

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Кафедра наноелектроніки

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

зі спеціальності 163 – «Біомедична інженерія»

на тему:

**«РОЗРОБКА ТА ДОСЛІДЖЕННЯ АПАТИТ-БІОПОЛІМЕРНИХ
МАТЕРІАЛІВ ДЛЯ МЕДИЦИНИ»**

Кумеди Марії Олександрівни

Завідувач кафедри

_____ проф. О. Д. Погребняк

Науковий керівник

_____ Л. Б. Суходуб

«__» _____ 2018р.

«__» _____ 2018р.

РЕФЕРАТ

Магістерська робота містить: 73 сторінки, 32 рисунки, 5 таблиць, 5 формул, 1 додаток та 57 джерел літератури.

Об'єктами дослідження роботи є хітозан-апатитні композити та альгінат-апатитні плівки з додаванням йонів металів.

Мета роботи – отримання композитів та плівок на основі гідроксиапатиту та біополімерів для ремоделювання дефектів кісткової тканини з функцією доставки лікарського засобу в зону імплантації.

В роботі описана структура кісткової тканини, властивості біополімерів, методи отримання гідроксиапатиту та матеріалів на його основі. Розглянуто сучасний стан розробок на дану тематику.

Досліджено вплив мікрохвильового випромінювання на швидкість формування хітогелів та на їх структурні характеристики. Дослідження структурних характеристик отриманих матеріалів було проведено на рентгенівському дифрактометрі ДРОН-3. Досліджено динаміку вивільнення лікарського засобу (Анестезину) зі складу композитних матеріалів за допомогою рідинного хроматографу Agilent 1200.

ГІДРОКСИАПАТИТ, ХІТОЗАН, АЛЬГІНАТ, XRD, HPLC, MW
ВИПРОМІНЮВАННЯ .

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	7
1.1. Будова та властивості кісткової тканини.....	7
1.2. Фосфати кальцію. Роль та застосування.....	9
1.3. Полімери. Роль та застосування	13
1.4. Апатит полімерні композитні матеріали	16
1.5. Інструментальні методи дослідження матеріалів	20
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	27
2.1. Технологія отримання гідроксиапатиту	27
2.2. Матеріали та технологія виготовлення хітозан-апатитних композитів.....	28
2.3. Матеріали та технологія виготовлення альгінат-апатитних плівок.....	31
2.4. Виготовлення кап для лікування зубів на основі альгінат-апатитних плівок	34
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	37
3.1. Вплив MW випромінювання на структуру хітозан-апатитних композитів.....	37
3.2. Дослідження вивільнення лікарських засобів з хітозан-апатитних композитів.....	46
3.3. Дослідження структури альгінат-апатитних плівок.....	50
РОЗДІЛ 4. БЕЗПЕКА ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ ТА ОХОРОНА ПРАЦІ ПРИ РОБОТІ В ЛАБОРАТОРІЇ.....	54
4.1. Основні правила безпеки при роботі в хімічній лабораторії.....	56
ВИСНОВКИ.....	61

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	62
ДОДАТОК А.....	70

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Alg – альгінат

CS – хітозан

DDS (СДЛ) – системи доставки лікарських засобів

FTIR (ІЧ) – інфрачервона спектроскопія Фур'є-перетворення

HPLC (ВЕРХ) – високоефективна рідинна хроматографія

MW – мікрохвильовий вплив

NCP – не колагенові білки

SEM (СЕМ) – скануючи електронна мікроскопія

XRD – рентгенівська дифракція

ГА (НА) – гідроксиапатит

Me – йони металів

ОФК – ортофосфати кальцію

ПЕГ – поліетиленгліколь

СНХ – хлоргексидин

PBS – фосфатно-буферний фізіологічний розчин

ВСТУП

Синтетичний гідроксиапатит відіграє ключову роль в імплантології, стоматології та регенеративній медицині. Завдяки його нетоксичності та біосумісності з кістковими і стоматологічними тканинами, він знайшов застосування як замітник кістки. Той факт, що пористі гранули та скафолди можуть бути виготовлені з нанокристалічного гідроксиапатиту і те, що вони мають високу пористість, означає, що він може бути використаний у фармацевтиці як носій для лікарських засобів з контрольованим їх вивільненням.

Біополімери, такі як хітозан та альгінат, широко використовуються в медицині та фармацевтиці. Вони нетоксичні, біосумісні та біодеградуєчі, що дозволяє використовувати їх для зв'язування апатиту і отримання більш твердих або, навпаки, пластичних матеріалів.

Дана робота є частиною системного дослідження біоматеріалів, які проводяться в ННЦ «Нано- і біоматеріали» СумДУ в рамках держбюджетної наукової теми № 62.15.00-01.18/203П «Фізичні основи формування складу апатит-біополімерних пористих матриць для контрольованої доставки лікарських засобів в зону імплантації»

РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Будова та властивості кісткової тканини

Людська кістка складається з 69% неорганічного компонента та 22% органічного компонента, такого як колаген I, а решта – вода. Переважним неорганічним компонентом кісток є гідроксиапатит (ГА, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).

Людські кістки мають три основні функції: прийом навантаження; захист кісткового мозку і постачання клітин; зберігання йонів, таких як йони кальцію та йони фосфату. З огляду на структуру кісток, ми можемо зробити висновок, що вона побудована за ієрархічною структурою, яка коротко зображена на рисунку 1.1 [1].

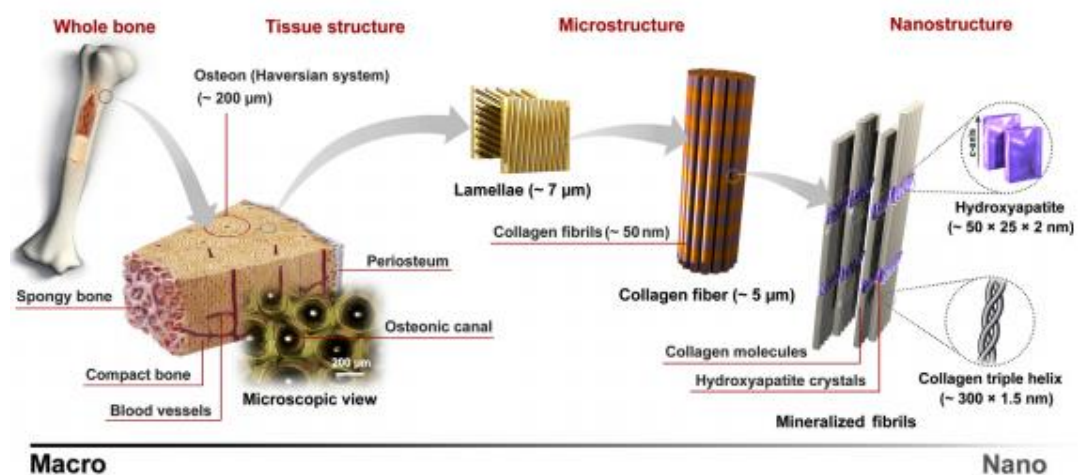


Рис. 1.1 – Ієрархічна структура типової кістки в різних масштабах довжини [1].

Це сімейство матеріалів (кісткова тканина) також містить інших членів, які з історичних причин, мають різні назви. Найбільш відомий приклад - дентин, матеріал, який утворює внутрішні шари зубів [2].

Три основних компоненти кістки мають абсолютно різні властивості. У цьому сенсі кістка має форму композиту. Органічна складова має фіброзну структуру на рівні окремих потрійних спіральних молекул, на рівні фібрил та на рівні зборок фібрил, які утворюють волокна. У той час як в межах фібрили

структура є кристалічною з ортотропною симетрією, що забезпечується включенням неорганічної складової. Це означає наявність трьох площин симетрії, ортогональних один до одної.

У той час як апатит є єдиним мінеральним типом у зрілої кістки, колаген I типу не є єдиним білком. Є двадцять і більше так званих не колагенових білків (NCP), але разом вони складають менше 10% загального вмісту білка [3].

Жорстка частина кістки – або компактна кістка – складена остеонами (гаверсова система) розміром ~ 200 мкм. Вони мають концентричну та багат шарову структуру навколо гаверсових каналів. Їх ламелі розміром ~ 7 мкм складені анізотропними волокнами, а в напрямку волокон вони підвищують міцність на розрив. Причому кожне багат шарове накладання ортогональне, так що кістка може показати не тільки гнучкість, але і високу міцність у бік як розтягування, так і згинання.

У наноструктурі можна спостерігати приблизно 5 мкм орієнтованих колагенових волокон з хімічним зшиванням і розміщеними кристалами гідроксиapatиту розміром $\sim 50 \times 25 \times 2$ нм між ними. Тому кістку можна назвати своєрідним нанокмполитом, і саме тому вона може мати гарні механічні властивості [1].

Органічні молекули в фізіологічному розчині можуть впливати на морфологію та орієнтацію неорганічних кристалів. Розуміння того, як живі організми контролюють ріст і структуру неорганічних матеріалів, може призвести до значних досягнень у галузі матеріалознавства, наближаючи до нових методів синтезу наномасштабних композитів.

1.2. Фосфати кальцію. роль та застосування

1.2.1. Ортофосфати кальцію (ОФК). Кристалографія апатиту.

Ортофосфати кальцію широко розповсюджені в природі та займають важливе місце у організмі людини (кістки, зуби) (табл. 1.1). Через це вони мають велику популярність у галузі тканинної інженерії. Вони були виявлені в 1679 році та складаються з трьох хімічних елементів: Ca, P та O.

Більшість ОФК не розчинні у воді, але мають гарну розчинність у кислотах. У формі порошку штучні ОФК мають білий колір, у той час як природні завжди забарвлені через наявність домішок (наприклад, лужноземельними металами).

Найчастіше апатит у тканинах людини може бути виражений формулою $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, і найбільш домінуючим компонентом є гідроксиapatит (ГА: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). На рисунках 1.2 і 1.3 показана схематична та кристалічна структури гідроксиapatиту відповідно.

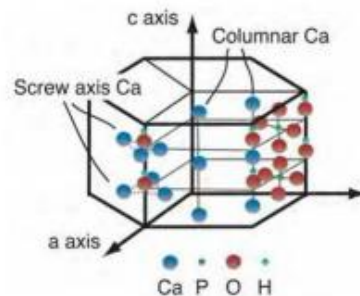


Рис. 1.2 – Схема структури ГА [5].

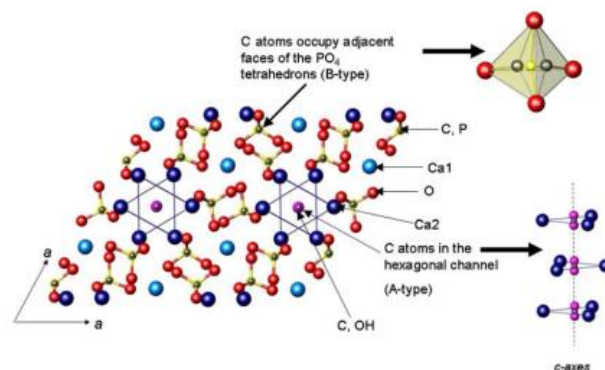


Рис. 1.3 – Кристалічна структура моделі ГА з поперечного перерізу [6].

