



Българска академия на науките
Институт по физика на твърдото тяло
„Акад. Георги Наджаков”



Тодор Атанасов Хиков

**Получаване и изследване на
нано-композитни полимерни слоеве:
нови материали с приложение в медицината**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”
по специалност: „Структура, механични и термични свойства на кондензираната
материя“

Научни консултанти:
Доц. Д-р Лиляна Д. Праматарова

Рецензенти:
Акад. Александър Петров
Проф. Дориана Димова-Малиновска

София, 2017

Данни за дисертационния труд:

Дисертацията се състои от 79 страници, 34 фигури, 6 таблици и 82 цитирани литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от научен семинар на направление „Функционални материали и наноструктури”,
Институт по физика на твърдото тяло „Акад. Георги Наджаков”-БАН, състоял се на 27.03.2017 година.

ISSP-BAS-2017-PhD019

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в зала на Институт по Физика на Твърдото тяло „Акад. Г. Наджаков”-БАН, бул. „Цариградско шосе” 72, пред научно жури в състав:

1. Акад. Александър Петров
2. Проф. Дориана Димова-Малиновска
3. Доц. д-р Тодор Петров
4. Доц. д-р Виктория Накова
5. Доц. д-р Милена Игнатова

Съдържание

I.	Обща характеристика на дисертационния труд	1
1.	Актуалност на темата.....	1
2.	Цел и задачи на дисертационната работа.....	1
3.	Научна новост и принос на автора.....	2
4.	Публикации.....	2
5.	Обем и структура на дисертацията.....	3
II.	Кратко изложение на дисертационния труд	4
1.	Композитни материали на основата на хексадиметилсилоксан (ХДМС) и детонационен нанодиамант (ДНД).....	4
2.	Материали	5
3.	Експериментална резултати	7
III.	Списък на публикации и доклади на научни конференции свързани с дисертацията	22
IV.	Литература	23

I. Обща характеристика на дисертационния труд

1. Актуалност на темата

Прегледът на литературата показва, че все още се работи изключително интензивно в посока на създаването на материали със свойства, близки до тези на природните материали и с приложения в сферата на човешкото здраве. Тематиката на дисертацията е пряко свързана с едно от основните научни направления на Европейския Съюз (ЕС), както и на приетите от Българска Академия на Науките, фонд Научни изследвания и Националният Иновационен Фонд стратегически направления и приоритети включващи: «Борба със социално-значими заболявания», «Подобряване човешкия потенциал и качеството на живот», «Създаване на усъвършенствани стратегии, ориентирани към удължаване продължителността на живот на човека». Други тематични приоритети се отнасят до ”Получаване на материали чрез иновационни технологии”, “Моделирание и дизайн на мултифункционални материали”, “Интелигентни био-материали за коригиране и възстановяване на човешката кост”.

2. Цел и задачи на дисертационната работа

Целта на дисертационната работа е отлагането на слоеве върху твърди подложки от нов композитен материал с медицински приложения, с определена и контролируема биоактивност, получен на базата на плазмена полимеризация на мономерът хексаметилдисилоксан с вградени наночастици.

За постигане на тази цел бяха поставени следните задачи:

- Да се синтезират, модифицират и охарактеризират ДНД, Ag-ДНД, Si-ДНД наночастици.
- Да се разработи технология за плазмената полимеризация на мономера хексаметилдисилоксан заедно с ДНД, Ag-ДНД и Si-ДНД наночастици, като се използват различни твърди подложки (Si, стъкло).
- Да се модифицират така получените полимерни композитни слоеве чрез хидрофилизиране с амонячна плазма.

- Да се изследват физико-химичните свойства на получените композитни слоеве чрез СЕМ, АСМ, ФТИЧ и Раманова спектроскопия, мокреюмост, елипсометрия, измерване на твърдост и еластичност.
- Да се оцени токсичността на наночастици от ДНД, Ag-ДНД, Si-ДНД и композитни полимерни слоеве с клетъчни култури.
- Да се оцени адхезивността и спрединга на клетъчни култури в присъствието на наночастици от ДНД, Ag-ДНД, Si-ДНД и върху композитни полимерни слоеве.
- Да се изследва влиянието на повърхностните свойства на композитните слоеве върху поведението на клетъчните култури.

3. Научна новост и принос на автора

Разработена е технология за получаване на композитни слоеве (ДНД/ППХМДС) на базата на плазмена полимеризация на хексаметилдисилоксан (ХМДС) мономер и нанодиамаментени частици (ДНД) върху различни твърди подложки, както и последваща тяхна модификация с амонячна плазма.

За първи път са получени композитни слоеве от типа ДНД/ППХМДС, както и такива, модифицирани с амонячна плазма.

Установено бе влиянието на количеството и вида на запълващите полимера частици върху физико-химичните свойства на композитния слой: промяна на твърдостта и еластичността, на контактния ъгъл, на повърхнинно активните групи

Установено бе, че полимерните слоеве, както и самите наночастици не са цитотоксични и живите клетки се развиват добре.

4. Публикации

Резултатите от работата по дисертацията са публикувани в три статии: две в списание с импакт фактор Journal of Optoelectronics and advanced materials (импакт

фактор (ИФ) - 0.433) и една глава от книга в *On Biomimetics*. Участие в международни научни конференции в областта през последните години с общо 7 доклада.

5. Обем и структура на дисертацията

Дисертационният труд е представен на 79 страници, с изчерпателно описание на свършената работа и получените резултати. Работата съдържа 34 фигури и 6 таблици, като са цитирани 82 литературни източника.

Дисертационният труд се състои от увод, обща част с обзорен характер, специална част, съдържаща основните експерименталните резултати, заключение, списък с използваната литература и списък на публикации и доклади на научни конференции по темата на дисертацията.

В глава 1 е направено въведение в композитните материали, както и материалите на базата на използвания полимер и наночастици.

В глава 2 е направен преглед на използваните в дисертацията материали, методите за синтез на полимерните и композитни слоеве, както и използваните методи за анализ.

В глава 3 подробно са описани основните експериментални резултати от работата по дисертацията.

В глава 4 са направени основните заключения.

В настоящата дисертация са изследвани физико-химичните свойства на композитни слоеве на базата на полимер и нанодиамаментени частици. Наночастиците са модифицирани, както и повърхността на получените композитни слоеве с цел получаване на химически структурирана и с различна топография повърхност. Изследван е клетъчният отговор на остеобластни клетки при инкубирането им върху получените композити.

II. Кратко изложение на дисертационния труд

1. Композитни материали на основата на хексадиметилсилоксан (ХДМС) и детонационен нанодиамант (ДНД)

Важна цел на науката за материали е разработката на интерфейси, които интегрират функции на живите клетки и материали. Природата ни е дарила много идеи за това как да се изградят композитни материали в организирана структура [1, 2]. Структурата на даден биоматериал е от решаващо значение при определяне на клетъчния отговор и съответно вариантите за неговите биомедицински приложения. Общите уникални свойства, предлагани от органични и неорганични съставки в рамките на един материал, с участие на нано ниво, прави композитите привлекателни за следващото поколение биосъвместими материали. Така например, композитен материал от типа ДНД/полимер притежава пространствена организация на компоненти с нови структурни характеристики и физични свойства, както и сложни функции, в резултат на силен синергичен ефект между наночастиците и полимера. В последно време има все по-голям интерес в синтеза на композитни материали с нови физикохимични свойства, включващи интегрирането на неорганични наноматериали в полимерна матрица [3, 4, 5]. Разработени са многобройни силоксан-базирани материали, включително плазмено полимеризиран хексаметилдисилоксан (ППХДМС). ППХДМС се създава лесно с помощта на добре утвърдената технология на плазмена полимеризация [6, 7]. ППХДМС има множество приложения в различни области, тъй като не е токсичен, прозрачен е, има много ниско повърхностно напрежение, гъвкав е, биосъвместим, и не се разтваря или набъбва в средата на клетъчните култури[8]. Плазмената полимеризация позволява отлагането на много плътни, добре свързани филми без дефекти върху различни подложки като например други полимери, стъкло или метали. Предимства на плазмената полимеризация са и лесното вариране на параметрите на процеса и използването на модификатори и/или пълнители за получаването на нови материали и композити със стабилни свойства [9].

