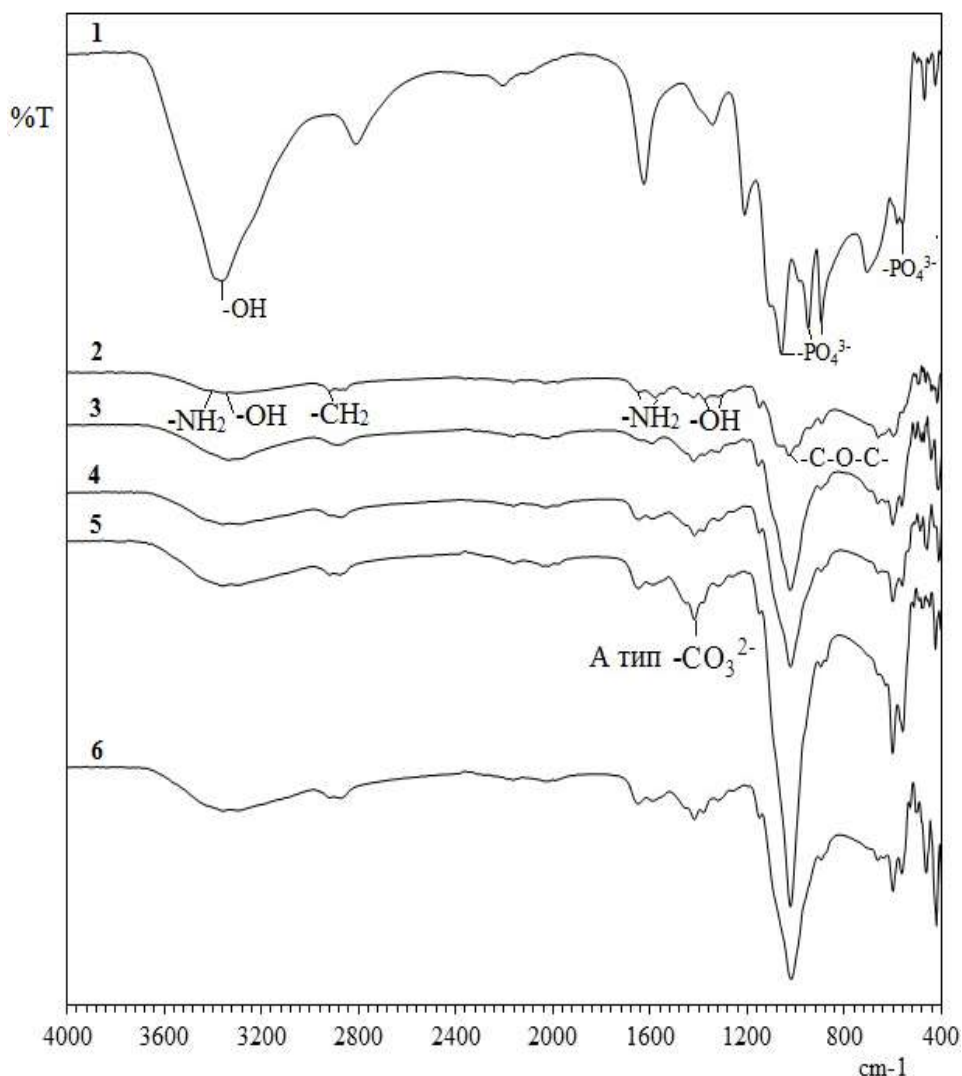


Рис. 2.25. ИК-Фурье спектры образцов ХЗ/ГА=70:30 масс. %
 1) ГА; 2) ХЗ; 3) ХЗ ММ 26000; 4)78000; 5)200000; 6)290000

Известно, что ХЗ и его производные обладают способностью образовывать хелатные соединения с ионами металлов. Образованию хелатного соединения и связи между Ca^{2+} и хитозаном может способствовать депротонирование аминогрупп хитозана. Однако учитывая низкую склонность ионов Ca^{2+} к комплексообразованию с хитозаном, можно предполагать, что в выбранных условиях синтеза при $\text{pH} > 7$ получены именно композитные материалы ХЗ - гидроксипатит кальция.

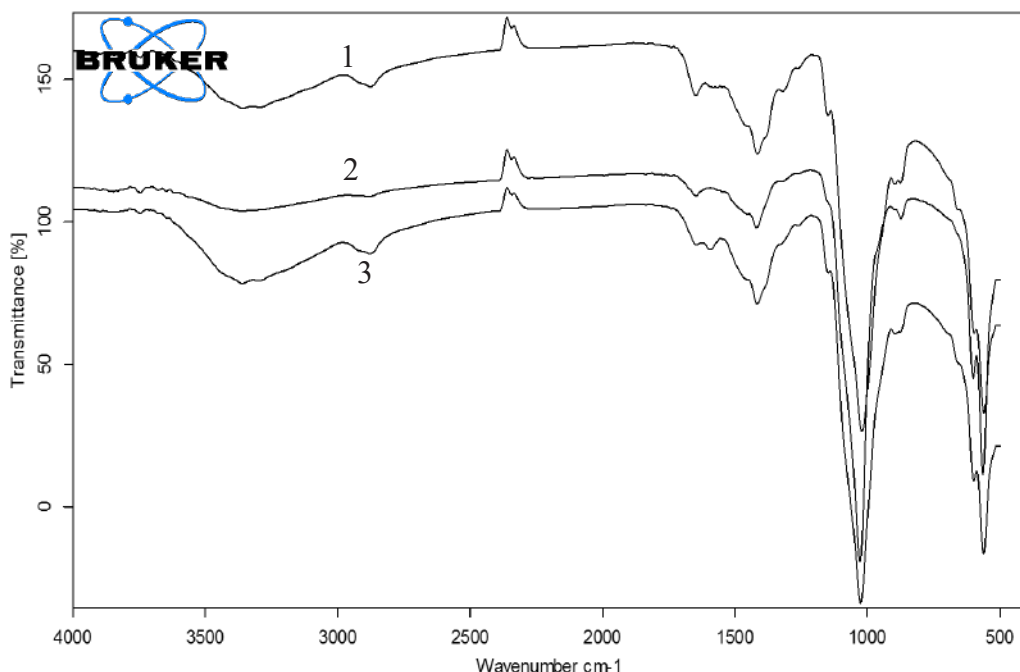


Рис.2.26. ИК-Фурье спектры образцов ХЗ/ГА=70:30 масс. %:

1) СДА(ХЗ)=90%; 2) СДА(ХЗ)=80%; 3) СДА(ХЗ)=70%

Сравнительные ИК-спектры композитов ХЗ/ГА, полученные на основе ХЗ с различными СДА, показывают, что наблюдается перекрывание полос поглощений -СОС-эфирной связи ХЗ при 1026 см^{-1} и принадлежащие к $(\text{PO}_4)^{3-}$ группы ГА, а именно -Р-О групп при 1027 см^{-1} , 1026 см^{-1} и 1020 см^{-1} для ХЗ с СДА 90%, 80% и 70%, соответственно (рис.2.26). При всех значениях СДА ХЗ, в композитах ХЗ-ГА=70:30 масс.% наблюдались деформационно-колебательные связи группы -Р-О (PO_4^{3-}) в области поглощения $561\text{-}602 \text{ см}^{-1}$, что свидетельствует об их участии в электростатическом взаимодействии с ХЗ.

2.9. Рентгеноструктурный анализ композитов ХЗ/ГА

Степень кристалличности (СК) ХЗ, ГА и композитов на их основе определена по формуле:

$$C_c = \frac{(I - I_a)i - K}{(I_c - I_a)i}$$

по их дифрактограммам.

По результатам расчетов выявлено, что СК образцов гидроксиапатита кальция, полученных в течение от 8 до 36 ч составляет 98-99% (рис. 2.27).

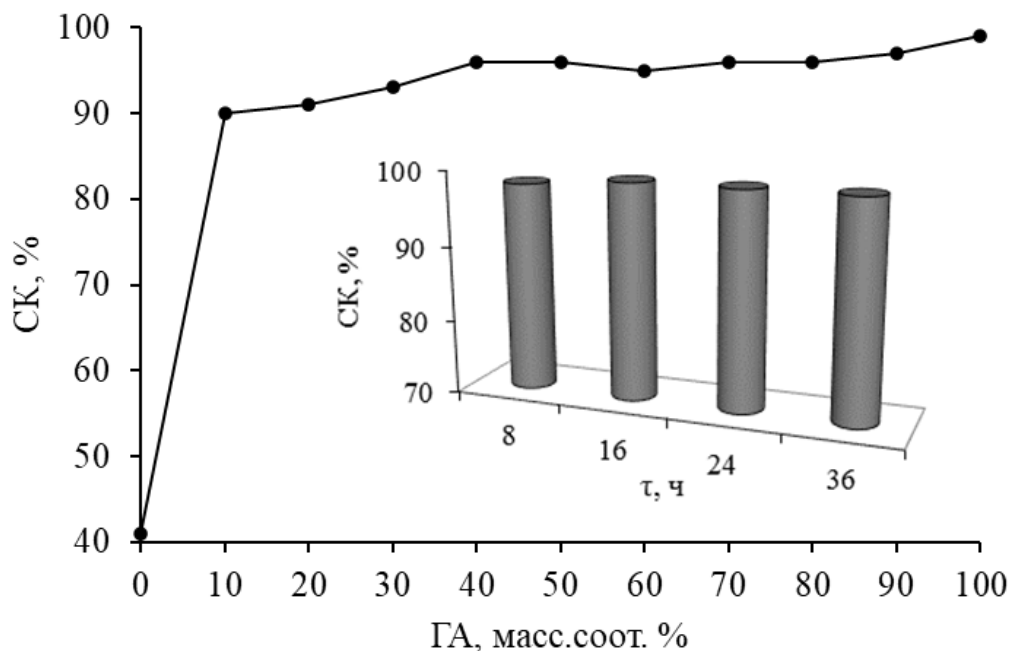


Рис.2.27. Зависимость степени кристалличности ХЗ и его композитов от соотношения ХЗ/ГА масс.%, Са/Р=1,67 моль.%

Как видно из полученных результатов, СК хитозана составляет 40%, при введении в макромолекулу 10% ГА СК составляет 90%, а при дальнейшем добавлении ГА СК композитов увеличивается до 99% (рис. 2.27).

Проведены сравнительные рентгеноструктурные исследования ХЗ и его композитов с ГА. Результаты РСА исследований макромолекул ХЗ показывают, что характерные пики появляются при 2θ 10° и 20° (рис. 2.28).

При 2θ 25° , 27° , 28° , $31,5^\circ$, 32° , 33° , 39° и 20° обнаружены интенсивные пики кристаллов апатита, что хорошо согласуется с литературными данными. Следует отметить, что при получении гидроксиапатита ХЗ наблюдается полное исчезновение пиков характерных для ХЗ. Также повышение содержания апатита в композитах приводит к появлению новых пиков, характерных для ГА в области: 2θ $30-50^\circ$, где при 2θ $31,5-34^\circ$ и 37° возрастает интенсивность пиков. Так же с повышением количества апатита в полимере (10→90 масс.%) растворимость композитов уменьшается. Возможно, это связано с введением апатита кальция в макромолекулу ХЗ, что приводит к увеличению степени кристалличности композитов [9,175].

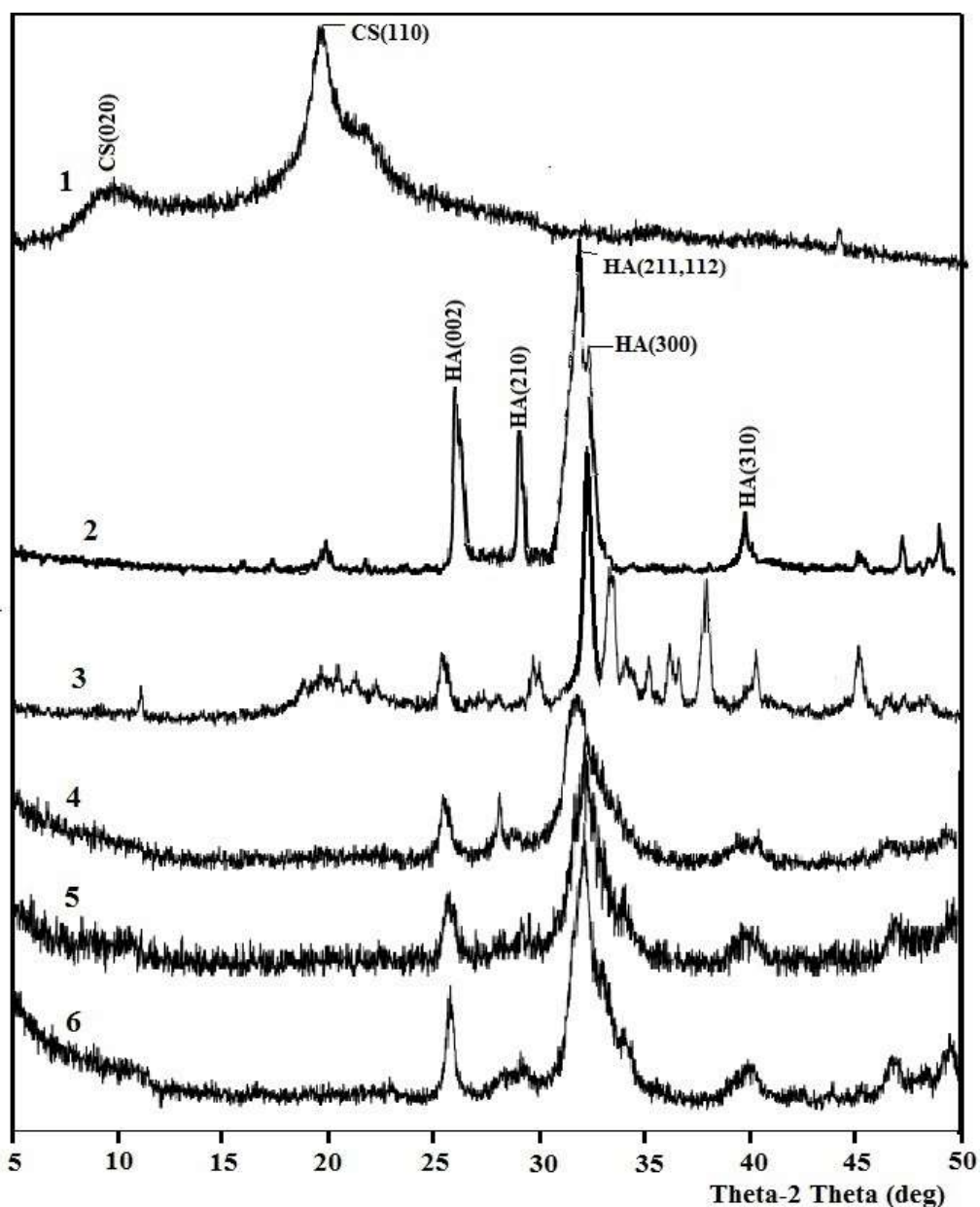


Рис. 2.28. Дифрактограммы образцов: 1) ХЗ 2) ГА 3) ХЗ/ГА=80:20 4) ХЗ/ГА=50:50 5) ХЗ/ГА=30:70 6) ХЗ/ГА=20:80 масс.%. Ca/P=1,67 моль.%

На основе дифрактограмм композитов ХЗ рассчитаны некоторые параметры кристаллитов ХЗ/ГА при различных соотношениях исходных компонентов (табл. 2.9.).

**Некоторые параметры кристаллитов наночастиц
ХЗ/ГА=80:20, 50:50, 70:30, 20:80 масс. %**

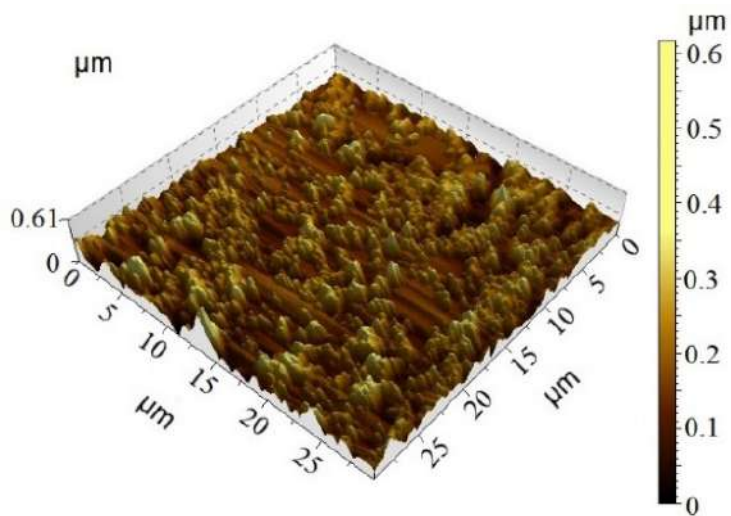
Образцы	ХЗ/ГА=80:20			ХЗ/ГА=50:50			ХЗ/ГА=30:70			ХЗ/ГА=20:80		
Индексы Мюллера	112	300	310	002	112	310	002	112	310	002	211	310
$2\theta, ^\circ$	32,4	33,5	38,0	25,8	32,2	40	26,1	32,3	39,9	25,8	32,1	39,8
d, nm	2,75	2,67	2,36	3,44	2,77	2,24	3,42	2,76	2,25	3,44	2,78	2,26
β , radian	0,007	0,007	0,007	0,011	0,028	0,017	0,014	0,028	0,025	0,011	0,024	0,017
D, nm	20	20,4	20,7	12,8	5,0	8,6	10	5,1	5,6	12,8	5,9	8,5
$D_{\text{сред.}}$, nm	20,4			8,8			6,9			9		

Расчеты показывают, что размеры кристаллитов в композитах составляют от 6,9 до 20,4 нм. Также обнаружено, что с повышением содержания ХЗ в композите соответственно увеличивается размер кристаллов. В рентгенофазовых кривых существуют все соответствующие пики ГА при $2\theta=26,08^\circ(002)$; $31,88^\circ(211)$; $32,98^\circ(112)$; $33,5^\circ(300)$; $39,88^\circ(310)$ (рис. 2.28).

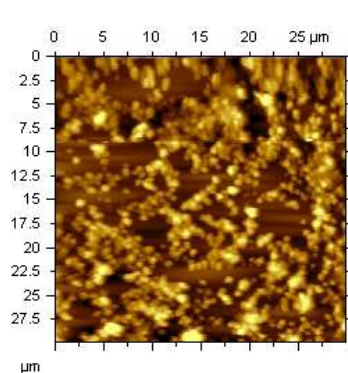
Следует отметить, что гидроксипатит и синтетические апатиты, включающие в свой состав различные карбонаты, образуют одинаковые кристаллические зоны в XRDA дифрактограммах, в которых с повышением количества карбонатов наблюдается расширение пиков кристаллических зон. Для карбоната гидроксипатита (КГА) характерны пики при $2\theta 25,8^\circ$ (КГА (002)) и $31-34^\circ$. ИК-спектры и XRDA дифрактограммы синтезированных образцов композитов показывают наличие карбоната гидроксипатита в составе ХЗ/ГА *Bombyx mori* [9,175].

2.10. Влияние продолжительности процесса на морфологию композитов гидроксипатита хитозана *Bombyx mori*

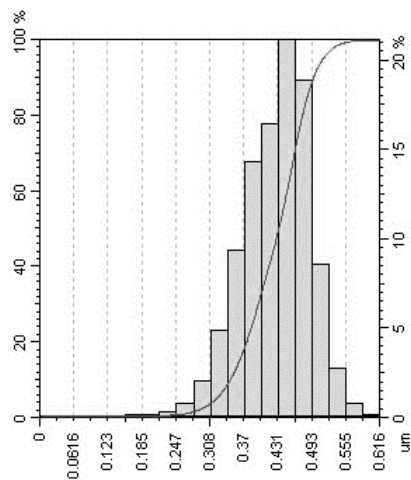
Повышение степени кристалличности образцов ГА в присутствии ХЗ показывает, что в условиях «*in situ*» формируются кристаллиты ГА. Изучением морфологии ХЗ/ГА установлено, что при продолжительности времени синтеза до 8 ч образуются частицы от 200 до 600 нм со средним размером 430 нм (рис. 2.29).



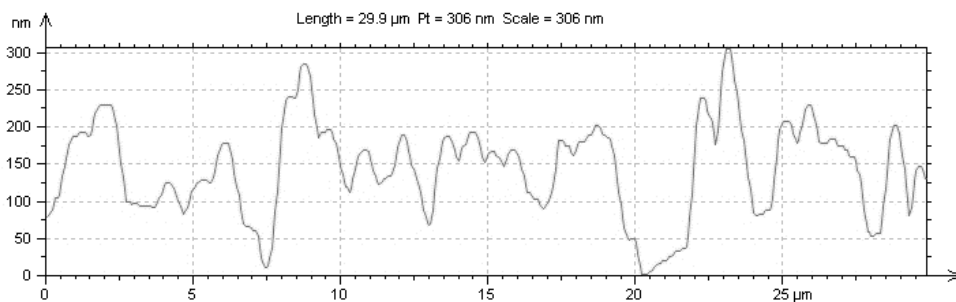
а



б

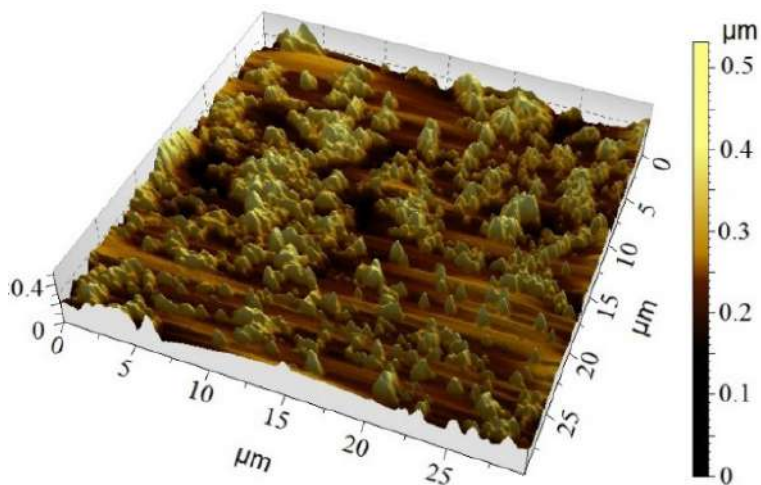


с

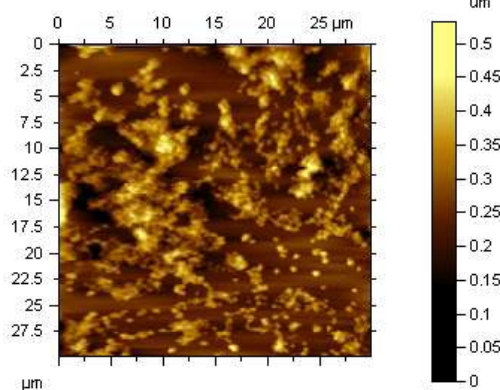


д

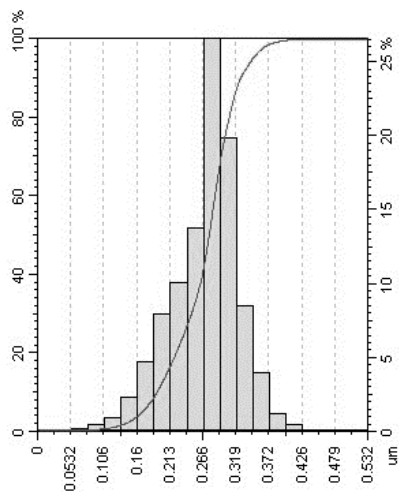
ХЗ/ГА=70:30 масс.% (8 ч)



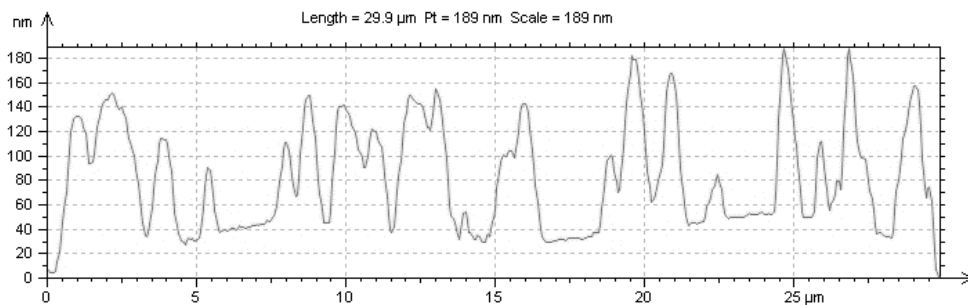
а



б

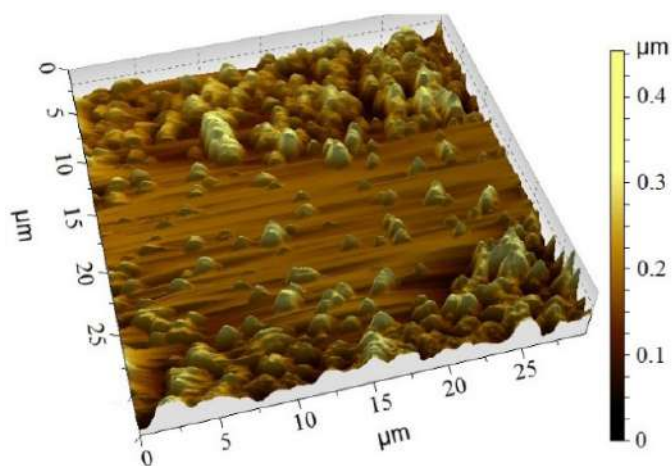


с

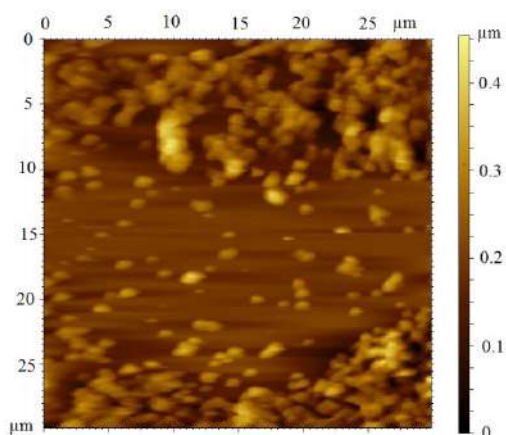


д

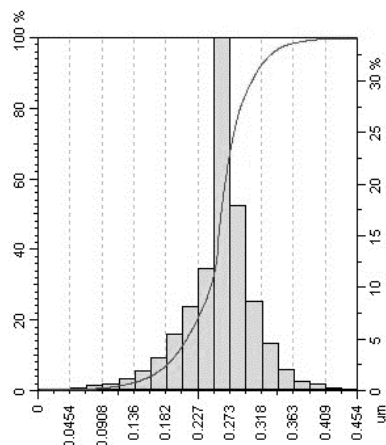
X3/ГА=70:30 масс. % (16 ч)