Таблиця 1.1 – Ортофосфати кальцію та їх основні властивості [4]

Співвід. Са: Р	Ортофосфат кальцію [2,4]	Хімічна формула	Розчинність при температурі		Область рН стабіль- ності у водних розчинах при температурі 25 °С
			25 °С	37 °С	
Монокальцій фосфат:					
0,5	моногідрат (МКФМ)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,14	Немає даних	0,0-2,0
0,5	ангідрид (МКФА)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1,14	То же	Нестабільний
Дикальцій фосфат:					
1,0	дигідрат, мінерал брушит	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,59	6,63	2,0 - 6,0
1,0	ангідрид, мінерал монетит	CaHPO_4	6,90	7,02	Нестабільний
1,33	Октакальцій фосфат (ОКФ)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,6	95,9	5,5 - 7,0
1,5	α -трикальцій фосфат (α -ТКФ)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,5	25,5	Немає даних
1,5	β -трикальцій фосфат (β -ТКФ)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	29,5	Немає даних
1,2-2,2	Аморфний фосфат кальцію (АФК)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n = 3,0 - 4,5$)	Немає даних		~5-12
1,5-1,67	Гідроксиапатит с дефіцитом кальцію	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	~85,1	~85,1	6,5 - 9,5
1,67	Гідроксиапатит (ГА)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	117,2	9,5 - 12
1,67	Фторапатит (ФА)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	120,0	119,2	7-12
2,0	Тетракальцій фосфат	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38-44	37-42	Немає даних

Як видно на рисунку 1.2, ГА має гексагональну кристалічну структуру ($a=b=9.432 \text{ \AA}$; $c=6.881 \text{ \AA}$). Однак ГА у кістках та зубах не є чистим ГА, а містить кілька карбонатних йонів. Кістки людини містять 7,4% карбонатних йонів, а зуби мають 5,6%. Залежно від розташування вуглецевих атомів можна отримати два типи карбонатних гідроксиапатитів.

Оскільки ГА є основним компонентом твердих тканин людини, він має чудову біосумісність і абсолютно нетоксичний. Завдяки цим здібностям багато біоматеріалів були вироблені з ГА і було зроблено багато досліджень. Проте як ГА екстрагується на колагенові волокна все ще незрозуміло, і дослідження способів компенсації крихкості ГА в біомедичних матеріалах продовжується.

1.2.2. Методи отримання біосумісних матеріалів

Для отримання гідроксиапатиту існують так звані мокрі, сухі і гідротермальні способи [7]. Кожен з них має як свої переваги, так і недоліки.

1) Сухі (твердофазні) способи передбачають отримання ГА шляхом застосування твердофазних реакцій, дифузійних процесів в результаті прожарювання при 1000-1300 °C сумішей сполук, що містять йони кальцію і фосфат-йони, в певних кількостях. Як джерело ОН-груп використовують атмосферу парів води. Одним із прикладів сухого синтезу служить спосіб отримання ГА з солей лужноземельних металів (Ca, Sr, або Ba) і ортофосфорної кислоти.

Інший приклад твердофазного синтезу ГА - прожарювання сумішей $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ і CaCO_3 ; $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ і CaCO_3 ; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і CaO при 900-1300 °C в присутності парів води:



Сухі методи вважаються стандартними для отримання ГА стехіометричного складу з співвідношенням Ca/P = 1,67, але вони вимагають багато часу, енергоємності та високих температур. Крім того, за допомогою цих методів важко досягти гомогенності продуктів.

2) Вологі (рідкофазні) методи засновані на утворенні осаду ГА при реакції осадження в результаті змішування водних розчинів сполук, що містять йони кальцію і фосфат-йони при збереженні рН вище 7 (оптимально 10,5) і витримці осаду в відповідних умовах. Як джерела йонів кальцію в більшості випадків використовують $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; а як джерело фосфору - H_3PO_4 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Для регулювання рН часто застосовують розчин аміаку або гідроксид натрію.

На швидкість кристалізації первинного осаду в ГА впливають багато чинників: концентрація вихідних солей, швидкість перемішування, рН, температура реакції, час витримування, вплив MW випромінювання і ін. Тому для отримання відтворюваних результатів необхідно строго дотримуватися всіх умов синтезу.

Серед безлічі мокрих методів можна виділити кілька класичних, які з тими чи іншими змінами наводяться в 70% зарубіжних статей і патентів. Одним з них є метод, в якому в якості джерела йонів кальцію використовують $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ і який описується наступною реакцією:



На практиці розчин $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ повільно додається до розчину $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ змішаного з NH_4OH . В процесі утворюється білий хмароподібний осад. Далі отриманий розчин нагрівають до 80°C . Відстоюють одну добу і промивають, до отримання нейтрального рН промивної води.

Серед усього розмаїття способів отримання ГА перевага віддається останній групі методів як найбільш простих, які не потребують спеціальної апаратури.

1.3. Полімери. Роль та застосування

1.3.1. Альгінат

Альгінат - це природний аніонний полімер, який, як правило, отримують з коричневих водоростей. Може бути використаний для багатьох біомедичних застосувань через його біосумісність, низьку токсичність, відносно низьку вартість та здатність до гелеутворення шляхом додавання двовалентних катіонів, таких як Ca^{2+} [8]. На рисунку 1.4 представлена структура альгінату натрію:

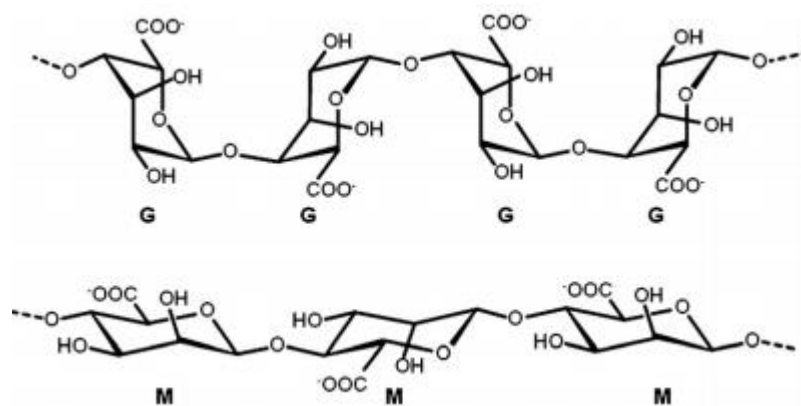


Рис. 1.4 – Структура альгінату натрію.

Комерційно доступний альгінат витягують з водоростей шляхом обробки водними лужними розчинами, як правило, розчином NaOH. Екстракт фільтрують, а до фільтрату додають або хлорид натрію, або кальцію, щоб осаджувати альгінат. Після подальшої очистки виробляється водорозчинний порошок альгінату натрію [8]. Альгінат, як правило, використовується у формі гідрогелю в біомедицині, включаючи загоєння ран, доставку ліків та застосування до інженерних матеріалів. Він біосумісний, і часто може бути доставлений в організм за допомогою інвазивного введення.

«Зшивання» альгінату зазвичай здійснюється шляхом хімічного або фізичного зв'язування. Найбільш поширеним способом приготування гідрогелів є сполучення розчину з йонними зшиваючими агентами, такими як

двовалентні катіони (наприклад, Ca^{2+}). Хлорид кальцію (CaCl_2) є найбільш часто використовуваним агентом для перехресного зв'язку альгінату, хоча це призводить до швидкого та погано контрольованого гелеутворення.

1.3.2. Хітозан

Хітозан - це лінійний полісахарид, що складається з випадково розподіленого β - (1-4)-зв'язаного D-glucosamine (деацетильованого агрегату) та N-ацетил-D-глюкозаміну (ацетильованого агрегату) [9]. Він виробляється шляхом деацетилування хітину, що є структурним елементом екзоскелету ракоподібних (наприклад, крабів та креветок) та клітинних стін грибів. На рисунку 1.5 представлена структура хітозану.

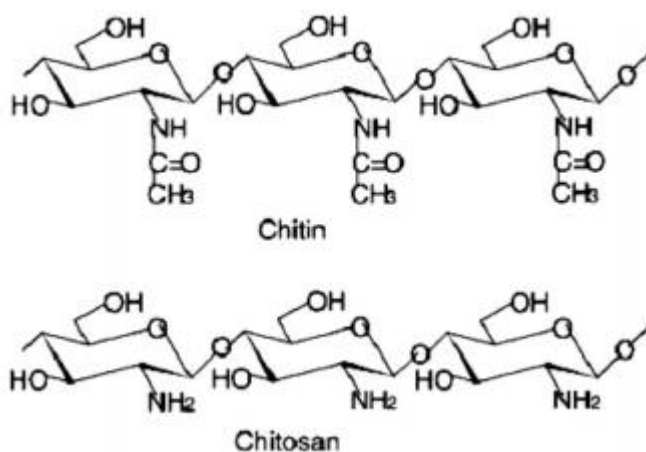


Рис. 1.5 – Хімічна структура хітину та хітозану.

Загальним методом синтезу хітозану є деацетилування хітину з використанням надлишку гідроксиду натрію як реагенту, та води як розчинника. Молекулярна маса CS знаходиться в діапазоні від 300 до 1000 кДа і залежить від джерела та методу, який використовується для його отримання. Ступінь деацетилування CS (N-ацетилглюкозамін /глюкозамін) може варіювати від 30 до 95% [9].

Хітозан є розчинним у воді, біосумісним, біологічно розкладається, а також є біо-клеєм, який легко зв'язується з негативно зарядженими поверхнями, такими як слизові оболонки. Це також покращує транспортування полярних лікарських засобів через епітеліальні поверхні.

Хітозан може бути використаний для транспортування лікарського засобу в кислому середовищі. Одним із прикладів було транспортування інсуліну [10].

1.3.3. Синтетичні полімери

Хоча природні полімери в даний час є матеріалами, найбільш широко використовуваними при виготовленні композитів, синтетичні полімери були і продовжують широко використовуватися, оскільки вони мають хорошу механічну міцність, контрольовані механіко-хімічні властивості та контрольований рівень біодеградації.

Синтетичні полімери можна розділити на два класи: біологічно деградуючі, такі як полігліколева чи полімолочна кислота та сополімери, полікапролактон, поліуретани; і не деградуючі, такі як полівініловий спирт, полігідроксиетилметакрилат, і поліпропілакриламід.

Однак, оскільки найбільш поширені синтетичні полімери мають гідрофобний характер, вони мають погані властивості змочування, що призводить до поганого розподілу клітин та поганої адгезії. Крім того, синтетичні полімери можуть викликати системні або локальні реакції, викликані продуктами кислотної деградації [11,12].

1.4. Апатит полімерні композитні матеріали

1.4.1. Вимоги до матеріалів медичного призначення

Виготовлення матеріалів, придатних для біомедичного застосування, висуває підвищені вимоги до властивостей цих матеріалів. В цілому, необхідна міжгалузєва співпраця між матеріалознавцями, медиками і біологами, щоб створити оптимальні матеріали. Необхідно розглядати три області властивостей, які разом складають поняття біосумісності матеріалів:

- механічна сумісність (жорсткість);
- хімічна сумісність (відсутність токсичних продуктів розкладу, сумісність з навколишніми тканинами);
- біологічна сумісність (відсутність імунної реакції).