От друга страна, детонационният нанодиамант като член на въглеродното семейство се утвърждава като обещаващ материал за биологични приложения [10-16]. Наноразмерният диамант е химически здрав, нетоксичен на клетъчно ниво, и лесно модифицируем с различни макромолекули [17-19]. Нанодиамантните структури представляват интерес поради комбинация от уникалните свойства на обемният

материал диамант и на наночастиците с тяхната специфична повърхностна структура [3]. От друга страна, ДНД, синтезирани при детонация на експлозиви, съдържащи въглерод, са съставени предимно от частици с големина 4 нм и може лесно да бъдат модифицирани чрез подходящи химични реакции. Тъй като за всички наночастици е известно, че бързо и трайно агрегират в големи агломерати, при което се губи уникалността на наноразмера, ДНД частици могат да бъдат силанизирани, за да се предотврати образуването на НД агрегати [20]. НД-те могат да се използват като добавки в различни материали за увеличаване на механичната стабилност и подобряване на тъканното взаимодействие [21-23]. Установено е, че параметри на повърхността, като повърхностен заряд, овлажняемост (хидрофобност / хидрофилност), химия, микроструктура, грапавост и механични свойства оказва влияние на отлагането и разпространението на различни видове клетки върху биоматериалната повърхност [8]. Едно предимство на наночастиците като добавки към полимери е, че чрез добавяне на малко количество могат да се изменят свойствата на материала. Включването само на няколко процента НД частици в полимерната матрица може да увеличи твърдостта и силата на полимера и може също така да създаде нанотопография на повърхността, наподобяваща костната. Свойствата на полимер-НД композит могат лесно да се променят като се сменя вида, концентрацията или размера на наночастиците. Включването на частици в полимерната матрица силно влияе на свързването между частици и полимера и така на свойствата на получения композитен материал [24]. В момента няма достатъчно информация върху това как включването на НД частици в силиконовата матрица влияе на повърхностните свойства на композита и как това може да се използва за контролиране на клетъчното поведение. Този въпрос е разгледан в настоящата дисертация.

2. Материали

В дисертацията са използвани следните видове ДНД частици:

Чисти ДНД частици: При началния синтез на нанодиаманти е използвана смес от въглерод-съдържащи експлозиви – конични заряди (0.6 кг) състоящи се от тринитротолуен/ 1,3,5-тринитро-1,3,5-триазациклохексан (ТНТ/РДХ) в съотношение 70/30. Взривяването на заряда е направено в сферична експлозивна камера с вътрешен обем от 3 м³, в присъствието на вода като охлаждащ елемент (мокър синтез).

Пречистването на диамантения прах е направено както следва: варене в разтвор от стехиометрично изчислени количества от калиев дихромат ($K_2Cr_2O_7$) и сярна киселина (H_2SO_4) при 100-115°C, последвано от няколко измивания с вода и допълнително отстраняване на метални примеси чрез третиране със солна киселина (HCl , 80-100°C) и отново измиване с вода докато не достигне $pH=7$. Направеният прах от нанодиамант е изследван чрез инфрачервена спектроскопия (ФТИЧ), окислително титриране и измерване на pH както е описано в [25]. Чрез трансмисионен микроскоп е показано, че изучаваният материал се състои от диамантени наночастици, чиито размер е под 10 nm. Ниското съдържание на силиций (по-малко от 1%) го прави труден за локализиране.

Ag-ДНД: Амониевият комплекс на среброто ($[Ag(NH_3)_2]^+$) е добавен към суспензия на чисти ДНД частици при постоянно бъркане, при стайна температура следвано от добавяне на разтвор от декстроза. Температурата на разтвора е покачена до 50°C, докато сребърното съединяване с диамантената повърхност не се завърши.

Si-ДНД: Силинизирането на повърхността на чисти ДНД, чрез “закачането” на триметилсилилови групи, е направено като дехидратирани ДНД са смесени с етилацетат, съдържащ хексаметилдисилазан и триметилхлоросилан. След реакцията, останалите в повече реагенти са премахнати чрез микровълново загряване на пробата в среда от бутил ацетат. Страничният продукт (амониев хлорид) и останалият в повече бутил ацетат са премахнати чрез измиване с метанол. Пробата от Si-ДНД накрая е изсушена чрез микровълни.

Полихексаметилдисилоксан

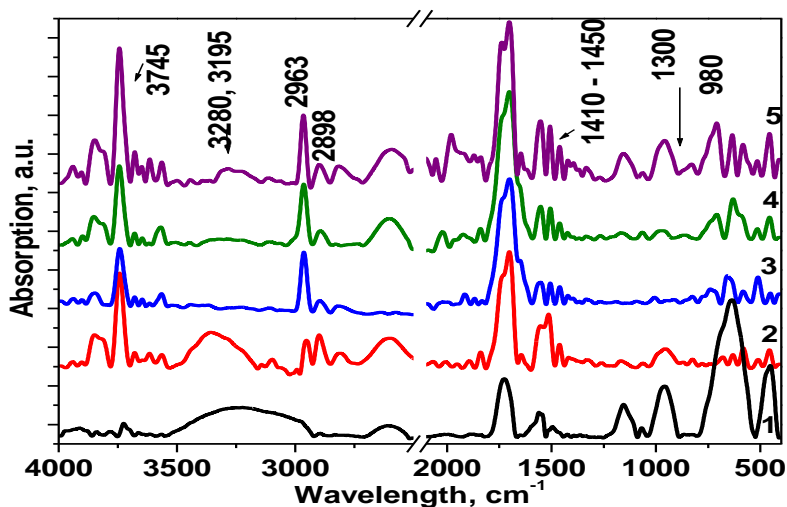
Омреженият полихексаметилсилоксан, популярен като силиконов каучук, е един от най-широко използваните полимери в производството на медицински изделия. От дълги години той се изследва като биоматериал за създаване на изкуствено сърце, сърдечни клапи; бюстови импланти; изделия за офталмологията – контактни и вътреочни лещи, роговица, за хирургията при ретиналните отлепвания и защитита на склерата, дренажни импланти при глаукома, лицево-челюстна реконструкция, изкуствена кожа, хранопровод, стави, биосензори, катетри и други [26, 27]. В много работи се дискутират стабилността, токсичността, хидрофобността, тъканният отговор и проницаемостта за кислород на този материал [28, 29].

3. Експериментална резултати

Характеризиране на ППХМДС слоеве

Инфрачервени спектри на ППХМДС и на образец, обработен с амонячна плазма са показани на фигура 6. Образуването на слой от ППХМДС върху покривно стъкло (ПС, фигура 1-1) се вижда от характерни пикове на полимера.

Асиметричната стречинг вибрация на връзката Si-O-Si около 1165 cm^{-1} е доказателство за омрежване от Si-O-Si, което е добре определено върху стъклото, т.к. присъстват тройни пикове. Силният пик при 700 cm^{-1} показва съществуването на различни тетраедрични подреджания на CH_3 групи свързани със силициеви атоми, докато стречинг мода от връзката C-H в групата Si- CH_3 се вижда в пика на 460 cm^{-1} . Пиковете в региона $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ показват присъствието на карбонилни функционални групи в полимера, както и присъствието на ОН групи.



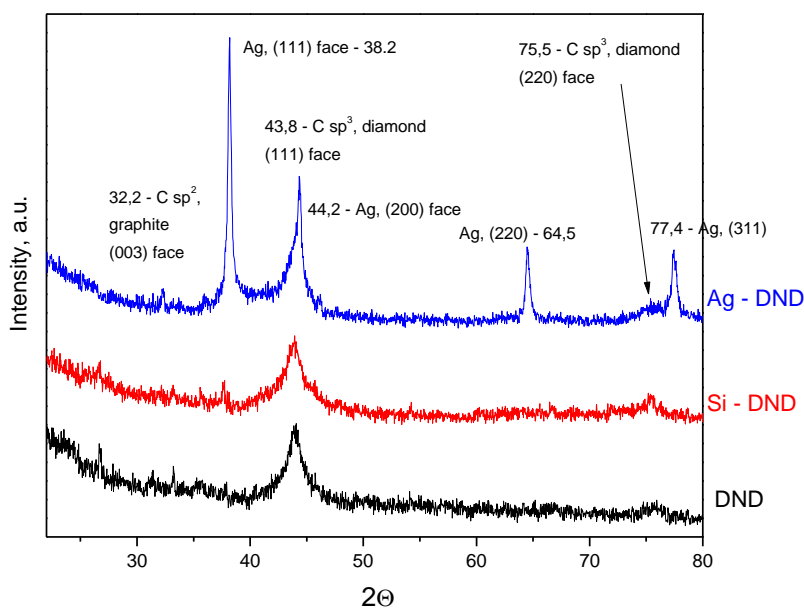
Фигура 1. Инфрачервен спектър на (1) ППХМДС; (2) ППХМДС третиран с NH_3

Инфрачервените спектри показват значителна промяна на функционалните групи след обработка с амонячна плазма. След обработката се появяват нови пикове в региона $1410\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ и $1620\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$, които съответстват на съществуващи NH_4^+ групи.