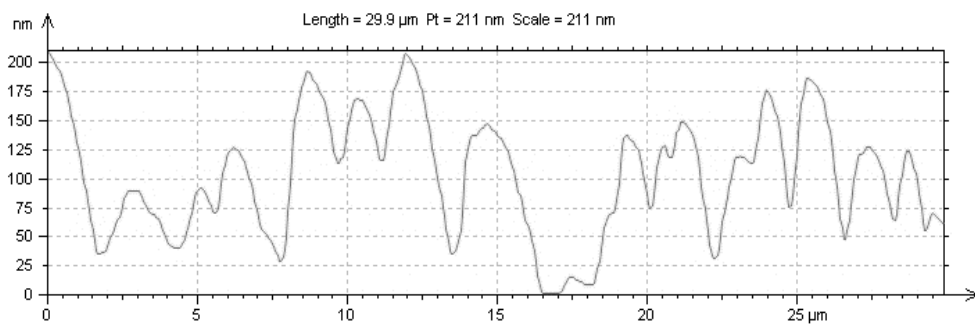
а



б

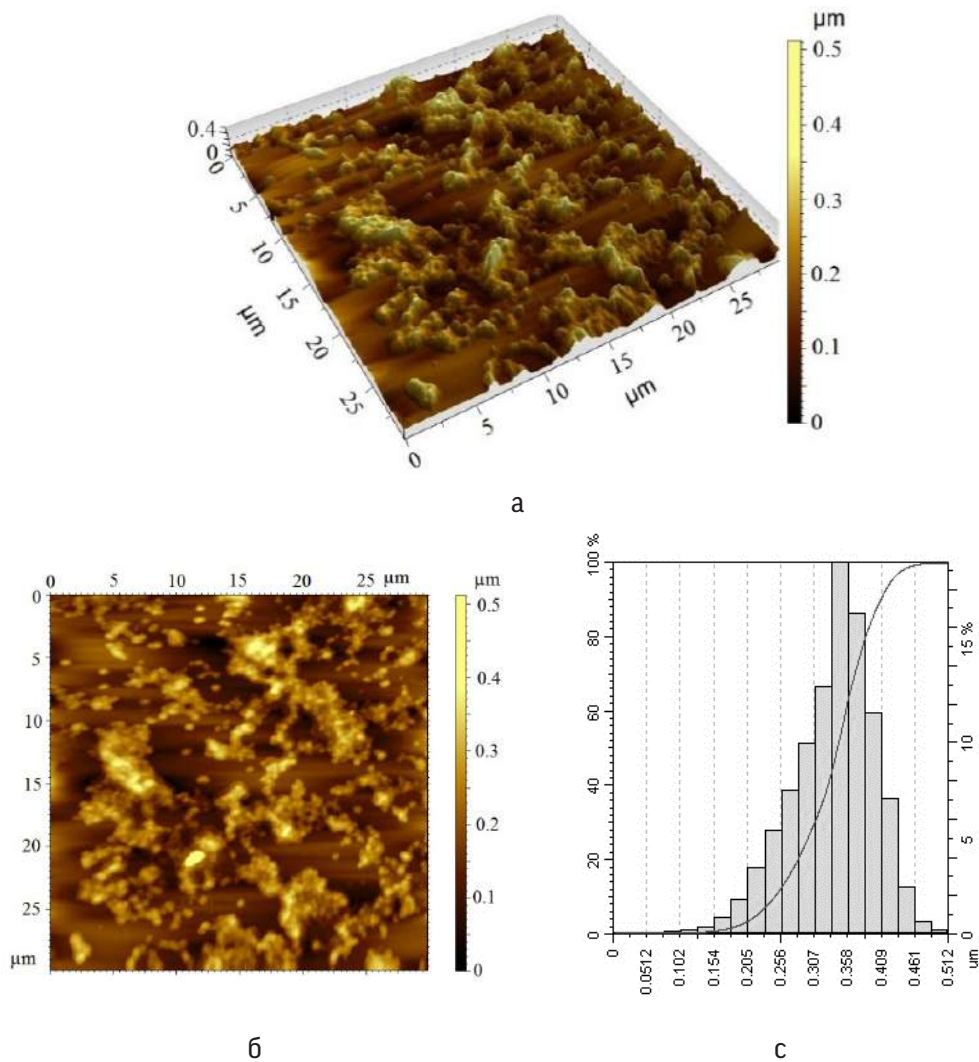


с



д

X3/ГА=70:30 масс. % (24 ч)



Д
ХЗ/ГА=70:30 масс. % (36 ч)

Рис. 2.29. Фазовые (а) и топографические (б) АСМ-снимки ХЗ/ГА=70:30 масс.%; гистограмма распределения (с) и шероховатость поверхности (д) при 8, 16, 24 и 36 ч

Следует отметить, что при продолжительности синтеза 16 ч образуются частицы от 100 до 300 нм, где средний размер составляет 300 нм. Увеличение времени синтеза до 24 ч приводит к сужению размера частиц от 150 до 350 нм, при среднем размере 273 нм. Также, при синтезе за 36 ч формируются частицы от 200 до 400 нм, средний размер которых составляет 300 нм. Анализ формирования НЧ в течение 8-36 ч показывает, что с повышением продолжительности времени кристаллизации ГА интервал размера частиц относительно сужается. Относительное увеличение размера, возможно, связано с их агломерацией. По шероховатостям поверхностей видно, что активная поверхность образцов повышается в связи с уменьшением размера кристаллов.

СЭМ-исследования композитов ХЗ/ГА

СЭМ-исследования показывают, что морфология пленок композитов, полученных в одинаковых условиях, но высушенных в комнатной температуре и лиофильной сушке отличаются (рис. 2.30).

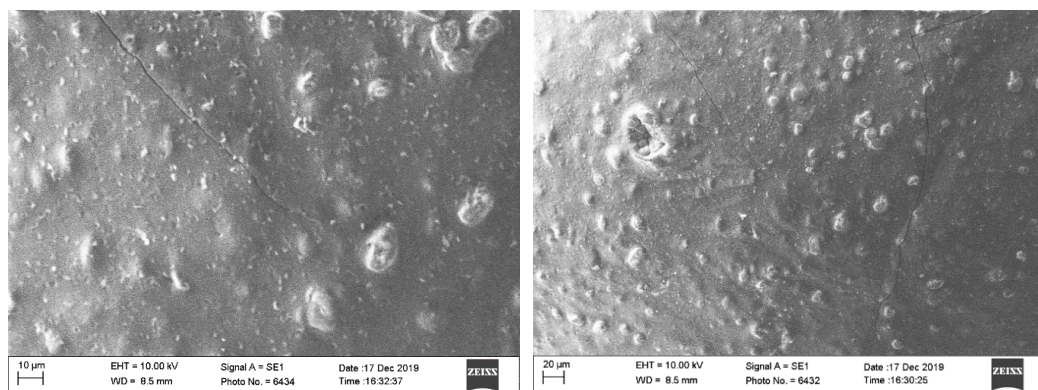


Рис. 2.30. Электронно-микроскопическое (СЭМ) изображение микроструктуры пористого ХЗ/ГА=80:20 масс.%. высушенного при 22°C в аэробных условиях

Образцы, высушенные при комнатной температуре в аэробных условиях, имеют плотную поверхность, а частицы ГА распределены в матрице ХЗ. В образцах, высушенных в лиофильной сушке при -50°C под вакуумом, поверхность представляет собой губчатую, пористую структуру, содержащую гранулы ГА (рис. 2.31).

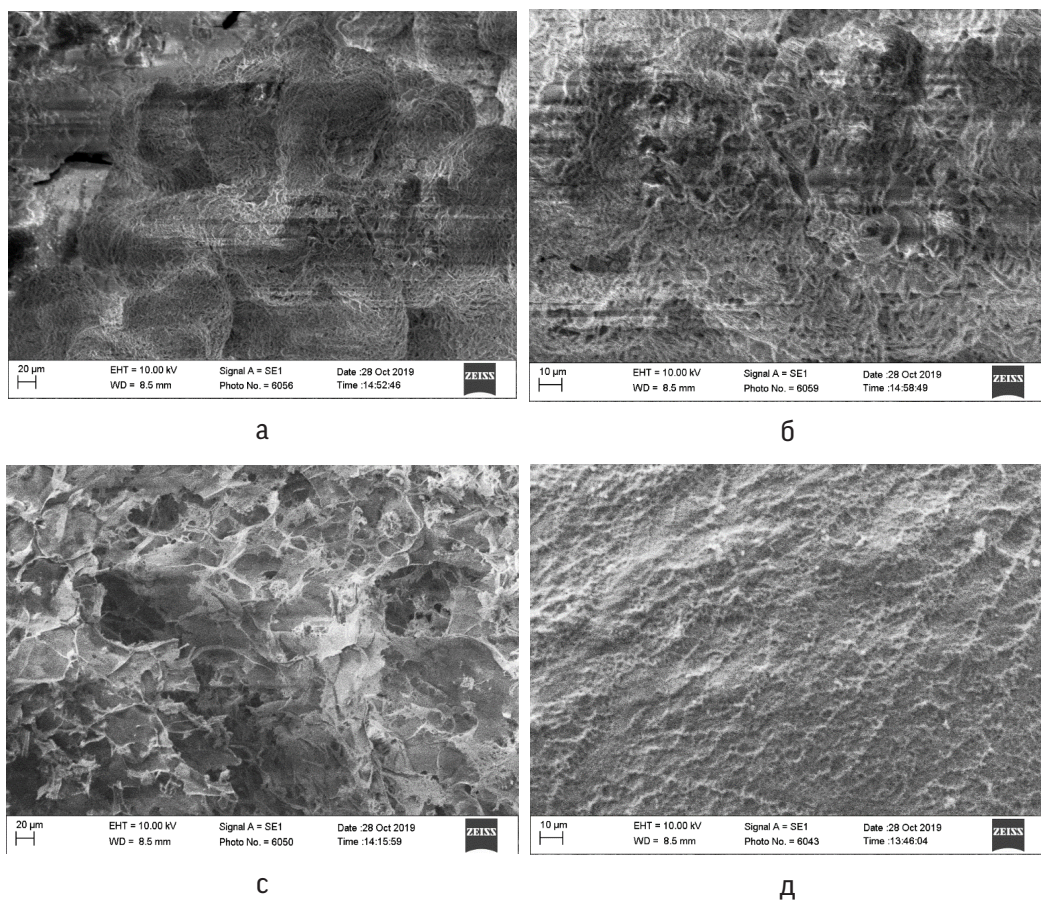


Рис. 2.31. СЭМ изображение микроструктуры пористого ХЗ/ГА:
 а) ГА; б) ХЗ/ГА=20:80; в) ХЗ/ГА=50:50; д) ХЗ/ГА=80:20 масс.%

Согласно [181], рассчитаны размеры пор в композитах ХЗ/ГА=50:50 масс.%. $S = k \cdot D_f^2 (НОРМ.РАСП(D_f; d; \sigma; 1) - НОРМ.РАСП(D_{f-j}; d; \sigma; 1)) / d^3$. Выявлено, что ГА имеет плотную структуру, с введением макромолекул формируются рыхлые структуры с размерами пор 10-15 мкм (рис. 2.32), которые представляют практический интерес для применения в травматологии, стоматологии и др.

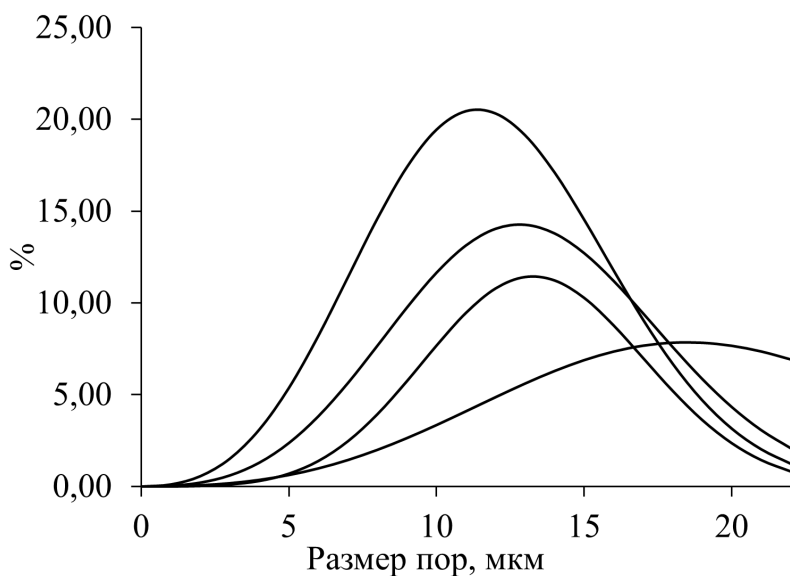


Рис. 2.32. Средний размер пор гранул композита ХЗ/ГА-50:50 масс.%

Следует отметить, что согласно литературным данным композиты, полученные при ХЗ/ГА=50:50 масс.% могут быть применены в имплантации костей [174, 175].

2.11. Термические характеристики композитов на основе хитозана *Bombyx mori* и гидроксиапатита

Показаны экспериментальные кривые дифференциального термического анализа (ДТА), термогравиметрии (ТГ) и термогравиметрии по производной (ТГП) исходных соединений – хитозана (рис. 2.33), гидроксиапатита (рис. 2.34) и их композитов ХЗ/ГА (рис. 2.35 а, б, в, г) с различным содержанием ингредиентов.

Рассмотрим термограммы хитозана. На кривой ТГП в интервале температур от комнатной до 100°C можно видеть первую стадию (температурная область I на рис. 2.33) потери массы с экстремальной точкой при температуре 75°C на которую приходится максимальная скорость потери массы. Общие потери массы на первой стадии определяются из кривой ТГ и составляют 11 % от исходной. Потери массы на данной стадии можно отнести к десорбционным процессам, когда несвязанные молекулы воды и растворителей покидают поверхностные и близкие к поверхности слои образца.

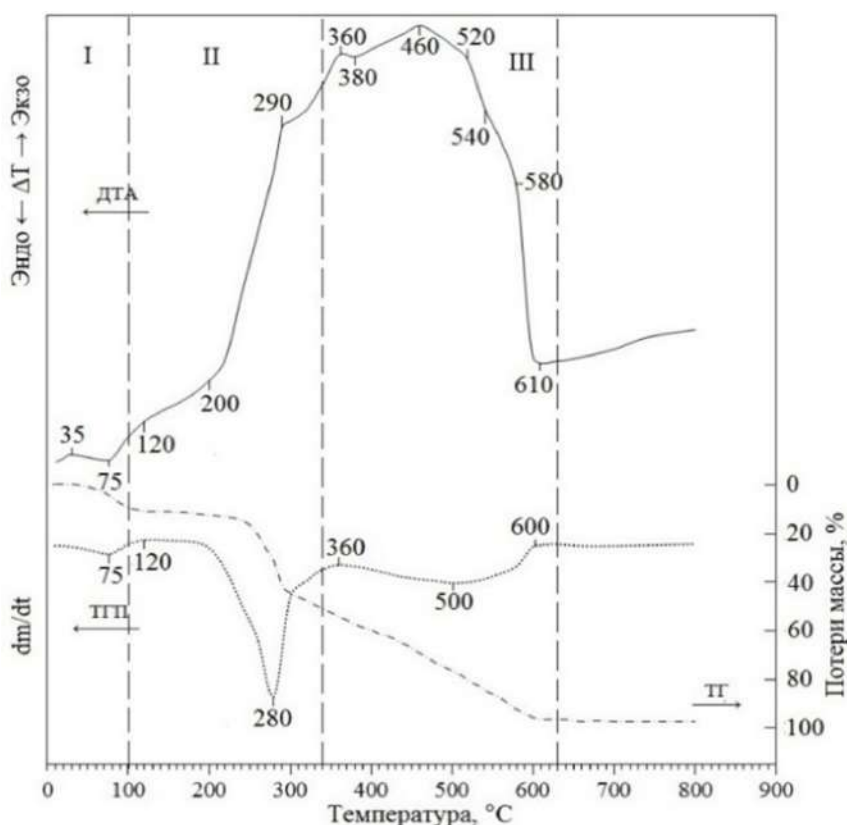


Рис. 2.33. Термограммы хитозана: ДТА; ТГ; ТГП

Далее, по мере повышения температуры, на кривой ТГП обозначается вторая стадия потерь в интервале температур 100-340°C (температурная область II на рис. 2.33). Если в начале ($\Delta T=100\div 200^\circ\text{C}$) и в конце ($\Delta T=290\div 340^\circ\text{C}$) второй стадии наблюдаются относительно умеренные изменения термических кривых (ДТА, ТГ, ТГП), то участок теплового сканирования в отрезке температур 200 до 290°C на всех трех термограммах характеризуется очень резкими изменениями. Кривая ДТА имеет наивысший угол подъема, что указывает на стремительную интенсификацию термоокислительных процессов в этом температурном диапазоне. Именно в этом диапазоне кривая ТГ имеет крутое снижение, показывающее наличие максимального уменьшения массы хитозана, и тут же на кривой ТГП это отражается появлением интенсивного глубокого пика. Нижняя крайняя точка пика при 280°C кривая ТГП соответствует максимальной скорости потерь полисахарида. Вероятно, при этом происходит разрыв связей и окисление продуктов термолита. Потери массы для второй стадии составляют 42%.

Дальнейшее повышение температуры в интервале $340\div 630^{\circ}\text{C}$ обозначено на кривой ТГП третьей (высокотемпературной) стадией изменений массы. На этой стадии потери составляют 43%. Таким образом, по рис 2.33 а) видно, что минимальные потери наблюдается на I стадии. Значительные потери массы хитозана приходится на II стадию и сопровождаются резкими деструкционными процессами. На второй стадии разложения наблюдаются сложные экзотермические процессы, при которых происходит дегидратация сахаридных колец хитозана вместе с разложением ацетилированных и деацетилированных звеньев полимера [2]. Затем происходят остаточные не менее значительные потери массы на III стадии. В финальной стадии пиролиза имеет место окончательное разложение остатков хитозана в интервале температур от 460 до 610°C

На кривой ТГП ГА (2.34) в интервале температур от комнатной до 150°C можно видеть первую стадию (температурная область I) потери массы с экстремальной точкой при температуре 100°C , на которую приходится максимальная скорость потери массы на первой стадии. Потери массы на первой стадии определяются из кривой ТГ и составляют 3% от исходной.

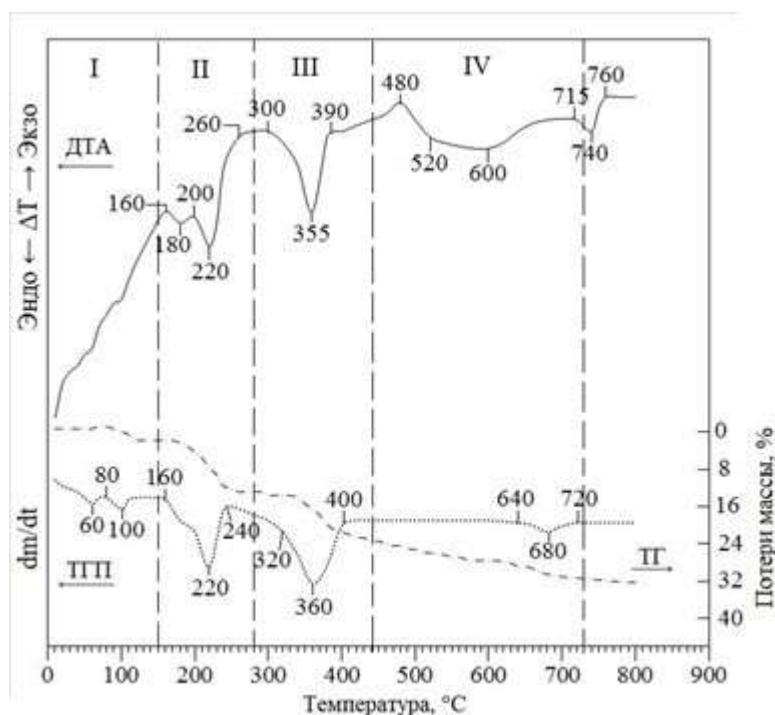
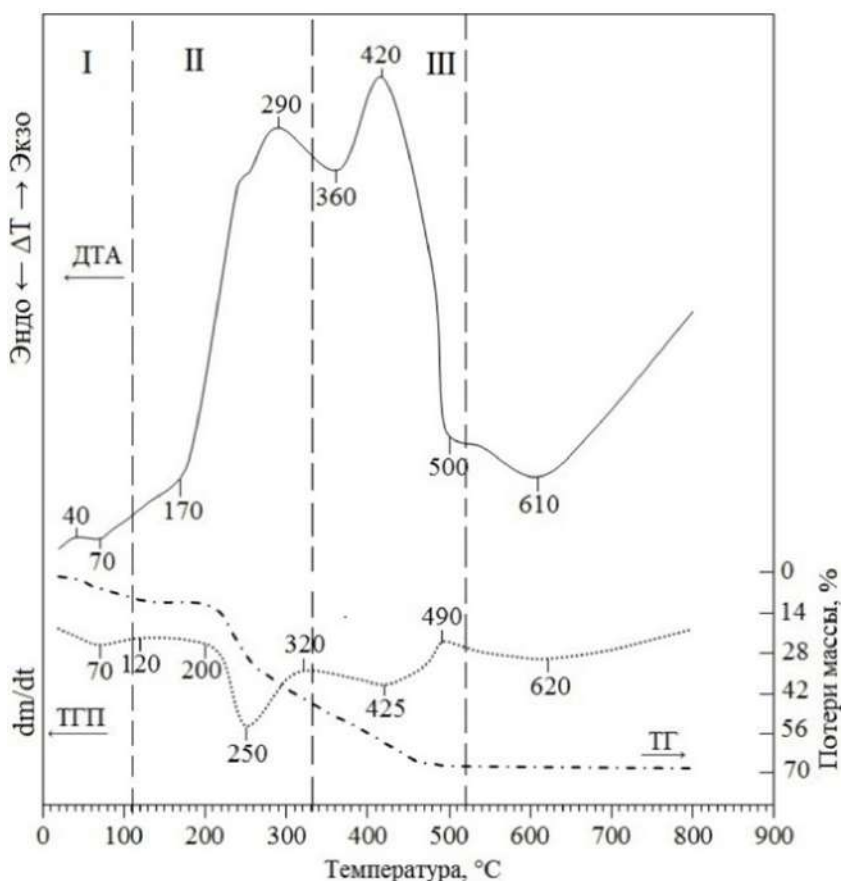


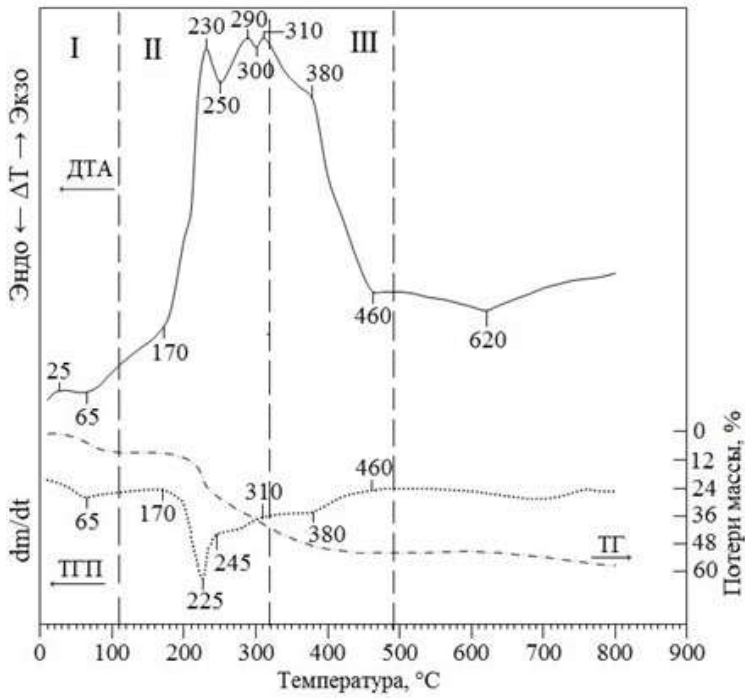
Рис. 2.34. Термограммы гидроксипатит кальция: ДТА; ТГ; ТГП

На кривой ТГП обозначается вторая стадия потерь в интервале температур 150-280°C, потери массы определяются из кривой ТГ и составляют 9 % от исходной. На кривой ТГП также обозначается III стадия потерь в интервале температур 280-440°C, нижняя крайняя точка пика при 360 °C соответствует максимальной скорости потерь ТГ, потери массы определяются из кривой ТГ и составляют 12 % от исходной.

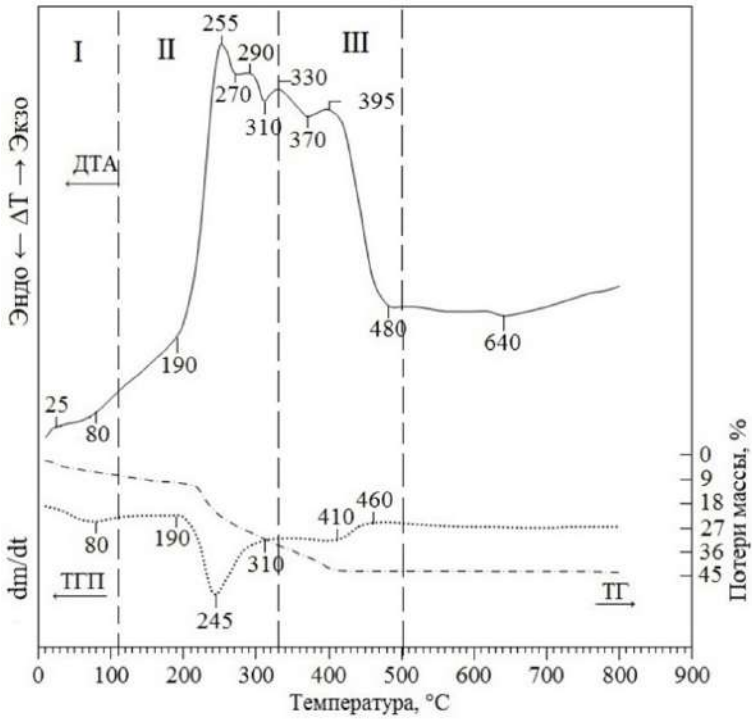
Также были исследованы образцы композитов на основе хитозана и гидроксиапатита (рис. 2.35, а-г). Сравнение термограмм исходных соединений и композитов показало заметные отличия термического поведения композитов. Эти отличия указывают на взаимодействие хитозана с ГА.



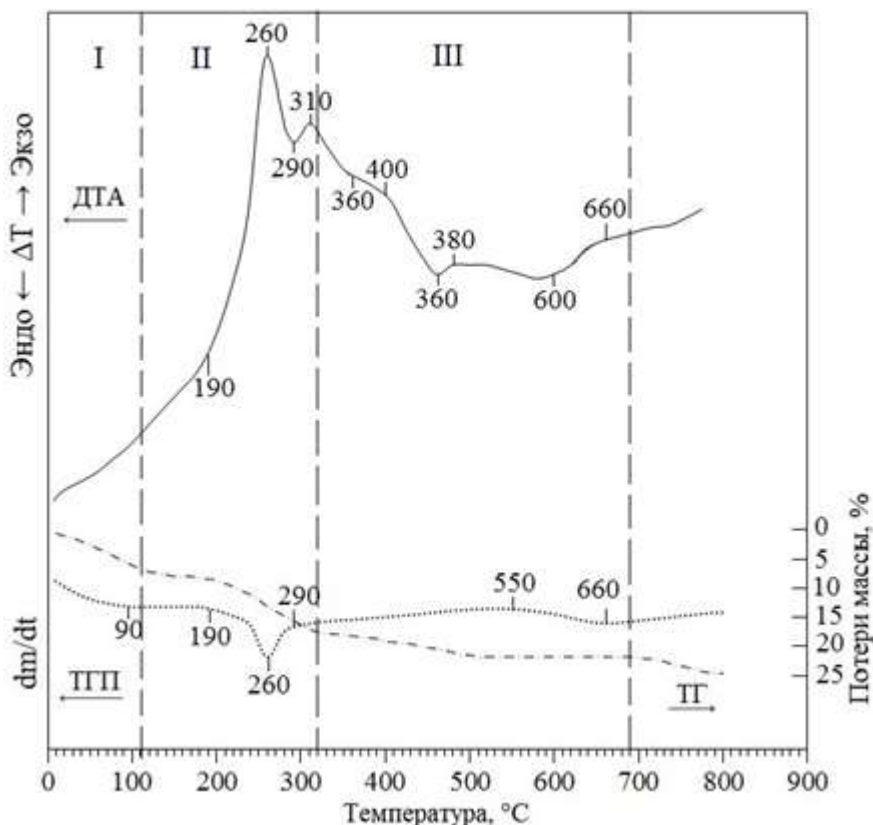
а



б



в



г

Рис. 2.35. Термограммы композитов ХЗ/ГА: ДТА; ТГ; ТГП.