З наведених прикладів випливає, що всі три класи перерахованих вище вимог не можна відокремити один від одного. Так, зокрема, виділення хімічного компонента з матеріалу може привести до біологічної реакції відторгнення, а також знизить механічну міцність.

Сучасні можливості припускають широкий вибір матеріалів, які за певних умов можна комбінувати і створювати композитні матеріали, щоб досягти кращих властивостей [13].

Композитний каркас, що складається з двох різних матеріалів, таких як синтетичний органічний полімер та неорганічні матеріали, поєднує переваги кожного окремого матеріалу та мінімізує їх недоліки.

Полімерні матеріали не мають адекватної жорсткості. Додавання жорстких матеріалів неорганічного походження, таких як скло та кераміка, робить їх придатними для регенерації кісткових тканин.

Високопористий полімер-керамічний композитний каркас є перспективним матеріалом для інженерії кісткової тканини завдяки своїм відмінним механічним властивостям та остеопровідності. Науковці [14] вказали на поліпшення клітинної адгезії, розповсюдження та життєздатність клітин, вирощених на полімерно-біологічних композитах, а також

підтвердили високу біологічну активність та біосумісність матеріалу для відновлення твердих тканин.

1.4.2. Огляд існуючих композитів на основі ГА.

На даний момент існує велика кількість матеріалів, до складу яких входить гідроксиапатит та різні синтетичні полімери. Такі матеріали забезпечують довгий час біодеградації та вивільнення лікарських засобів. Однак все ж залишається проблема створення максимально нетоксичних матеріалів для організму людини. Тому використання природних полімерів для створення композитів має значний сенс.

Нещодавні дослідження в галузі інженерії тканини почали зосереджуватися на використанні ін'єкційних композитів, оскільки вони можуть бути введені в дефектну ділянку методом неінвазивної хірургії для запобігання інфікування, хірургічних рубців та великої крововтрати [15-18].

Розроблені різні типи ін'єкційних матеріалів, таких як мікрочастинки, гідрогелі, нанокомпозитні плівки та наночастинки, з використанням біоматеріалів, таких як природні та синтетичні полімери, біокомпозити та біокераміка [19-21]. Серед багатьох біоматеріалів хітозан та гідроксиапатит широко досліджені для виготовлення ін'єкційних лікарських форм [22,23].

Полісахаридний ланцюг хітозану здобув ще більшу увагу в сфері заміни кісток і регенерації хрящів через структурну подібність з глікозаміногліканом, що є основним компонентом позаклітинної матриці кісток [24]. Хітозан має амінову групу, яку можна перехресно зв'язати з аніонним нетоксичним триполіфосфатом натрію (ТПФ), щоб отримати жорсткі хітозанові скафолди з високою механічною міцністю та контрольованим вивільненням інкапсульованих факторів росту [25-27].

Механічна міцність скафолдів є важливою властивістю, необхідною для інженерії кісткової тканини. Для покращення механічних властивостей

матеріалів хітозан може бути сполучений з іншими синтетичними та природними полімерами, керамікою [28-31].

ГА-хітозанові скафолди показали хорошу цитоактивність з остеобластами, що є свідченням можливості застосування ГА в інженерних матеріалах для кісткової тканини [32]. Крім того, дослідження показали, що наявність ГА в композитних кісткових біоматеріалах покращує диференціювання передостеобластів, мезенхімальних стовбурових клітин людини у присутності остеогенних факторів [33].

1.4.3. Застосування біокомпозитних матеріалів в якості систем для доставки лікарських засобів

Одним з напрямків розвитку апатитної біоінженерії є виробництво систем доставки ліків (DDS) та контрольованих систем вивільнення лікарських засобів, які демонструють гарні адсорбційні властивості [34].

Пористі структури ГА, просочені відповідним лікарським засобом, являють собою систему, яка доставляє ліки до постраждалих ділянок, а також являє собою каркас для новоутвореної кістки [35]. Такі біоматеріали використовуються в терапії та профілактиці захворювань кісток, в першу чергу остеопорозу, пухлин кісток та метастазів в кістках, а також для лікування пародонтиту зубів. Також надзвичайно важливим є дослідження систем, що поставляють антибіотики безпосередньо до твердих тканин [34].

Системи доставки та введення лікарських засобів, вважається, мають підвищену біодоступність, передбачувану терапевтичну відповідь, більшу ефективність та безпеку, а також контрольований і тривалий час вивільнення ліків [36].

Розроблені різні матеріали, що містять препарати, розподілені в межах біосумісної матриці [36-40]. Існують монолітні системи на основі пористої кераміки [39,40]. Системи на основі кераміки викликали підвищений інтерес, при цьому особлива увага приділялася використанню гідроксиапатиту як

керамічної складової системи. ГА широко використовується для репарації кісток, він абсолютно біосумісний з організмом людини, нетоксичний та остеокондуктивний [40-42]. Тому розвиток матеріалів на основі ГА з вмістом лікарських засобів (наприклад: антибіотики, антимікробні препарати) з контрольованою кінетикою їх вивільнення є актуальним з огляду на кількість проблем в хірургії кісток [42], які пов'язані з нерівномірним розподілом лікарських засобів в зоні дефекту через обмежену циркуляцію крові [42,43].

Поведінка біоматеріалів в організмі залежить від їх морфології та мікроструктури. Відомо, що нерегулярна морфологія твердих частинок викликає запальні реакції [41], тому круглі гранули з гладкою геометрією є кращими для заповнення дефектів тканини.

Лікарські засоби можуть бути введені до складу біоматеріалів на основі гідроксиапатиту через адсорбцію, хімічне або фізичне зв'язування, імпрегнацію. Стратегії підготовки детально описані Лоса та ін. [44].

В даній роботі до складу полімер-апатитних композитів вносили наступні лікарські засоби:

- Хлоргексидин - лікарський препарат, антисептик, в готових лікарських формах використовується у вигляді біглюконату (Chlorhexidini bigluconas). Хлоргексидин успішно застосовується в якості протимікробного засобу в стоматології, зовнішнього антисептика і як дезинфікуючий засіб вже більше 60 років.

- Бензокаїн («Анестезин») - лікарський засіб, місцевий анестетик. Білий кристалічний порошок без запаху, слабогіркокого смаку; викликає на язиці відчуття оніміння. 1 г бензокаїну розчинний в 2500 мл води, 5 мл етанолу, 4 мл ефіру, 2 мл хлороформу, в жирних оліях (від 30 до 50 мл).

1.5. Інструментальні методи дослідження матеріалів

1.5.1. Метод рентгенівської дифракції. Визначення параметрів зразків на основі дифрактограм.

Рентгенівська дифракція (XRD) застосовується для ідентифікації неорганічних кристалів, вимірювання ступеня кристалічності, визначення розміру кристала та кристалічної орієнтації. Коли рентген проникає до кристалів, атоми яких регулярно лідирують, він розсіюється через атоми. Рентгенівський промінь розсіюється, коли відстань між ґратками кристала задовольняє закон Брегга. Формула (1.1) відповідає закону Брегга, а рисунок 1.6 ілюструє схематичний механізм рентгенівської дифракції.

$$2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda \quad (1.1)$$

де λ - довжина хвилі рентгенівського випромінювання;

$n = 1, 2, 3 \dots N$;

θ - кут дифракції;

d_{hkl} - міжплощинна відстань.

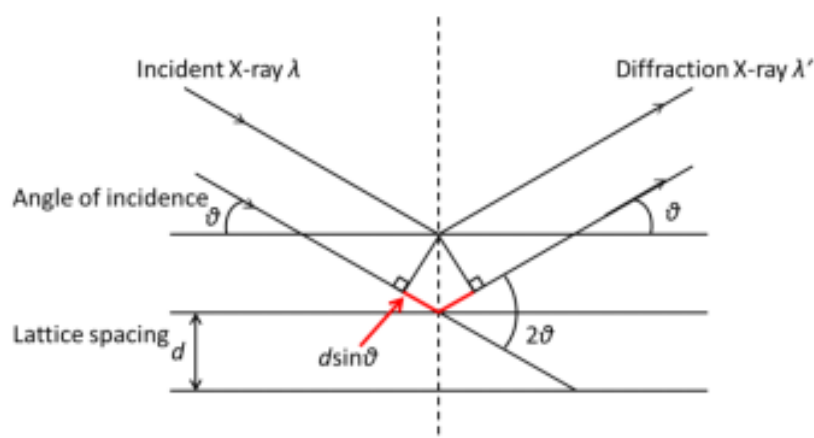


Рис. 1.6 – Схематичне зображення рентгенівської дифракції.

Рентгенівський дифрактометр ДРОН-3 (рис. 1.7) є універсальним дифрактометром і може бути використаний для дослідження як монокристалів, так і полікристалічних речовин.



Рис. 1.7 – Загальний вигляд дифрактометра ДРОН-3.

Дифрактометр складається з наступних основних частин: гоніометра, джерела рентгенівського випромінювання, блока вимірювально-реєструючої і керуючої апаратури в комплексі з персональним комп'ютером.

Принцип роботи гоніометра заснований на явищі дифракції рентгенівських променів від атомних площин кристалічної ґратки досліджуваної речовини. У гоніометрі ГУР-9 реалізований метод фокусування рентгенівського випромінювання по Брегу–Брентано (рис. 1.8).

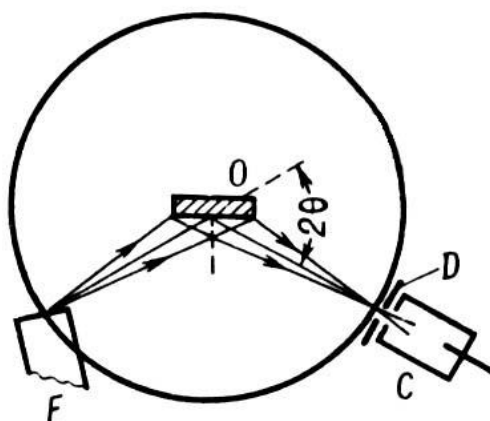


Рис. 1.8 – Схема фокусування по Брегу–Брентано.

1.5.2. Метод високоефективної рідинної хроматографії.

Модель Agilent 1200 (рис. 1.9) укомплектована електронними блоками управління нового покоління, що поєднує в собі величезну швидкість роботи, максимальну роздільну здатність та чутливість. Модульна конструкція дозволяє формувати саме ті конфігурації хроматографів, які найкраще відповідають вимогам різних прикладних завдань будь-якої складності.



Рис. 1.9 – Високоефективний рідинний хроматограф Agilent 1200.

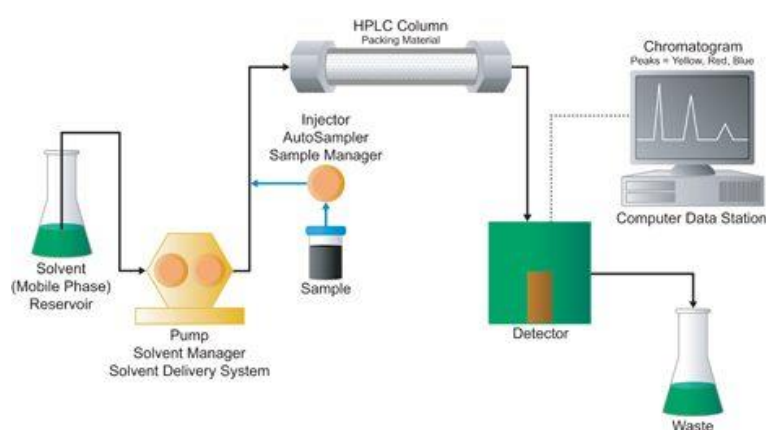


Рис. 1.10 – Схематичне зображення принципу дії високоефективного рідинного хроматографа (HPLC).