Характеризиране на ДНД наночастици.

Рентгенограмата на чисти ДНД частици (Фигура 2) показва типичните за кубичния диамант пикове (монокристална структура на ядрата) при $2\theta=43.8^\circ$ и 75.5° . При Ag-ДНД частици се появяват нови и ясно разграничими тесни, но с висок интензитет пикове на 32.8° и 64.5° характерни за (111) и (220) кристалографски равнини на среброто.

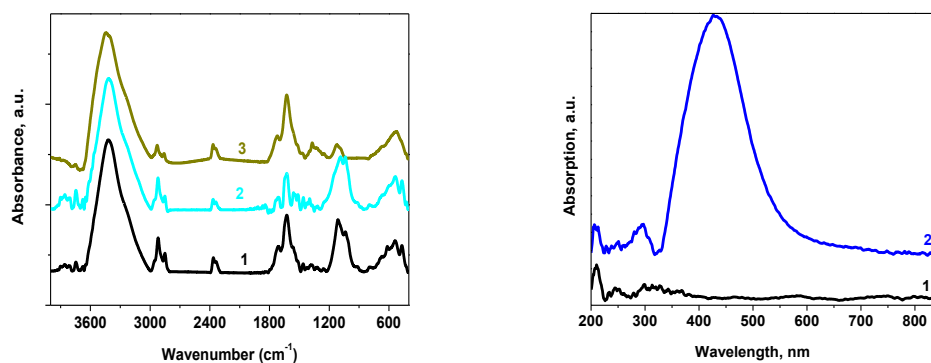
Размерът на зърната е определен по формулата на Шерер, използвайки пика (111) на диаманта при 43.8 градуса. Определен е средния размер на нанодиамантите, приблизително 11 нм.



Фигура 2. Рентгенова дифракция на нанодиамантни прахове (ДНД, Si-ДНД, Ag-ДНД)

На фигури 3 и 4 са представени инфрачерните и ултравиолетовите спектри на нанодиамантите използвани като пълнител на полимера (ДНД, Si-ДНД, Ag-ДНД). Спектрите показват, че всички материали притежават хидрофилна повърхност, която е химически мултифункционална. В спектъра на б-DND, широкият пик при $400-700\text{ cm}^{-1}$ показва аморфен sp^3 свързан въглерод, докато сравнително острите пикове при $1000-1150\text{ cm}^{-1}$ показват sp^2 свързан въглерод. Пиковете в диапазона $1500-1800\text{ cm}^{-1}$ показват C=O. Наличието на Ag по нанодиамантената повърхност (фигура 3-3) се установява по намаляването на пиковете около 1100 cm^{-1} и появата на нов пик около 1300 cm^{-1} . Силинизирането на нанодиамантената повърхност (фигура 3-2) се вижда при повечето

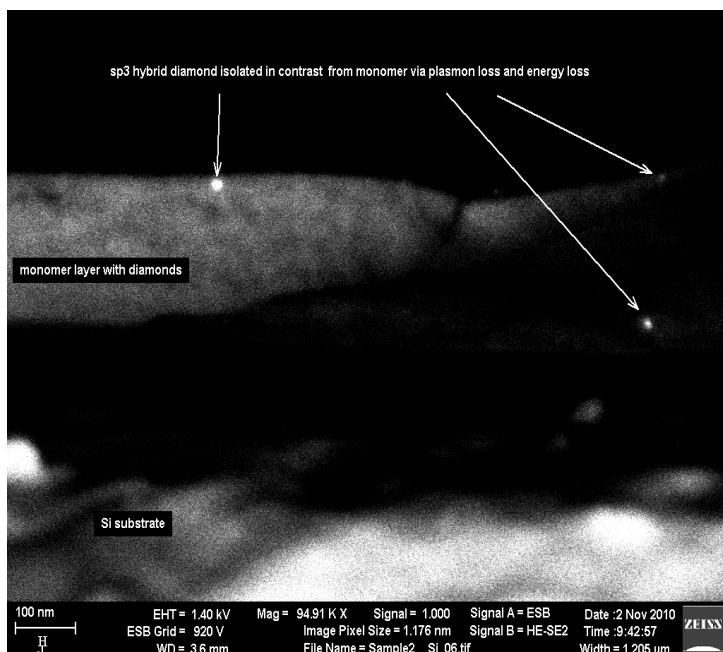
sp^2 свързани въглеродни атоми ($1000-1150\text{ cm}^{-1}$) и намаляването на киселинните функционални групи ($1500-1750\text{ cm}^{-1}$) поради образуването на нови Si-O-C връзки. Ниско интензивните пикове около 210 и 280 nm се дължат на формирането на Ag_2^+ и малки сребърни кластери (Ag_n) (фигура 4). Появата на пик след 410 nm индикира формирането на сребърни наноструктури [30, 31].



Фигура 3. Инфрачервен спектър на нанодиамантите използвани като пълнител на ППХМДС (1) ДНД; (2)Si-ДНД; (3) Ag-ДНД; Фигура 4. Ултравioletов спектър на синтезираните нанодиаманти (1) ДНД; (2) Ag-ДНД;

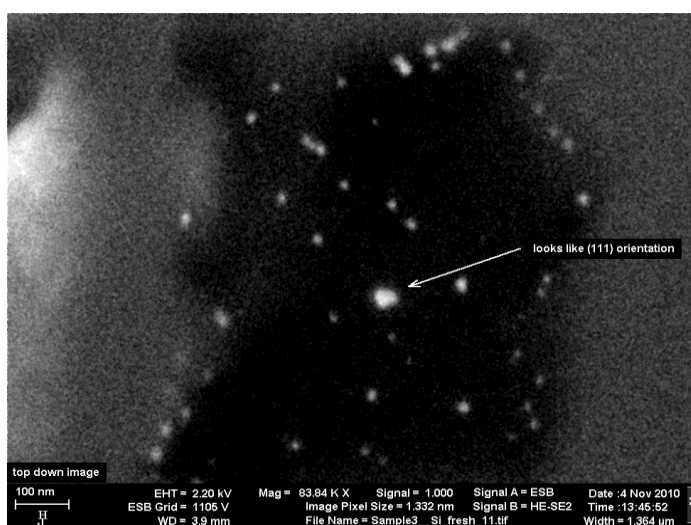
Характеризиране на композитните слоеве от ДНД/ППХМДС

На фигура 5 е представен композитен слой от ДНД/ППХМДС, израстнат върху силициева подложка. Ярките бели точки са sp^3 хибриден въглерод с размер от 5 до 20 nm. Слой е с дебелина 240 nm. На фигура 6 ясно се виждат отново сферичната форма на частиците от Si-ДНД.

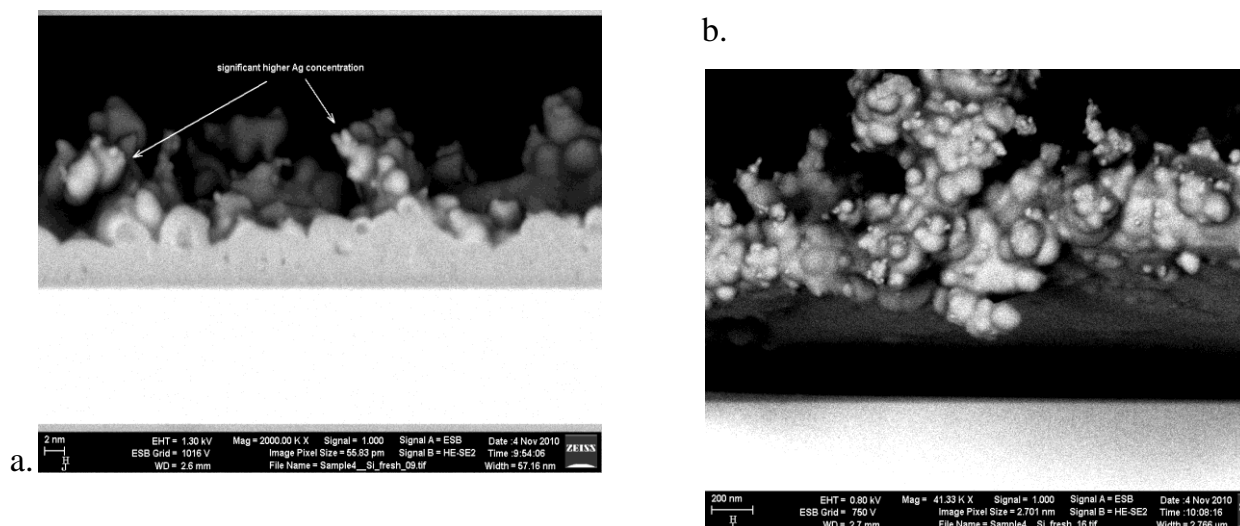


Фигура 5. Напречен разрез на слой от ДНД/ППХМДС.