а) ХЗ/ГА=80:20; б) ХЗ/ГА=70:30; в) ХЗ/ГА=50:50; г) ХЗ/ГА=20:80 масс.%

Сравнительно изучены термические свойства и потери массы композитов ХЗ/ГА с различным содержанием ингредиентов. Обнаружено, что и в случаях с композитами потери массы происходят в следующие три последовательные стадии. Для образцов композитов определены характеристики термического разложения по стадиям и показаны на рис. 2.35 и табл. 2.10. Таким образом, наибольшие убыли массы приходятся на II стадию, когда на табл. 2.10 приведены количественные изменения величины потери массы по каждой стадии в зависимости от содержания ГА в композитах.

Таблица 2.10

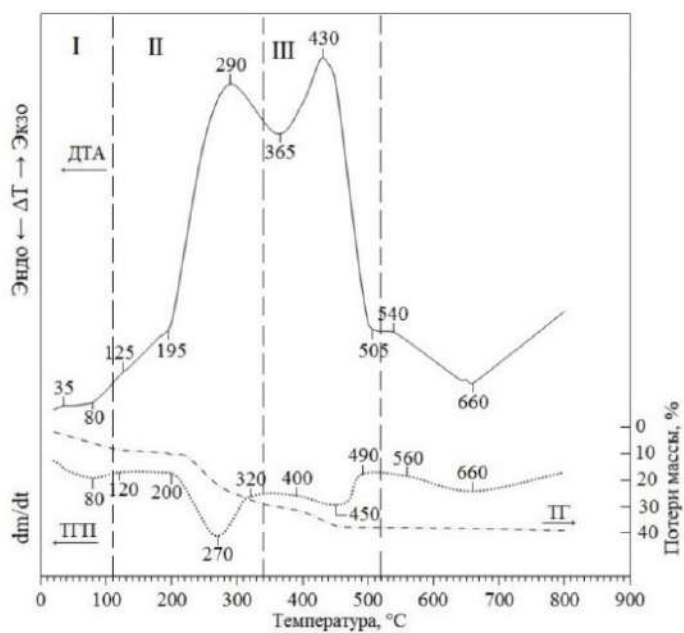
**Данные анализа параметров стадий термической
деструкции исследованных образцов**

№	Наименование образца	Температурный интервал (по стадиям), °С	Величина потери массы, %	Температура максимальной скорости потери массы, °С
1	ХЗ	20-100	11	75
		100-340	42	280
		340-630	43	500
2	ХЗ/ГА=80:20 масс.%	20-110	10	70
		110-330	35	250
		330-520	23	425
3	ХЗ/ГА=70:30	20-110	8	65
		110-320	34	225
		320-490	20	380
4	ХЗ/ГА=50:50	20-110	7	80
		110-330	27	245
		330-500	10	410
5	ХЗ/ГА=20:80	20-110	3	90
		110-320	17	260
		320-690	8	660
6	ГА	20-150	3	100
		150-280	9	220
		280-440	12	360
		400-730	7	680

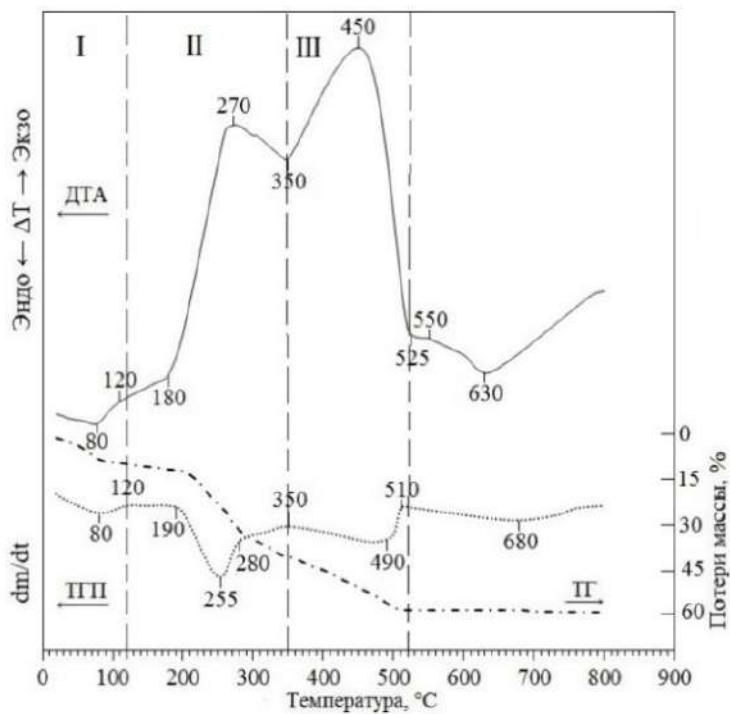
Значения потери массы на разных стадиях значительно отличаются: на I стадии составляют от 3 до 11 %; на II стадии от 17 до 47 % и на III стадии от 8 до 25%. Увеличение содержания ГА в композите приводит к монотонному уменьшению значений потери массы образцов на каждой из температурных стадий, а также к уменьшению суммарной потери массы композитов в целом.

*Влияние молекулярной массы хитозана *Bombux mori* на термические характеристики композитов гидроксипатита хитозана*

С целью изучения влияния ММ ХЗ на термические свойства композитов синтезированы образцы ХЗ/ГА 70:30 и 50:50 масс.% при ММ ХЗ ММ=290000 и 26000 соответственно. Термограммы приведены на рис 2.36 – а, б, в, г.



а



б

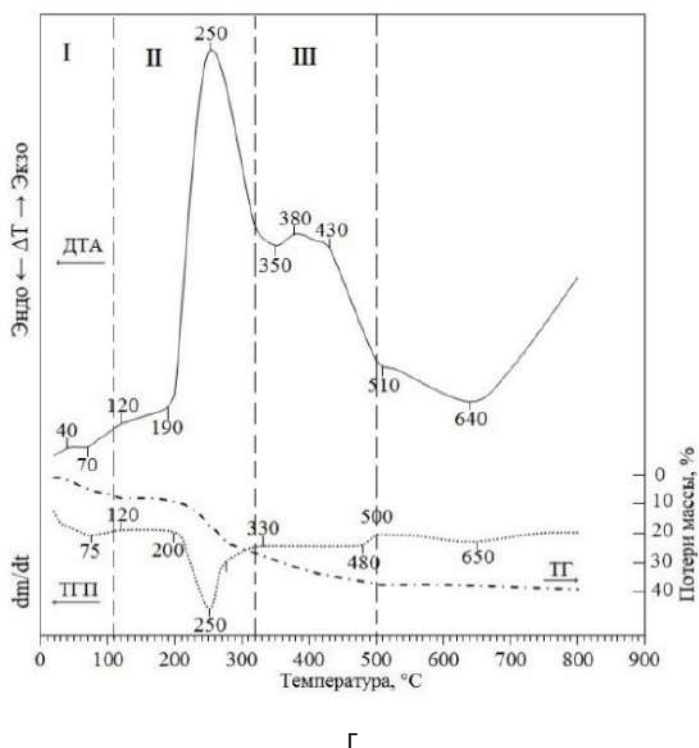
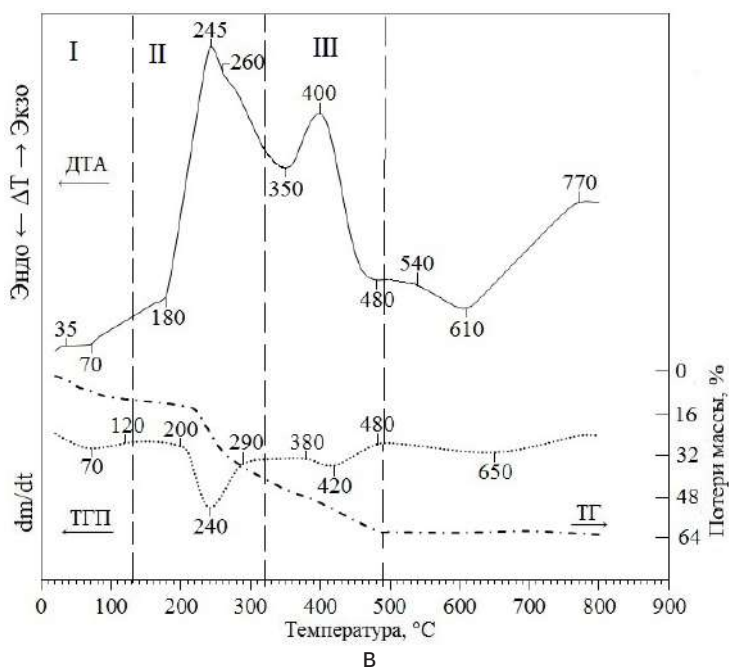


Рис. 2.36. Кривые термического анализа композитов в зависимости от ММ ХЗ
 приведены в табл. 2.12. а) ХЗ/ГА=70:30 (ММ290000); б) ХЗ /ГА=70:30 (ММ 26000);
 в) ХЗ/ГА=50:50 (ММ 290000); г) ХЗ/ГА=50:50 масс.% (ММ-26000)

Первая – в интервале температур от 20 до 110÷120°C, связанная с удалением веществ (от 8 до 17% от исходной массы образца), поглощенных образцами в процессе адсорбции. Вторая – в области температур от 110÷120 до 320÷340°C. связана с разрушениями при окислительных реакциях, приводящим к потерям массы от 19 до 31%. Третья – в промежутке температур от 320÷340 до 500÷520°C, обусловленная потерями (8÷17%). связанными с процессами горения. Результаты обработки термограмм композитов с различными ММ приведены в табл.2.11.

Таблица 2.11

Данные анализа параметров стадий термической деструкции исследованных образцов, масс. соот. (%)

№	Наименование образца	Температурный интервал (по стадиям). °С	Величина потери массы. %	Температура максимальной скорости потери массы. °С
1	ХЗ/ГА=70:30 (ММ 290000)	20-110	9	80
		110-340	21	270
		340-520	8	450
2	ХЗ/ГА=70:30 (ММ 26000)	20-120	10	80
		120-350	31	255
		350-520	17	490
3	ХЗ/ГА=50:50 (ММ 290000)	20-110	17	70
		110-320	32	240
		320-500	13	420
4	ХЗ/ГА=50:50 (ММ 26000)	20-110	8	75
		110-320	19	250
		320-500	9	480

Путем сопоставления результатов термогравиметрического анализа образцов композитов ХЗ/ГА, отличающихся значениями молекулярной массы полисахарида (табл. 2.11), было выявлено, что композит на основе ХЗ с ММ 26000 обладает сравнительно более высокой термической стойкостью, чем композит с ММ 290000. Особенно это заметно на первой стадии теплового воздействия (интервал температур от комнатной до 110÷120 °С), когда наблюдаются десорбционные процессы. Вероятно, в случае использования более высокомолекулярной составляющей композита, последняя, будучи

более громоздкой препятствует процессу формирования относительно плотной структуры.

Таким образом, процессы термического разложения всех исследованных образцов происходят в три стадии. Наибольшие значения потери массы и для ХЗ, и для композитов наблюдаются на второй стадии термического разложения. Имеющиеся заметные отличия термограмм указывают на существование взаимодействия хитозановой матрицы с неорганической компонентой. Увеличение содержания ГА в композитах приводит к повышению их термической стабильности.

2.12. Теоретический аспект взаимодействия хитозана с гидроксиапатитом

По механизму взаимодействия хитозана с гидроксиапатитом существуют различные предположения. Исходя из этого, нами исследован теоретический аспект взаимодействия ХЗ с гидроксиапатитом при формировании композита в условиях «*in situ*».

Авторами установлено, что ионы кальция взаимодействуют посредством аминогрупп ХЗ, образуя координационную связь [88, 108]. Однако в работе [70] показано, что при взаимодействии ионов кальция с электронодонорными функциональными группами ХЗ происходит их адсорбция в макромолекулу. Механизм адсорбции ионов металлов хитозаном зависит от ряда факторов таких, как рН раствора, молекулярно-массовые характеристики ХЗ, молекулярная масса (ММ) и степень деацетилирования (СДА), размер частиц, пористость и др. [6, 106].

На наш взгляд, в растворах ХЗ и ГА, наличие ионов кальция, фосфатных, гидро- и дигидрофосфатных ионов, а также аминогрупп $-NH_3^+$ способствует формированию электростатических связей между поликатионом и низкомолекулярными противоионами. В свою очередь, наличие $-OH$ групп в структуре ХЗ и ГА приводит к образованию $H-H$ связей. Эти рассуждения хорошо согласуются с литературными данными [6, 9, 175].

Результаты исследований показывают, что взаимодействие ХЗ с гидроксиапатитом происходит при $pH < 7$. Известно, что ХЗ в разбавленных растворах органических и минеральных кислот находится в солевой форме, что затрудняет взаимодействие аминогрупп с катионами металлов [181-184].

В выбранных условиях получения композитов ХЗ с Ca^{2+} рН реакционной системы во всех случаях составляет $\text{pH} < 7$, что исключает предположение о взаимодействии Ca^{2+} с $-\text{NH}_3^+$. Результаты кондуктометрических титрований, а также УФ- и ИК-спектроскопических исследований показывают, что взаимодействие макромолекул хитозана с молекулой гидроксиапатита происходит за счет электростатических и водородных связей функциональных групп ХЗ и ГА.

Механизм межфазного взаимодействия полимеров с минералами на атомистическом уровне ранее устанавливался с помощью молекулярного моделирования [185, 186]. Результаты данных исследований предоставляют полезную информацию для понимания межфазного механизма взаимодействия полимера и минерала на атомистическом уровне. Полуэмпирические квантово-химические методы продолжают оставаться актуальными во многих областях исследований. Мы применяли этот метод в исследованиях для получения структурных, электронных и спектроскопических данных о многих системах, в том числе полимерных системах на основе хитозана и его производных [187-190]. В последних работах мы предложили новую концепцию зависимости электронной структуры с реакционной способностью полимеров с различными функциональными группами. В последнее время использование систем на основе хитозана и гидроксиапатита имеет большое значение в биологии и медицине. Полученный композит представляет собой очень перспективный инструмент в качестве замены костной системы.

Для понимания природы взаимодействия хитозана с гидроксиапатитом использованы полуэмпирические методы. Модельная структура гидроксиапатита была предложена в виде трех структур для исследования взаимодействия с активными центрами хитозана. Соответственно, это исследование проводится с целью моделирования взаимодействия хитозана с гидроксиапатитом.

Взаимодействие между хитозаном и гидроксиапатитом изучали с помощью полуэмпирического метода РМЗ. Полные дипольные моменты, ВЗМО (высшая занятая молекулярная орбиталь) и НСМО (низшая свободной молекулярная орбиталь) энергии, термодинамические параметры, а также распределение электронов были выполнены на этом уровне теории. Квантово-механические расчеты проводились с использованием программ *Chen3DPro 12.0* и *Hyperchem 8.0*.

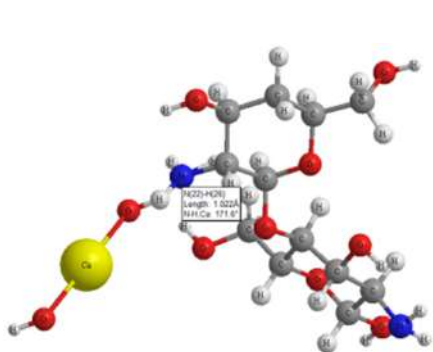
Для сборки модельных систем при исследовании взаимодействия хитозана и гидроксиапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) мы использовали структурные компоненты: $-\text{OH}$, $-\text{NH}$ и $=\text{O}$. Предлагаем три отдельные модельные структуры, представляющие гидроксиапатит. Изучили 8 моделей (рис.2.37). согласно результатам моделирования мы предложили одну схему взаимодействия в системе ХЗ/ГА (рис. 2.37-2.38). Для моделирования взаимодействия структурных компонентов гидроксиапатита ($-\text{OH}$, Ca^{2+} и PO_4^{3-}) со структурой хитозана использовали три мономерных единицы. Из изученных схем выбрали наиболее вероятные структуры, согласно рассчитанным энергиям взаимодействия. Соответственно выбраны структуры с меньшим численным значением энергии запрещенной зоны (разница ВЗМО-НСМО) и высоким дипольным моментом.

Для НСМО наблюдается следующая закономерность: чем ниже значение E НСМО, тем более сильным акцептором является данная молекула. Т.е. более положительная энергия НСМО соответствует росту нуклеофильных свойств молекулы, более отрицательная - электрофильным свойствам, что соответствует всем модельным структурам взаимодействия ХЗ/ГА. Сближение по энергии граничащих орбиталей говорит о возрастании реакционной способности молекулы в целом [191].

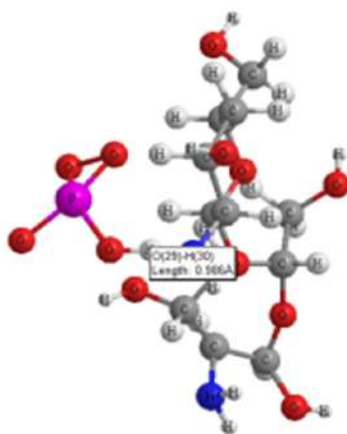
Оптимизированная структура ХЗ/ГА показана на рис. 2.38, где Ca^{2+} связан с двумя мономерными единицами через атом азота ($-\text{NH}_2$), а также атомами кислорода мономера 1 и кислорода между двумя мономерными звеньями. Анион PO_4^{3-} взаимодействует с третьим мономерным звеном через кислород, связываясь с атомом водорода группы $-\text{NH}_2$ хитозана [192].

Перенос электрона невозможен без отражения процесса ионизации в результате различных взаимодействий ХЗ/ГА. Стоит упомянуть, что частичный заряд создается из-за асимметричного распределения электронов по химическим связям. Образующиеся частичные заряды находятся только в зоне внутри распределения, а не в совокупности в целом. Показано, что атомы гидроксиапатита взаимодействуют с хитозаном посредством водородной связи через активные центры, которые различаются своей электроотрицательностью. Электроны частично отводятся без передачи. Это оставляет область вокруг взаимодействующего атома с изменением частичного заряда. В свою очередь, это изменяет поляризацию и приводит к изменению полного дипольного момента. Реакционная способность данной структуры увеличивается в результате увеличения его дипольного момента.

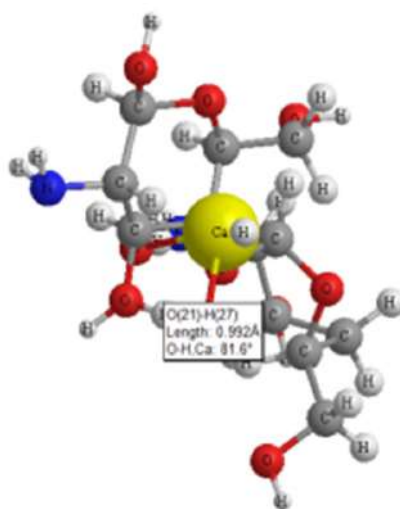
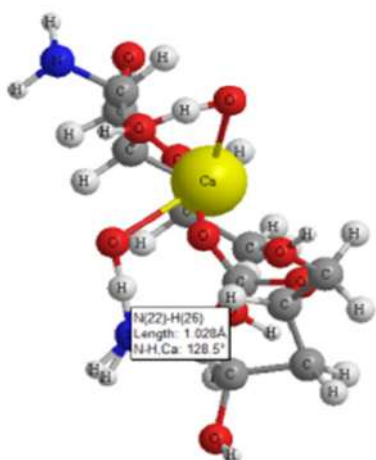
Реакционная способность данной структуры увеличивается как в результате увеличения его дипольного момента. Рассчитанный дипольный момент показал, что система ХЗ/ГА реакционноспособна. Сравнение рассчитанных данных для системы ХЗ/ГА с модельной структурой хитозана, показало, что структура ХЗ/ГА термодинамически стабильна с меньшей шириной запрещенной зоны (-7,656 эВ) по сравнению с хитозаном (-11,38 эВ). С термодинамической точки зрения система ХЗ/ГА имеет гораздо более узкую запрещенную зону, поэтому она может легко вступать в реакции как электрофильного, так и нуклеофильного характера, и впоследствии взаимодействовать с биологическими объектами.



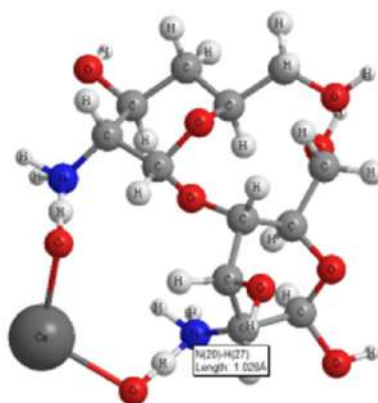
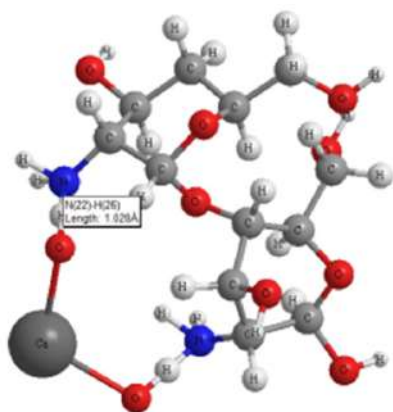
а



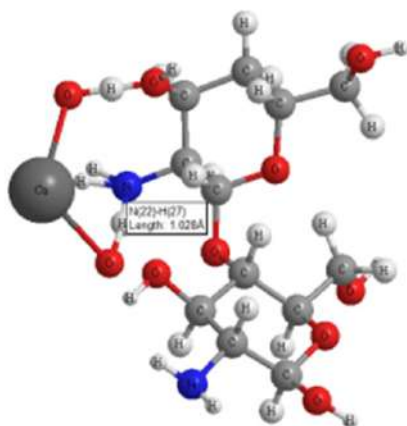
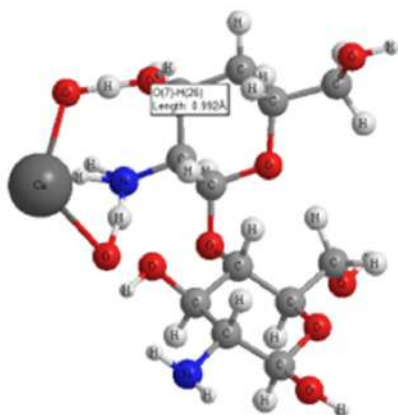
б



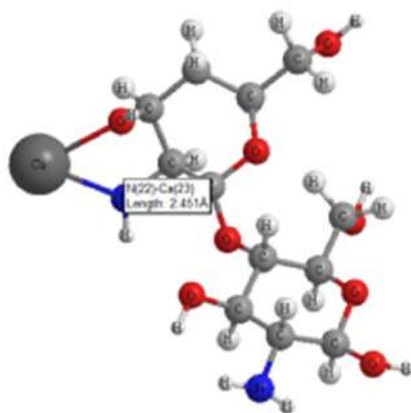
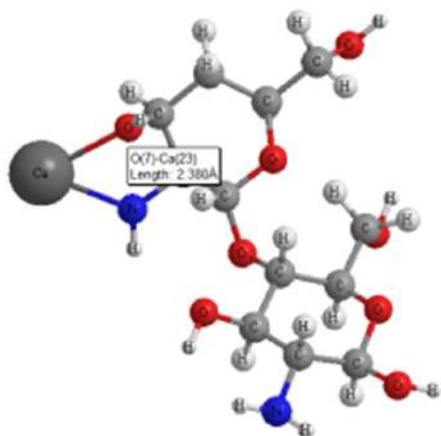
в



Г



Д



е

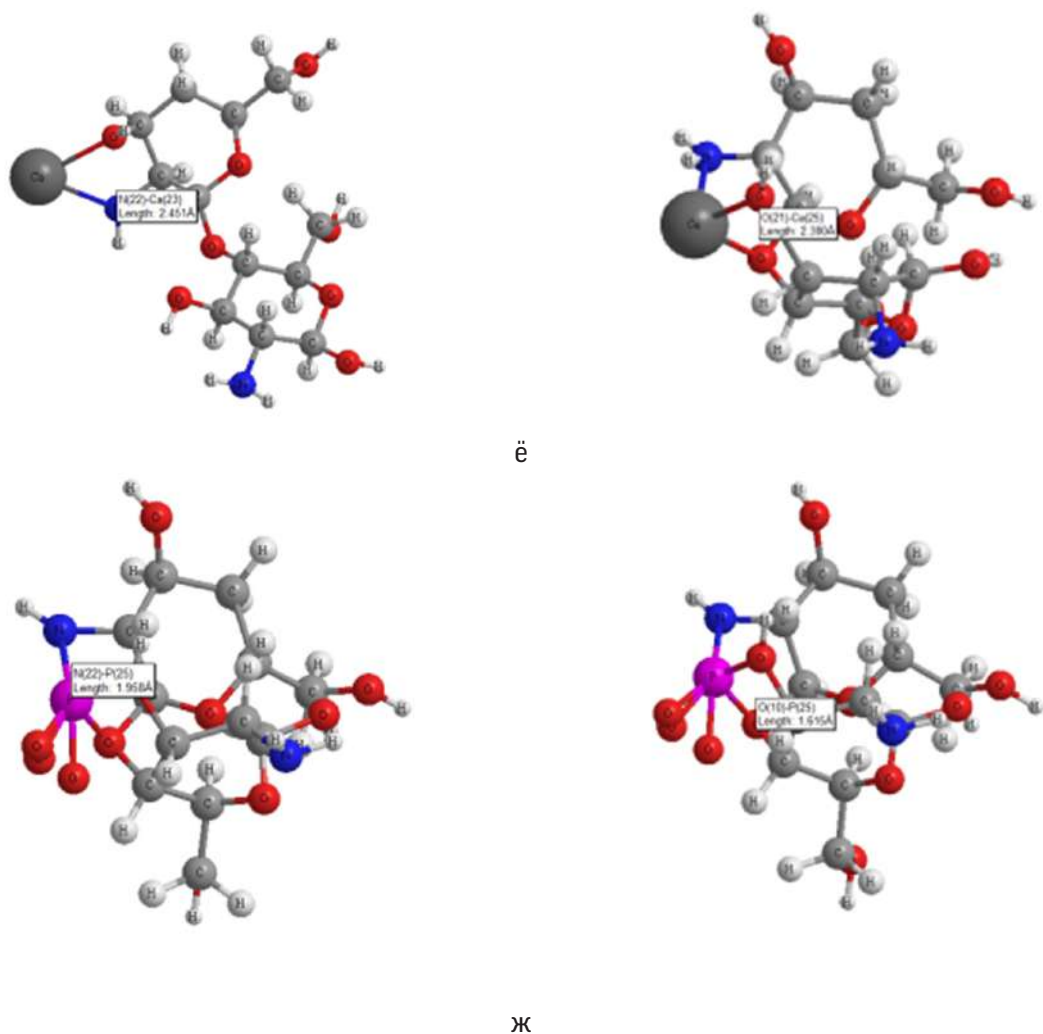


Рис. 2.37. Расчет типов взаимодействия в системе ХЗ/ГА полуэмпирическим методом PM3

В результате компьютерного моделирования были рассчитаны электронные и структурные характеристики моделей и предложена модель взаимодействия ХЗ/ГА, молекулярный размер системы ХЗ/ГА составляет около 1,4 нм. Результаты расчетов показали, что система ХЗ/ГА не ионизируется и внутри системы не происходит перенос заряда. Численное значение ширины запрещенной зоны меньше и выше по полному дипольному моменту по сравнению с хитозаном, что говорит о большей реакционной способности и возможности использования данной системы в качестве биологически активного соединения.