Водосховище містить розчинник (називається рухомою фазою, оскільки вона рухається). Насос високого тиску (система доставки розчинника або регулятор розчинника) використовується для генерації та вимірювання заданого потоку рухомої фази, як правило, мілілітрів на хвилину. Інжектор (менеджер зразків або автосамплер) здатний ввести зразок у постійно протікаючий потік рухомої фази, який переносить зразок у колонку. У колонці містяться хроматографічні матеріали, необхідні для здійснення розділення. Цей матеріал називається стаціонарною фазою, тому що він утримується на місці за допомогою апаратури колонки. Детектор необхідний для того, щоб побачити відокремлені складові смуги, коли вони елюються із колонки HPLC (більшість сполук не мають кольору, тому ми не можемо їх побачити нашими очима).

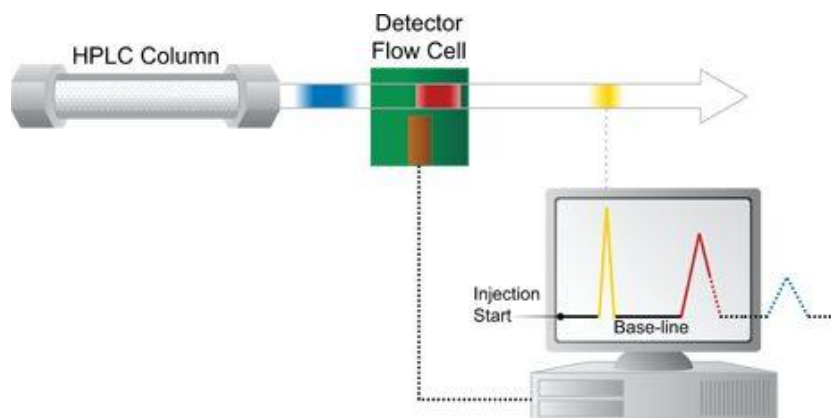


Рис. 1.11 – Принцип формування хроматограм.

1.5.3. Метод просвічуючої електронної мікроскопії

Метод просвічуючої електронної мікроскопії (ПЕМ) застосовується для характеристики структури матеріалу, як в об'ємі зразка, так і в його приповерхневій області. ПЕМ - один з найбільш високоінформативних методів дослідження, які використовуються в матеріалознавстві, фізиці твердого тіла, біології та інших науках.

Електронний пучок, що йде врозріз від джерела, перетворюється конденсорними лінзами, і потім потрапляє на досліджуваний зразок, який

поміщається поблизу полюсного наконечника об'єктивної лінзи. Змінюючи струм в котушці проміжної лінзи, можна змінювати її фокусну відстань, так що на флуоресцентному екрані мікроскопа буде фокусуватися або площина самого досліджуваного об'єкта, або задня фокальна площина об'єктивної лінзи. У першому випадку ми будемо спостерігати збільшене зображення структури зразка. У другому, на екрані мікроскопа буде видна дифракційна картина (дифрактограма, електронограмма), відповідна ділянці зразка.

Якщо растрова електронна мікроскопія може пояснити, як сталося руйнування в досліджуваному матеріалі, як металева поверхня деталі відгукується на термопластичний вплив зовнішнього середовища, то просвічуюча електронна мікроскопія може пояснити, чому це відбувається, як цьому сприяє структурно-фазовий склад матеріалу.

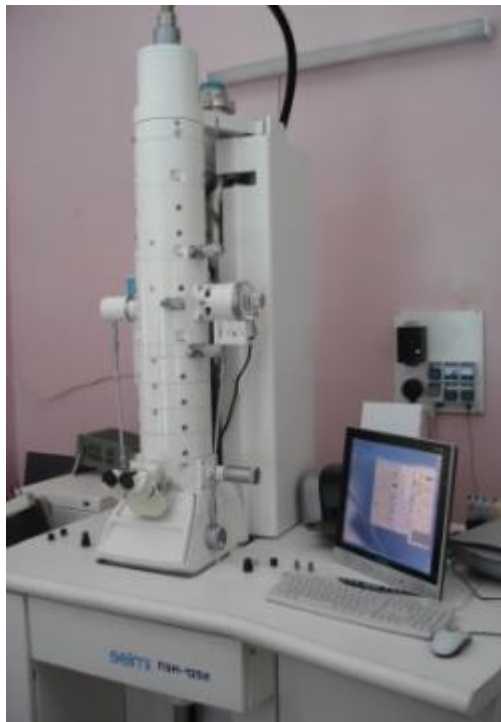


Рис. 1.12 – Просвічуючий електронний мікроскоп.

Метод просвічуючої електронної мікроскопії дозволяє вивчати внутрішню структуру досліджуваних металів і сплавів, зокрема:

- визначати тип і параметри кристалічної решітки матриці і фаз;

- визначати орієнтаційні співвідношення між фазою і матрицею;
- вивчати будову кордонів зерен;
- визначати кристалографічну орієнтацію окремих зерен, субзерен;
- визначати кути розорієнтування між зернами, субзернами;
- визначати площини знаходження дефектів кристалічної будови;
- вивчати щільність і розподіл дислокацій в матеріалах виробів;
- вивчати процеси структурних і фазових перетворень в сплавах;

Можливість одночасно із зображенням мікроструктури зразка спостерігати картину дифракції електронів дозволяє отримувати цінну інформацію про симетрію кристалічної решітки і дефекти структури досліджуваного матеріалу. Зіставлення мікрофотографії з картинами електронної дифракції дає можливість співвідносити елементи мікроструктури з тією чи іншою кристалічною або аморфною фазою, ідентифікованою на електронограмі.

Для розміщення об'єктів у предметній площині об'єктивної лінзи ПЕМ використовують спеціальні сітки у вигляді диска діаметром 3 мм, які отримали назву опорних. Опорні сітки виготовляють шляхом фотолітографії з електролітично осадженої міді, нікелю, платини тощо.

Багато об'єктів необхідно розміщувати на тонких плівках, оскільки вони мають розміри менші отворів сітки. Такі плівки повинні мати товщину не більше 20 нм, бути суцільними і прозорими для електронів. Плівки-підкладки виготовляються з пластиків, вуглецю, оксидів кремнію, сплаву барію з алюмінієм.

1.5.4. Метод інфрачервоної спектроскопії

Інфрачервона спектроскопія Фур'є-перетворення (FTIR) - це метод, який використовується для отримання інфрачервоного спектра поглинання або випромінювання твердої речовини, рідини або газу. ІЧ-спектроскопія є швидким і простим методом аналізу хімічної структури, який заснований на поглинанні інфрачервоного випромінювання молекулами [46].

Термін "інфрачервона спектроскопія Фур'є-перетворення" впливає з того, що перетворення Фур'є (математичний процес) необхідне для перетворення вихідних даних у фактичний спектр.

Дослідження проводили на інфрачервоному спектрометрі на основі Фур'є перетворення Agilent Cary 63 FTIR (компанія Agilent Technologies, США), в якому застосовується сучасний метод ідентифікації молекулярних сполук і їх кількісного аналізу.

Більшість молекул мають функціональні групи, які поглинають випромінювання в середині ІЧ діапазону $\nu = 400 - 4000 \text{ см}^{-1}$.

Для ідентифікації невідомих молекул за їх ІЧ-спектрами повинні бути взяті до уваги такі характеристики абсорбційних зв'язків: розміщення, інтенсивність, повна ширина на напіввисоті.

ІЧ-спектроскопія має певні обмеження: вона не є чутливою до моноатомних йонів, що розчиняються в воді, благородних газів та двоатомних мононуклеарних молекул, через їх симетрію ($\text{N}\equiv\text{N}$ чи $\text{O}=\text{O}$). Інтерпретація ІЧ-спектрів комплексних сполук є також досить складним завданням через їх накладання: чим більше атомів у молекулі, тим складнішим є перерозподіл енергії по зв'язках, що приймають участь у коливанні.

Характеристичними коливаннями є ті, в яких приймають участь групи з подвійними та потрійними зв'язками: OH , CH , NH , SH , $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{N}$, $\text{C}=\text{O}$, $\text{S}=\text{O}$, $\text{C}=\text{C}=\text{O}$, $\text{N}=\text{O}$, $\text{P}=\text{O}$ та інші, а також атоми водню та дейтерію. Частоти характеристичних коливань наведені в довідкових таблицях.

Спектральні характеристики (положення максимумів смуг поглинання, їх півширина, інтенсивність) окремої молекули залежать від мас атомів, що входять до її складу, геометричної будови, міжатомних сил, розподілу заряду та ін. Тому спектри є дуже індивідуальними, що важливо при ідентифікації будови сполук.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

У даному розділі наведені характеристики матеріалів використаних в експериментах, схеми отримання гідроксиапатиту, описані етапи отримання композитів та плівок на його основі, а також описана зміна властивостей матеріалів в залежності від параметрів проведених досліджень.

2.1. Технологія отримання гідроксиапатиту

Серед усього розмаїття способів отримання ГА перевага віддається групі вологих методів. Зараз все більша увага приділяється методикам синтезу ГА за умови постійного складу розчину. Основні фактори, що визначають розмір кристалів ГА, одержуваних у водних розчинах, - температура і наявність домішок [47]. При високих температурах ($\sim 80^\circ\text{C}$) форма частинок в основному визначається спільним впливом рН і початкових концентрацій розчинів. При високих температурах водних розчинів зазвичай отримують голчасті кристали ГА з розмірами від декількох нанометрів до міліметрів.

У процесі виконання роботи були використані наступні матеріали: нітрат кальцію тетрагідрат $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, гідрофосфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 25% водний аміак NH_4OH . Всі компоненти поставлені Shanghai Chemical Company Ltd, Китай.

Синтез гідрогелю гідроксиапатиту проводили за рівнянням реакції:



Розчин фосфату амонію концентрацією 0,5 М капали повільно у розчин нітрату кальцію з концентрацією 0,3М та до суміші додавали 25% розчин аміаку. Аміак додається з метою встановлення у суміші $\text{pH} = 10,5$. Було визначено, що при даному рН отримують найбільш чистий гідроксиапатит

без домішок інших ортофосфатів кальцію. Під час прокапування утворювався білий осад.

Після змішування, отриманий розчин нагрівали до температури 80 °С при цьому перемішуючи зі швидкістю 200 об./хв. Далі відбувався етап старіння протягом однієї доби, після чого проводили відмивання розчину гідроксиапатиту до отримання у розчині нейтрального рН промивної води. Відділення гелю гідроксиапатиту від рідкої фази проводили за допомогою центрифугування протягом 6 хвилин при 8000 об./хв.

Відділений гідрогель використовувався для подальшого отримання плівок.