На фигура 7 е показан слой от Ag-ДНД/ППХМДС върху силициева подложка. Ясно се различават 2 части на слоя: долната част е по-плътна с дебелина около 125 nm, докато горната част е със значителна концентрация на сребърни йони, с по-ниска плътност и дебелина около 300nm.

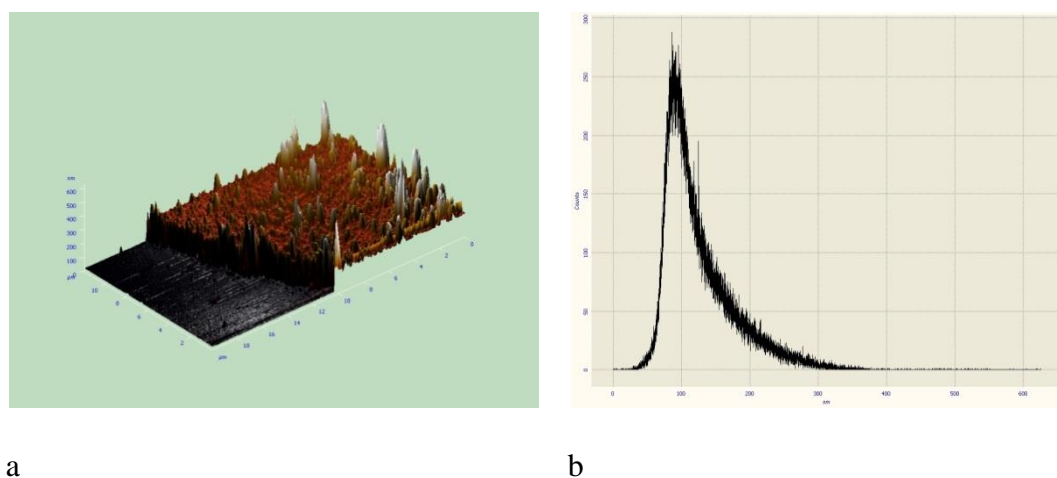


Фигура 6. Образ на повърхността на Si-ДНД/ППХМДС слой.



Фигура 7. Слой от Ag-ДНД/ППХМДС: напречен разрез (а) от страни (б).

Триизмерните изображения и линейно сканиране на композитен слой от Ag-ДНД/ППХМДС са показани на фигури 8 и 9.

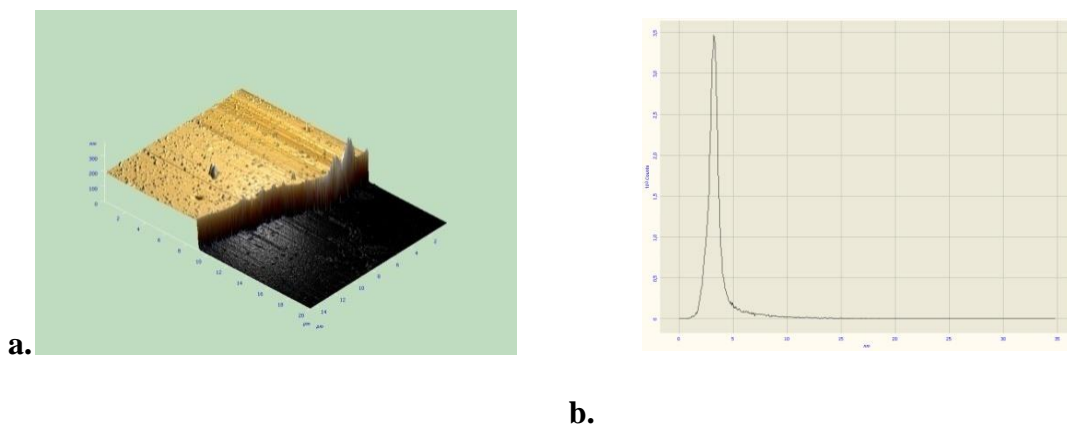


а

б

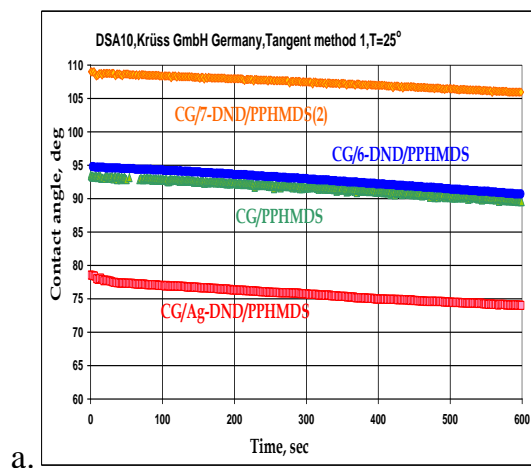
Фигура 8. Триизмерно изображение на Ag-ДНД/ППХМДС върху Si подложка чрез АСМ; размерът е $(x,y,z) = (10\text{mm} \times 20\text{mm} \times 600\text{nm})$ (а); линейно сканиране на образца чрез АСМ(б);

Вижда се, че след третиране с амонячна плазма за 5 мин, грапавостта намалява изключително – до 2.02 nm (фигура 9-б).



Фигура 9. Триизмерно изображение на Ag-ДНД/ППХМДС/ NH_3 върху Si подложка чрез АСМ; размерът е $(x,y,z) = (20\text{mm} \times 16\text{mm} \times 300\text{nm})$ (a); линейно сканиране на образеца чрез АСМ (b);

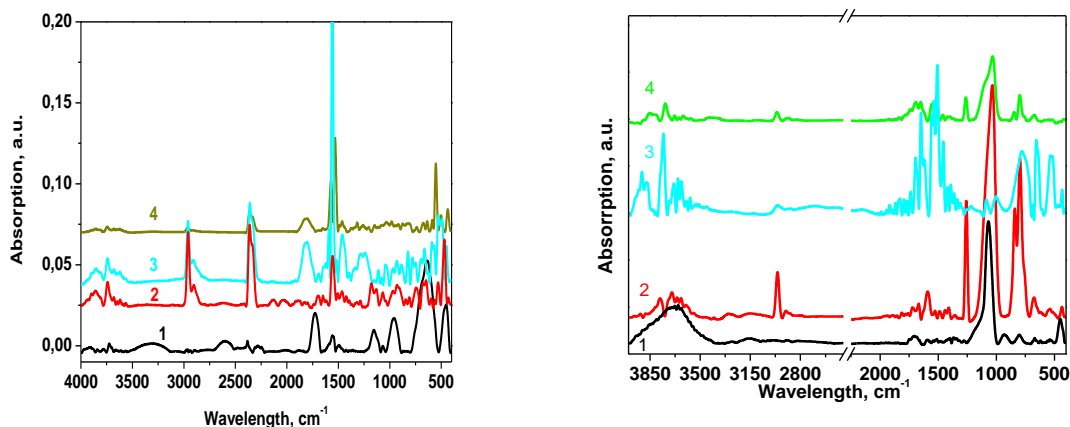
На фигура 10 са представени графики на изменените контактни ъгли на композитни слоеве от типа ДНД/ППХМДС и ДНД/ППХМДС/ NH_3 с времето. Измереният нисък контактен ъгъл за Ag-ДНД/ППХМДС се дължи на хидрофилната повърхност на Ag-ДНД.



Фигура 10. Изменение на водния контактен ъгъл на композитни слоеве от (a) ДНД/ППХМДС и (b) ДНД/ППХМДС/ NH_3 с течение на времето (максимум 600 сек.)