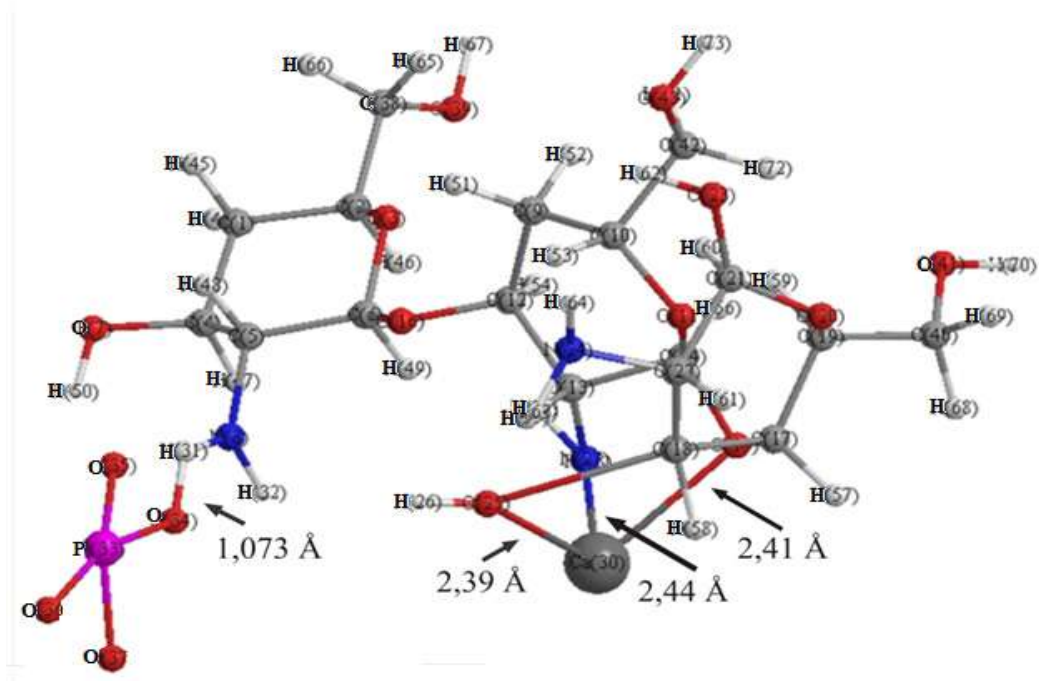


Рис. 2.38. Оптимизированная структура X3/ГА

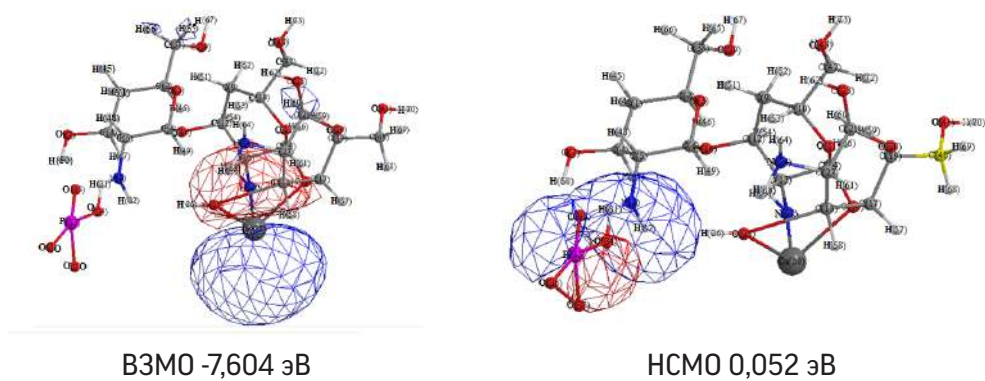


Рис. 2.39. Графическое представление НСМО и ВЗМО системы X3/ГА

**Рассчитанные значения изменения геометрических характеристик
(длина связей) и заряда системы ХЗ/ГА**

	Длина связи (Å)	Заряд системы ХЗ/ГА
N-Ca	2,44	0,142
O-Ca	2,38	-0,112
O гликозид. связь - Ca	2,41	-0,184
H-O (M3)	1,073	0,41

Расчет QSAR свойств

QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*) измеряет связь между физико-химическими свойствами исследуемых молекул и их биологической активностью. В табл. 2.13 показаны некоторые из выбранных свойств QSAR. Исследовали структуры, рассчитанные полуэмпирическим методом PM3. Результаты QSAR показывают заряд всей молекулы или системы, а не выбранного атома. В нашем случае результаты показывают, что все схемы взаимодействия не содержат нулевой частичный заряд, который указывает на отсутствие возмущения в основном состоянии. Эти данные подтверждают ранее сделанные выводы [191-192] об отсутствии ионизации в результате взаимодействия.

Таким образом, предложенные структуры подходят в качестве биоматериалов и многих других биомедицинских приложений. Нативная костная ткань является природной органоминеральной композицией, состоящей из наноразмерных стержневидных кристаллов ГА и биополимера коллагена. Для создания биосовместимых органоминеральных композиций в качестве органической компоненты композитов, помимо коллагена, используют природные: хитозан, целлюлозу, желатин и синтетические полимеры (например, полиэтилен).

Полисахариды в качестве органической компоненты биосовместимых органоминеральных композиций представляют особый интерес. В этой связи проведен расчет взаимодействия структурной части состоящей из трех звеньев целлюлозы (Цел) с ГА. Результаты представлены на рис 2.40 и табл. 2.13.

По сравнению с хитозаном и Цел/ГА система ХЗ/ГА имеет большую площадь поверхности - объем увеличен за счет количества атомов в системе в

соответствии с координатами взаимодействия. Это также может относиться к объемным химическим группам (Ca^{2+} и PO_4^{3-}), которые занимают большую поверхность и объем.

Поляризуемость - это относительная тенденция распределения заряда, подобно электронному облаку поляризуемости атома или молекулы, чтобы быть искаженным от своей нормальной формы внешним электрическим полем, что может быть вызвано присутствием соседнего иона или диполя.

Расчетная поляризуемость исследуемых систем также представлена в табл. 2.13. Заметное увеличение поляризуемости соответствующие ХЗ/ГА считается $47,2 \text{ \AA}^3$. Это указывает на его более высокое притяжение из-за более высокой поляризуемости и, следовательно, более высокого дипольного момента. Это свойство является преимуществом ХЗ/ГА вследствие присутствия аминогруппы.

Энергия гидратации определяется как количество высвобождающейся энергии, когда моль иона растворяется в большом количестве воды, образуя бесконечно разбавленный раствор. Расчетная энергия гидратации хитозана составляет $-33,2$ (Ккал / моль), что имеет более низкую энергии гидратации, чем для другой системы. Коэффициент распределения в системе октанол – вода (P) широко используется в химии, медицине, фармакологии, токсикологии и экологии для описания транспорта вещества через биологические мембраны, растворимости, токсичности, абсорбции и т.п. По этой причине расчетам $\log P$ посвящены работы многих авторов, занимающихся вопросом структура – свойство. Большая часть методов основана на линейной $\log P$ - самый важный параметр дескрипторов QSAR (биологической активности). Значение $\log P$ для соединения - это логарифм коэффициента распределения (P). Экспериментально значение коэффициента липофильности определяется при помощи стандартной системы 1-октанол-вода. Логарифм коэффициента распределения незаряженных форм субстрата и есть искомая величина, стандартно обозначаемая как $\log P$ [191].

$$\log P_{\text{oct/wat}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{water}}} \right)$$

Высокое значение $\log P$ указывает на то, что молекула гидрофобна, в то время как низкое значение $\log P$ указывает на то, что молекула гидрофильна. Как показано в табл. 2.13 хитозан более гидрофилен, это может быть связано со степенью гидрофобного замещения, т.е. распределением

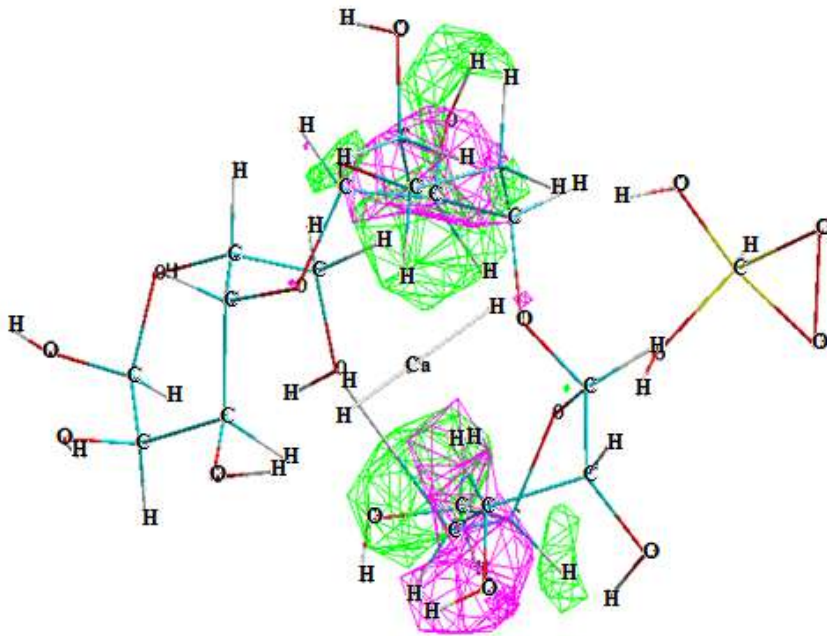
гидрофобных групп по длине макромолекулярного скелета. По предложенной схеме взаимодействия Ca^{2+} как свободного иона и PO_4^{3-} с тремя звеньями хитозана показано уменьшение расчетного значения гидрофильности этой структуры (-2,75). С увеличением взаимодействия Ca^{2+} и/или PO_4^{3-} с хитозаном гидрофильность структуры уменьшилась вследствие того, что взаимодействие осуществляется через аминогруппы хитозана. Уменьшение гидрофильности хитозана с увеличением содержания гидроксиапатита обусловлено восстановлением полярных гидроксильных групп и аминогрупп в композите ХЗ/ГА.

Таблица 2.13

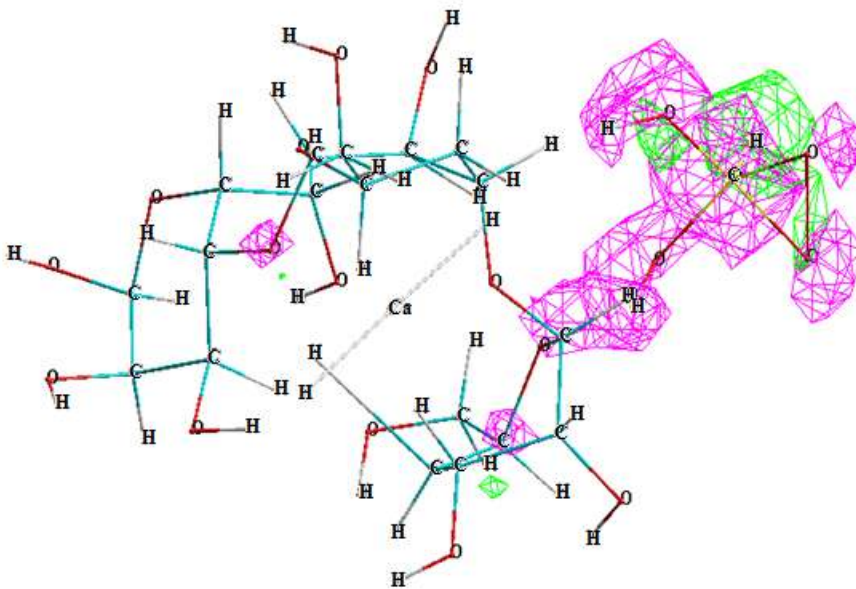
Значения расчетной площади поверхности (\AA^2), объема (\AA^3), энергии гидратации (ккал / моль), $\log P$, поляризуемости (\AA^3) хитозана, ХЗ/ГА, Цел/ГА, которые рассчитаны полуэмпирическим методом РМЗ

Структура	Площадь поверхности	Объем	Энергия гидратации	Log p	Поляризуемость
Хитозан	535,9	889,3	-33,2	-3,6	28,5
ХЗ/ГА	679,8	1303,8	-25,6	-2,75	47,2
Цел/ГА	669,9	1265,45	4,85	-1,71	45,06

Однако гидрофильность для системы целлюлоза (Цел)/ГА ниже, что говорит о том, что система ХЗ/ГА более устойчива. На рис. 2.40 представлены НСМО и ВЗМО системы Ц/ГА. Сравнение рассчитанных данных для систем Цел/ГА и ХЗ/ГА показало, что структура ХЗ/ГА термодинамически стабильна с меньшей шириной запрещенной зоны (-7,656 эВ) по сравнению с Цел/ГА (-8,1124 эВ). С точки зрения электронной структуры данных систем композит ХЗ/ГА имеет гораздо более узкую запрещенную зону, поэтому он может легко вступать в реакции как электрофильного, так и нуклеофильного характера, и впоследствии взаимодействовать с биологическими объектами. Как видно на рис. 2.40 ВЗМО орбитали распределены на пиранозных кольцах Целлюлозы, а НСМО как и для системы ХЗ/ГА, одинаково, т.е. наблюдается взаимодействие водорода аминогруппы с анионом PO_4^{3-} .



V3MO -7,6165 эВ



H3MO 0,4959 эВ

Рис.2.40. Графическое представление H3MO и V3MO системы Цел/ГА

Создание органоминеральных композиций на основе полисахаридов, повышая растворимость ГА, в значительной степени увеличивают эффективность композита. ХЗ в данном случае улучшает характеристики композита, способствует уменьшению вероятности миграции ГА в окружающие ткани за счет более стабильной связи наночастиц ГА с макромолекулами ХЗ, нежели целлюлозы. Как показано в расчетах электронной структуры, значений площади поверхности, объема и поляризуемости высокая прочность композитов ХЗ/ГА, сопоставимая с Цел/ГА, позволяет предположить широкие возможности использования *in vivo* в качестве биорастворимых имплантатов с высокой степенью биоактивности и остеокондуктивности.

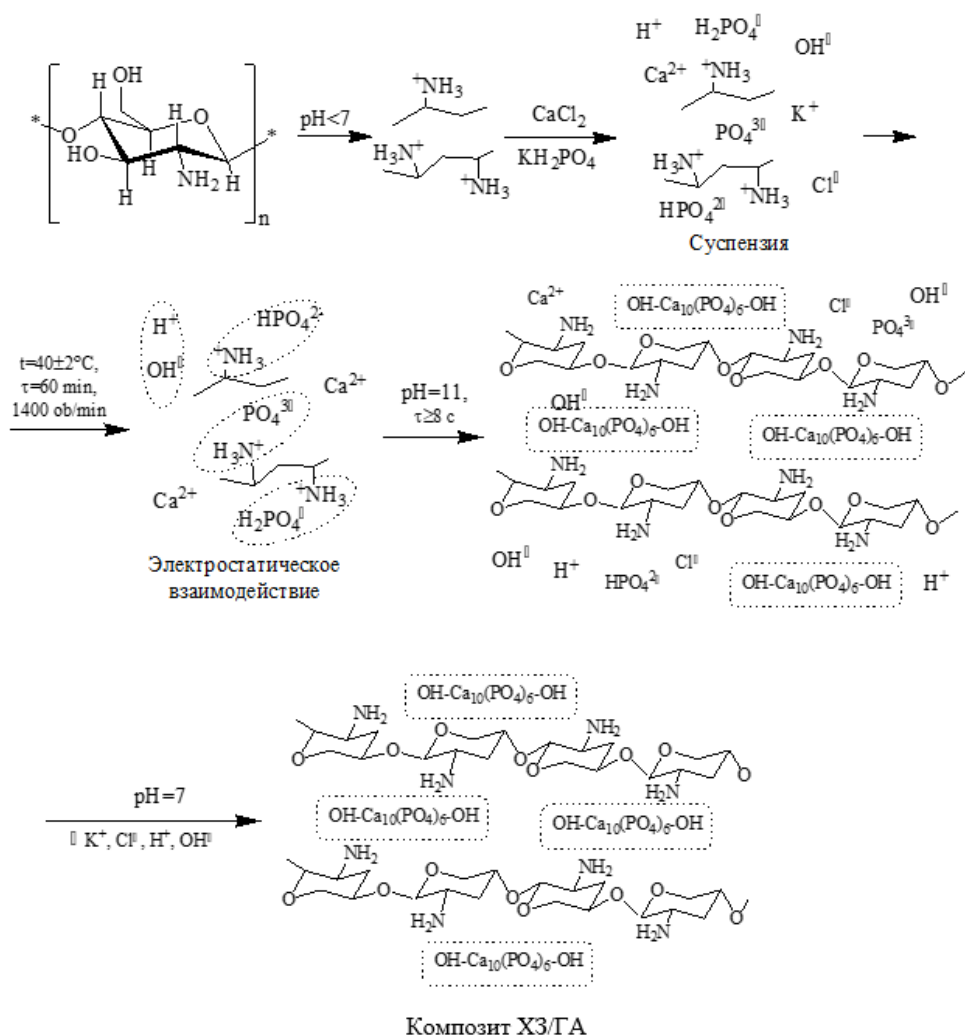


Схема 2.1. Предварительная схема формирования композитов ХЗ/ГА в условиях «*in situ*» [6]

На основе экспериментальных и теоретических методов исследований предложена предварительная схема взаимодействия макромолекул хитозана с гидроксиапатитом кальция. Формирование композита условно разделили на следующие этапы (схема 2.1):

1. Растворение ХЗ при $pH < 7$ /протонирование хитозана.
 2. Образование суспензии ХЗ/ГА.
 3. Образование промежуточных комплексов с помощью электростатических взаимодействий компонентов при интенсивном перемешивании.
 4. Рост кристалла ГА в условиях «*in situ*».
 5. Нейтрализация раствора и выделение целевого продукта.
- Данный способ позволяет получать композиты ХЗ/ГА с регулируемым составом и морфологией.

Заключение к главе 2

Синтез композитов с заданными свойствами, разработка инструментов регулирования их состава и структур представляют фундаментально-прикладной интерес. Нами синтезирован и идентифицирован стехиометрический гексагональный гидроксиапатит кальция Са/Р-1,67 моль.%. Разработан новый экспресс - способ синтеза ГА в условиях «*in situ*» и «*ex situ*» и обнаружено, что в присутствии макромолекул ХЗ формируются наночастицы от 20 до 720 нм.

Известно, что частицы стехиометрического гексагонального ГА формируются в течение 24-48 часов. Эмиссионным элементным анализом, рентгенографическим, микроскопическими, спектральными методами установлено, что при интенсивном перемешивании со скоростью 1400 об/мин, практически во всех образцах ХЗ/ГА, полученных в течение 8-16-24-36 часов, в системе формируется стехиометрический ГА, т.е. соотношение Са/Р составляет 1,67 моль.% как в условиях «*ex situ*», так и в условиях «*in situ*».

Результаты кондуктометрических титрований, а также УФ- и ИК-спектроскопических исследований показывают, что в промежуточной стадии, взаимодействие макромолекул хитозана с молекулой гидроксиапатита происходит за счет электростатических и водород-водородных связей их функциональных групп. В результате компьютерного моделирования

были рассчитаны электронные и структурные характеристики моделей и предложен предварительный механизм взаимодействия ХЗ и ГА.

Таким образом, разработан новый способ получения композитов хитозана/гидроксиапатита с регулируемым составом, морфологией, степенью кристалличности.

ГЛАВА 3

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ХИТОЗАН/ ГИДРОКСИАПАТИТА

- 3.1. Исследование острой токсичности композита ХЗ/ГА
- 3.2. Изучение влияния соединения гидроксиапатита хитозана *Bombyx mori* на экспериментальный остеопороз в эксперименте на белых крысах
- 3.3. Биологически активные свойства композитов гидроксиапатита хитозана
- 3.4. Изучение влияния препарата ХЗ/ГА=50:50 масс.% на количество и качество куриного мяса
- 3.5. Влияние ХЗ/ГА на Са-Р баланс в сыворотке крови бройлеров
- 3.6. Изучение ХЗ/ГА на морфологические параметры и лейкоцитарную формулу крови бройлеров
- 3.7. Определение влияния гидроксиапатита хитозана *Bombyx mori* на иммунные показатели организма цыплят и продолжительности после вакцинации цыплят-бройлеров против Ньюкаслской и инфекционной болезнью бронхита

Заключение к главе 3

ГЛАВА 3 БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ХИТОЗАН/ГИДРОКСИАПАТИТА

3.1. Исследование острой токсичности композита ХЗ/ГА¹

Острая токсичность композитов ХЗ/ГА изучена в Научном центре стандартизации лекарственных средств на 20 белых мышах смешанного пола и весом 20 ± 1 г. Гидроксиапатит хитозана растворили в 2% уксусной кислоте до гелеобразного состояния и вводили мышам однократно внутривентрикулярно в дозах 1000 мг/кг, 2000 мг/кг, 4000 мг/кг, и 5000 мг/кг [193]. Животные находились под непрерывным наблюдением в течение первого часа, далее под ежечасным наблюдением в течение первого дня эксперимента и один раз в сутки в последующие 13 дней эксперимента. В качестве показателей функционального состояния животных учитывалось общее состояние мышей и их поведение, интенсивность и характер двигательной активности, наличие судорог, координация движений, реакция на внешние раздражители и тонус скелетных мышц, аппетит, масса тела, количество и консистенция фекальных масс. В ходе эксперимента осуществляли контроль за клиническим состоянием животных: наличие/отсутствие признаков отравления, время их появления, гибель мышей. Все подопытные животные находились в стандартных условиях содержания, на общем рационе питания со свободным доступом к воде и пище [193]. После завершения эксперимента определяли средне-смертельные дозы (LD_{50}).

Исследования показывают, что после однократного внутривентрикулярного введения ХЗ/ГА=50:50 масс. % в дозах 1000 мг/кг, 2000 мг/кг, 4000 мг/кг, и 5000 мг/кг общее состояние мышей остались стабильным и в их поведении не наблюдалось видимых изменений. Координация движений и тонус скелетных мышц были в норме, судороги не отмечались, реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители – выраженные, состояние волосяного и кожного покрова – без изменений, цвет слизистых оболочек и размер зрачка были фактически без отклонений, аппетит – выраженный, потребление воды не увеличилось, масса тела без изменений, количество и консистенция фекальных масс фиксированы в норме. Гибель мышей в те-

¹ Эксперименты проведены в организации «Dori vositalarini standartlash ilmiy markazi»

чение 14 суток не наблюдалась. LD_{50} препарата гидроксиапатита хитозана составила более 5000 мг/кг (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Определение острой токсичности гидроксиапатита хитозана

№ мышей	Гидроксиапатит хитозана <i>Bombux mori</i>			
	масса, г	Доза мг/кг	способ введения	летальный исход
1	21	1000	внутри- желудочный	Нет
2	19			Нет
3	20			Нет
4	21			Нет
5	19			Нет
6	20			Нет
1	20	2000		Нет
2	21			Нет
3	19			Нет
4	21			Нет
5	21			Нет
6	20			Нет
1	20	4000		Нет
2	20			Нет
3	21			Нет
4	19			Нет
5	20			Нет
6	20			Нет
1	20	5000	Нет	
2	20		Нет	
3	19		Нет	
4	20		Нет	
5	19		Нет	
6	19		Нет	
LD_{50}		>5000 мг/кг		

Полученные данные показывают, что LD_{50} ХЗ/ГА=50:50 масс. % составляет более 5000 мг/кг и относится к практически нетоксичным препаратам. Благодаря морфологической характеристике и анализу МТТ хитозан не показал токсичности по отношению к клеткам остеобластов плода человека (hFOB). Также было показано, что хитозан снижает жизнеспособность осте-

осаркомы человека на 96% по сравнению с контрольными образцами [194]. Это предполагает наличие проапоптотического механизма против остеосаркомы, а также потенциальное клиническое применение хитозана в качестве лекарственного средства в керамических каркасах на участках резекции опухоли. Результаты МТТ для остеобластов (hFOB) и остеосаркомы (MG-63) на 3-й и 6-й дни. Присутствие хитозана не показало токсического воздействия на жизнеспособность клеток остеобластов на 3-й и 6-й день по сравнению с образцами чистой ГА. Присутствие хитозана показало значительное снижение жизнеспособности клеток остеосаркомы на 6-й день по сравнению с контрольными образцами.

Хотя токсичность/биосовместимость наночастиц гидроксиапатита (НЧ ГА), перспективного нанобиоматериала, широко изучается, их воздействие на репродуктивную систему после воздействия используется меньше [195]. В настоящем исследовании крысы-самцы подвергались воздействию НЧ ГА (300 мг/кг массы тела) для определения их возможной репродуктивной токсичности. Кроме того, изучалось защитное действие наночастиц хитозана (НЧ ХЗ, 280 мг/кг массы тела) и/или куркумина (НЧ Cur, 15 мг/кг массы тела) против репродуктивной токсичности, вызванной НЧ ГА. Животным ежедневно вводили через зонд соответствующие дозы в течение 45 последовательных дней. Полученные результаты показали, что НЧ ГА вызывают значительное снижение количества сперматозоидов, подвижности сперматозоидов, гормона тестостерона, стероидогенных ферментов (17-кетостероидредуктаза и 17-β-гидроксистероиддегидрогеназа) и антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, каталаза и супероксиддисмутаза) в дополнение к общей антиоксидантной способности и восстановленному глутатиону. ЛГ и ФСГ, аномальные сперматозоиды, параметры окислительного стресса (вещества, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, оксид азота (NO) и δ-гидроксидезоксигуанозин, p53, TNFα и интерлейкин-6 были значительно выше. Повреждение ДНК также анализировали путем анализа уровня 8-OHdG, который рассматривается как показатель генотоксичности, а также подавления экспрессии гена mtTFA, индукции UCP2. Точно так же гистопатологическая оценка также изменилась после воздействия НЧ ГА. Антиоксидантная активность НЧ ХЗ и Cur продемонстрировала смягчающий эффект против ухудшения репродуктивной функции, вызванного НЧ ГА, посредством улучшения характеристик

половых гормонов, воспалительных факторов и антиоксидантного статуса. Настоящее исследование пришло к выводу, что НЧ ГА индуцируют репродуктивную токсичность, и важно использовать наноантиоксиданты НЧ ХЗ и Сиг в качестве защитных агентов.

Гидроксиапатит (ГА) показал высокую биосовместимость и нетоксичность при сохранении отличных остеointеграционных и остеоондуктивных характеристик [196].

3.2. Изучение влияния соединения гидроксиапатита хитозана *Bombyx mori* на экспериментальный остеопороз в эксперименте на белых крысах

В настоящее время нетоксичные препараты, полученные на основе хитозана и его производных, широко применяются в медицине и ветеринарной медицине [197].

Гидроксиапатит химически связан с неорганическим компонентом костного матрикса как сложная структура - $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$. Преимуществами нанокристаллов гидроксиапатита являются остеоондуктивность, биорезорбция и контакт на близком расстоянии. Кристалл остеопоротической кости представляет собой гидроксид фосфата кальция с химической формулой $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$. Кристалл нормальной кости представляет собой гидрат гидрокарбоната натрия-кальция с химической формулой $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{NaHCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Основные элементы кристаллов гидроксиапатита, состоящие из атомарных минералов в определенном геометрическом порядке, и их связь с биологической активностью костных клеток открыли возможности для применения кристаллов гидроксиапатита в качестве добавки при остеопорозе [198].