2.2. Матеріали та технологія виготовлення хітозан-апатитних композитів

Використання пористих полімер-біокерамічних композитів для регенерації кісткової тканини є предметом довготривалої цікавості. Проте матеріали, які можуть повністю відповідати як механічним, так і біологічним властивостям матриці кісткової тканини людини та підтримувати васкуляризацію тканин, ще не були зроблені. Тому композити з підвищеним рівнем біофункціональності є перспективним напрямом досліджень. Крім того, матеріали з контрольованим вивільненням лікарських засобів впродовж тривалого часу є також актуальними на даний момент.

З огляду наукових досліджень витікає можливість застосування для біомедичних матеріалів природного хітозану у якості ефективного протимікробного компоненту. Хітозан проявляє протимікробну активність щодо широкого кола грамнегативних та грампозитивних патогенних мікроорганізмів, включаючи грибки. Протимікробні властивості хітозану залежать від ряду факторів. Розглядають декілька механізмів протимікробної дії хітозану [48].

У ході виконання дипломної роботи були синтезовані композитні матеріали на основі НА та хітозану під впливом мікрохвильової енергії.

Мікрохвильове випромінювання є частиною електромагнітного спектра. Поглинання мікрохвильових випромінювань матеріалами, звільняючи тепло, може відбуватися за допомогою двох специфічних механізмів:

- дипольних взаємодій;
- йонної провідності.

Мікрохвилі не здатні змінювати молекулярну структуру, оскільки вони не мають достатньої енергії, щоб зламати ковалентні хімічні зв'язки [49]. Тому для короткочасної оптимізації умов реакції часто використовують мікрохвильову техніку з її численними перевагами, включаючи швидкі, ефективні, однорідні процеси та зменшення побічних реакцій [50]. З огляду на ці переваги, матеріал був синтезований за допомогою мікрохвильового опромінення.

В ході експерименту були використані наступні матеріали: біомедичний хітозан (молекулярна маса 100-300 кДа) виробництва "Біопрогрес" (Москва, Росія) зі ступенем деацетилювання 85%, хлорид кальцію (CaCl_2), 85% ортофосфорна кислота (H_3PO_4), 10М гідроксид натрію (NaOH) виробництва компанії «Merck».

Схема технологічного процесу синтезу композитів наведена на рисунку 2.1.

Під час синтезу початковий розчин готувався додаванням суміші 0,06М розчину фосфорної кислоти з порошковим хітозаном до 0,1М розчину хлориду кальцію (рис. 2.1). До отриманої суміші додавали розчин гідроксиду натрію з концентрацією 10М до отримання рН розчину 10,7.

Отриманий розчин ділили на чотири рівних частини. Перший зразок НА-CS не піддавали MW впливу, а нагрівали до 80 °С на електричній плитці з

наступним зістарюванням протягом 24 годин. Цей зразок використовували як контрольний.

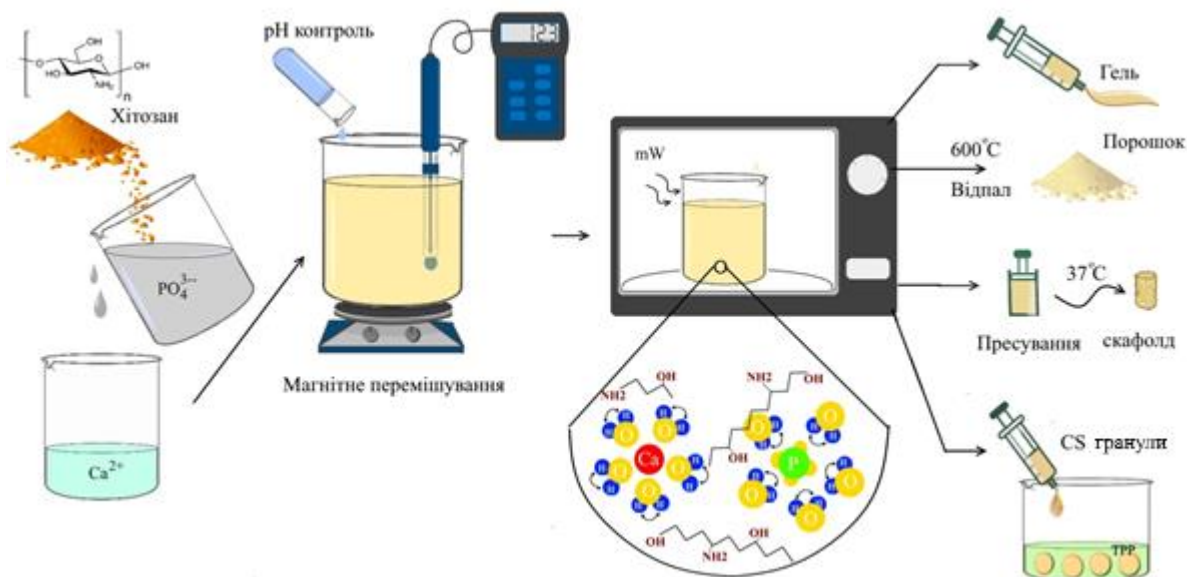


Рис. 2.1 – Схема формування композитного матеріалу.

Інші три зразки синтезували у мікрохвильовій печі при потужностях 300, 600, 800 Вт, при цьому кінцева температура сумішей складала 60 °С, 84 °С, 94 °С, відповідно. В залежності від потужності MW випромінювання зразки були названі НА-CS-300, НА-CS-600, НА-CS-800. Зразки, отримані з впливом мікрохвильової енергії, не потребують зістарювання.

Після охолодження та осадження всі чотири зразки відмивали до отримання нейтрального рН промивної води та центрифугували. Отримані гідрогелі вологістю близько 95% були першою виготовленою формою композитних матеріалів (рис. 2.2а).

Для отримання другої форми матеріалів (порошків) (рис. 2.2б) зразки у формі гідрогелів сушили при 37°C та відпалювали при температурі 600°C.

Для отримання третьої форми матеріалів (скафолдів) (рис. 2.2в) зразки у формі гідрогелів поміщали у пластикові циліндри об'ємом 1 см³ і сушили при 37 °С.

Четверта форма (гранули) була отримана шляхом диспергування суміші НА гідрогелю та 3% розчину хітозану у 1% розчин натрій

триполіфосфату. Після 24 годин експозиції гранули промивали і висушували при температурі 37 °С (рис. 2.2г).

Отже, в результаті були отримані по 4 зразки у кожній з чотирьох форм: гідрогель, порошок, скафолд та гранули.

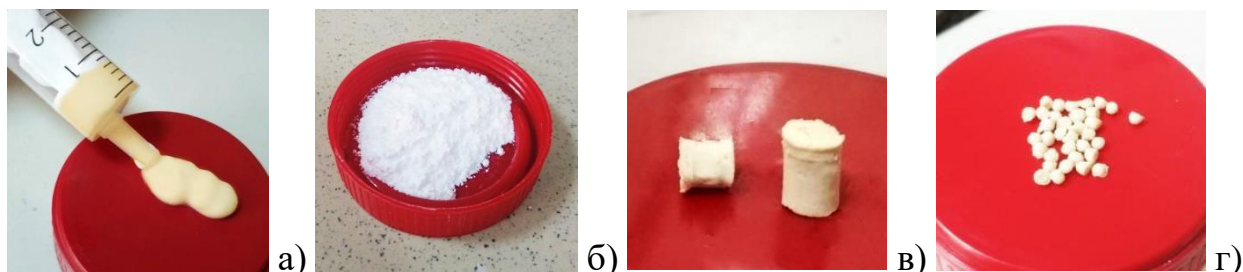


Рис. 2.2 – Форми отриманих композитних матеріалів: а) гель; б) порошок; в) скафолд; г) гранули.

2.3. Матеріали та технологія виготовлення альгінат-апатитних плівок

Важливою стратегією стоматології є використання матеріалів з остеointегруючими та бактерицидними властивостями. З цією метою виготовлені плівки на основі гідроксиапатиту та природнього полімеру (альгінату) з додаванням у розчин йонів металів та подальшим насиченням хлоргексидином.

У процесі виготовлення використовували: поліетиленгліколь (ПЕГ), алюміній хлорид $AlCl_3$, сульфат міді $CuSO_4$, сульфат магнію $MgSO_4$, сульфат цинку $ZnSO_4$, хлорид кальцію $CaCl_2$ (Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd), натрій альгінат (Китай), фармацевтичний СНХ (0,05%) та отриманий гідрогель гідроксиапатиту.

Велику роль у створенні біоматеріалів відіграють біополімери, особливо альгінат натрію, не тільки через низьку вартість, біосумісність, здатність до біологічного розкладання, а також через їх потенційне використання для отримання систем доставки лікарських засобів [51,52].

Хлоргексидин (СНХ) відомий як один з найефективніших протимікробних агентів у галузі стоматології.

Йони кальцію, магнію, алюмінію, цинку та міді відповідають за зміцнення кісткової тканини, саме тому їх обрали для внесення у матрицю плівок. Вони також відомі своїми антимікробними властивостями [53].

ПЕГ мають такі властивості як: низька токсичність, відсутність помітної побічної дії на організм, розчинність у воді та полярних розчинниках, не чутливість до зміни рН, стійкість до мікробної контамінації (мають у молекулі первинні гідроксильні групи, що зумовлюють слабку бактерицидну дію). Широко застосовуються в медичній та фармацевтичній практиці. ПЕГ застосовуються як розчинники, стабілізатори, регулятори вологості (осушення і зволоження) і в'язкості (можуть збільшувати і зменшувати в'язкість); в якості стабілізаторів емульсій та емульгаторів - вони допомагають з'єднати речовини, що в нормальному стані не з'єднуються.

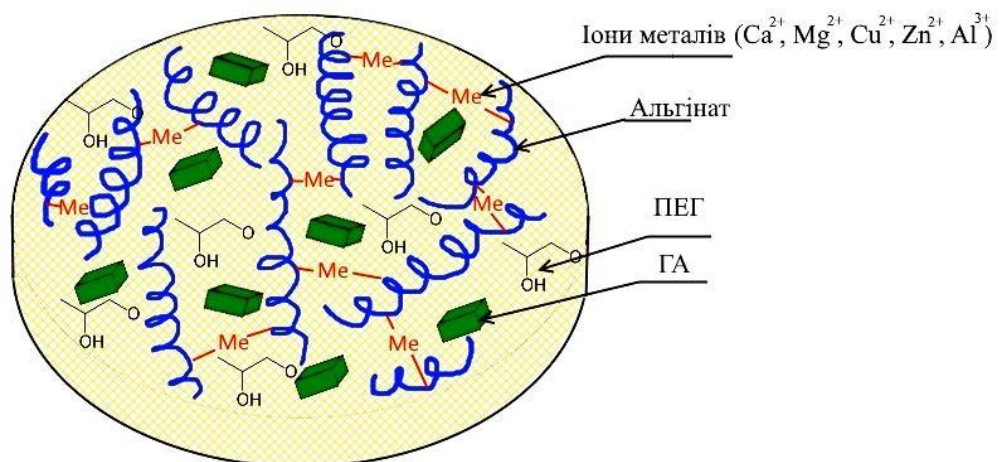


Рис. 2.3 – Схематична будова альгінат-апатитних плівок.