Както се вижда от спектрите на фигура 11, наблюдава се промяна в характерните пикове на полимера, което се обяснява с навлизането на нанодиамаантните частици в

матрицата на полимера. Добре изразени са характерните пикове на sp^3 и sp^2 свързания въглерод на нанодиаманта съответно при 1550 и 1160 cm^{-1} . Така повърхността на композитните слоеве се характеризира с функционални групи от типа $-\text{OH}$, $>\text{C}=\text{O}$, $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$, $\text{Si}-\text{O}-\text{C}$ (фигура 11-2). Образуването на нови



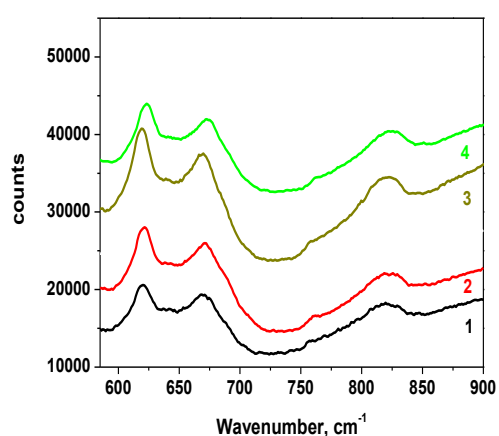
Фигура 11. ФТИЧ спектри на (1) ППХМДС; (2) ДНД/ППХМДС; (3) Si-ДНД/ППХМДС; (4) Ag-ДНД/ППХМДС
 Фигура 12. ФТИЧ спектри на (1) ППХМДС/ NH_3 ; (2) ДНД/ППХМДС/ NH_3 ; (3) Si-ДНД/ППХМДС/ NH_3 ; (4) Ag-ДНД/ППХМДС/ NH_3 ;

връзки (C-Si-C) и различна тетраедрална структура CH_3 (интензивните пикове при $2800-3000\text{ cm}^{-1}$) доказват съществуването както на хидрофобни, така и на хидрофилни центрове по повърхността на композитните слоеве. В случая на Si-ДНД/ППХМДС (фигура 11-3) пиковете около 500 , $1200-1300$, 1470 и 1600 cm^{-1} показват повишено съдържание на аморфен въглерод, дължащо се на силинизирането на нанодиамантените частици. Появата на интензивен пик около 550 cm^{-1} в спектъра на Ag-ДНД/ППХМДС (фигура 11-4), разцепването на пика при 1550 cm^{-1} и появата на широк пик при 1800 cm^{-1} потвърждават наличието на сребърни йони по границите на зърната от диамантни наночастици [32].

Сравняването на същите композитни слоеве, но обработвани с амонячна плазма (фигура 12), показва че функционалните групи по повърхността са значително изменени. Доказателство за това е намалената интензивност на пиковете за метилови групи,

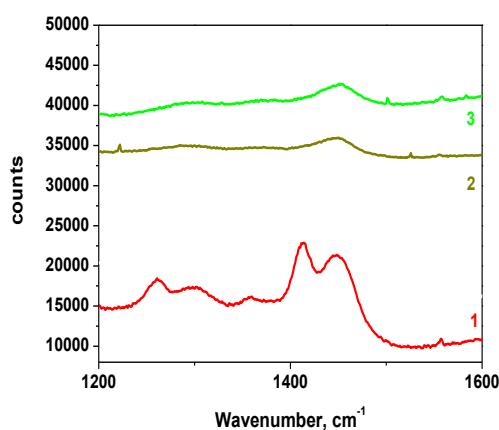
оширяване и увеличена интензивност на пиковите в района $3000\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$. Потвърждаваме, че повърхността на композита е с повишена хидрофилност.

За допълнителен анализ на характерните групи на композитните слоеве от ДНД/ППХМДС използвахме Раманова спектроскопия. На фигура 13-а,b,c са показани спектрите на различни композити. Пиковите, дължащи се на вибрации на метиловите групи се виждат при 2967 и 2906 cm^{-1} , 1413 и 1260 cm^{-1} и 865 , 756 и 688 cm^{-1} . Пиковите при 845 , 790 и 706 cm^{-1} се дължат на връзката C-Si-C. Всички характерни вибрационни пикове на полимера се наблюдават при композитните слоеве. Забелязва се относително интензивен нов пик при 1450 cm^{-1} при всички композити съдържащи нанодиамант.



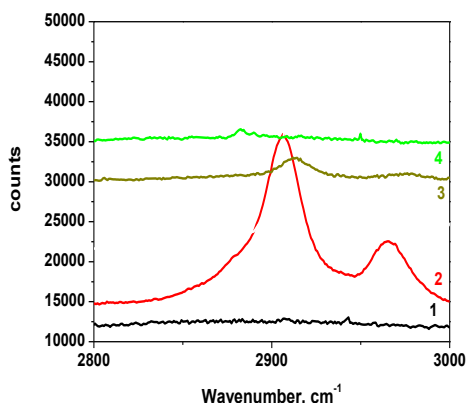
Фигура13–а Раманови спектри ($600\text{--}900\text{ cm}^{-1}$)

- (1) ППХМДС;
- (2) ДНД/ППХМДС;
- (3) Ag- ДНД/ППХМДС;
- (4) Ag- ДНД/ППХМДС/ NH_3 ;



Фигура13–b Раманови спектри ($1000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$)

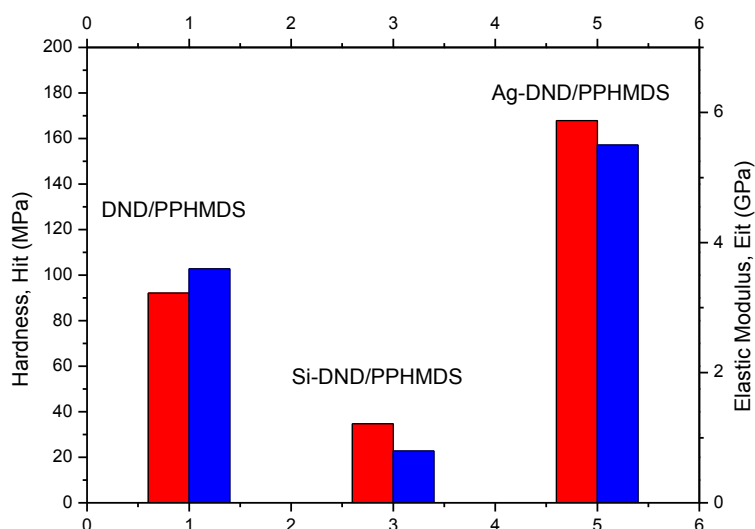
- (1) ДНД/ППХМДС;
- (2) Ag- ДНД/ППХМДС;
- (3) Ag- ДНД/ППХМДС/ NH_3 ;



Фигура 13–с Раманови спектри (2700–3200 cm^{-1})

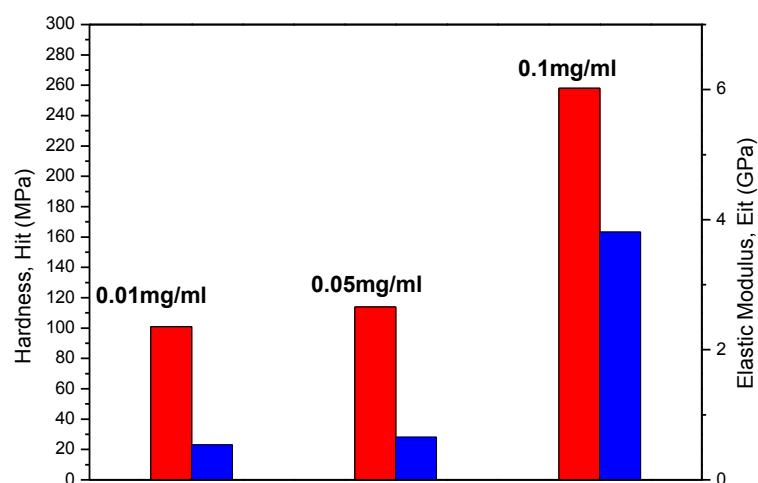
- (1) ППХМДС;
- (2) ДНД/ППХМДС;
- (3) Ag- ДНД/ППХМДС;
- (4) Ag- ДНД/ППХМДС/ NH_3 ;

На фигура 14 е показано сравнение между твърдостта и модула на еластичност на композитните слоеве (ДНД/ППХМДС, Si-ДНД/ППХМДС и Ag-ДНД/ППХМДС). На всеки образец са извършени 8 измервания. За снемане на данните са избрани 5 от тях, при които не се наблюдават изкривявания. Дори при прилагане на сила $10 \mu\text{N}$, се наблюдава дълбочина на пробиване от над 10% от дебелината на слоя. Резултатите показват, че образците Si-ДНД/ППХМДС и Ag-ДНД/ППХМДС имат съответно най-висока и най-ниска стойности на твърдостта (34.7 и 167 MPa), както и на модула на еластичност (0.8 и 5.5 GPa). Извършените измерваният на всички образци показват повтарящи се резултати с ниска дисперсия.