Остеопороз на сегодняшний день является наиболее частым метаболическим заболеванием, поражающим кости [199]. Одним из инновационных подходов к усилению терапии остеопороза и предотвращению потенциальных побочных эффектов является разработка технологий доставки лекарственных препаратов, нацеленных на кость. Он минимизирует системную токсичность, а также улучшает фармакокинетический профиль и терапевтическую эффективность химических препаратов. Ранние исследования показали, что наноразмерный ГА способствует биологической активности

остеобластов, усиливая регенерацию кости [200-201]. В связи с этим сам наноситель способствует росту костной ткани и увеличивает отложение костной массы.

Костные кристаллы чрезвычайно малы, со средней длиной 50 нм (в диапазоне 20–150 нм), средней шириной 25 нм (в диапазоне 10–80 нм) и толщиной всего 2–5 нм. Апатитовая фаза содержит 4–8% карбоната по массе, называемого далитом. Минеральный состав будет меняться с возрастом и всегда зависит от дефицита кальция, когда ионы карбоната и фосфата находятся в кристаллической решетке [202]. Формула $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,43}(\text{CO}_3)_{3x}(\text{HPO}_4)_y(\text{OH})_{0,3}$ отражает средний состав кости, где y уменьшается, а x увеличивается с возрастом, тогда как сложение $x+y$ будет постоянным и равным 1,7. Рост минеральных кристаллов происходит при определенной ориентации, при которой ось c кристалла приблизительно параллельна оси длины коллагенового волокна, где происходит отложение кристалла [203].

Одним из преимуществ нанокompозита является его способность собираться с другими молекулами. Эти свойства повысят качество лечения остеопороза, хотя и требуют дальнейшего изучения. Через 12 недель после операции в группе нано ГА/ХЗ наблюдалось полное заживление дефекта сегментарной кости, в то время как в группе хитозана дефект все еще оставался видимым, хотя глубина дефекта уменьшилась. Эти наблюдения позволяют предположить, что инъекционные каркасы нано-ГА/ХЗ являются потенциальными материалами-кандидатами для регенерации костной ткани [206].

Проведены исследования по изучению остеорегенеративной способности каркасов из коллагена/ХЗ/ГА у крыс с дефицитом гормонов, вызванным экспериментальной двусторонней овариэктомией. Сорок две крысы были разделены на неовариэктомированные (-NO) и овариэктомированные (O) группы, разделенные на три подгруппы: контроль (пустой дефект) и две подгруппы, получавшие каркасы Колл/ХЗ/ГА, приготовленные с использованием различных методов включения гидроксиапатита, «*in situ*» (Колл/ХЗ/ГА=1) и «*ex situ*» (Колл/ХЗ/ГА=2). Области дефекта подвергали макроскопическому, рентгенологическому и гистоморфометрическому анализу. Воспалительных процессов в области дефекта большеберцовой кости, свидетельствующих об иммунном отторжении матриксов, не выявлено, что подтверждает биосовместимость биоматериалов. Костнообразование, начиная с краев костного дефекта, наблюдалось у всех крыс, с большим объемом в группах -NO,

особенно в группе, получавшей Колл/ХЗ/ГА=2. Меньшее костеобразование было обнаружено в подгруппах О по сравнению с -NO. В заключение, каркасы из коллагена/хитозана/гидроксиапатита стимулируют рост костей *in vivo*, но патологические состояния хрупкости костей, вызванные дефицитом гонадных гормонов, могут задерживать процесс восстановления кости [207].

Гибриды состоят из биополимерной матрицы коллагена/хитозана/гиалуроновой кислоты и частиц кремнезема с функциональными аминогруппами, украшенных апатитом, к которому были координированы молекулы алендроната. Их можно точно вводить в пораженную ткань в виде вязкого золя или частично сшитого гидрогеля, где они могут служить каркасами для локально контролируемой регенерации/ремоделирования костной ткани, поддерживая образование/пролиферацию остеобластов и поддерживая оптимальный уровень остеокластов. Эти материалы не обладают системной токсичностью. Они могут быть особенно полезны для восстановления небольших остеопоротических дефектов костей, для комбинированного применения при лечении остеопороза и костной ткани [208].

Анализ литературы показывает, что несмотря на то, что по композитам ХЗ/ГА проводится огромное количество исследований, каждая работа уникальна по-своему и представляет фундаментально-прикладной интерес.

Для моделирования экспериментального остеопороза использовали овариоэктомию и для ускорения процесса – введение глюкокортикостероидов. Так, например, дексаметазон в дозе 0,3 мг/кг, вводимый овариоэктотомизированным крысам даже 1 раз в 2 нед в течение не менее 1 мес, существенно снижает плотность костной ткани в позвонках, а через 3 месяца – в костях таза [209]. опыты проводили на белых половозрелых крысах самках, животные были подвергнуты овариоэктомии, так как у самок остеопороз развивается быстрее, чем у самцов. Животных разделили на 4 группы по 6-7 животных в каждой. Первая группа - интактная, у которых не проводили овариоэктомию и не вводили дексаметазон. Вторая группа – контрольная, в данной группе проводили двухстороннюю овариоэктомию и в дальнейшем вводили дексаметазон без лечения остеопороза.

Животным третьей и четвертой групп - опытные, также проводили двухстороннюю овариоэктомию и в дальнейшем вводили дексаметазон.

Через месяц после моделирования экспериментального остеопороза животным опытных групп (третья и четвертая группы) вводили соединение

в виде суспензии гидроксиапатит хитозана *Bombux mori* и препарат “Кальция глюконат” производства ОАО «Борисовский завод медицинских препаратов», Республика Беларусь, серия 49 31820822, срок годности 08 2027) в дозе 250 мг/кг внутривенно в течение месяца. После введения соединения и препарата собирали кровь для определения уровня кальция в крови животных. Для определения массы, плотности и содержания кальция в бедренной кости забирали бедренные кости животных после эвтаназии. Плотность костей (HU- Hounsfield) [210] животных исследовали на Магнитно-резонансном томографе IQON SPECTRAL в отделении Радиологии и ПЭТ/КТ (Позитронно-эмиссионная томография/Компьютерная томография) диагностики клиники имени М.Федоровича. Содержание кальция в золе костей животных исследовали комплексонометрическим методом в лаборатории дефолиантов Института общей и неорганической химии АН РУз [211].

Для подтверждения развития остеопороза у экспериментальных животных использовали такие показатели, как содержание кальция, минеральную плотность костных тканей и массу бедренных костей².

Согласно данным табл. 3.2, развитие остеопороза у овариоэктомированных крыс в контрольной группе сопровождается существенным снижением веса высушенной бедренной кости, а также уменьшением уровня кальция в крови. Кроме того, отмечено выраженное уменьшение плотности костной ткани бедренной кости и увеличению хрупкости костей по сравнению с интактной группой (рис. 3.1 - 3.2) [212].

При введении соединения гидроксиапатит хитозана *Bombux mori* масса бедренной кости увеличилась на 23,6%, плотность бедренной кости увеличилась на 12,1% по сравнению с контрольной группой. Содержание кальция в сыворотке крови существенно не менялось. При определении содержания кальция в золе костей по сравнению с контрольной группой увеличилось на 16,4%, что существенно не отличается от результатов интактной группы (рис. 3.3).

В группе препарата сравнения “Кальция глюконат” масса бедренной кости увеличилась на 31,6%, плотность бедренной кости увеличилась на 21,7% по сравнению с контрольной группой. Содержание кальция в сыворотке крови существенно не менялось. При введении препарата “Кальция глюконат” содержание кальция в золе костей по сравнению с контрольной группой увеличилось на 8,9%, что существенно не отличается от результатов интактной группы (рис. 3.4).

² Эксперименты проведены в «Dori vositalarini standartlash ilmiy markazi»

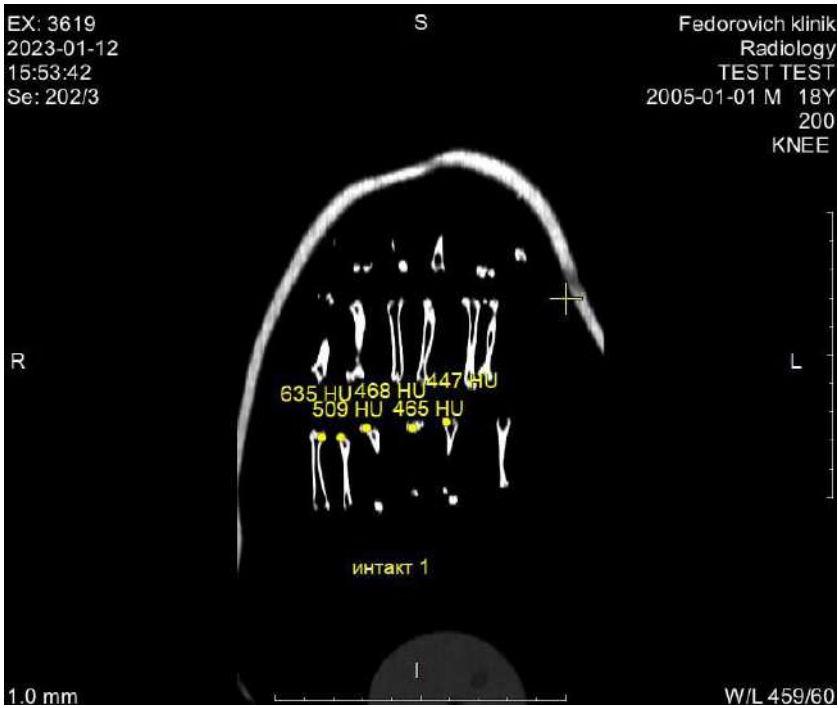


Рис.3.1. МРТ-снимок бедренные кости животных после эвтаназии интактной группы

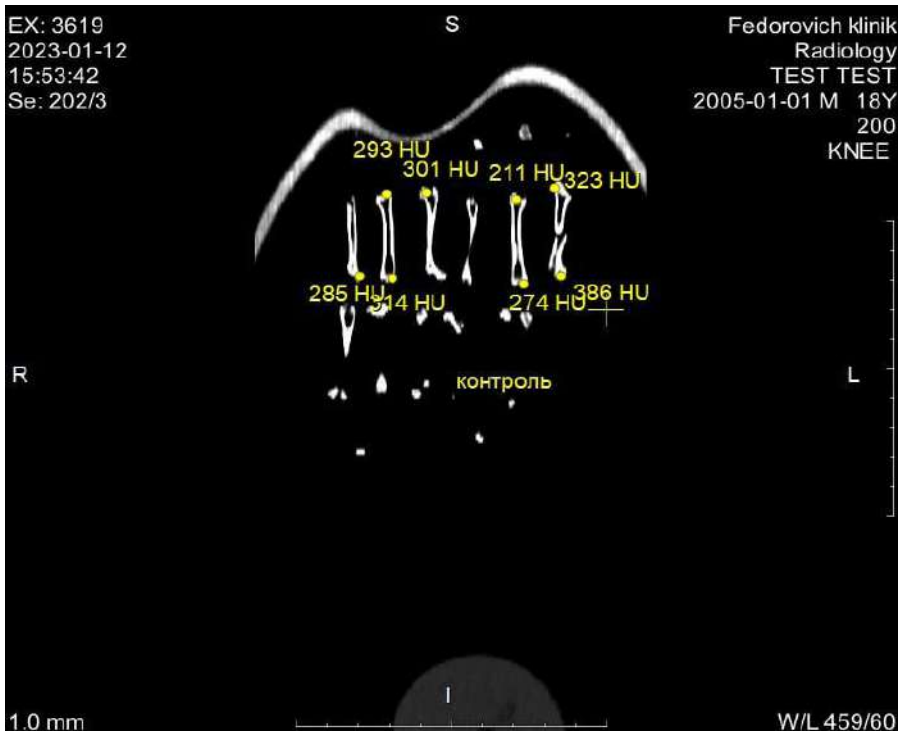


Рис. 3.2. МРТ-снимок бедренные кости животных после эвтаназии контрольной группы

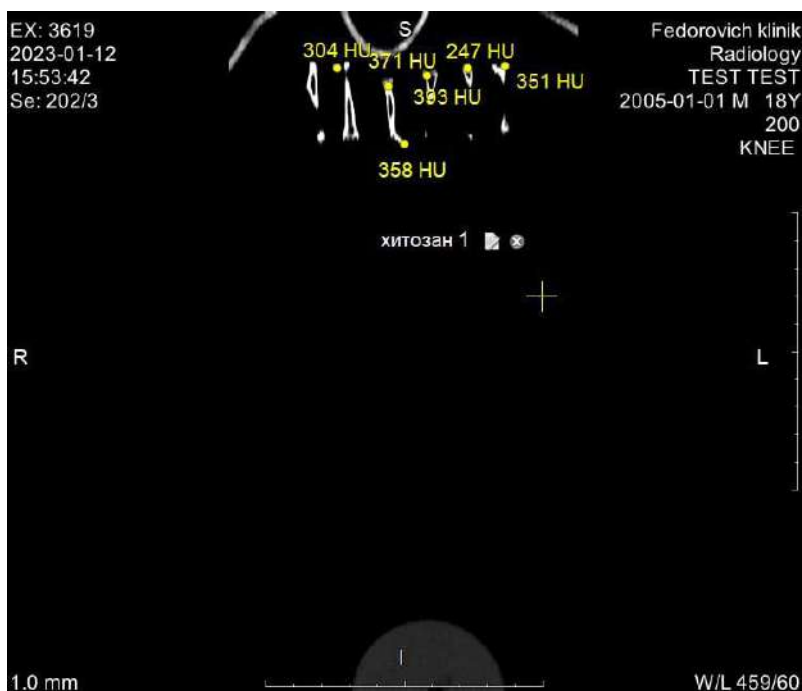


Рис. 3.3. МРТ-снимок бедренные кости животных после эвтаназии, принимающих ХЗ/ГА *Bombyx mori*

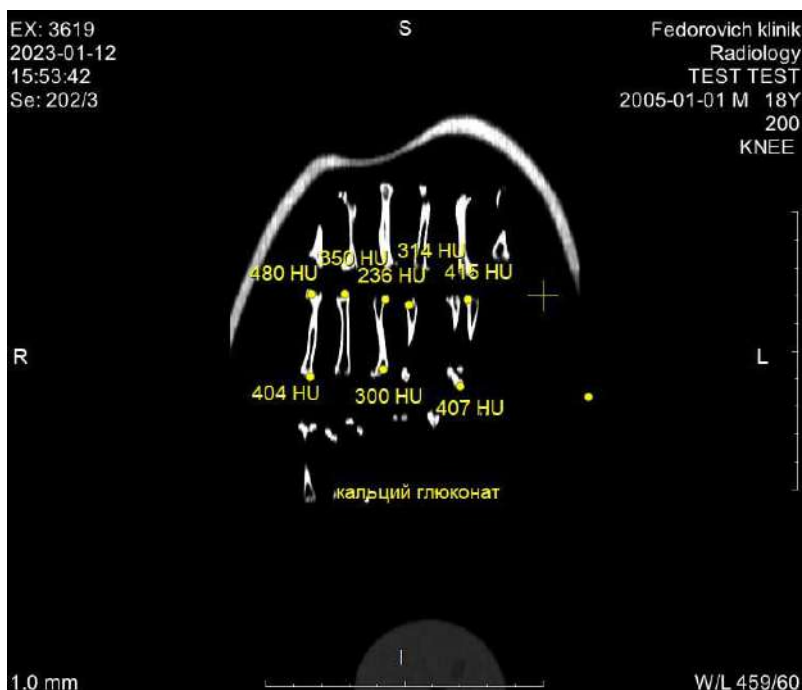


Рис. 3.4. МРТ-снимок бедренные кости животных после эвтаназии, принимающих глюконата кальция

Сравнение результатов показывает, что гидроксиапатит хитозана *Bombux mori* при испытанной дозе способствует увеличению массы и плотности бедренной кости, а также увеличению содержания кальция в костях животных (табл. 3.2).

Таблица 3.2

**Влияние гидроксиапатит хитозана *Bombux mori* и препарата
“Кальция глюконат” на экспериментальный остеопороз костей**

№	Группы	Масса бедренной кости (на 100 г массы тела)	Уровень кальция в крови	Плотность бедренной кости, НУ	Содержание кальция (%) в золе костей
1	Интактная	0,233±0,02	2,60±0,09	493,1±27,6	7,23±0,24
2	Контрольная	0,161±0,01 ^x	2,24±0,10 ^x	298,4±17,4 ^x	6,52±0,13 ^x
3	Гидроксиапатит хитозана 250мг/кг	0,199±0,01 ^y	2,23±0,06 ^x	334,6±18,8 ^x	7,59±0,21 ^y
4	Глюконат кальция, 250 мг/кг	0,212±0,01 ^y	2,30±0,05 ^x	363,3±27,6 ^x	7,10±0,17 ^y

Примечание:

^x - статистически значимо по отношению к интактной группе при $P < 0,05$;

^y - статистически значимо по отношению к контрольным показателям при $P < 0,05$.

Таким образом, овариоэктомия у самок животных и последующее введение глюкокортикостероидов приводит к нарушению минерального обмена и развитию остеопороза, что видно из полученных результатов. При сравнении результатов контрольной группы с интактной группой наблюдается статистически достоверное снижение массы бедренной кости, уровня содержания кальция в крови животных, плотности ткани бедра, а также общего содержания кальция в золе костей животных. Эти показатели в данной модели указывают на развитие остеопороза у экспериментальных животных [212].

При сравнении полученных показателей с результатами в группе животных, которым вводили препарат “Кальция глюконат” статистически значимой разницы не наблюдалось. Положительное влияние соединения гидроксиапатита хитозана *Bombux mori* на течение экспериментального остеопороза согласуется с результатами, полученными при лечении остеопороза различными соединениями гидроксиапатита другими исследователями [213].

Показано, что ХЗ пригоден для использования в ИТ в качестве трансплантата костной ткани, при изготовлении пористых матриц, пленок для поверхностных ран, высвобождении лекарств и в составах для производства гидрогелей [214, 215]. Однако недостатком ХЗ является его плохие механические свойства [216], поэтому для улучшения этого в нескольких исследованиях сообщается о разработке композитов на основе ХЗ/ГА, поскольку оба биоматериала обладают превосходной биосовместимостью с клеточной тканью человека [217], сообщается, что этот композит обладает улучшенными механическими свойствами благодаря связыванию amino- и гидроксильных групп ХЗ с ионами кальция, присутствующими в ГА [218-219].

Остеобласты играют решающую роль в формировании костей. Ранее показано, что нановолокна хитозана могут стимулировать пролиферацию и созревание остеобластов. В этом трансляционном исследовании использовалась модель костных дефектов на животных для оценки влияния каркасов из нановолокон хитозана на заживление кости и возможные механизмы. В этом исследовании исследованы однородные нановолокна хитозана с диаметром волокна около 200 нм.

В проксимальных отделах бедра самцов мышей C57LB/6 хирургическим путем создавали костный дефект, а затем в левое бедро имплантировали каркасы из хитозановых нановолокон на 21 день и сравнивали с правым бедром, которое служило контролем. Гистологический анализ показал, что имплантация каркасов из нановолокон хитозана не приводит к гепатотоксичности или нефротоксичности. Результаты свидетельствовали о потенциале каркасов из нановолокон хитозана для лечения заболеваний костей, включая дефекты костей и переломы костей [220].

3.3. Биологически активные свойства композитов гидроксиапатита хитозана³

В связи с тем, что цыплят и бройлеров содержат в тесных помещениях при искусственном освещении, а также в связи с неполноценностью рациона у них наблюдается склонность к гиповитаминозу, внутренним незаразным болезням, иммунодефициту, а именно дефициту кальция и фосфору. Следует отметить, что это отрицательно сказывается на повышение живой массы

³ Эксперименты проведены совместно с учеными Самаркандского Государственного университета Ветеринарной медицины, животноводства и биотехнологий

бройлеров и яйценоскости кур. А иногда вызывает остеопороз и остеомалацию. С целью повышения иммунной системы цыплят и для определения оптимальной дозы водимых ХЗ/ГА в сыворотке крови цыплят и обеспечения в организме стабильного Са-Р баланса а также изучено влияние без добавления витаминно-минеральных веществ в рацион цыплят-бройлеров. Для этого контролировали продолжительность испытания и дозу порошка ХЗ/ГА, добавляемой в их рацион. Биологически активные свойства ХЗ/ГА изучены в лабораторных условиях на 100 однодневных цыплятах породы "Росс-308" с добавлением в их рацион 25-40 мг/кг порошков композита. Затем цыплята разделены на 10 групп и фиксировано изменение их веса через каждые 10 дней. В течение 30-дневного эксперимента контрольная группа цыплят №1 кормилась стандартным рационом (табл. 3.3) [221-222].

Таблица 3.3

Стандартный рацион цыплят-бройлеров (% добавок на 100 кг корма)

№	Состав стандартного рациона	Количество корма
1	Соевая мука	20 кг
2	Кукуруза	32,6 кг
3	Пшеница	25,6 кг
4	Подсолнечная мука	7,3 кг
5	Хлопковая мука	2 кг
6	Растительное масло	2 литр
7	Метионин	51 г
8	Ортофосфат кальция	1780 г
9	Известняк	8,22 г
10	Соль	50 г

В экспериментальных группах №2-10 в их рацион вместо витаминов и премиксов добавлены порошки ХЗ/ГА в течение 15-25 дней, а результаты получены на 30 день (табл. 3.4). Эффективность композитов, использованных в экспериментах, оценивали на основании выживаемости цыплят и увеличением их живой массы. Изучено влияние ХЗ/ГА на сохранность и прирост массы цыплят. Результаты показывают, что при добавлении в состав корма 25-40 мг/кг хитозанового апатита наблюдалась 100% сохранность, а привес составлял 71,5-75,5%. Биодобавка ХЗ/ГА эффективно влияла на морфологические показатели и лейкоцитарную формулу крови, что способствовало достоверному увеличению числа эритроцитов и гемоглобина. Так как уровень

гемоглобина был на 11-12% выше, чем у цыплят контрольных групп. Результаты хорошо согласуются с литературными данными [223].

В результате исследования уровень выживаемости цыплят контрольной группы составила 90%, а выживаемость цыплят опытных групп №2-10, где в рацион добавляли ХЗ/ГА в дозе 25-40 мг/кг достигала 100 %.

Таблица 3.4

Влияние гидроксипатита хитозана *Bombux mori* на увеличение живой массы цыплят и их выживаемость. Продолжительность испытаний 30 дней

№	Группы	Доза ХЗ/ГА, (мг/кг)	Продолжительность добавления в корму ХЗ/ГА, дней	Средняя живая масса 1 цыпленка в начале опыта (г)	Живая масса 1 цыпленка после 30 дней (г)	Выживаемость, (в %)	Увеличение средней живой массы цыплят, (в%)
1	Контроль ХЗ/ГА	-	Стандартный рацион	310	1350	90	67,5
2		25	10-20	310	1200	100	60,0
3		30	10-20	313	1250	100	62,5
4		35	10-20	309	1290	100	64,5
5		40	10-20	311	1350	100	67,5
6		25	15-25	313	1250	100	62,5
7		30	15-25	309	1340	100	67,0
8		35	15-25	312	1430	100	71,5
9		40	15-25	311	1510	100	75,5

Ранее было установлено, что уровень хитозана до 5,0 г/кг снижает эффективность усвоения азота, возможно, что высокий уровень хитозана препятствует усвоению аминокислот, угнетает рост и снижает прибавку массы тела. Это свидетельствует о наличии порога концентрации добавок хитозана, при котором они перестают быть полезными для рациона цыплят [221, 224]. По-видимому, поэтому применение гидроксипатита хитозана в дозах 10-40 мг/кг не способствовало увеличению прироста живой массы, однако повысилась выживаемость и устойчивость к болезням подопытных цыплят.

В период испытаний живая масса одного бройлера из контрольной группы увеличилась от 310 г до 1350 г. При этом выживаемость достигала 90%, а увеличение средней живой массы цыплят составляла 67,5 %. В экспериментальных группах живая масса увеличивалась от 311±2 г до 1200-1510 г, с эффективностью 100% и средняя живая масса цыплят увеличилась до 75,5%. В качестве оптимальной дозы и продолжительность введения ХЗ/ГА в рацион цыплят выбраны 40 мг/кг и 15 дней, соответственно.

За время опытов живая масса подопытных цыплят увеличилась незначительно - всего на 8%. Вероятно, это связано с отсутствием в рационе кур витаминно-минеральных добавок. Однако следует отметить, что добавление гидроксиапатита хитозана независимо от дозы приводило к повышению иммунитета цыплят и клинических симптомов инфекционных заболеваний не наблюдалось.

3.4. Изучение влияния препарата ХЗ/ГА=50:50 масс.% на количество и качество куриного мяса

Научно-исследовательские опыты в лабораторных условиях проводились в лаборатории факультета «Ветеринарной диагностики и безопасности пищевых продуктов» Самаркандского государственного университета ветеринарной медицины, животноводства и биотехнологии. С целью определения влияния препарата ХЗ/ГА на выход и качество мяса цыплят-бройлеров сформировали общую группу цыплят кросса Росс-308 из птицефабрики «Даргом Парранда Файз» Пастдаргомского района Самаркандской области, и сохранили в одиноковых условиях и кормили стандартным рационом. Когда цыплятам исполнилось 10 дней, сформировали 4 группы согласно весу по установленной методике. Разница в живой массе 100 голов цыплят составила ±5 г.

Первая группа цыплят была контрольной и их кормили стандартным рационом. В рацион цыплят из второй опытной группы вводили порошок гидроксиапатита ХЗ *Bombyx mori* (ХЗ/ГА=50:50 мас. %) по расчету - 25 мг/кг в период с 10 по 20 сутки, цыплятам третьей группы в дозе 30 мг/кг между 20 и 30 днями, а в рацион цыплят четвертой группы добавляли в норме 35 мг/кг в течение с 30 по 40 дней. Эффективность применяемых препаратов оценивали в конце опыта по уровню сохранности цыплят-бройлеров, среднему выходу и качеству мяса на голову цыпленка (табл.3.5).

**Влияние хитозана *Bombux tori* гидроксиапатита
на выход мяса и качество цыплят**

№	Образцы, мг/кг	Цыплята, принятые в разведение (голов.)	выжи- ваемость (%)	выход мяса средней головы курицы (кг)	Категории мяса (%)		
					I	II	Н/С
1	Контроль	100	94	1,671	62,3	21,7	16
2	25	100	100	1,715	67,4	16,3	16,3
3	30	100	100	1,781	75,6	17,8	6,6
4	35	100	100	1,812	81,3	14,2	4,5

Результаты опытов показали, что выживаемость цыплята контрольной группы и средний выход мяса составляли 94 % и 1671 г, соответственно. Выход мяса 1-й, 2-й и нестандартной группы постепенно снижались и достигали 62,3 %, 21,7 % и 16 %. Следует отметить, что при добавке ХЗ/ГА в корм цыплят, во всех опытных группах имели стопроцентную сохранность головня, а средний выход мяса на голову цыплят из 2, 3, 4 опытных групп составили 1715-1785-1812 г, соответственно. Качество мяса I категории 67,4-75,6-81,3 %, II категории 16,3-17,8-14,2 %, а не соответствующих стандарту имели 16,3-6,6-4,5 %.