Початковий розчин отримували шляхом змішування гідроксиапатиту та суміші альгінату з ПЕГ. Його перемішували за допомогою ультразвуку, після чого додавали суміш 0,1 М розчину сполук металів з 0,3 М розчином фосфорної кислоти (співвідношення 1:1) і знову перемішували. Йони металів добре «зшивають» макромолекули альгінату в тривимірну сітку, яка служить матрицею для утримання частинок гідроксиапатиту. Для отримання гомогенної суміші використовували ультразвукове перемішування на

ультразвуковому диспергаторі УЗДН-А (ВАТ «СЕЛМІ», м. Суми).
Ультразвук розбиває згустки та нагріває суміш.

Для формування плівок, розчин об'ємом 2 мл заливали у форми діаметром 25 мм та висотою 4 мм.

Подальше формування плівок відбувалося двома шляхами:

1) сушка при кімнатній температурі близько однієї доби – одержували еластичні плівки товщиною <1 мм;

2) заморожування з наступною ліофілізацією протягом 4,5 годин при -53 °С – отримані пористі каркаси товщиною близько 2 мм.

Вигляд отриманих матеріалів наведено для зразків НА-Alg-Al³⁺ та НА-Alg-Cu²⁺ (рис. 2.4).

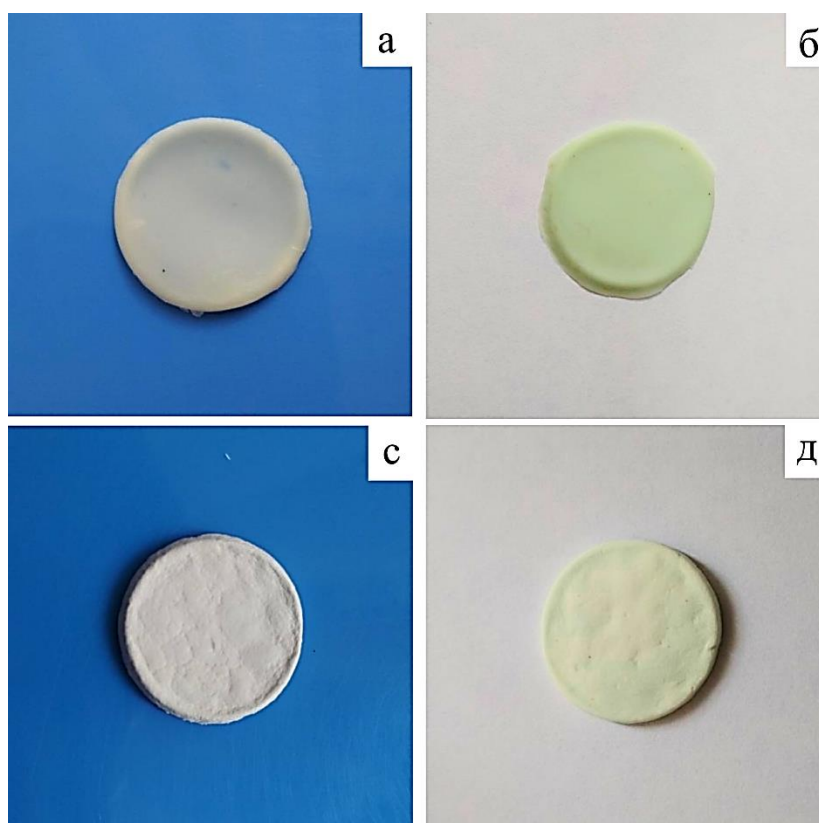


Рис. 2.4 – Зображення отриманих зразків плівок: а), б) висушені при кімнатній температурі з додаванням Al та Cu; с), д) ліофілізовані при -53 °С з додаванням Al та Cu, відповідно.

2.4. Виготовлення кап для лікування зубів на основі альгінат-апатитних плівок

На даний момент, широке розповсюдження отримали стоматологічні матеріали для покращення стану зубів та зубної емалі у домашніх умовах. Серед них можна виділити широку групу відбілюючих засобів представлених у різних виглядах – плівки, пасти та гелі.

Карієс зубів є однією з найпоширеніших хвороб порожнини рота. В результаті діяльності бактерій на початковій стадії карієсу відбувається пошкодження зубної емалі, яка є зовнішнім покриттям зубів і має досить високу твердість і стійкість. Зубні пасти, що містять наночастинки апатиту, можуть сприяти частковій ремінералізації демінералізованої емалі, а також володіють деяким відбілюючим ефектом. Наночастинки гідроксиапатиту з діаметром ~ 20 нм можуть значно знижувати мінеральні втрати з поверхні емалі.

Також новим методом є внесення лікувальних чіпів у простір карманів викликаних пародонтитом. Одним з прикладів таких матеріалів є PerioChip. PerioChip містить 2,5 мг хлоргексидин глюконату в біодеградуючій матриці гідролізованого желатину поперечно зв'язаного з глутаральдегідом.

Особливий інтерес зараз викликають комбіновані матеріали, що поєднують декілька функцій. У даному пункті розглянуто варіація подібного матеріалу у формі кап для домашньої профілактики.

Капа – насадка з металів чи полімерів, що надягається на зуби для виправлення їх положення, або здійснення терапевтичного ефекту.

Основу даних кап складає гідроксиапатит, який, як вже зазначалося, складає значну частку кісткової тканини.

Метою розробок було створення багатофункціональних матеріалів для використання їх для покращення стану ротової порожнини. У якості допоміжних компонентів використовували спиртовий розчин ментолу, вітаміну D₃ та хлоргексидину. Вітамін D₃ регулює метаболізм кальцію та

фосфатів, що сприяє правильній мінералізації. Ментол забезпечує заспокійливу та протимікробну функцію, парфумерний ефект. Хлоргексидин, як вже зазначалося, є широко застосовуваним лікарським засобом у медицині та стоматології, сприяє загоєнню ран та зменшенню пародонтальних кишень у яснах.

Виготовлення кап відбувалося у декілька етапів.

Перший варіант розчину (К-1) готували шляхом поєднання НА з 1% альгінатом натрію у співвідношенні 1:2 (з розрахунку на сухі компоненти сумішей). Проводили змішування за допомогою УЗДН-А. Попередньо заморожували зразки, після чого ліофілізували протягом 6,5 годин при температурі -53°C . Отримані пористі структури для більш міцного зшивання змочували у 0,1М розчині CaCl_2 , після чого матеріали висушували у формах при кімнатній температурі (рис. 2.5). Далі відбувався етап промивання отриманих кап у спиртовому розчині ментолу, вітаміну D_3 та хлоргексидину. Процес промивання дозволяє вивести із складу кап залишкові йони Cl та насичити структуру лікарськими засобами.

У результаті отримували тонкі, тверді структури (рис. 2.6).



Рис. 2.5 – Вигляд кап К-1 та К-2.

Другий варіант (К-2) містив у собі: розчин 2% альгінату натрію змішаний з гліцерином у співвідношенні 10:1, гідроксиапатит (1:4 у відношенні до Alg), та розчин 0,1М CaCl₂ змішаний з 0,3М H₃PO₄ (1:1) (об'ємом 7% від отриманої суміші). Компоненти змішували у заданому порядку використовуючи УЗДН-А. Після чого кінцевий розчин висушували при температурі 37°C. Етапи зшивання та промивання аналогічні для першого варіанту виготовлення.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Вплив MW випромінювання на структуру хітозан-апатитних композитів.

Огляд літератури показав, що використання MW випромінювання суттєво підвищує утворювальну здатність при одержанні НА у порівнянні зі звичайними методами.

Одним із недоліків класичного методу «мокрої хімії» є досить значний час утворення гідроксиапатиту, що тягне за собою додатковий вміст карбонат-йонів у його складі. Класичний механізм включає нагрівання та конвекцію: тепло розподіляється від гарячої поверхні плитки догори у холодні шари розчину, що впливає на час нагрівання. Під час нагрівання за допомогою мікрохвильової печі електричне поле поляризує одночасно всі молекули матеріалу, що призводить до перетворення електричної енергії в тепло, тобто до швидкого нагрівання.

Як було зазначено раніше, під час отримання зразку НА-CS на формування гідроксиапатиту шляхом старіння розчину витрачається 24 години. В той же час, при отриманні зразків НА-CS-300, НА-CS-600 та НА-CS-800 час утворення гідроксиапатиту скорочується до 15 хвилин.

3.1.1. Дослідження впливу MW випромінювання на параметри кристалічної решітки матеріалу.

Кристалічність та структуру гідроксиапатиту у складі синтезованих композитних матеріалів досліджували за допомогою рентгенівського дифрактометра ДРОН-3. Дифрактограми досліджених зразків, висушених при температурі 37 °C та відпалених при 600 °C, наведено на рис.3.1 та 3.2.

Якщо порівнювати рисунки 3.1 та 3.2 бачимо, що при висушуванні при 37 °C зразки мають погану кристалічність, невиражену форму піків, та їх «розмазаність» вздовж осі кутів, у той час як відпалені зразки мають виражені гострі піки, рівномірної ширини.

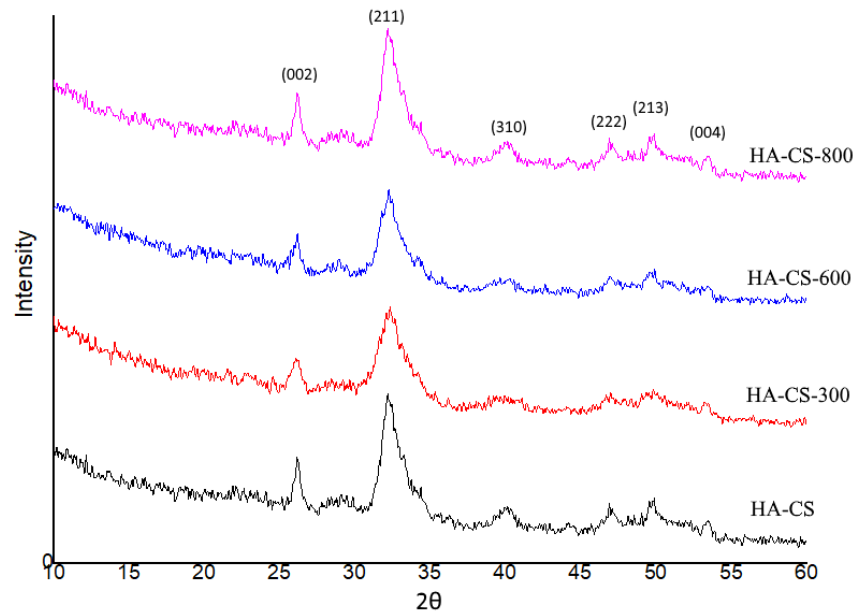


Рис. 3.1 – XRD спектри зразків, висушених при 37 °С.