Фигура 14. Сравнителна хистограма за твърдостта и модула на еластичност на измерените образци (ДНД/ППХМДС, Si- ДНД/ППХМДС и Ag- ДНД/ППХМДС)

Същите измервания бяха направени и с един и същ нанодиамаант като пълнител в полимера, но при различни концентрации. Резултатите за твърдостта и модула на еластичност са показани на фигура 15. Образецът с най-голяма концентрация на нанодиамаантени частици (0.1 мг/мл) показва най-високи стойности на твърдостта и модула на еластичност (258 МПа и 3.81 GPa, съответно). От друга страна другите образци с по-ниска концентрация на нанодиамаант (0.01 и 0.05 мг/мл) показват сходни стойности на измерените величини, около 101 МПа и 0.5385 GPa съответно.



Фигура 15. Твърдост и модул на еластичност на измерените образци (ДНД/ППХМДС композити с различна концентрация на нанодиамаант)

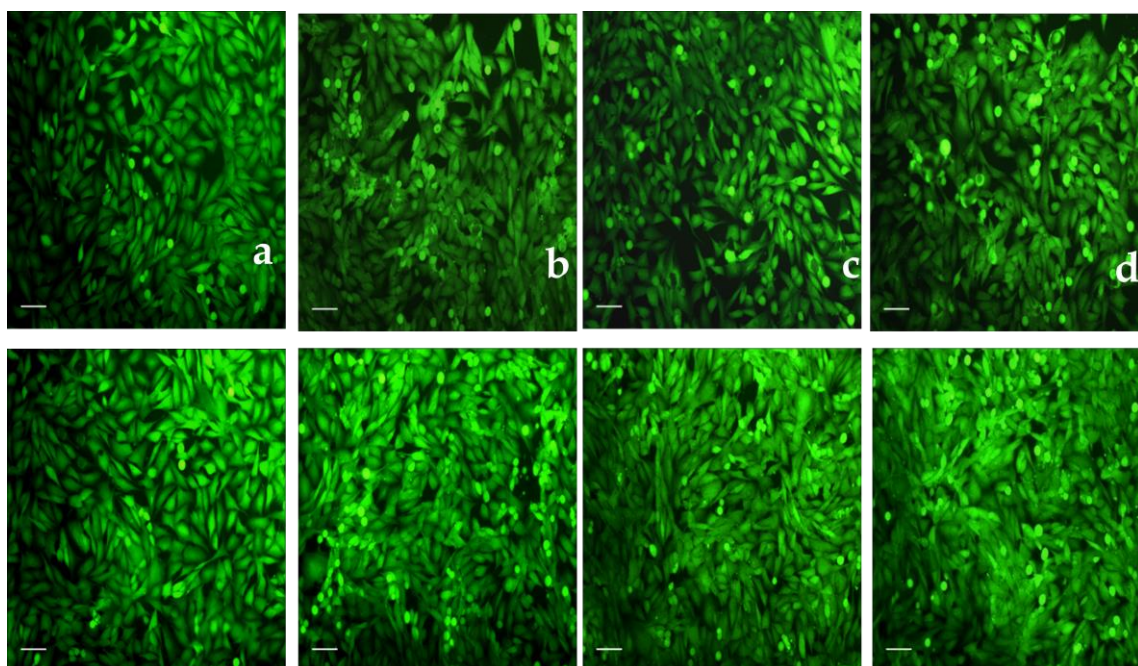
Гореизброените резултати показват, че твърдостта и модула на еластичност на композитните слоеве могат да се изменят като се променя вида на нанодиамаантените частици и тяхната концентрация.

Изследване на биосъвместимост на композитните материали

Цитотоксичност на ДНД частици

В последно време бе доказано, че нанодиамаантът е по-малко цитотоксичен от другите въглеродни материали [33]. От друга страна, цитотоксичността на диаманта може да бъде повлияна от по-нататъшното му химично пречистване или модификация. Затова ние изследвахме токсичността и биосъвместимостта на нанодиамаантите използвани като пълнител за полимерния слой. Резултатите от това изследване са показани на

фигура 16. Както се вижда, излагането на клетките на супернатанта (фигура 16, долен панел) не влияе значително на виталността им. Остеобластните клетки в продължение на 3 дни растат добре в присъствието на всички наночастици образци без съществена разлика помежду им. Когато клетките се инкубират със суспензия от ДНД, съдържаща по-големи наночастици и агломерати, се забелязва слабо намаляване в броя на живите клетки в сравнение със супернатанта (фигура 16, горен панел). Тези резултати показват, че в присъствието на нанодиаманнти, клетките оцеляват и растат нормално и това е, което потвърждава добрата им биосъвместимост[34].

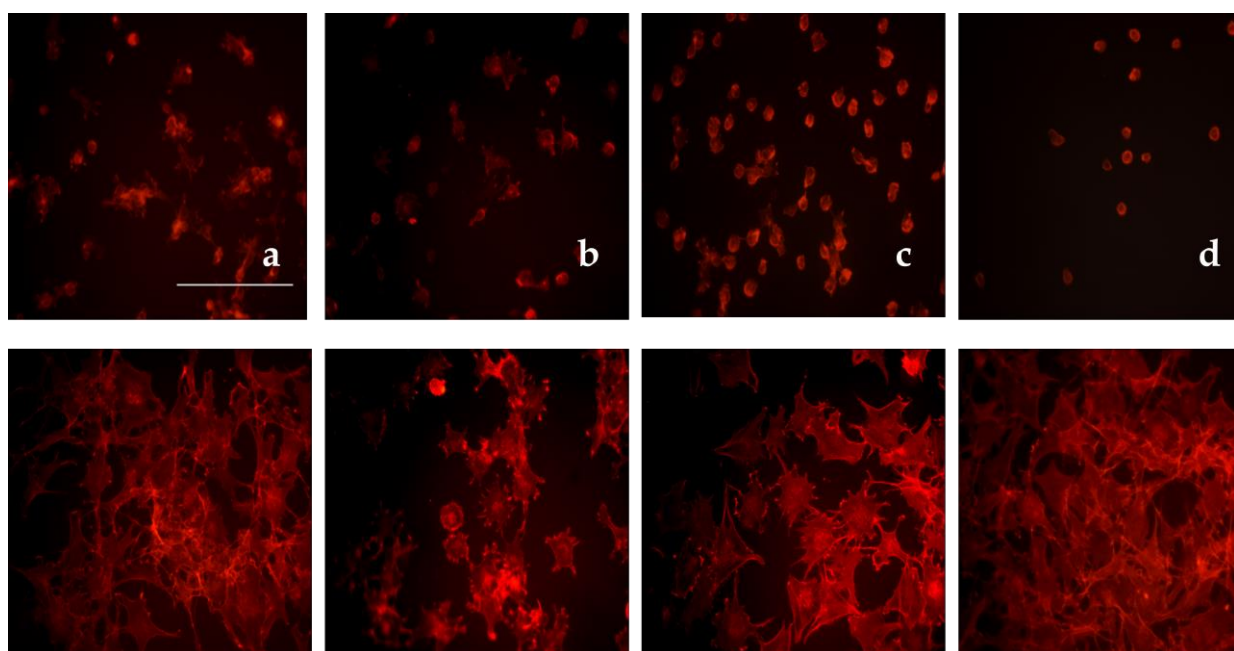


Фигура 16. Обща морфология на MG63 остеобластни клетки инкубирани за 72 ч в суспензия (горен панел) и супернатант (долен панел), ДНД (b); Si-ДНД (c); Ag-ДНД (d); съответно; culture medium+10% FCS се използва като контрола (a); мащаб, 100 μ m.

Обща клетъчна морфология върху композитни слоеве от DNDs/PPHMDS

За по-подробно охарактеризиране на биосъвместимостта на композитните слоеве от ДНД/ППХМДС е изследвано началното взаимодействие с остеобластни MG63 клетки. Остеобластните клетки са основните клетки на костната тъкан, затова взаимодействието им с даден материал дава информация за неговата остеоинтеграция. Ние изследвахме общата клетъчна морфология, организацията на актиновия цитоскелет и комплексите при фокално-адхезионните комплекси, които се формират на местата на

прикрепване на клетките върху повърхността на композита. В допълнение изследвахме ефекта на фибронектин, който е главния адхезивен протеин в извънклетъчния матрикс и играе значителна роля за първоначалното взаимодействие на клетките с биоматериали. Промяната в цялостната клетъчна морфология и в броя на прикрепените клетки върху композита е показана на фигура 17. Когато клетките са поставени върху чисти (без фибронектин) повърхности, те са малки и кръгли по форма (фигура 17, горен панел) и не се забелязва актинова организация. Както се очаква, отлагането на фибронектин върху композитите подобрява клетъчното взаимодействие с всички материали. Върху непокрытите повърхности, най-голям брой клетки се наблюдават при Si-ДНД/ППХМДС (фигура 17-с, горен панел), докато при покритите с протеин повърхности клетките се развиват по-добре върху Ag-ДНД/ППХМДС (фигура 17-d, долен панел).