Резюмируя, можно сказать, что добавление в рацион цыплят-бройлеров хитозана гидроксиапатита в норме расхода 25-35 мг/кг, приводит к стопроцентной сохранности цыплят, а также к увеличению выхода мяса и соответственно его качества. Полученные данные обнадеживают и поэтому эксперименты в этом направлении продолжаются.

Проведены предварительные лабораторные опыты по определению оптимальной дозы гидроксиапатита хитозана и сроков их добавления в корма для цыплят. Был составлен рацион, не включающий витамины и минералы (табл. 4.3). На 10-й день опыта до 20-го дня добавляли добавки ХЗ/ГА в модуле 25, 30, 35 и 40 мг на 1 кг корма соответственно. После этого были получены образцы крови подопытных цыплят и определено содержание Са/Р в составе их крови и сыворотки крови (табл. 3.6.)

Показано, что с увеличением дозы композита в рацион цыплят, закономерно повышалось количество кальция и фосфора соответственно. Сравнительные исследования свидетельствуют, что содержание кальция у цы-

плат контрольной группы составляло $2,2 \pm 0,415$ мМоль/л, в тоже время как в исследованной группе №4 при дозе ХЗ/ГА 40 мг/кг, в сыворотке крови цыплат-бройлеров увеличилось содержание Са до $3,5 \pm 0,354$ мМоль/л.

Таблица 3.6

Влияние различной дозы ХЗ/ГА на биохимические параметры сывороток крови цыплат-бройлеров

№	Образцы, мг/кг	Ca ²⁺ мМоль/л	P мМоль/л	Na ⁺ мг/%	K ⁺ мг/ %
1	Контроль	$2,20 \pm 0,42$	$1,4 \pm 0,87$	$364 \pm 11,8$	$22,0 \pm 10,7$
2	25	$2,31 \pm 0,38$	$2,0 \pm 0,37$	$371 \pm 20,5$	$22,0 \pm 10,6$
3	30	$2,44 \pm 0,43$	$1,7 \pm 0,69$	$365 \pm 20,2$	$22,3 \pm 11,1$
4	35	$2,75 \pm 0,29$	$2,2 \pm 0,44$	$370 \pm 20,3$	$22,4 \pm 8,11$
5	40	$3,51 \pm 0,35$	$2,3 \pm 0,51$	$364 \pm 20,1$	$22,8 \pm 11,3$

Следует отметить, что содержание фосфора увеличилось пропорционально дозе добавок ХЗ/ГА. Например, при дозе ХЗ/ГА 40 мг/кг содержание фосфора в сравнении контрольного образца увеличилось приблизительно в 1,3 раза. Аналогичные результаты были получены авторами. Было показано, что добавки фосфора, используемые в рационе бройлеров, влияют на продуктивность и характеристики их костей. Цыплята, обработанные дикальцийфосфатом (14 % доступного фосфора и 23 % кальция), имели лучшие экономические и экологические показатели [225-226].

Исследователи обнаружили, что лучшие показатели у цыплат с меньшим содержанием кальция. Вероятно, это связано с тем, что из-за образования в пищеварительной системе преципитатов ортофосфата кальция уменьшается количество свободного фосфора, пригодного для всасывания. Фактически, ионы кальция могут повышать рН кишечника и снижать растворимость и доступность минералов [227-229].

Установлено, что незначительные добавки ХЗ/ГА к стандартному рациону цыплат-бройлеров способствуют увеличению количества Са и Р в сыворотке крови, но мало влияют на количество К⁺ и Na⁺. Выявлено, что незначительные добавки ХЗ/ГА в стандартный рацион цыплат-бройлеров спо-

способствуют повышению количества Са и Р в сыворотке крови, однако слабо влияют на количество K^+ и Na^+ .

По результатам исследований влияния ХЗ/ГА на биохимические показатели сыворотки крови установлено, что количество Са и Р в опытных группах выше, чем у контрольных цыплят [230]. Это связано с тем, что элементы - Са и Р из состава ХЗ/ГА эффективно усваиваются организмом цыплят.

Итак, экспериментально установлено, что ХЗ/ГА в дозе 35-40 мг/кг в рационе цыплят увеличивает их сохранность и привесы у бройлеров. Негативного влияния на гематологические показатели их крови не оказывается. В настоящее время исследуется влияние ХЗ/ГА на иммунологический статус организма цыплят.

3.5. Изучение ХЗ/ГА на морфологические параметры и лейкоцитарную формулу крови бройлеров

Изучены морфологические параметры крови цыплят-бройлеров и установлено влияние ХЗ/ГА на содержание ретинола в печени и сыворотке крови. Для исследования выбраны 4 группы цыплят-бройлеров: группа №1-контроль, в рацион группы №2 первые 10-20 дни добавлены порошки ХЗ/ГА в дозе 25мг/кг, когда в рацион группы №3 последующие 20-30 дней добавлены порошки ХЗ/ГА в дозе 30мг/кг и в стандартный рацион цыплят из группы №4 в следующие 30-40 дней добавлены добавки гидроксиапатита хитозана в дозе 35 мг/кг. После чего определена лейкоцитарная формула всех групп цыплят на 20, 30 и 40 сутки.

Таблица 3.7

Влияние ХЗ/ГА на количество эритроцитов (10^{12} г/л) и лейкоцитов (10^9 г/л) в крови цыплят, $M \pm m$

№	Доза ХЗ/ГА, мг/кг	Эритроциты (10^{12} г/л)			Лейкоциты (10^9 г/л)		
		Период эксперимента, день					
		20	30	40	20	30	40
1	Контроль	2,62±0,07	2,64±0,10	2,68 ±0,11	29,3±1,09	29,7 ± 1,10	28,8 ±1,11
2	25	2,83±0,09	2,85±0,12	2,89 ±0,05	28,5±1,20	28,5 ± 1,25	28,1 ±2,30
3	30	2,61±0,08	2,87±0,13	2,94±0,01	28,1±1,12	28,2 ± 1,03	28,3 ±2,77
4	35	2,60±0,05	2,65±0,10	3,00 ±0,06	27,9±1,21	28,5 ± 1,15	28,1 ±1,55

Таблица 3.8

Влияние биодобавок ХЗ/ГА различного состава на гемоглобин (г/л) и количество тромбоцитов (10^9 г/л) в крови цыплят, $M \pm m$

№	Доза ХЗ/ГА, мг/кг	Тромбоциты (10^9 г/л)			Гемоглобин (г/л)		
		Период эксперимента, день					
		20	30	40	20	30	40
1	Контроль	37,2±2,01	38,5±2,03	37,5±2,55	79,3±1,11	85,5±1,13	90,0±1,12
2	25	35,6±1,19	36,7±1,17	37,0±2,06	84,8±1,17	91,4±1,00	97,2±0,06
3	30	36,4±1,12	37,3±1,20	37,1±2,00	79,8±0,09	93,2±0,06	99,0 ±0,09
4	35	36,7±1,33	37,0±1,35	36,8±0,95	78,2±1,15	85,8±0,05	100,6±1,2

Согласно результатам исследования показано, что по сравнению с контролем в крови цыплят 2-й, 3-й и 4-й опытных групп количества эритроцитов и гемоглобина увеличились на 7-8%, 9-10% и 11-12%, соответственно. В то же время как количества лейкоцитов и тромбоцитов в крови цыплят всех опытных групп, практически не отличались от контрольной группы ($P < 0,05$) (табл. 3.7-3.8).

Выявлено, что добавление порошков композита ХЗ/ГА=50:50 масс.% в рацион цыплят-бройлеров, независимо от периода введения, способствует увеличению количества эритроцитов и гемоглобина в крови цыплят. Резюмируя можно сказать, что композиты на основе хитозана и гидроксиапатита в счет синергетического эффекта положительно влияют на морфологические показатели крови.

Установлено, что добавление в рацион цыплят-бройлеров порошков состава ХЗ/ГА=50:50 масс.%, независимо от срока введения, способствует увеличению количества эритроцитов и гемоглобина в крови цыплят-бройлеров цыплята. Обобщая можно понять, что композит на основе хитозана и гидроксиапатита за счет синергетического эффекта оказывает положительное влияние на морфологические показатели крови. По-видимому, включение ХЗ/ГА в рацион цыплят стимулирует деятельность органов кроветворения [221].

Таблица 3.9

**Влияние ХЗ/ГА на количество базофилы (%) и
эозинофилы (%) (10^{-9} г/л) в крови цыплят, $M \pm m$**

№	Доза ХЗ/ ГА, мг/кг	Базофилы (%)			Эозинофилы(%)		
		Период эксперимента, день					
		20	30	40	20	30	40
1	Контроль	2,3±0,33	2,3±0,33	2,3±0,33	3,5±0,32	3,5±0,33	3,5±0,67
2	25	2,3±0,66	2,3±0,67	2,3±0,33	3,6±0,64	3,7±0,67	3,3±0,88
3	30	2,3±0,32	2,3±0,33	2,3±0,88	3,4±0,35	3,3±0,33	3,7±0,67
4	35	2,1±0,87	2,0±0,88	2,3±0,33	3,6±0,58	3,7±0,57	3,3±0,33

Примечание: $P \geq 0,05$

Количество базофилов в крови цыплят контрольной группы в течение 40 суток осталось постоянным и составило $2,3 \pm 0,33$ %. Количество базофилов в крови цыплят подопытных групп №2 и №4 в период эксперимента незначительно уменьшалось от $2,3 \pm 0,66$ % до $2,3 \pm 0,33$ %. У цыплят 3-й опытной группы наблюдалось повышение количества базофилов от $2,3 \pm 0,32$ % до $2,3 \pm 0,88$ %. Видно, что в контрольной группе за 20-40 дней количество эозинофилов в крови цыплят увеличилось слабо от $3,5 \pm 0,32$ % до $3,5 \pm 0,67$ %. Когда их количество в крови цыплят опытной группы №2 с добавлением хитозана *Bombux mori* гидроксиапатита в дозе 25 мг/кг, снизилось от $3,6 \pm 0,64$ % до $3,3 \pm 0,88$ % в течение 40 дней. Хотя, отмечалось снижение количества эозинофилов в сыворотке крови цыплят опытной группы №3 от $3,4 \pm 0,35$ % (20 суток) до $3,3 \pm 0,33$ % на 30-е сутки и повышение до $3,7 \pm 0,67$ % на 40 суток. При добавлении в стандартном рационе 35 мг/кг добавок ХЗ/ГА, количество эозинофилов у опытной группы №4 эозинофилы увеличились в их крови от $3,6 \pm 0,58$ % до $3,7 \pm 0,57$ % на 30-е сутки, и на 40-е сутки наблюдалось резкое снижение до $3,3 \pm 0,33$ % (табл. 3.9).

Обнаружено, что количество псевдоэозинофилов в крови цыплят контрольной группы неравномерно меняется в ходе эксперимента. Например, наблюдалось увеличение на 20-й день с $27,5 \pm 1,20$ % до $28,4 \pm 1,21$ % на 30-й день, а на 40-й день опять снизилось до $27,5 \pm 2,05$ % (табл. 3.10).

Количество псевдоэозинофилов в крови цыплят 2-й опытной группы, получавших хитозан *Bombux mori* гидроксиапатита в дозе 25 мг/кг, в течение

периода опыта псевдоэозинофилы постепенно увеличивалось на 20-30-40-е сутки на $26,1 \pm 1,74\%$, $27,0 \pm 1,84\%$ и $28,0 \pm 2,42\%$, соответственно. Добавление 30 мг/кг ХЗ/ГА к стандартному рациону приводило к увеличению количества псевдоэозинофилов в крови цыплят 3-й группы: на 20-30-40 е сутки на $25,1 \pm 2,12\%$, $26,4 \pm 2,33\%$ и $27,3 \pm 1,75\%$.

Таблица 3.10

Влияние ХЗ/ГА на количество псевдоэозинофилов (%) и моноцитов (%) (10^{-9} г/л) в крови цыплят, $M \pm m$

№	Доза ХЗ/ГА, мг/кг	Псевдоэозинофилы (%)			Моноциты (%)		
		Период эксперимента, день					
		20	30	40	20	30	40
1	Контроль	$27,5 \pm 1,2$	$28,4 \pm 1,2$	$27,5 \pm 2,1$	$4,5 \pm 0,31$	$4,5 \pm 0,33$	$4,5 \pm 1,2$
2	25	$26,1 \pm 1,7$	$27,0 \pm 1,8$	$28,0 \pm 2,4$	$4,3 \pm 0,34$	$4,3 \pm 0,33$	$4,3 \pm 0,9$
3	30	$25,1 \pm 2,1$	$26,4 \pm 2,3$	$27,3 \pm 1,7$	$4,3 \pm 0,32$	$4,3 \pm 0,33$	$4,3 \pm 1,8$
4	35	$26,2 \pm 1,7$	$26,6 \pm 1,8$	$27,2 \pm 2,1$	$4,3 \pm 0,87$	$4,3 \pm 0,88$	$4,3 \pm 0,3$

Примечание: $P \geq 0,05$

Следует отметить, что увеличение количества добавляемого в рацион апатита ХЗ до 35 мг/кг, практически не повлияло на объем псевдоэозинофилов в крови цыплят опытной группы №4, т.е. зарегистрировалось увеличение от $26,2 \pm 1,75\%$ до $27,2 \pm 2,11\%$ в период эксперимента. Таким образом установлено, что при добавлении апатита ХЗ в рацион цыплят-бройлеров в дозе >30 мг/кг препарат не влияет на количество структур в их крови (табл. 3.10) [221].

Результаты свидетельствуют, что количество лимфоцитов в крови цыплят всех контрольных и подопытных групп повышается. Например, за время эксперимента в контрольной группе цыплят лимфоциты в крови увеличились слабо: на 20-40е сутки оно составило $57,3 \pm 2,13\%$, $58,3 \pm 2,14\%$ и $59,5 \pm 1,10\%$, соответственно (табл. 3.11).

Таблица 3.11

**Влияние биодобавок ХЗ/ГА на количество лимфоцитов (%) в
крови цыплят $M \pm m$**

№	Доза ХЗ/ГА, мг/кг	Лимфоциты (%)		
		Период эксперимента, день		
		10	20	30
1	Контроль	57,3±2,13	58,3±2,14	59,5±1,10
2	25	58,3±3,72	59,3±3,73	60,0±3,20
3	30	56,6±2,14	58,5±2,15	59,8±2,59
4	35	57,4±3,76	58,2±3,77	59,0±3,33

Примечание $P > 0,05$

Можно наблюдать, что количество лимфоцитов в крови цыплят опытной группы №2, которым в корм добавляли 25 мг/кг гидроксиапатита ХЗ, в ходе эксперимента значительно увеличилось. Например, на 20-40е сутки повышение составило 2%. При добавлении в рацион цыплят 3-й опытной группы ХЗ-гидроксиапатита в дозе 30 мг/кг количество лимфоцитов увеличилось с 56,6±2,14% до 58,5±2,15% и 59,8±2,59% на 40-е сутки. Слабое увеличение числа лимфоцитов от 57,4±3,76 % до 59,0±3,33 % наблюдалось у цыплят опытной группы №4. Согласно результатам, можно сделать вывод, что в экспериментальных группах, получавших гидроксиапатит ХЗ *Bombux mori*, не было существенного изменения по сравнению с контрольной группой, и не было обнаружено отрицательного влияния на количество кровяных элементов (табл. 3.11) [231-232].

В период эксперимента, в течение 10-20-30 дней, спектрофотометрическим методом проверяли количества витамина А в печени и сыворотке крови цыплят (табл. 3.12).

Таблица 3.12.

**Влияние биодобавок ХЗ/ГА на уровни витамина
А в куриной печени и сыворотке (мкмоль/л) ($M \pm m$)**

№	Доза ХЗ/ ГА, мг/кг	Витамин А в печени (мкмоль/л)			Витамины А сыворотки (ммоль/л)		
		Период эксперимента, день					
		10	20	30	10	20	30
1	Контроль	91,16±1,29	110,42±1,9	140,05±2,55	1,17±0,07	1,59±0,07	1,62± 0,03
2	25	97,54±0,03	118,7±0,03	149,85±0,03	1,25±0,03	1,71±0,03	1,74±0,03
3	30	90,06±1,29	120,35±0,1	152,65±0,03	1,12±0,03	1,47±0,01	1,77±0,03
4	35	91,11±1,13	111,6±0,07	155,45±0,03	1,11±0,03	1,56±0,07	1,79±0,03

Примечание Р- $\geq 0,05$

Следует отметить, что при добавлении в рацион цыплят биодобавок - ХЗ/ГА, в период эксперимента содержание витамина А в печени составляло от 90,06 (10 день) до 155,45 ммоль/л (30 день), $R > 0,05$, а количество ретинола в сыворотке крови - от 7,5 до 10% $R > 0,05$. В остальных экспериментальных группах количество витамина А в печени и сыворотке цыплят существенно не отличалось от количества витамина А у цыплят контрольной группы. Выявлено, что количество витамина А и ретинола в сыворотке крови цыплят 2-й опытной группы при добавлении в корм 25 мг/кг ХЗ/ГА, увеличилось на 7,5-8% (табл. 3.12).

Содержание ретинола в сыворотке крови и печени цыплят 3-й опытной группы, получавших в рационе 30 мг/кг ХЗ/ГА в течение 20-30 дней, повышалось на 9-10%, а также в период 30-40 дней. 40 дней при добавлении в комбикорм 35 мг/кг ХЗ/ГА. Установлено, что количество витамина А в сыворотке крови и составе печени цыплят 4-й опытной группы увеличилось на 11-12%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидроксиапатит хитозана положительно влияет на количество витамина А в печени и сыворотке крови кур, а препарат обладает иммуномодулирующими свойствами. Содержание ретинола в сыворотке крови и печени цыплят 3-й опытной группы, получавших в рационе 30 мг/кг ХЗ/ГА в течение 20-30 дней, повышалось на 9-10%. Установлено, что количество витамина А в сыворотке крови и составе печени цыплят 4-й опытной группы, получавших в корме 35 мг/кг

ХЗ/ГА в период 30-40 дней, увеличилось на 11-12%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что гидроксипатит хитозана положительно влияет на количество витамина А в печени и сыворотке крови кур, а препарат обладает иммуномодулирующими свойствами [221, 231-232].

3.6. Определение влияния гидроксипатита хитозана *Bombux mori* на иммунные показатели организма цыплят и продолжительности после вакцинации цыплят-бройлеров против Ньюкаслской и инфекционной болезней бронхита

Согласно методике, для опытов были сформированы 4 группы 10-дневных цыплят рода «Росс-308». В каждом варианте группированы по 25 цыплят, с разницей живой массы ± 5 г. В частности, цыплята 1-ого варианта являлись контрольной группой и до конца 45-дневного опыта кормили стандартным рационом. Цыплятам подопытных групп № 2-3 и №4 в скармливали с добавкой гидроксипатита хитозана *Bombux mori* в разном количестве и продолжительности по разработанной схеме. Цыплята первой группы служили контролем. Их кормили на стандартной диете без добавок апатита. Цыплятам второй опытной группы вводили 25 мг/кг препарата гидроксипатит хитозана *Bombux mori* в период между 10-ми и 20-ми сутками, цыплятам третьей группы в рацион добавлены 30 мг/кг в период 20-30 суток, а четвертой опытной группе в корм добавили 35 мг/кг ХЗ/ГА в интервале 30-40 суток.

Всего было исследовано 100 проб крови, из них 30 на иммунитет к болезни Ньюкасла, 30 на куриный инфекционный бронхит и 40 на иммунологические показатели. Иммунологические исследования крови проводились в лаборатории НИИ Ветеринарии Тайлакского района Самаркандской области. Количество Т-лимфоцитов определяли с помощью образования самореакции с эритроцитами барана (Э-камень): В-лимфоцитов - определяли с помощью образования комплементарной розетки с эритроцитами крупного рогатого скота.

Эффективность иммунитета после вакцинации оценивали методами ИФА и РПГА при исследовании сыворотки крови на состав специфических антител на базе производственно-технологической лаборатории птицефабрики. Цифровой материал, полученный в ходе экспериментальных исследований, обрабатывали биометрическими методами с использованием таблицы Стьюдента с использованием интегрированной программы Excel. $P \leq 0,05$

Результаты исследования. Изначально цыплят группы сравнительного контроля в течение 45-суточного опыта кормили стандартным рационом, без добавок. цыплятам опытной группы № 2, 3 и 4 вводили 25, 30, 35 мг/кг порошок иммуномодулятора ХЗ/ГА=50:50 на 1 кг корма в течение 10 дней, начиная с 10-го дня. Показатели эффективности применяемых препаратов в разном количестве и продолжительности оценивали в течение 45-дневного экспериментального периода по иммунологическим показателям в крови цыплят и иммунному титру болезни Ньюкасла и инфекционного бронхита.

Таблица 3.13.

Влияние ХЗ/ГА на ряд иммунологических показателей в крови цыплят, $M \pm m$

№	ХЗ/ГА, мг/кг	Сроки доставки	Лейкоциты, тыс./мкл	Лимфоциты	
				Т, тыс./мкл	Б, тыс./мкл
1	Контроль	-	25,0±0,7	2,24±0,32	2,53±0,32
2	25	10-20	28,7±0,8***	2,51±0,6**	2,72±0,27***
3	30	20-30	31,1±0,6***	2,60±0,59***	2,85±1,17**
4	35	30-40	32,3±1,0***	2,67±0,80***	3,01±1,12**

Примечание: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Таблица 3.14

Специфическая резистентность цыплят к вирусу болезни Ньюкасла при использовании ХЗ/ГА=50:50 масс. %

№	ХЗ/ГА, мг/кг	Возраст цыплят			
		10 дней		40 дней	
		Средний титр, \log_2	Количество цыплят с иммунитетом, %	Средний титр, \log_2	Количество цыплят с иммунитетом, %
1	Контроль	3,35	64	3,84	72
2	25	3,58	67	4,54	92
3	30	3,75	72	4,59	95
4	35	3,85	76	4,65	93

Результаты 45-дневного опыта показали (табл. 3.13), что цыплята группы сравнительного контроля имели 100% выживаемость. Средний иммунный индекс одной головы цыплят в конце опыта был следующим: опытная груп-

па №2, при введении ХЗ/ГА в дозе 25мг/кг корма, иммунный индекс цыплят составил 14,8%, Т-В лимфоциты 12,0%-7,5%, иммунный титр в Ньюкасле 10-40 дней 6,86%-18,2%. В опытной группе №3 при в скармливании ХЗ/ГА в дозе 30 мг/кг комбикорма иммунный индекс цыплят составил 24,4%, Т-В-лимфоцитов 16,0% и 12,64%, иммунный титр болезни Ньюкасла 10-40 дней 6,86%-18,2%. 4-опытная группа ХЗ/ГА при в скармливании 25мг/кг корма иммунный индекс цыплят составил 29,2%, Т-В-лимфоциты 19,2%-18,9%, иммунный титр Ньюкасла 10-40 дней 14,92%-21, составил 1%.

Полученные данные представляют интерес в применении гидроксиапатита хитозана в профилактике и лечении остеопороза и остеомалации, а также для повышения яйценоскости кур.

Заключение к главе 3

Разработан лабораторный регламент на способ получения композитов ХЗ/ГА и следует отметить, что он весьма технологичен, не требует дорогостоящего оборудования и в Республике имеется сырьевая база. Показано, что препарат не токсичен (LD_{50} = 5000 мг/кг).

Длительное введение препарата в организм животных, с экспериментальным остеопорозом привело к повышению массы бедренной кости, уплотнению кости и увеличению содержания кальция в золе костей животных. Полученные данные представляют прикладной интерес применения ХЗ/ГА для профилактики и лечения остеопороза и замены костной ткани живых организмов.

Порошки ХЗ/ГА были добавлены в рацион бройлеров и показано их положительное влияние на физиологическое состояние цыплят, а также на морфологические и некоторые биохимические показатели их крови. Соответственно установлено, что добавление ХЗ/ГА в дозе 40 мг/кг в рацион цыплят способствует поддержанию баланса Са и Р и легко усваивается их организмом. В настоящее время изучается влияние ХЗ/ГА на иммунологический статус цыплят.