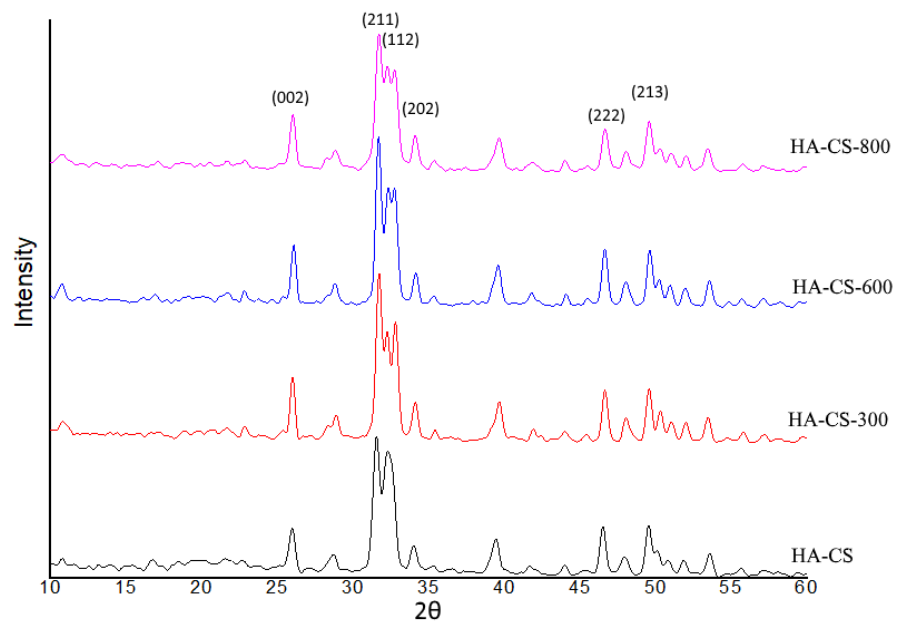


Рис. 3.2 – XRD спектри зразків, відпалених при 600 °С.

Щоб визначити параметри елементарної комірки, такі як середній розмір, ширина та висота, виконали ідентифікацію індексів Міллера для атомних площин, відносно координатних вісей (h, k, l – індекси Міллера).

$$a_{hk0} = 2d_{hk0} \frac{\sqrt{3}}{3} \sqrt{h^2 + hk + k^2} \quad \text{і} \quad c_{00l} = l \cdot d_{00l}, \quad (3.1)$$

де a_{hko} – параметр елементарної комірки для площини з індексами $hk0$;

d_{hko} – міжплощинна відстань площини $hk0$;

h, k, l – індекси Міллера;

c_{00l} – параметр елементарної комірки для площини з індексами $00l$;

d_{00l} – міжплощинна відстань площини $00l$.

Для розрахунку були обрані найбільш чіткі та інтенсивні піки з індексами (002), (130), (004) та (222). Пік з індексом (002) найчастіше застосовується для розрахунку параметру c .

Середній розмір кристалітів розрахований за формулою Селякова-Шеррера [54]:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta_m \cos \theta}, \quad (3.2)$$

де K – безрозмірна константа, яка залежить від форми кристалітів ($K = 1$);

β_m – інтегральна ширина дифракційного профілю;

λ – довжина хвилі рентгенівського випромінювання;

θ – кут дифракції.

Рівень мікродеформацій вимірювався як відношення зміни міжплощинної відстані отриманого зразка відносно еталону, у якому деформації відсутні. У випадку, коли деформація у зразку відбувається лише через деформації кристалічної решітки, то величина мікродеформацій розраховується за формулою:

$$\varepsilon = \frac{\beta_n}{4 \operatorname{tg} \theta}, \quad (3.3)$$

де β_n – інтегральна ширина дифракційного профілю.

Отримані зразки відповідають гідроксиапатиту JCPDS 00-046-0905, що стверджує про формування апатиту в скорочений термін завдяки впливу mW випромінювання. Також у зразках спостерігається незначний зсув піків у сторону більших кутів за рахунок впливу хітозану. Даний факт підтверджується зміною розмірів a та c кристалічної ґратки НА у порівнянні зі стандартним значенням ($a = 0,944$ нм; $c = 0,688$ нм).

Як бачимо з таблиці 3.2, середній розмір L кристалітів гідроксиапатиту у складі синтезованих під MW впливом композитів збільшується у порівнянні з класичним методом. Відомо, що при температурах синтезу 0-35°C розмір кристалітів становить менше 15 нм, а при збільшенні температури до 80 °C відбувається їх активний ріст. Тобто, при 80 °C ріст кристалітів превалює над процесом їх утворення.

Також спостерігаємо, що параметри кристалітів у зразку НА-CS-800 майже ідентичні до зразку НА-CS. Однак НА-CS-800 має суттєво менший рівень мікродеформацій, що також є перевагою MW методу.

Таблиця 3.1 – Структурні характеристики хітозан-апатитних композитів, висушених при 37 °C

Зразок	Параметри синтезу				Індекс Міллера	Середній розмір L , нм	Параметри кристалів, нм		
	Т, °C	Вплив	Р, Вт	t, хв.			a, нм	c, нм	Мікродеформації
НА-CS	80	-	-	15	(130)	15,175	0,935	0,68	0,622
					(002)				
НА-CS-300	60	MW	300	5	(130)	14,679	0,937	0,682	0,642
					(002)				
НА-CS-600	84	MW	600	5	(130)	14,432	0,938	0,68	0,652
					(002)				
НА-CS-800	94	MW	800	5	(130)	14,683	0,936	0,679	0,639
					(002)				

Таблиця 3.2 – Структурні характеристики хітозан-апатитних композитів, відпалених при 600 °С

Зразок	Параметри синтезу				Індекс Міллера	Середній розмір L, нм	Параметри кристалів, нм		
	Т, °С	Вплив	Р, Вт	t, хв.			a, нм	c, нм	Мікродеформації
HA-CS	80	–	–	15	(130)	18,994	0,946	0,683	0,585
					(002)				
HA-CS-300	60	MW	300	5	(130)	28,062	0,945	0,684	0,314
					(002)				
HA-CS-600	84	MW	600	5	(130)	26,518	0,946	0,681	0,398
					(002)				
HA-CS-800	94	MW	800	5	(130)	23,693	0,945	0,683	0,391
					(002)				

Дослідження електронної структури та фазового складу проводилося за допомогою просвічуючого електронного мікроскопу ПЕМ-125К. Робота проводилася у двох режимах: світлопольному та мікродифракційному, без введеної селекторної діафрагми. Прискорююча напруга складала 90 кВ.

Просвічуюча мікроскопія дозволяє вимірювати розмір частинок матеріалу (кристалітів), а електронна дифракція дозволяє визначити фазовий склад, індекси площин та параметри решітки.

Дифракційна картина у режимі мікродифракції була отримана для ділянки зразка невеликого розміру площею менше ніж при звичайній дифракції. Це важливо при дослідженні мікроструктури та багатофазних зразків.

У контрольному зразку HA-CS та у зразку HA-CS-300 кристаліти мають округлу, пластинчасту форму, в той час як зразки, синтезовані під вищою MW дією демонструють утворення витягнутих вздовж осі c голкоподібних кристалітів гідроксиапатиту.

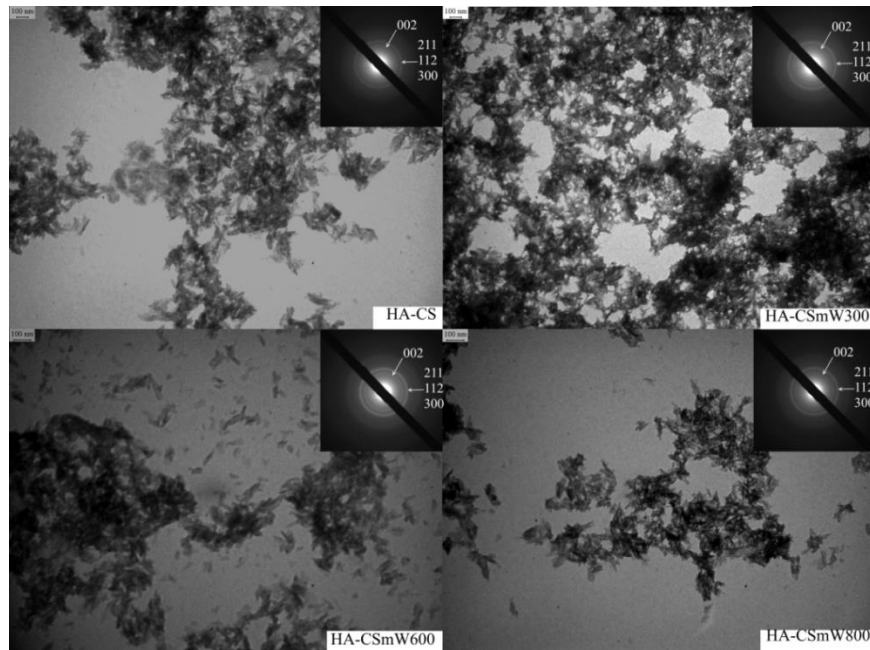


Рис. 3.3 – Знімки ПЕМ отриманих зразків.

На основі отриманих знімків було розраховано та побудовано розподіл за розмірами кристалітів у хітозан-апатитних зразках (додаток А). Отримані результати свідчать про те, що під дією MW випромінювання утворюються значно менші агломерати, у порівнянні з класичним методом.

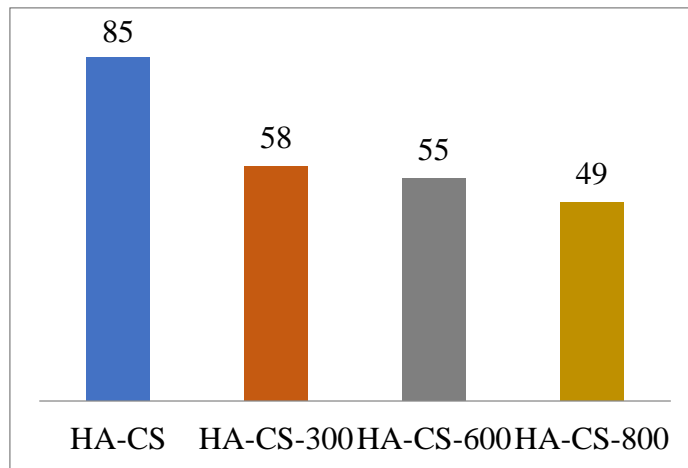


Рис. 3.4 – Середній розмір кристалітів отриманих зразків по знімкам ПЕМ, нм.

3.1.2. Дослідження зразків методом ІЧ спектроскопії.

Взаємодію функціональних груп хітозану та НА досліджували методом ІЧ спектроскопії.

Для порівняння отриманих спектрів усіх зразків та хітозану графіки були побудовані в однакових х- та у-шкалах (рис. 3.5). У таблиці 3.3 наведено типові коливання для апатиту та хітозану.

Таблиця 3.3 – Характеристичні коливання НА та хітозану.

ІЧ адсорбц. зв'язки (cm^{-1})	Опис	Сполука
3570	(O–H) для OH – в крист. реш. НА	НА
1024–1095	$\nu(\text{P–O}) \text{PO}_4^{3-}$	НА
955–956	$\nu(\text{P–O}) \text{PO}_4^{3-}$	НА
635	$\delta(\text{O–H})$	НА
3454–3459	$\nu_s(\text{N–H})$	хітозан
1642–1654	$\nu(\text{–C=O–})$ амід I	хітозан
1586–1596	Амін	хітозан
1420	$\delta(\text{C–H})$	хітозан
1153,1070, 1031	$\nu_{as}(\text{C–O–C})$ та $\nu_s(\text{C–O–C})$	хітозан

ν – вал. колив.; ν_s – симетр. вал. кол.; ν_{as} – асиметр. вал. колив.; δ – деформ. колив.