Фигура 17. Обща морфология на MG63 остеобластни клетки инкубирани за 2 ч върху покривно стъкло, използвано като контрола (a), ДНД/ППХМДС (b); Si-ДНД/ППХМДС (c) и Ag-ДНД/ППХМДС (d); чисти (непокрыти) с фибронектин (горен панел), покрити с фибронектин (долен панел); мащаб 100µм

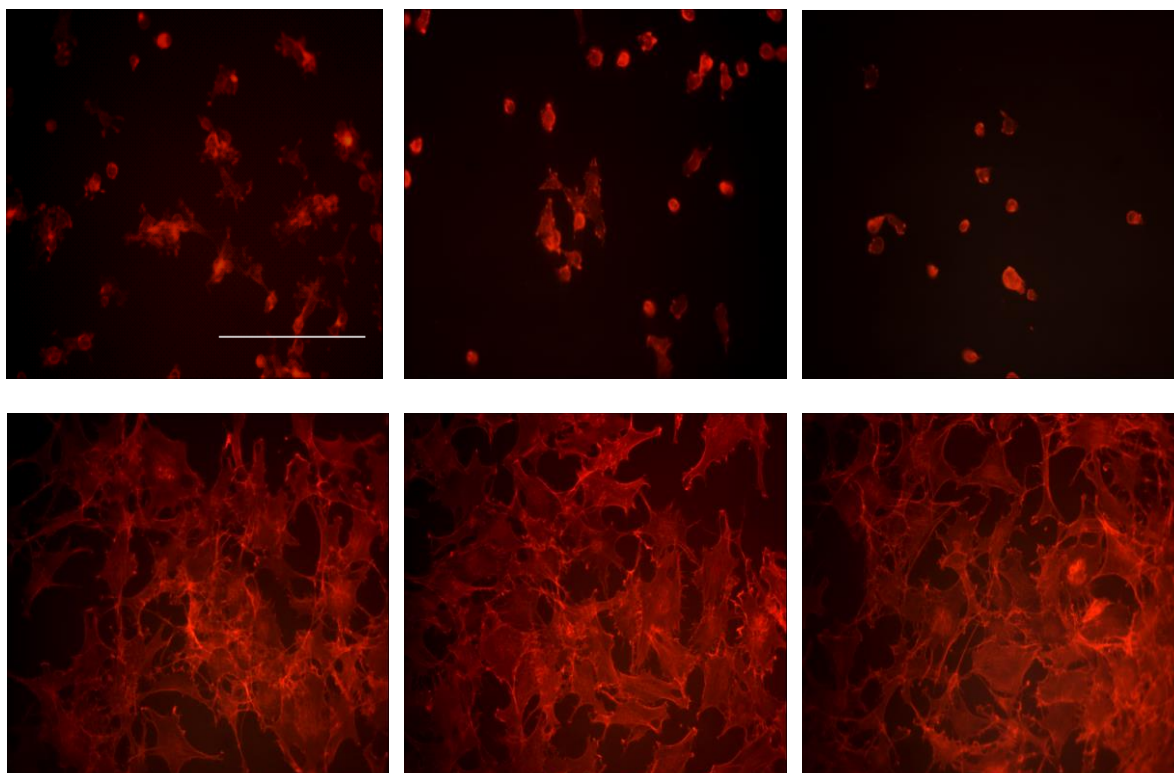
Интересното е, че при покрития с фибронектин ДНД/ППХМДС материал (фигура 17-b, долен панел) клетките показват различна морфология, което означава различна степен на адхезия. Върху Si-ДНД/ППХМДС и особено върху

Ag-ДНД/ППХМДС остеобластите са добре разстлани и цитоскелета е по-добре организиран с добре изразени актинови влакна (фигура 17, долен панел).

Изследване на биосъвместимостта на композитни слоеве от ДНД/ППХМДС, обработвани с амонячна плазма

Изследвахме и ефекта от модификацията с амонячна плазма на слоеве от Si-ДНД/ППХМДС и Ag-ДНД/ППХМДС върху началната адхезия на остеобластни клетки (фигура 18). Използвахме амонячна плазма, тъй като в литературата има данни [35, 36, 37], че такава обработка е лесен начин да се промени една хидрофобна повърхност в хидрофилна и така да се получат подложки, върху които могат да се прикрепят и растат клетки. Наблюдава се слаба спонтанна адхезия на остеобластни клетки върху всички материали, непокрити с фибронектин и обработвани с амонячна плазма (фигура 18, горен панел), подобни на тези, които не са третирани с плазма (фигура 17, горен панел). Отново, повече клетки се прикрепят върху Si-ДНД/ППХМДС и контролното стъкло в сравнение с Ag-ДНД/ППХМДС. След адсорбцията на фибронектин се забелязва драстично покачване на броя прикрепени и разстлани клетки (фигура 18, долен панел), както и значително подобрение в организацията на актиновия цитоскелет и фокалните адхезионни контакти.

Въпреки това, нашите изследвания не показват директна връзка между повишената хидрофилност и наблюдаваните биологични ефекти. След третирането с амонячна плазма, се наблюдават полярни аминок-групи върху полимерните слоеве и така се променя не само хидрофилността, но и повърхностните химични свойства. Много изследвания показват увеличена адсорбция на фибронектин върху функционализираните с NH_3 повърхности амонячна плазма и покритите с фибронектин слоеве, може да се обясни също и с по-доброто свързване на фибронектина с композитния слой. Наблюдаваната висока спонтанна клетъчна адхезия, но не и разстилане, върху непокрити с протеин Si-ДНД/ППХМДС най-вероятно се дължи на увеличена адсорбция на новосинтезирани адхезивни протеини от клетките, и на факта че клетките могат лесно да преодолеят електростатичната бариера, която обуславя бърза адхезия и разстилане.



Фигура 18. Обща морфология на MG63 остеобластни клетки инкубирани за 2 ч: контрола (a), Si-ДНД/ПІХМДС/ННЗ (b) и Ag-ДНД/ПІХМДС/ННЗ (c); не покрити с фибронектин (горен панел), покрити с фибронектин (долен панел); размер 100 μ m

4. Изводи

Успешно бяха получени композитни слоеве на базата на плазмена полимеризация на мономерът хексаметилдисилоксан (ХМДС) и вградени нанодиамантени частици (ДНД) върху различни твърди подложки.

Получените композитни слоеве от типа ДНД/ППХМДС бяха прецизно характеризирани чрез различни физико-химични методи с цел получаване на максимално точна информация.

Получените чисти полимерни (ППХМДС) и композитни (ДНД/ППХМДС) слоеве бяха допълнително модифицирани с амонячна плазма. Показано бе, че след тази обработка повърхностите им се хидрофилизират.

Тестът за цитотоксичност на слоевете показва, че клетките (остеобластни клетки MG63) не само оцеляват, но и се развиват добре в присъствието на нанодиамантени частици (ДНД).

Биологичните изследвания, проведени с остеобластни клетки MG63 показват също, че клетките се развиват добре и върху композитните слоеве, като техния брой е най-голям при слоеве от типа Si-ДНД/ППХМДС. Предварителното покриване на композитните слоеве с фибронектин подобрява клетъчното взаимодействие с всички повърхности, но най-вече при композити от типа Ag-ДНД/ППХМДС. Същият ефект се наблюдава и при обработените с амонячна плазма повърхности.

Най-важният резултат от това изследване е, че използвайки различен тип нанодиамантени частици (ДНД), може да се променя морфологичната и химичната природа, както и биологичното представяне на съответния композитен слой.