Отечественный препарат ХЗ/ГА в Республике не имеет аналогов, является импортозамещающим и экспортоориентированным препаратом в ветеринарии. И в будущем представляет прикладной интерес в создании препаратов для профилактики и лечении остеопороза, остеомалации, а также в качестве костных имплантатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dhanwal DK, Dennison EM, Harvey NC, Cooper C; (2011). Epidemiology of hip fracture: Worldwide geographic variation. *Indian J Orthop.* 45(1), 15-22. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.73656>
2. Tikhonovich L; (2010). Osteoporosis: killer No 4. *Filantrop. Electronic mag. ab. charity.* <https://philanthropy.ru/environment/2010/10/05/3708/>
3. Thomas MS, Koshy RR, Mary SK et al; (2019). Starch, chitin and chitosan based composites and nanocomposites. *Springer Briefs in Mol Sci, Biobased Poly, Cham, Switz.* 65. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-03158-9>
4. Varlamov VP, Il'ina AV, Shagdarova BTs et al; (2020). Chitin/chitosan and its derivatives: fundamental problems and practical approaches. *Biochem.* 85 (S1), 154-176. <https://doi.org/10.1134/S0006297920140084>
5. Rashid S, Shen, Chensi YJ, Liu J, Li J; (2017). Preparation and properties of chitosan-metal complex: Some factors influencing the adsorption capacity for dyes in aqueous solution. *J of Environmental Sci.* S1001074216308762. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.04.033>
6. Vokhidova NR, Ergashev KH, Rashidova SSh; (2022). Synthesis and application of chitosan hydroxyapatite: Review. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives.* 27, 5-34. <https://doi.org/10.15259/PCACD.27.001>
7. Szczepański R, Gadomska L, Michalak M, Bakun P, Pawlak K, Goslinski T, Ziegler-Borowska M, Czarczynska-Goslinska B; (2020). Chitosan-derivatives in combinations with selected porphyrinoids as novel hybrid materials for medicine and pharmacy. *Prog Chem Appl Chitin Deriv* 25, 63-78. <https://doi.org/10.15259/PCACD.25.005>
8. Randy ChFCh, Tzi BN, Jack HW, Wai YCh; (2015). Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar. Drugs* 13, 5156-5186. <https://doi.org/10.3390/md13085156>
9. Vokhidova NR, Ergashev KH, Rashidova SSh; (2020). Hydroxyapatite chitosan *Bombyx mori*: synthesis and physicochemical properties. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials.* 30, 3357-3368. <https://doi.org/10.1007/s10904-020-01649-9>

10. Il'ina AV, Shagdarova BTs, Lunkov AP, Varlamov VP; (2020). The formation of hydrogels based on chitosan and its water-soluble derivatives. *Prog Chem Appl Chitin Deriv.* 25, 5-15. <https://doi.org/10.15259/PCACD.25.001>
11. Arca HC, Senel S; (2008). Chitosan based systems for tissue engineering Part 1: Hard tissues. *Fabad J Pharm Sci.* 33(1), 35-49. <http://dergi.fabad.org.tr/pdf/volum33/issue1/035-050.pdf>
12. Martin RV, Brenda VR, Rodrigo RZ, Daniel ASK, Luis FQO; (2015). Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine. *BioMed Res Int.* 821279. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/821279>
13. Drewnowska O, Turek B, Carstanjen B, Gajewski Z; (2013). Chitosan – a promising biomaterial in veterinary medicine. *Polish J of Vet Sci.* 16(4), 843-848. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0119>
14. Arca HG, Senel S; (2008). Chitosan based systems for tissue engineering Part II: Soft tissues. *Fabad J. Pharm. Sci.* 33, 211-216. <http://dergi.fabad.org.tr/pdf/volum33/issue4/211-226.pdf>
15. Islam M, Shahruzzaman Md, Biswas Sh et al; (2020). Chitosan based bioactive materials in tissue engineering applications. A review. *Bioac Mat.* 5(1), 164-183. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.01.012>
16. Kucharska M, Ciechańska D, Niekraszewicz A, et al; (2010). Potential use of chitosan – based materials in medicine. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its* 15, 169-176. [http://www.ptchit.lodz.pl/pliki/PTChit_\(6jc08cdm27pqxjld\).pdf](http://www.ptchit.lodz.pl/pliki/PTChit_(6jc08cdm27pqxjld).pdf)
17. Hengameh H, Mehdi B; (2009). Applications of biopolymers I: chitosan. *Monatsh Chem.* 140(12), 1403-1420. <https://doi.org/10.1007/s00706-009-0197-4>
18. Dorozhkin SV; (2009). Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine. *Materials* 2, 1975-2045. <https://doi.org/10.3390/ma2041975>
19. Rasskazova LA; (2015). Technology of obtaining magnesium-and silicon-modified hydroxyapatites and bioresorbable composite materials using lactic acid polymers. *Diss. Tomsk* 27. (in Russian)
20. Mohd Pu'ad NAS, Abdul Haq RH, Mohd Noh H, et al; (2020). Synthesis method of hydroxyapatite: A review. *Materials Today: Proceedings.* S2214785320341389. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.536>

21. Pai Sh, Kini MS, Selvaraj R, Pugazhendhi A; (2020). A review on the synthesis of hydroxyapatite, its composites and adsorptive removal of pollutants from wastewater. *J Water Process Eng.* 38, 101574. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101574>
22. Qi ML, He K, Huang ZN, et al; (2017). Hydroxyapatite Fibers: A Review of synthesis methods. *The Minerals, Metals & Materials Society.* 69(8), 1354–1360. <https://doi.org/10.1007/s11837-017-2427-2>
23. Stepuk AA, Veresov AG, Putlyaev VI, Tretyakov YuD; (2007). The Influence of NO_3^- , CH_3COO^- and Cl^- ions on the morphology of calcium hydroxyapatite crystals. *Dokl Phys Chem.* 412(1), 11–14. <https://doi.org/10.1134/S0012501607010046>
24. Mohd Pu'ad NAS, Abdul Haq RH, Mohd Noh H, et al; (2020). Synthesis method of hydroxyapatite: A review. *Materials Today: Proceedings.* S2214785320341389–. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.536>
25. Tsuber VK, Lesnikovich LA, Kulak AI, et al; (2006). Synthesis, identification and determination of impurities in bioactive hydroxyapatite. *Pharm Chem J.* 40(8), 455–458. <https://doi.org/10.1007/s11094-006-0151-2>
26. Safronova TV, Kuznetsov AV, Korneychuk SA, et al; (2009). Calcium phosphate powders synthesized from solutions with $[\text{Ca}^{2+}]/[\text{PO}_4^{3-}]=1$ for bioresorbable ceramics. *Cent Eur J Chem.* 7(2), 184–191. <https://doi.org/10.2478/s11532-009-0016-0>
27. Kulyashova KS, Sharkeev YP; (2011). Obtaining synthetic hydroxyapatite for the formation of biocoatings on medical implants. *Chem for Sustainable Development* 19, 447-453. <https://www.sibran.ru/upload/iblock/2ba/2bab70211f6eaa43b9697acbd5ccef82.pdf>
28. Dorozhkin SV; (2012). Amorphous calcium orthophosphates: nature, chemistry and biomedical applications. *Int Jour of Mat and Chem.* 2(1), 19-46. <https://doi.org/10.5923/j.ijmc.20120201.04>
29. Dorozhkin SV; (2012). Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature. *World J Methodol.* 26, 2(1), 1-17. <https://doi.org/10.5662/wjm.v2.i1.1>
30. Meyer U, Joos U, Wiesmann HP; (2004). Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering Part III. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 33, 635–641. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2004.04.005>

31. Mohamed KR, Beherei HH, El-Rashidy ZM; (2014). *In vitro* study of nano-hydroxyapatite/chitosan-gelatin composites for bio-applications. *J Adv Res* 5(2), 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.02.004>
32. Ishikawa K, Hayashi K; (2021). Carbonate apatite artificial bone. *Sci Technol Adv Mater*. 22(1), 683-694. doi:10.1080/14686996.2021.1947120
33. Liao S, Wang W, Uo M; (2005). A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. *Biomaterials*. 26(36), 7564-7571. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.050>.
34. Tadjoein ES, de Lange GL, Bronckers AL, et al; (2003). Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol* 30(3), 261-270. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2003.01099.x>.
35. Madupalli H, Pavan B, Tecklenburg MMJ; (2017). Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite. *J Solid State Chem* 255, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2017.07.025>
36. Gurin AN; (2009). Comparative assessment of the effect of various osteoplastic materials based on calcium phosphates on the healing of bone defects. *Diss. Moscow*. 30-33.
37. Ishikawa K; (2019). Carbonate apatite bone replacement: learn from the bone. *J Ceram Soc Jpn*. 127(9), 595-601. <https://doi.org/10.2109/jcersj2.19042>
38. Safronova TV; (2021). Inorganic materials for regenerative medicine. *Inorganic materials*. 57(5), 467-499. <https://doi.org/10.31857/S0002337X21050067>
39. Putlyaev VI, Safronova TV; (2006). A new generation of calcium phosphate biomaterials: the role of phase and chemical compositions. *Glass and Ceramics* 63(3), 99-102. <https://doi.org/10.1007/s10717-006-0049-1>
40. Al-Zubaydi AAM; (2014). Investigation of the physicochemical properties of metal-substituted nanocrystalline calcium-deficient hydroxyapatite. *Diss. Voronej* 95-96.
41. Ivanova AA, Surmeneva MA, Tyurin AI, et al; (2016). Fabrication and physico-mechanical properties of thin magnetron sputter deposited silver-containing hydroxyapatite films. *Appl Surf Sci*. 360, 929-935. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.11.087>

42. Ramesh N, Moratti SC, Dias GJ; (2017). Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 106(5), 2046–2057. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33950>
43. Konovalova MV, Kurek DV, Litvinets SG, Martinson EA, Varlamov VP; (2016). Preparation and characterisation of cryogels based on pectin and chitosan. *Prog Chem Appl Chitin Deriv.* 21, 114-121. <https://doi.org/10.15259/PCACD.21.12>
44. Rogina, A, Rico P, Gallego FG, et al; (2016). *In Situ* hydroxyapatite content affects the cell differentiation on porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds. *Ann Biomed Eng.* 44(4), 1107-1119. <https://doi.org/10.1007/s10439-015-1418-0>
45. Zakharov NA, Sentsov Myu, Kiselev MR, et al; (2016). The influence of methylcellulose (MC) on solubility of calcium hydroxyapatite (HA) crystals in HA/MC nanocomposites. *Prot Met Phys Chem Surf.* 52(1), 89–99. <https://doi.org/10.1134/S2070205115060246>
46. Murugan R, Ramakrishna S; (2004). Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials.* 25, 3829–3835. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.016>
47. Komlev VS; (2011). Formation of microstructure and properties of calcium phosphate ceramics for bone tissue engineering. *Diss. Moscow.* 21-22.
48. Yanovskaya AA, Kuznetsov VN, Stanislavov AS, et al; (2015). Structured materials based on hydroxyapatite and gelatin for biomedical applications. *Chem Phys and Tech of Surface.* 6(4), 535-544. <https://doi.org/10.15407/hftp06.04.535>
49. Jahan F, Mathad RD; (2016). Mechanical studies on chitosan/PVA blend with calcium chloride as ionic crosslinker. *Int J Adv Eng Technol.* 4(4-2), 31-34. http://www.iraj.in/journal/journal_file/journal_pdf/6-329-148575522031-34.pdf
50. Jahan F, Mathad RD; (2016). Effect of ionic crosslinking on thermal stability of chitosan-polyvinyl alcohol polymer blend. *Int J Innov Res Technol Sci Eng.* 5(1), 1077-1083. <https://doi.org/10.15680/IJRSET.2015.0501061>
51. Sergio Andrés PC, et al; (2018). Novel biopolimeric system for bone tissue engineering: crosslinked and plasticized chitosan/polyvinyl alcohol/hydroxiapatite scaffolds. *IX Inter Sem of Biomed Eng (SIB).* Bogota. Col. <https://doi.org/10.1109/SIB.2018.8467728>

52. Azin A, Koohi AD, Padekan B; (2022). Chitosan-collagen/hydroxyapatite and tripolyphosphate nanocomposite: characterization and application for copper removal from aqueous solution. *Polym Bull.* 79, 10251-10275. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03998-y>
53. Wahl DA, Czernuszka JT; (2006). Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater.* 11, 43-56. <https://doi.org/10.22203/eCM.v011a06>
54. Haiguang Z, Lie M, Changyou G, Jiacong Sh; (2008). Fabrication and properties of mineralized collagen-chitosan/hydroxyapatite scaffolds. *Polym Adv Technol.* 19, 1590-1596. <https://doi.org/10.1002/pat.1174>
55. Monica VZ, Richard AS, Benjamin TR, et al; (2012). Physical properties and *in vitro* evaluation of collagen-chitosan-calcium phosphate microparticle-based scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomater Appl.* 28(4), 566-579. <https://doi.org/10.1177/0885328212465662>
56. Soares DG, Rosseto HL, Basso FG, et al; (2016). Chitosan-collagen biomembrane embedded with calcium-aluminate enhances dentinogenic potential of pulp cells. *Original research Basic implantodontology and biomaterials, Braz Oral Res.* 30(1), 1-10. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0054>
57. Krutko VK, Kulak AI, Musskaya ON; (2015). Electrochemical deposition of apatite-polymer coatings on titanium surface. *Physicochemical aspects of the study of clusters, nanostructures and nanomaterials.* 7, 322-328. <https://www.researchgate.net/publication/286861753>
58. Romanov DP, Khripunov AK et al; (2014). Nanotextures of composites. formed by the interaction of hydroxyapatite and cellulose *Gluconacetobacter xylinus*. *Glass Phys Chem.* 40(3), 367-374. <https://doi.org/10.1134/S1087659614030183>
59. Arkharova NA; (2017). Structure of composites based on cellulose *Gluconacetobacter xylinus* and nanoparticles of various nature. *Diss. Moscow.* 40-45.
60. Khayrullin AR, Severin AV, Khripunov AK, et al; (2013). Composites based on *Gluconacetobacter xylinus* bacterial cellulose and calcium phosphates and their dielectric properties. *Russ J Appl Chem.* 86(8), 1298-1304. <https://doi.org/10.1134/S1070427213080247>

61. Zhang J, Iwasa M, Jiang DL; (2006). Size-Controlled Hydroxyapatite Nanoparticles as Self-Organized Organic-Inorganic Composite Materials. *Advances in Science and Technology*. 53, 32–37. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/ast.53.32>
62. Mohammad Sh, Sumbul M, Reshma D, et al; (2018). Synthesis. *in vitro* characterization and screening of nano-hydroxyapatite/chitosan / *Euryale ferox* nanoensemble - a unique approach for bone tissue engineering. *New J Chem*. 42, 363–371. <https://doi.org/10.1039/C7NJ02953E>
63. Sun W, Gregory DA, Tomeh MA, Zhao X; (2021). Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 22(3), 1499. <https://doi.org/10.3390/ijms22031499>
64. Venkatesan J, Kim SK; (2010). Chitosan composites for bone tissue engineering - An Overview. *Marine Drugs*. 8, 2252–2266. <https://doi.org/10.3390/md8082252>
65. Wang X, Tan Y, Zhang B, Gu Z, Li X; (2009). Synthesis and evaluation of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites for bone grafting. *J Biomed Mater Res. Part A*. 89, 1079–1087. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32087>
66. Hassanzadeh A, Ashrafihelan J, Salehi R, et al; (2021). Development and biocompatibility of the injectable collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds as *in situ* forming hydrogel for the hard tissue engineering application. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 49(1), 136–146. <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.1877153>
67. Teng S, Lee E, Yoon B, Shin D, Kim H, Oh J; (2009). Chitosan/nanohydroxyapatite composite membranes via dynamic filtration for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res. Part A*. 88, 569–580. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31897>
68. Zhang Y, Venugopal JR, El-Turki A, et al; (2008). Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 29, 4314–4322. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.038>
69. Fauziyah M, Salsabila T, Setyawan H, Widiyastuti W; (2021). Synthesis of chitosan/hydroxyapatite nanofibers as a wound dressing via electrospinning method. *BICAME III 2020, Journal of Physics: Conference Series* 1726, 012019. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1726/1/012019>
70. Kuo Y, Lin C; (2006). Effect of genipin-crosslinked chitin-chitosan scaffolds with hydroxyapatite modifications on the cultivation of bovine knee chondrocytes. *Biotechnol Bioeng*. 95, 132–144. <https://doi.org/10.1002/bit.21007>

71. Pena J, Izquierdo-Barba I, García M, Vallet-Regí M; (2016). Room temperature synthesis of chitosan/apatite powders and coatings. *J Eur Ceram Soc.* 26, 3631–3638. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2005.12.028>
72. Hu Q, Li B, Wang M, Shen J; (2004). Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via *in situ* hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials.* 25, 779–785. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00582-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00582-9)
73. Lakrat M, Fadlaoui S, Aaddouz M, et al; (2020). Synthesis and characterization of composites based on hydroxyapatite nanoparticles and chitosan extracted from shells. *Prog Chem Appl Chitin Deriv.* 25, 32–142. <https://doi.org/10.15259/PCACD.25.010>
74. Xianmiao C, Yubao L, Yi Z, Li Z, Jidong L, Huanan W; (2009). Properties and *in vitro* biological evaluation of nano-hydroxyapatite/chitosan membranes for bone guided regeneration. *Mater Sci Eng C.* 29, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.05.008>
75. Murugesan S, Scheibel T; (2021). Chitosan-based nanocomposites for medical applications. *J Polym Sci.* 59(15), 1610–1642. <https://doi.org/10.1002/pol.20210251>
76. Madhumathi K, Shalumon K, Rani V, et al; (2009). Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol.* 45, 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.03.011>
77. Manjubala I, Ponomarev I, Wilke I, Jandt K; (2008). Growth of osteoblast like cells on biomimetic apatite-coated chitosan scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A Appl Biomater.* 8, 7–16. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30838>
78. Thein-Han W, Misra R; (2009). Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 5, 1182–1197. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.11.025>
79. Oliveira JM, Rodrigues M, Silva S, et al; (2006). Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 27, 6123–6137. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.034>

80. Liuyun J, Yubao L, Chengdong X; (2009). A novel composite membrane of chitosan-carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complex membrane filled with nano-hydroxyapatite I. Preparation and properties. *J Mater Sci Mater Med.* 20, 1645-1652. <https://doi.org/10.1007 / s10856-009-3720-6>
81. Ding S; (2007). Biodegradation behavior of chitosan/calcium phosphate composites. *Journal Non-Cryst. Solids.* 353, 2367-2373. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2007.04.020>
82. Li Q, Chen Z, Darvell B, Zeng Q, Li G, Ou G, Wu M; (2006). Biomimetic synthesis of the composites of hydroxyapatite and chitosan-phosphorylated chitosan polyelectrolyte complex. *Mater Lett.* 60, 3533-3536. <https://doi.org/10.1016 / j.matlet.2006.03.046>
83. Verma D, Katti K, Katti D; (2008). Effect of Biopolymers on structure of hydroxyapatite and interfacial interactions in biomimetically synthesized hydroxyapatite/biopolymer nanocomposites. *Ann Biomed Eng.* 36, 1024-1032. <https://doi.org/10.1007 / s10439-008-9483-2>
84. Davidenko N, Carrodegua R, Peniche C, Solís Y, Cameron R; (2010). Chitosan/apatite composite beads prepared by *in situ* generation of apatite or Si-apatite nanocrystals. *Acta Biomater* 6, 466-476. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.07.029>
85. Zhang Y, Zhang M; (2004). Cell growth and function on calcium phosphate reinforced chitosan scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 15, 255-260. <https://doi.org/10.1023 / B: JMSM.0000015485.94665.25>
86. Ehrlich H, Krajewska B, Hanke T, et al; (2006). Chitosan membrane as a template for hydroxyapatite crystal growth in a model dual membrane diffusion system. *J Membr Sci.* 273, 124-128. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2005.11.050>
87. Xiong Lu, Yang Leng, Qiyi Zhang; (2008). Electrochemical deposition of octacalcium phosphate micro-fiber/chitosan composite coatings on titanium substrates. *Surf Coat Technol.* 202(13), 3142-3147. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2007.11.024>
88. Pang X, Zhitomirsky I; (2005). Electrodeposition of composite hydroxyapatite-chitosan films. *Mater Chem Phys.* 94, 245-251. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2005.04.040>

89. Huang Z, Dong Y, Chu C, Lin P; (2008). Electrochemistry assisted reacting deposition of hydroxyapatite in porous chitosan scaffolds. *Mater Lett.* 62, 3376–3378. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.03.045>
90. Shi YY, Li M, Liu Q, et al; (2016). Electrophoretic deposition of graphene oxide reinforced chitosan–hydroxyapatite nanocomposite coatings on Ti substrate. *J Mater Sci Mater Med.* 27, 48. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5634-9>
91. Pang X, Zhitomirsky I; (2007). Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite-chitosan coatings. *Mater Charact.* 58, 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2006.05.011>
92. Yuan H, Chen N, Lu X, Zheng B; (2008). Experimental study of natural hydroxyapatite/chitosan composite on reconstructing bone defects. *J Nanjing Med Univ.* 22, 372–375. [https://doi.org/10.1016/S1007-4376\(09\)60009-5](https://doi.org/10.1016/S1007-4376(09)60009-5)
93. Balouiri M., Sadiki M., Ibensouda SK; (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharm Anal.* 6, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
94. Phakamat T, Pasutha T, Wanpen T; (2008). Chitosan/Calcium Phosphate Composites Scaffolds Prepared by Membrane Diffusion Process. *J Met Mater Miner.* 18(2), 67-71. <http://www.jmmm.material.chula.ac.th/index.php/jmmm/article/download/313/356>
95. Maria R, Haberko K, Danuta C, Antoni N, Magdalena K; (2008). Hydroxyapatite - chitosan biocomposites. *Polish Chitin Society.* 13, 89-94. <http://31.186.81.235:8080/api/files/view/49171.pdf>
96. Danilchenko SN, Kalinkevich OV, Pogorelov MV, Kalinkevich AN; (2009). Chitosan–hydroxyapatite composite biomaterials made by a one step co-precipitation method: preparation, characterization and *in vivo* tests. *Journal of Biological Physics and Chemistry.* 9(3), 119–126. <https://doi.org/10.4024/22DA09A.jbpc.09.03>
97. Teng ShH, Lee EJ, Yoon BH, Shin DS, Kim HE, Oh JS; (2009). Chitosan/nanohydroxyapatite composite membranes via dynamic filtration for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res.* 88A(3), 569–580. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31897>

98. Starikov VV, Rudchenko SO; (2010). Optimization of the properties of a composite based on hydroxyapatite and chitosan by varying its composition and heat treatment modes. Vestnik KhNU Series Physics 915(14), 35-39. http://physics.karazin.ua/doc/v_14_2010/10SVVSRT.pdf
99. Ramli RA, Adnan R, Abu Bakar M, Masudi S; (2011). Synthesis and characterisation of pure nanoporous hydroxyapatite. J Phys Sci. 22(1), 25–37. <http://web.usm.my/jps/22-1-11/22.1.2.pdf>
100. Pogorielov MV, Gusak YeV, Babich IM, et al; (2014). Trake elements sorption by the chitosan-based materials. J Clin Exp Med Res. 2(1), 88-99. <https://oaji.net/articles/2014/785-1401266265.pdf>
101. Sukhodub LF, Sukhodub LB, Chorna IV; (2016). Chitosan-apatite composites: synthesis and properties. Biopolym Cell. 32(2), 83–97. <https://doi.org/10.7124/bc.000910>
102. Okada T, Nobunaga Y, Konishi T, et al; (2017). Preparation of chitosan-hydroxyapatite composite mono-fiber using coagulation method and their mechanical properties. Carbohydr Polym. 175, 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.072>
103. Tomasz S, Agnieszka KR, Jakub Z, et al; (2015). Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan composites. Physicochem Probl Miner Process. 51(2), 575–585. <https://doi.org/10.5277/ppmp150217>
104. Pighinelli L, Kucharska M; (2013). Properties of microcrystalline chitosan-calcium phosphate complex composite. J Biomater Nanobiotechnol. 4, 20-29. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2013.44A003>
105. Li XY, Nan KH, Shi Sh, Chen H; (2012). Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan cross-linking composite membrane Intended for tissue engineering. Int J Biol Macromol. 50(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.09.021>
106. Ruphuy G, Weide T, Lopes JCB, et al; (2018). Preparation of nano-hydroxyapatite/chitosan aqueous dispersions: from lab scale to continuous production using an innovative static mixer. Carbohydr Polym. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.123>
107. Suetenkov DYe, Terentyuk GS, Karagaychev AL, Lyasnikova AV; (2011). Immunological Effects Used of Orthodontic Microimplants with Modified Coat:

- an Animal Study. *Saratov J Med Sci Res.* 7(1), 262-266. https://ssmj.ru/system/files/2011_01_pril_262-266.pdf
108. Emad El-M, Abu-Elsaad NI, Abeer MEI-K, Manar AI; (2018). Improvement of physicochemical properties of dextran-chitosan composite scaffolds by addition of nano-hydroxyapatite. *Scientific Reports.* 8, 12180. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30720-2>
109. Shaikhaliev AI, Krasnov MS et al; (2016). Influence of the chemical nature of implantation materials on the course of regenerative processes in the bone bed. *Biophysics.* 61(4), 813–822. (in Russian)
110. Maria Jucelia L.D et. al; (2019). The impact of the ionic cross-linking mode on the physical and in vitro dexamethasone release properties of chitosan/hydroxyapatite beads. *Molecules.* 24(4510), 1-20. <https://doi.org/10.3390/molecules24244510>
111. Sharifianjazi F, Khaksar S, Esmaeilkhanian A, et al; (2022). Advancements in fabrication and application of chitosan composites in implants and dentistry: A Review. *Biomolecules.* 12, 155. <https://doi.org/10.3390/biom12020155>
112. Kikuchi M, Ikoma T, Itoh S, et al; (2004). Biomimetic synthesis of bone like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Compos Sci Technol.* 64, 819–825. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2003.09.002>
113. Mahdavinia GR, Karimi MH, Soltaniniya. M, Massoumi B; (2019). *In vitro* evaluation of sustained ciprofloxacin release from κ -carrageenan-crosslinked chitosan/hydroxyapatite hydrogel nanocomposites. *Int. J Biol Macromol.* 126. 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.240>
114. Zhang Y, Ni M, Zhang M, Ratner B; (2003). Calcium phosphate chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 9, 337-345. <https://doi.org/10.1089/107632703764664800>
115. Fathi MH, Hanifi A, Mortazavi V; (2008). Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *J Mater Process Technol.* 202(1-3), 536-542. <https://doi.org/10.1016/J.JMATPROTEC.2007.10.004>
116. Kwon SH, Jun YK, Hong SH, Kim HE; (2003). Synthesis and dissolution behavior of β -TCP and HA/ β -TCP composite powder. *J Eur Ceram Soc.* 23(7), 1039-1045. [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(02\)00263-7](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(02)00263-7)

117. Dorozhkin SV; (2016). Calcium orthophosphates (CaPO_4): occurrence and properties. *Prog Biomater* 5, 9-70. <https://doi.org/10.1007/s40204-015-0045-z>
118. Dorozhkin SV; (2013). Self-setting calcium orthophosphate formulations. *Journal of Functional Biomaterials*. 4, 209-311. <https://doi.org/10.3390/jfb4040209>
119. Dorozhkin SV; (2012). Nanodimensional and nanocrystalline calcium orthophosphates. *IJCMR*. 1(6), 105-174. <https://doi.org/10.5923/j.ajbe.20120203.01>
120. Le HR, Qu S, Mackay RE, Rothwell R; (2012). Fabrication and mechanical properties of chitosan composite membrane containing hydroxyapatite particles. *J Adv Ceram*. 1(1), 66-71. <https://doi.org/10.1007/s40145-012-0007-z>
121. Nitin EG, Pratheesh MD, Amar N, et al; (2012). Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. *Vet World*. 5(8), 499-507. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2012.499-507>
122. Vedyeva AP; (2016). Combined bioimplants for tissue regeneration in reconstructive surgery of the oral cavity (Experimental justification, clinical implementation). *Diss. Saratov P*. 59-70, 79-82, 292. (in Russian)
123. Mania S, Banach A, Tylingo R; (2020). Review of current research on chitosan as a raw material in three-dimensional printing technology in biomedical applications. *Prog Chem Appl Chitin Deriv*. 25, 37-50. <https://doi.org/10.15259/PCACD.25.003>
124. Gortynska EN, Pogorielov MV; (2014). Periimplant zone morphology after application of the nanocomposite osteoplastic material. *Nanotechnology Research and Practice*. 2(2), 73-79. <https://doi.org/10.13187/ejnr.2014.2.73>
125. Fabiola VC, Héctor MR, Sergio HD, et al; (2017). Pilot study using a chitosan-hydroxyapatite implant for guided alveolar bone growth in patients with chronic Periodontitis. *J Funct Biomater*. 8(29), 1-10. <https://doi.org/10.3390/jfb8030029>
126. Shavandi A, Bekhit AEA, Ali M.A, Sun Z, Gould M; (2015). Development and characterization of hydroxyapatite/ β -TCP/chitosan composites for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C*. 56, 481-493. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.004>
127. Wang Y, Zhang L, Hu M, et al; (2008). Synthesis and characterization of collagen-chitosan-hydroxyapatite artificial bone matrix. *J Biomed Mater Res A*. 86(1), 244-252. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31758>

128. Patil JH, Murthy VKA, Kusanur Rj, Melavanki R; (2021). Synthesis and characterization of chitosan-hydroxyapatite composite for bone graft applications. J Indian Chem Soc. 99(1), 100308. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.10030>
129. Li H; (2010). Preparation and characterization of homogeneous hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds via *in-situ* hydration. J Biomater Nanobiotechnol. 1, 42-49. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2010.11006>
130. Barinov SM, Smirnov VV et al; (2009). Porous composite materials based on chitosan for filling bone defects. Patent RU 2376019 C2. <https://patentimages.storage.googleapis.com/37/c1/e6/29a51f831cd504/RU2376019C2.pdf>
131. Yan Y, Zhang X, Li C, Huang Y, Ding Q, Pang X; (2015). Preparation and characterization of chitosan-silver/hydroxyapatite composite coatings on TiO₂ nanotube for biomedical applications. Appl Surf Sci. 332, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.01.136>
132. Shinn-JD; (2006). Preparation and Properties of chitosan/calcium phosphate composites for bone repair. Dent Mater J. 25(4), 706-712. <https://doi.org/10.4012/dmj.25.706>
133. Yanovska AA, Stanislavov AS, Sukhodub LB, et al; (2014). Silver-doped hydroxyapatite coatings formed on Ti₆Al₄V substrates and their characterization. Mater Sci Eng C. 36, 215-220. doi:10.1016/j.msec.2013.12.011
134. Dimitrov P, Dyulgerova E, Ilieva R, et al; (2017). Bone regeneration in critical-size calvarial defect in rats using innovative nano composite material of chitosan/nano-hydroxyapatite composite. Tradition and modernity in veterinary medicine. 2(1(2)), 17-20. <https://scij-tmvm.com/vol./vol.2/1/P.Dimitrov%20et%20al..pdf>
- 135] Ge Z, Bagueard S, Lim LY, Wee A, Khor E; (2004). Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes. Biomaterials. 25, 1049-1058. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00612-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00612-4)
136. Khaled R. Mohamed; (2012). Biocomposite Materials. Composites and Their Applications, InTech. 113-141. <https://doi.org/10.5772/48302>
137. Sun MZ, Deepti S, Ashok K, et al; (2012). Chitosan-hydroxyapatite macroporous matrix for bone tissue engineering. Current Science. 103(12(25)), 1438-1446. <https://www.researchgate.net/publication/263847826>

138. Sari NK, Indrani DJ, Johan C, Corputty JE; (2017). Evaluation of chitosan-hydroxyapatite-collagen composite strength as scaffold material by immersion in simulated body fluid. The 1st Physics and Technologies in Medicine and Dentistry Symposium. Conf. Series: Journal of Physics. 884, 012116. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/884/1/012116>
139. Shakir M, Jolly R, Khan MSh, et al; (2015). Nano-hydroxyapatite/chitosan-starch nanocomposite as a novel bone construct: Synthesis and in vitro studies. Int J Biol Macromol. 80, 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.009>
140. Gharib X, Tan Y, Zhang B, Gu Z, Li X; (2009). Synthesis and evaluation of collagen-chitosan-hydroxyapatite nanocomposites for bone grafting. J Biomed Mater Res Part A. 89, 1079–1087. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32087>
141. Yu Li, Zhang Z; (2018). Porous chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds incorporating simvastatin-Loaded PLGA microspheres for bone repair. Cells Tissues Organs. 205(1), 20-31. <https://doi.org/10.1159/000485502>.
142. Wang Y, Zhang L, Hu M, Liu H, Wen W, Xiao H, Yu N; (2008). Synthesis and characterization of collagen-chitosan-hydroxyapatite artificial bone matrix. J Biomed Mater Res. 86(1), 244-252. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31758>
143. Silvia RC; (2019). Composites made of bioceramic and chitosan physical hydrogel as potential bone substitutes. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02061737/document>
144. Husain Sh, Al-Samadani KH, Najeeb Sh, et al; (2017). Chitosan biomaterials for current and potential dental applications. Materials. 10(6), 602–622. <https://doi.org/10.3390/ma10060602>
145. Tondnevis F, Ketabi M, Fekrazad R, et al; (2019). Using chitosan besides nano hydroxyapatite and fluorohydroxyapatite boost dental pulp stem cell proliferation. J. Biomimetics Biomater Biomed Eng. 42, 39–50. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JBBBE.42.39>
146. Simeonov M, Gussiyska A, Mironova J, et al; (2019). Novel hybrid chitosan/calcium phosphates microgels for remineralization of demineralized enamel – A model study. European Polymer Journal. S001430571930302–7. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.07.005>.

147. Hashmi A, Zhang X, Kishen A; (2019). Impact of dentin substrate modification with chitosan-hydroxyapatite precursor nanocomplexes on sealer penetration and tensile strength. *J Endod.* 45(7), 935-942. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.03.021>.
148. Matthew JO, Rachel RM, Melissa DK; (2019). Rapidly curing chitosan calcium phosphate composites as dental pulp capping agents. *Regen Med Front.* 1, 190. <https://doi.org/10.20900/rmf20190002>
149. Li B, Xia X, Guo M, et al; (2019). Biological and antibacterial properties of the micro-nanostructured hydroxyapatite/chitosan coating on titanium. *Sci Reports* 9, 14052. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49941-0>
150. Hanafy RA, Mostafa D, Abd El-Fattah A, Kandil S; (2020). Biomimetic chitosan against bioinspired nanohydroxyapatite for repairing enamel surfaces. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials.* 9(2), 85-94. <https://doi.org/10.1680/jbibn.19.00008>
151. Kmiec M, Pighinelli L, Tedesco MF, Silva MM, Reis V; (2017). Chitosan-properties and applications in dentistry. *Adv Tissue Eng Regen Med.* 2(4), 205–211. <https://doi.org/10.15406/atroa.2017.02.00035>
152. Chesnutt BM, Youling Y, Karyl B, Warren OH, Joel DB; (2009). Composite chitosan nano-hydroxyapatite scaffolds induce osteocalcin production by osteoblasts *in vitro* and support bone formation *in vivo* chesnutt. *Tissue Eng. Part A.* 15(9), 2571–2579. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0054>
153. Stępniewski M, Martynkiewicz J, Gosk J; (2017). Chitosan and its composites: Properties for use in bone substitution. *Polim Med.* 47(1), 49–53. <https://doi.org/10.17219/pim/76517>
154. Venkatesan J, Qian ZJ, Ryu BM, Kumar NA, Kim SK; (2011). Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan – Natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 83(2), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.019>.
155. Dobrovolskaya IP, Yudin VE, Popryadukhin PV, Ivankova EM; (2016). Polymer matrices for tissue engineering. *Monograph.* St. Petersburg. 176-199. <https://sng1lib.org/dl/3502390/53e3e4> (in Russian)

156. Danilchenko SN, Kalinkevich OV, et al; (2009). Experimental substantiation of the use of composite materials based on chitosan and calcium phosphates for the replacement of bone defects. *Orthopedics, traumatology and prosthetics*. 1, 66–72. <http://web.kpi.kharkov.ua/krio/wp-content/uploads/sites/41/2020/02/2009-Ortopediya-travmatologiya-i-protezirovanie-3.pdf>
157. Murugan R, Kumar S, Yang F., Ramakrishna S; (2005). Hydroxyl carbonateapatite hybrid bone composites using carbohydrate polymer. *J. Compos Mater*. 39(13), 1159–1166. <https://doi.org/10.1177/0021998305048745>
158. Alessandro P, Daniela I, Consuelo C, et al; (2019). Engineering of chitosan-hydroxyapatite-magnetite hierarchical scaffolds for guided bone growth. *Materials* 12(2321), 1-13. <https://doi.org/10.3390/ma12142321>
159. Shomina SA; (2002). The use of chitosan in the treatment of acute inflammatory diseases of the maxillofacial area. *Diss. Cand. honey. sciences*. Tver. 195.
160. Veiga A, Castro F, Rocha F, Oliveira AL; 2021. An update on hydroxyapatite/collagen composites: What is there left to say about these bioinspired materials. *J Biomed Mater Res B. Appl Biomater* <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34976>
161. Qiaoling H, Baoqiang L, Mang W, Jiacong Sh; (2004). Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via *in situ* hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture. *Biomaterials*. 25, 779–785. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00582-9](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00582-9)
162. Xiaoyan W, Gan W, Long L, Dongyi Z; (2016). The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation. *Scientific RepoRts*. 6(39322), 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep39322>
163. Guilherme MMG., Andre LVZ, Rodrigo CM, et al; (2015). Morphological and mechanical characterization of chitosan-calcium phosphate composites for potential application as bone-graft substitutes. *Res Biomed Eng* <http://dx.doi.org/10.1590/2446-4740.0786>
164. Fellet G, Pilotto L, Marchiol L, Braidot E; (2021). Tools for nano-enabled agriculture: fertilizers based on calcium phosphate, silicon and chitosan nanostructures. *Agronomy*. 11(6), 1239. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061239>
165. Hesham RN; Maha N, Rania AHI, et al; (2020). Chitosan-calcium phosphate composite scaffolds for control of postoperative osteomyelitis: Fabrication,

- characterization, and *in vitro* - *in vivo* evaluation. Carbohydr Polym. 116482. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116482>
166. Peniche C, Solis Y, Davidenko N, García R; (2010). Chitosan/hydroxyapatite-based composites. Biotechnol Apl. 27(3), 202-210. <http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v27n3/bta02310.pdf>
167. Lukas G, Muhammad M, Viviana M, et al; (2019). Chitosan/hydroxyapatite composite bone tissue engineering scaffolds with dual and decoupled therapeutic ion delivery: copper and strontium. J Mater Chem. B. 7, 6109–6124. <https://doi.org/10.1039/C9TB00897G>
168. Costa-Pinto A.R, Lemos AL, Tavaría FK, Pintado M; (2021). Chitosan and hydroxyapatite based biomaterials to circumvent periprosthetic joint infections. Materials. 14(4), 804. <https://doi.org/10.3390/ma14040804>
169. Mohammad Sh, Reshma J, Aijaz AKh, et al; (2017). Resol based chitosan/nano-hydroxyapatite nanoensemble for effective Bone tissue engineering. Carbohydrate Polymers. 1(179), 317-327. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.103>
170. Alicia A, Naimah Z, Ezeddine H, et al; (2019). Application of chitosan in bone and dental engineering. Molecules. 24, 1-17. <https://doi.org/10.3390/molecules24163009>
171. Saraswathy G, Pal S, Rose C, Sastry TP; (2001). A novel bio-inorganic bone implant containing deglued bone. chitosan and gelatin. Bull Mater Sci. 24(4), 415-420. <https://doi.org/10.1007/BF02708641>
172. Kikuchi M, Matsumoto HN, Yamada T, et al; (2004). Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organization nanocomposites. Biomaterials. 25, 63-69. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00472-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00472-1)
173. Rusu VM, Ng CH, Wilke M, et al; (2005). Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials. Biomaterials. 26, 414-426. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.051>
174. Mira M, Lima FL, et al; (2012). XRD. AFM. IR and TGA Study of Nanostructured Hydroxyapatite. Materials Research. 15(4), 622-627. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392012005000069>
175. Vokhidova NR, Ergashev KH, Yugay SM, Rashidova SSh; (2019). Nanostructures obtaining the on the basis of *Bombyx mori* chitosan hydroxyapatite. American Journal of Polymer Science. 9(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.5923/j.ajps.20190901.01>

176. Попрыгина ТД; (2012). Синтез, структура и свойства гидроксипатита, композитов и покрытий на его основе. Автореферат. Воронеж. 6-13.
177. Tatarintseva TB; (2014). Methods of researching materials and processes: a training manual. Kazan. Kazan state energy un-t. 71-72 https://lib.kgeu.ru/irbis64r_15/scan/4857.pdf
178. Hou S, Ma H, Ji Y, Hou W, Jia N; (2013). A calcium phosphate nanoparticle-based biocarrier for efficient cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 5(3), 1131-1136. <https://doi.org/10.1021/am3028926>
179. Pokale P, Shende S, Gade A, Rai M; (2014). Biofabrication of calcium phosphate nanoparticles using the plant *Mimosa elengi*. *Environmental Chemistry Letters*. 12(3), 393-399. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0460-8>
180. Kong L, Gao Y, Cao W, Gong Y, Zhao N, Zhang X; (2005). Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds. *J Biomed Mater Res. Part A*. 75(A), 275-282. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30414>
181. Zhao X, Vokhidova N, Wang Q, Lan B, Lu Y; (2022). Effect of morphology and content of Ni nanoparticles on electromagnetic shielding coatings with salt resistance and heating performance. *J Mater Sci: Mater Electron*. <https://doi.org/10.1007/s10854-022-09155-z>
182. Zhao X., Vokhidova NR, Lu Y; (2022). Design preparation and characterization of flexible Ultra High Frequency (UHF) antennas based on polyether ether ketone (PEEK) Films. *Journal of Electronic Materials*. 51(8), 4601-4615. <https://doi.org/10.1007/s11664-022-09685-6>.
183. Vokhidova NR, Rashidova SSh; (2016). Synthesis and stabilization of cobalt and copper nanoparticles by chitosan *Bombyx mori*. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 26, 1380-1386. <https://doi.org/10.1007/s10904-016-0431-6>
184. Vokhidova NR, Rashidova SSh; (2016). Metal complexes of chitosan *Bombyx mori* with ions Co^{2+} , Cu^{2+} and features of their formation. *Nano Science and Nano Technology An Indian Journal*. 10(2), 67-72.
185. Qiang LT, Zhao ZL, Zhong S, Wang H, Cui X; (2013). *Colloid Surface Physicochem. Eng. Aspect*. 419, 124.

186. Ibrahim M, Abdel-Fattah WI, El-Sayed El-S M, Omar AA; (2013). Novel model for chitosan/hydroxyapatite interaction. *Quantum Matter.* 2, 1-4. <http://dx.doi.org/10.1166/qm.2013.1053>
187. Sarimsakov AA, Nurgaliev IN, Kholduraev BZ; (2020). Features in creating polymer forms of drugs. *International Journal of Scientific & Technology Research.* 8(1), 1012-1018.
188. Sarymsakov AA, Kholduraev B, Yunusov KhE, Oksengendler BL, Nurgaliev IN, Letfullin RR; (2020). The role of electron structure of polymers at their biodegradation in living organisms. *Drug Design Development and Delivery Journal.* 3(1), 1-6. <http://dx.doi.org/10.31021/dddd.20203110>
189. Нургалиев ИН, Оксенгендлер БЛ, Рашидова СШ; (2019). К вопросу о концепции квантово-химической теории реакционной способности функциональных групп полимеров. *Узб. хим. журн.* 3, 50-54.
190. Atakhanov A, Turdikulov I, Mamadiyurov B, Abdullaeva N, Nurgaliev I, Yunusov Kh, Rashidova S; (2019). Isolation of nanocellulose from cotton cellulose and computer modeling of its structure. *Open Journal of Polymer Chemistry.* 9, 117-129. <http://dx.doi.org/10.4236/ojpcchem.2019.94010>
191. Нургалиев ИН; (2019). Компьютерное моделирование «структура-свойство» хитозана и его производных. Дисс. Ташкент. 190.
192. Ibrahim M, Abdel-Fattah WI, El-Sayed MS, Omar A; (2012). A novel model for chitosan/hydroxyapatite interaction. *Quantum Matter.* 2, 1-4.
193. Habriev RU; (2005). Guideline for experimental (preclinical) studying of new pharmacological substances. 2nd Edition, Medicine, Moscow. 830.
194. Koski Caitlin, Vu Ashley A, Bose Susmita; (2020). Effects of chitosan-loaded hydroxyapatite on osteoblasts and osteosarcoma for chemopreventative applications. *Materials Science and Engineering: C.* 111041-. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111041>
195. Mokhtar YI, Haitham AH, Yasser HM, Maher KA; (2020). Synergistic effect of curcumin and chitosan nanoparticles on nano-hydroxyapatite-induced reproductive toxicity in rats. *Environmental Science and Pollution Research.* <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11395-7>

196. Jariya SAI, Padmanabhan VP, Kulandaivelu R, Prakash N, Mohammad F, Al-Lohedan HA, Paiman S, Schirhagl R, Hossain MAM, Sagadevan S; (2021). Drug delivery and antimicrobial studies of chitosan-alginate based hydroxyapatite bioscaffolds formed by the Casein micelle assisted synthesis. *Materials Chemistry and Physics*. 272, 125019. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.125019>
197. Randy ChFCh, Tzi BN, Jack HW, Wai Ych; (2015). Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*. 13, 5156-5186. <https://doi.org/10.3390/md13085156>
198. Zairin Noor; (2013). Nanohydroxyapatite application to osteoporosis management. *J Osteoporos*. 679025. <https://doi.org/10.1155/2013/679025>.
199. Mora-Raimundo P, Manzano M, Vallet-Regí M; (2017). Nanoparticles for the treatment of osteoporosis. *AIMS Bioengineering*. 4(2), 259-274. <https://doi.org/10.3934/bioeng.2017.2.259>
200. Yamaguchi M; (2010). Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Mol Cell Biochem*. 338, 241-254. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0358-0>
201. Ito A, Otsuka M, Kawamura H, et al; (2005). Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation. *Curr Appl Phys*. 5, 402-406. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2004.10.006>
202. Scintag; (1999). Basic X-ray diffraction. Buub Road. 7. <https://www.geo.umass.edu/courses/geo311/xrdbasics.pdf>
203. Vallet-Regi M, Arcos D; (2008). Biomimetic nanoceramics in clinical use: from materials to applications. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge. UK. 195.
206. Zhang X, Zhu L, Lv H, et al; (2012). Repair of rabbit femoral condyle bone defects with injectable nanohydroxyapatite/chitosan composites. *Journal of Materials Science*. 23, 1941-1949. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4662-y>
207. Chacon EL, Bertolo MRV, de Guzzi Plepis AM, et al; (2023). Collagen-chitosan-hydroxyapatite composite scaffolds for bone repair in ovariectomized rats. *Sci Rep*. 13, 28. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24424-x>
208. Gilarska A, Hinz A, Bzowska M, Dyduch G, Kaminski K, Nowakowska M, Lewandowska ŁJ; (2021). Addressing the osteoporosis problem multifunctional

- injectable hybrid materials for controlling local bone tissue remodeling. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 13, 49762–49779. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c17472>
209. Макарова МН, Макаров ВГ; (2019). Диет-индуцированные модели метаболических нарушений. Экспериментальный остеопороз. *Сооб.* 7(3). <https://cyberleninka.ru/article/n/diet-indutsirovannye-modeli-metabolicheskikh-narusheniy-soobschenie-7-eksperimentalnyy-osteoporoz/pdf>
210. Schreiber JA, et al; (2011). Hounsfield units for assessing bone mineral density and strength: A tool for osteoporosis management. *The Journal of bone and joint surgery. American*. 93, 1057-63. <https://doi.org/10.2106/jbjs.j.00160>
211. Комплексонометрическое определение кальция и магния при совместном присутствии в растворе. <https://www.kaznu.kz>
212. Ergashev KH, Vokhidova NR, Rashidova SSh; (2023). Chitosan hydroxyapatite *Bombyx mori* and its effect on the treatment of osteoporosis. *Uzbekistan Journal of Polymers*. 2(2), 97-108. <http://uzpolymerjournal.com/articles/article.php?id=230210>
213. Elghareeb MM, Elshopakey GE, Elkhooley TA, Salama B, Samy A, Bazer FW, Elmetwally MA, Almutairi MH., Aleya L, Abdel-Daim MM., Shaymaa R; (2022). Estradiol and zinc-doped nano hydroxyapatite as therapeutic agents in the prevention of osteoporosis; oxidative stress status, inflammation, bone turnover, bone mineral density, and histological alterations in ovariectomized rats. *Frontiers in Physiology*. 13, 989487. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.989487>. 2022.
214. Flores Valdez JD, Sáenz Galindo A, López Badillo CM, Castañeda Facio, AO, Acuña Vazquez P; (2022). Hydroxyapatite and biopolymer composites with promising biomedical applications. *Revista Mexicana De Ingenieria Biomedica*. 43(2), 6–23. <https://doi.org/10.17488/RMIB.43.2.1>
215. Alvarez-Barreto J, Márquez K, Gallardo E, Moret J, et al; (2017). Mesenchymal stem cell culture on composite hydrogels of hydroxyapatite nanoparticles and photo-crosslinking chitosan. *Rev Mex Ing Biom*. 38(3). 524-536. <https://doi.org/10.17488/RMIB.38.3.2>
216. Trakoolwannachai V, Kheolamai P, Ummartyotin S; (2019). Development of hydroxyapatite from eggshell waste and a chitosan-based composite: In vitro behavior of human osteoblast-like cell (Saos-2) cultures. *Int J Biol Macromol*. 134, 557-564. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.004>

217. Tripathi A, Saravanan S, Pattnaik S, Moorthi A, et al. (2012); Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper- zinc for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 50(1), 294-299. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.11.013>
218. Soriente A, Fasolino I, Gomez-Sánchez A, Prokhorov E, et al; (2022). Chitosan/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds to modulate osteogenic and inflammatory response. *J Biomed Mater Res Part A.* 110(2), 266-272. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37283>
219. Kaczmarek B, Sionkowska A, Skopinska-Wisniewska J; (2018). Influence of glycosaminoglycans on the properties of thin films based on chitosan/collagen blends. *J Mech Behav Biomed Mater.* 80, 189-193. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.02.006>
220. Chen RM, Ho MH, Liao MH, Lin PI, Liu SH, Yao CJ; (2015). Chitosan nanofiber scaffold improves bone healing via stimulating trabecular bone production due to upregulation of the Runx2/osteocalcin/alkaline phosphatase signaling pathway. *International Journal of Nanomedicine.* 5941. <https://doi.org/10.2147/IJN.S90669>
221. Vokhidova NR, Ergashev KH, Ibragimov D, Rashidova SSh; (2023). Chitosan hydroxyapatite: physic-chemical properties and its effect on the growth and development of broiler chickens. *Journal of World's Poultry Research.* 13(2), 233-243. <https://dx.doi.org/10.36380/jwpr.2023.26>
222. Vallet-Regi M, Arcos D; (2008). *Biomimetic nanoceramics in clinical use: from materials to applications.* The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Cambridge, UK.
223. Statsenko MI; (2017). Preventive action of the stimulant in case of metabolic disorders in agricultural poultry. *Authoreferat. Kazan.* 12-13. <https://www.dissercat.com/content/profilakticheskoe-deistvie-stimulara-pri-narushenii-obmena-veshchestv-u-selskokhozyaistvenno/read/pdf>
224. Shi BL, Li Dr DF, Piao XS, Yan SM; (2005). Effects of chitosan on growth performance and energy and protein utilisation in broiler chickens. *British Poultry Science.* 46(4), 516-519. <http://dx.doi.org/10.1080/00071660500190785>
225. Imari ZK, Hassanabadi A, Nassiri HM; (2020). Response of broiler chickens to calcium and phosphorus restriction: Effects on growth performance, carcass

- traits, tibia characteristics and total tract retention of nutrients. *Italian Journal of Animal Science*. 19(1), 929-939. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1808101>
226. Kaveh J, Hasan Dallalfarsh R, Mehrdad I, Hamed K; (2020). The effects of different phosphate sources on growth performance, blood calcium-phosphorus and bone characteristics of broilers. *Current Investigations in Agriculture and Current Research*. 8(2), 000285. <https://doi.org/10.32474/CIACR.2020.08.000285>
227. Adedokun SA, Sands JS, Adeola O; (2004). Determining the equivalent phosphorus released by an *Escherichia coli*-derived phytase in broiler chicks. *Canadian Journal of Animal Science*. 84(3), 437-444. <https://doi.org/10.4141/A03-117>
228. Gautier AE, Walk CL, Dilger RN; (2017). Influence of dietary calcium concentrations and the calcium-to-non-phytate phosphorus ratio on growth performance, bone characteristics, and digestibility in broilers. *Poultry Science*. 96(8), 2795-2803. <https://doi.org/10.3382/ps/pex096>
229. Olukosi OA, Fru-Nji F; (2014). The interplay of dietary nutrient specification and varying calcium to total phosphorus ratio on efficacy of a bacterial phytase: 1. Growth performance and tibia mineralization. *Poultry Science*. 93(12), 3037-3043. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03978>
230. Xu L, Li N, Farnell YZ, Wan X, Yang H, Zhong X, Farnell MB; (2021). effect of feeding a high calcium: phosphorus ratio, phosphorous deficient diet on hypophosphatemic rickets onset in broilers. *Agriculture*. 11, 955. <https://doi.org/10.3390/agriculture11100955>
231. Эргашев ҚХ, Воҳидова НР, Ибрагимов Д, Рашидова СШ; (2021). Хитозан *Bombyx mori* гидроксиапатити нанокөмпозитларининг паррандачиликда жўжаларнинг ўсиши ва ривожланиши ҳамда қоннинг морфологик ва биокимёвий кўрсаткичларига таъсири. *Агро илм*. 3, 57-58.
232. Эргашев ҚХ, Тошмуродов Д, Эшимов Д, Ибрагимов Д; (2022). Хитозан *Bombyx mori* гидроксиапатити нанокөмпозитларининг бройлер товуқларига берилиш муддати ва дозасини аниқлаш бўйича олинган натижалар. *Агро илм*. 4, 41-43.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Список условных обозначений	5
Глава 1. КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ С ГИДРОКСИАПАТИТОМ. СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ (Обзор литературы)	8
1.1. Особенности химического взаимодействия хитозана	8
1.2. Синтез и свойства гидроксиапатит кальция	11
1.3. Получение композитов природных полимеров с гидроксиапатитом и их применение	14
1.4. Методы получения композитов хитозана с гидроксиапатитом и их физико-химические свойства	16
1.5. Предварительная схема действия биополимера хитозана с гидроксиапатитом кальция	22
1.6. Применение композитов хитозана с гидроксиапатитом в медицинской практике	26
Заключение к главе 1	30
Глава 2. СТРУКТУРА И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХИТОЗАНА В <i>ВОМБУХ MORI</i> , ГИДРОКСИАПАТИТА КАЛЬЦИЯ И ИХ КОМПОЗИТОВ	32
2.1. Синтез гидроксиапатита кальция и его идентификация	32
2.2. Влияние продолжительности синтеза на формирование гидроксиапатита кальция	35

2.3.	Получение композитов ХЗ/ГА варьированием параметров синтеза в условиях « <i>in situ</i> »	40
2.4.	Взаимодействие хитозана <i>Bombyx mori</i> с гидроксиапатитом кальция в водных растворах	43
2.5.	Влияние макролекул ХЗ <i>Bombyx mori</i> на формирование стехиометрического гидроксиапатита кальция в условиях « <i>in situ</i> »	45
2.6.	Изучение влияния соотношений ХЗ/ГА на размер формирующихся частиц в условиях « <i>in situ</i> » и « <i>ex situ</i> »	49
2.7.	Исследование размерных характеристик частиц синтезированных образцов ГА и композитов ХЗ/ГА	51
2.8.	Спектроскопические исследования композитов хитозана с гидроксиапатитом	54
2.9.	Рентгеноструктурный анализ композитов ХЗ/ГА	61
2.10.	Влияние продолжительности процесса на морфологию композитов гидроксиапатита хитозана <i>Bombyx mori</i>	64
2.11.	Термические характеристики композитов на основе хитозана <i>Bombyx mori</i> и гидроксиапатита	71
2.12.	Теоретический аспект взаимодействия хитозана с гидроксиапатитом	81
	Заключение к главе 2	93
Глава 3.	БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ХИТОЗАН/ГИДРОКСИАПАТИТА	96
3.1	Исследование острой токсичности композита ХЗ/ГА	96
3.2	Изучение влияния соединения гидроксиапатита хитозана <i>Bombyx mori</i> на экспериментальный остеопороз в эксперименте на белых крысах	99

3.3	Биологически активные свойства композитов гидроксиапатита хитозана	106
3.4.	Изучение влияния препарата ХЗ/ГА=50:50 масс.% на количество и качество куриного мяса.....	109
3.5.	Изучение ХЗ/ГА на морфологические параметры и лейкоцитарную формулу крови бройлеров.....	112
3.6.	Определение влияния гидроксиапатита хитозана <i>Bombyx mori</i> на иммунные показатели организма цыплят и продолжительности после вакцинации цыплят-бройлеров против Ньюкаслской и инфекционной болезней бронхита	118
	Заключение к Главе 3	120
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121

Н.Р. Вохидова, К.Х. Эргашев, С.Ш. Рашидова

СИНТЕЗ ГИДРОКСИАПАТИТА
ХИТОЗАНА *BOMBUX MORI*
И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ
В ПТИЦЕВОДСТВЕ

Редактор	Мухаммадали Мамадалиев
Дизайнер	Муродилло Рахмонов
Верстка	Сухроб Мирзаев
Корректор	Джасур Кутбиддинов

Лицензия 1385, 21.01.2021 г.

Подписано в печать ---.2024.


Формат 70x100 $\frac{1}{16}$. Гарнитура «Good Pro».

Усл.п.л.11. Изд.п.л. 10.

Тираж 200. Заказ номера -. Цена договорная.

Издано типографии государственного учреждения
издательстве «Фан» Академии наук Республики Узбекистан.

100047, г.Ташкент, ул. Я.Гулямова, д.70.

 +(998) 99 791-75-55

 fan_ndk@mail.ru