III. Списък на публикации и доклади на научни конференции свързани с дисертацията

1. T. Hikov, L. Pramatarova, E. Radeva, L. Vanzetti, E. Iacob, R. Dimitrova, E. Pecheva, S. Stavrev, D. Fingarova, Study of plasma polymer structures to induce composite layers, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 11(9) (2009) 1327-1330 (ИФ-0.433)
2. E. Radeva, L. Pramatarova, R. Dimitrova, S. Popova, T. Hikov, D. Fingarova, E. Pecheva, Infrared analysis of plasma polymerized hexamethyldisiloxane for biocompatible composites, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials* 11(10) (2009) 1432-1435 (ИФ-0.433)
3. L. Pramatarova, E. Radeva, E. Pecheva, T. Hikov, N. Krasteva, R. Dimitrova, D. Mitev, P. Montgomery, R. Sammons, G. Altankov, The advantages of polymer composites with detonation nanodiamond particles for medical applications, Ch. 14, pp. 297-320, in: *On Biomimetics*, Assoc. Prof. Dr. Lilyana Pramatarova (Ed.), InTech Publications, August 2011

IV. Литература

- [1] H Heuer, Innovative materials processing strategies: a biomimetic approach. *Science*. 255.; 5048.;(1992), 1098 – 1105
- [2] H Lowenstam&S Weiner, *On biomineralization*, Ed. New York; Oxford Press(1989)
- [3] O Shenderova, V Zhirnov&D Brenner. *Carbon nanostructures. SolidState Mater.Sci.* 27; (3/4).;(2002), 227-356
- [4] V Dolmatov. *Composite materials based on elastomer and polymer matrix, filled with detonation nanodiamonds. Russian Chemical Reviews.* 70.; 7.; (2007), 607-626
- [5] V Borjanovic, W Lawrence, S Hens, M Jaksic, I Zamboni, C Edso, IVlasov, O Shenderova &G McGuire. *Effect of proton irradiation on photoluminescent properties of PDMS-nanodiamond composites. Nanotechnology.* 19; (2009), 1-10
- [6] K Vasilev, V Sah, K Anselm, C Ndi, M Mateescu, B Dollmann, P Martinek, Ys, L Ploux&H Griesser. *Tunable Antibacterial Coatings That Support Mammalian Cell growth. Nano Letter.* 10.;(2010),202-207
- [7] E Radeva, D Tsankov, K Bobev&L Spassov. *Fourier transform infrared analysis of hexamethyldisiloxane layers obtained in low-frequency glow discharge. J. Appl. Polym. Sci.* 50.;(1993), 165-169
- [8] Min-Hsien. *Simple poly(dimethylsiloxane) surface modification to control cell adhesion. Surf. Interface Anal.*;41.;(2009), 11–16
- [9] E. Kulaga, L. Ploux, L. Balan, G. Schrofj, V. Roucoules, *Mechanically responsive antibacterial plasma polymer coatings for textile biomaterials, Plasma Process. Polym.* 1 (2014) 63–79
- [10] A. Thalhammer, R.J. Edgington, L.A. Cingolani, R. Schoepfer, R.B. Jackman, *The use of nanodiamond monolayer coatings to promote the formation of functional neuronal networks, Biomaterials* 31 (2010) 2097–2104
- [11] H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa, D. Ho, *Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery, Nano Lett.* 7 (2007) 3305–3314
- [12] L.P. McGuinness, Y. Yan, A. Stacey, D.A. Simpson, L.T. Hall, D. Maclaurin, S. Praver, P. Mulvaney, J. Wrachtrup, F. Caruso, R.E. Scholten, L.C.L. Hollenberg, *Quantum measurement and orientation tracking of fluorescent nanodiamonds inside living cells, Nat. Nanotechnol.* 6 (2011) 358–363
- [13] Q. Zhang, V. Mochalin, I. Neitzel, I. Knoke, J. Han, C. Klug, J. Zhou, I. Lelkes, Y. Gogotsi, *Mechanical properties and biomineralization of multifunctional nanodiamond-*

- PLLA composites for bone tissue engineering, *Biomaterials* 32 (2011)87–94
- [14] L. Grausova, L. Bacakova, A. Kromka, S. Potocky, M. Vanecek, M. Nesladek, V. Lisa, Nanodiamond as promising material for bone tissue engineering, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 (2009) 3524–3534
- [15] K. Hristova, E. Pecheva, L. Pramatarova, G. Altankov, Improved interactions of osteoblast-like cells with apatite-nanodiamond coatings depends on fibronectin, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (8) (2010) 1891–1900.
- [16] E. Pecheva, L. Pramatarova, T. Hikov, Y. Tanaka, H. Sakamoto, H. Doi, Y. Tsutsumi, T. Hanawa, Apatite-nanodiamond composite as a functional coating of stainless steel, *Surf. Interface Anal.* 42 (2010) 475–480.
- [17] V. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi, The properties and applications of nanodiamonds, *Nat. Nanotechnol.* 7 (2012) 11–23
- [18] A.M. Schrand, H. Huang, C. Carlson, J.J. Schlager, E. Osawa, S.M. Hussain, L. Dai, Are diamond nanoparticles cytotoxic? *J. Phys. Chem. B* 1 (2007) 2–7
- [19] N. Mohan, C.-S. Chen, H.-H. Hsieh, Y.-C. Wu, H.-C. Chang, In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*, *Nano Lett.* 10 (2010) 3692–3699.
- [20] M Baidakova & A Vul'. New prospects and frontiers of nanodiamond clusters. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40, (2007) 6300-6311
- [21] V.A. Popov, Metal matrix composites with non-agglomerated nanodiamond reinforcing particles, in: X. Wang (Ed.), *Nanocomposites*, Nova Science Publishers, Inc., USA, 2013, pp. 369–401
- [22] S.A. Rakha, R. Raza, A. Munir, Reinforcement effect of nanodiamond on properties of epoxy matrix, *Polym. Compos.* 34 (2013) 811–818.
- [23] L. Pramatarova, E. Radeva, E. Pecheva, T. Hikov, N. Krasteva, R. Dimitrova, D. Mitev, P. Montgomery, R. Sammons, G. Altankov, The advantages of polymer composites with detonation nanodiamond particles for medical applications, in: L. Pramatarova (Ed.), *Biomimetics*, InTech Inc., Croatia, 2011, pp. 297–320
- [24] G. Schmidt, M.M. Malwitz, Properties of polymer–nanoparticle composites, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 8 (2003) 103–108
- [25] D Mitev, R Dimitrova, M Spassova, Ch Minchev & S Stavrev. Surface Peculiarities of Detonation Nanodiamonds in Dependence of Fabrication and Purification Methods. *Diamond and Related Materials.* 16.; 4-7.; (2007)776-780
- [26] M Leeper and R Wright, *Elastomers in Medicine, Rubber Chemistry and Technology*, 56, (1983) 525-526

- [27] I Karube, Biosensors and clinical analysis, *Rinsho. Byori.*, 39 (3), (1991) 237-242
- [28] P Vondrachek, B Dolesel, Biostability of medical elastomers: a review, *Biomaterials*, 5, (1984) 209-214
- [29] I Chifkova, P Lopour, P Vondrachek, F Jelinel, Silicone rubber-hydrogel composites as polymeric biomaterials: I. Biological properties of silicone rubber-p(HEMA) composite, *Biomaterials*, 11, (1990) 393-396
- [30] C-S Hong, H Park, S Wang, J Moon, H Park & R Hill. Formation of photoresist-free patterned ZnO film containing nano-sized Ag by photochemical solution deposition. *Applied Surface Science*. 252.; 21.,(2006). 7739–7742
- [31] J Murphy & N Jana. Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires. *Advanced Materials*. 14.; 1.; (2002). 80–82
- [32] L Pramatarova, N Krasteva, E Radeva, E Pecheva, R Dimitrova, T Hikov, D Mitev, K Hristova & G Altankov. Study of detonation nanodiamond – plasma polymerized hexamethyldisiloxane composites for medical application. *J. Phys.: Conf. Ser.* 253; (2010) 012078
- [33] A Schrand, J Johnson, L Dai, M Hussain, J Schlager & L Zhu.. Cytotoxicity and genotoxicity of carbon nanomaterials. In: Webster TJ, editor. *Safety of nanoparticles. From manufacturing to medical applications*. New York: Springer;. (2009), 159-187
- [34] Q Zhang, V Mochalin, I Neitzel, I Knoke, J Han, C Klug, J Zhou, P Lelkes & Y Gogotsi. Fluorescent PLLA-nanodiamond composites for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 32.; (2011) 87-94
- [35] M Chen, P Zamora, P Som, L Pena & S Osaki. Cell attachment and biocompatibility of polytetrafluoroethylene (PTFE) treated with glow-discharge plasma of mixed ammonia and oxygen. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 14.; 9.; (2003). 917–935
- [36] J Yang, G Shi, J Bei, S Wang, Y Cao, Q Shang, G Yang & W Wang. Fabrication and surface modification of macroporous poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. *J Biomed Mater Res.* 62.; (2002). 438–446
- [37] N Krasteva, K Hristova, E Radeva, E Pecheva, R Dimitrova & L Pramatarova. Effect of ammonia plasma treatment on the biological performance of plasma deposited polyhexamethyldisiloxane. *CP1203 American Institute of Physics.* (2010) 688-693