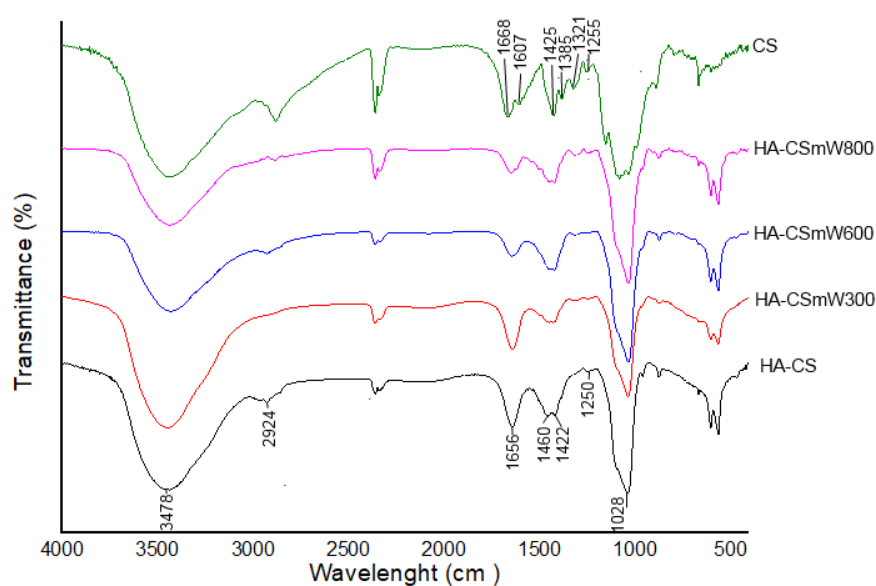


Рис. 3.5 – FTIR спектри отриманих зразків та чистого хітозану.

Карбонатні смуги поглинання спостерігаються при 1452, 1420 і 880 cm^{-1} і вказують на утворення карбонатного апатиту типу В.

Ширина смуги 3200-3500 cm^{-1} обумовлена адсорбцією води (НОН). Одночасно, спектри FTIR всіх зразків CS-НА та чистого CS показали відмінні смуги поглинання при 2910-2970 cm^{-1} (аліфатична смуга -CH₂), 1662 cm^{-1} (амід I C = O), 1601 cm^{-1} (амін -NH₂ згинання) та 1321 cm^{-1} (амід III).

З отриманих результатів можна зробити висновок, що спектри отриманих зразків мають піки відповідні пікам чистого хітозану, а також гідроксиapatиту. Це означає, що хітозан вбудований в фазу гідроксиapatиту.

3.1.3. Дослідження ступеню набрякання (поглинання) та пористості зразків.

Поглинання визначали шляхом вимірювання змін маси зразків у формі скафолдів в залежності від часу занурення зразка в фосфатно-буферний фізіологічний розчин (PBS) при різних значеннях рН (рис.3.6).

Осмолярність та концентрація йонів розчинів співпадають з людським фізіологічним розчином.

Зважені зразки занурювали в PBS протягом 1 години для набрякання. Далі зразки зважували після промивання з фільтровим папером, щоб видалити поверхневі води. Коефіцієнт набрякання (S_w) був розрахований з використанням наступного рівняння [47]:

$$S_w = (W_t - W_0) / W_0, \quad (3.4)$$

де W_t – маса після набрякання;

W_0 – маса до набрякання.

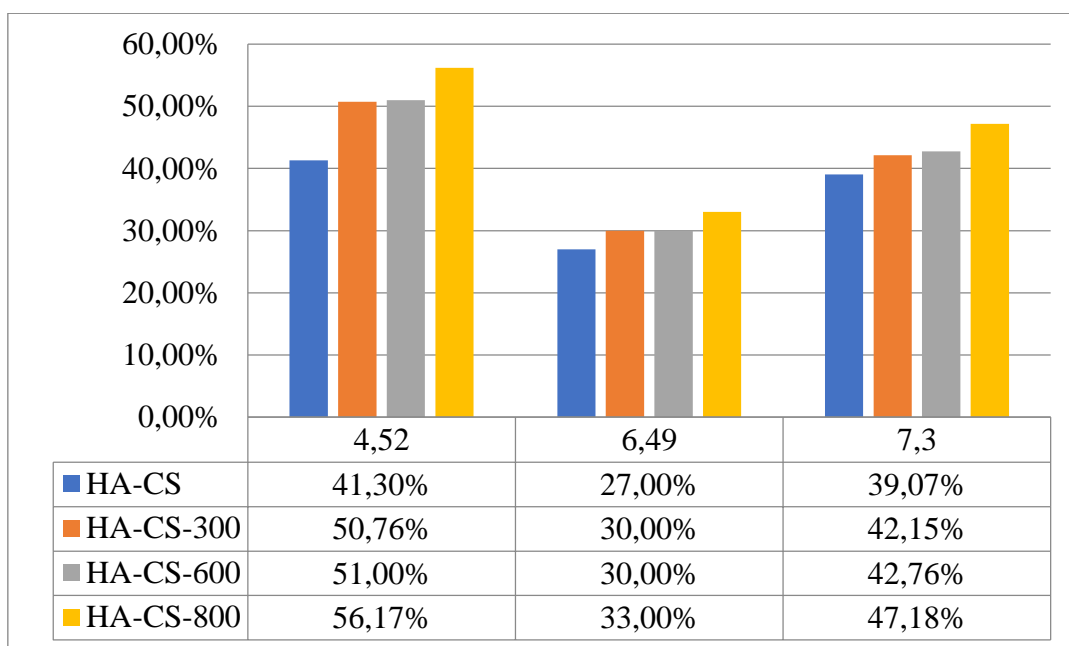


Рис. 3.6 – Ступінь набрякання в PBS з pH = 4,52; 6,49; 7,3.

Найбільш високе набрякання у всіх PBS показує зразок HA-CS-800, синтезований при максимальній потужності MW.

Для визначення пористості скафолди HA-CS певної маси клали у вимірювальний циліндр з відомим об'ємом етанолу (V_1) і виймали після 30 хвилин. Об'єм етанолу з насиченим зразком становить величину V_2 . Насичений зразок видаляли з етанолу та зважували (m_1), після чого вимірювали об'єм спирту, що залишився (V_3). Пористість (P) розраховували, використовуючи рівняння [55]:

$$P = (m_1 - m_0) / \rho (V_2 - V_3) \quad (3.5)$$

де ρ - концентрація етанолу.

Результати показують, що використання MW 300 Вт та 600 Вт збільшує пористість зразків на 4-6% порівняно з контрольним зразком (рис. 3.7). А найменша пористість спостерігається у зразку HA-CS-800.

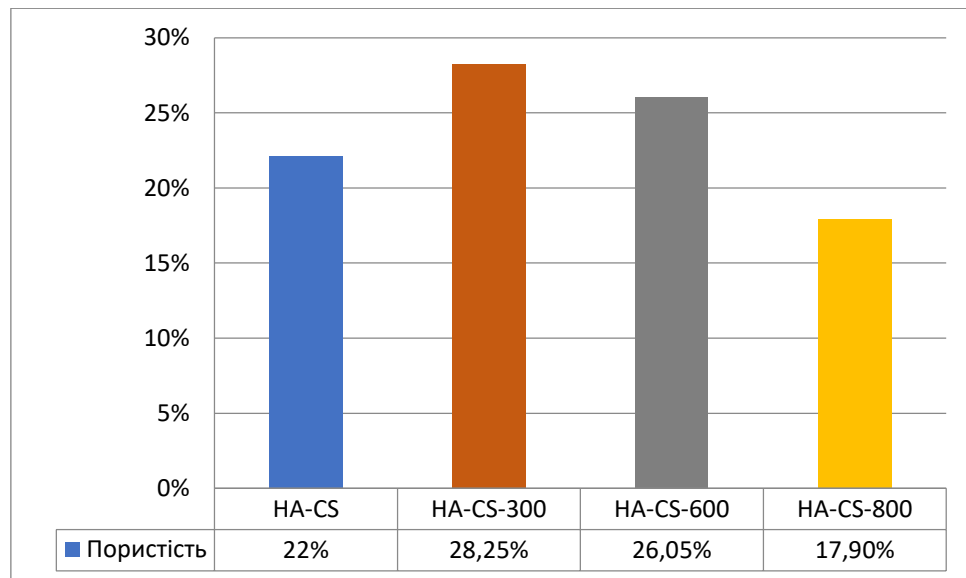


Рис. 3.7 – Пористість зразків.

Таким чином, хітозан-апатитні композитні матеріали для медичного використання були отримані при використанні класичної та MW технології з різними значеннями потужності. Рентгенівські знімки підтверджують формування кристалітів НА, розмір яких зменшується зі збільшенням потужності MW випромінювання. Вивчення морфології отриманих композитів показало утворення кристалітів НА округлої (зразок HA-CS та HA-CS-300) та голчатої форм (зразок HA-CS-600 та HA-CS-800). Методом ІЧ спектроскопії підтвердили міжмолекулярну взаємодію між хітозаном та НА.

3.2. Дослідження вивільнення лікарських засобів з хітозан-апатитних композитів.

Клінічні випробування встановили, що контрольоване вивільнення ліків анестетиків значно знижує глибину поранень і зменшує кровотечу [56].

Виходячи з цих міркувань, в даному дослідженні ми прагнули синтезувати новий наноструктурований композитний матеріал, який міг би поєднувати переваги хітозану і НА, особливо біоактивність, біосумісність хітозану і остеопровідність НА.

Остання форма зразків – гранули – була використана для дослідження виходу лікарських засобів (drug release). У якості ліків використовували Анестезин. Було зроблено додатковий зразок з чистого хітозану (CS). Зразки насичували слабким спиртовим розчином лікарського препарату, після чого висушували. Далі зразки поміщали в розчин PBS, з якого надалі відбиралися проби кожену добу.

Методика HPLC Анестезину: мобільна фаза складається з суміші метанолу та льодовикової оцтової кислоти (10%) у співвідношенні 10:90. Швидкість потоку 2,0 мл/хв. Розмір ін'єкції 5 мкл. Датчик DAD встановлений на рівні 258 нм. Вихід Анестезину спостерігається на 8-10 хвилини [45].

Під час підготовки було створено калібрувальну криву для різних концентрацій Анестезину: 11,76 мг/мл, 5,88 мг/мл, 2,94 мг/мл, 1,47 мг/мл та 0,735 мг/мл.

На основі даної калібрувальної кривої розраховувалась концентрація Анестезину у зразках за допомогою програмного забезпечення Agilent 1200 (рис. 3.8).

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ng/ul]	Grp	Name
9.063	MM	64.11324	6.14049e-3	3.93686e-1		Anestezine
Totals :				3.93686e-1		

Рис. 3.8 – Кінцевий звіт з розрахунку.

Типовий HPLC графік виходу Анестезину з хітозан-апатитних гранул зображений на рисунку 3.9.

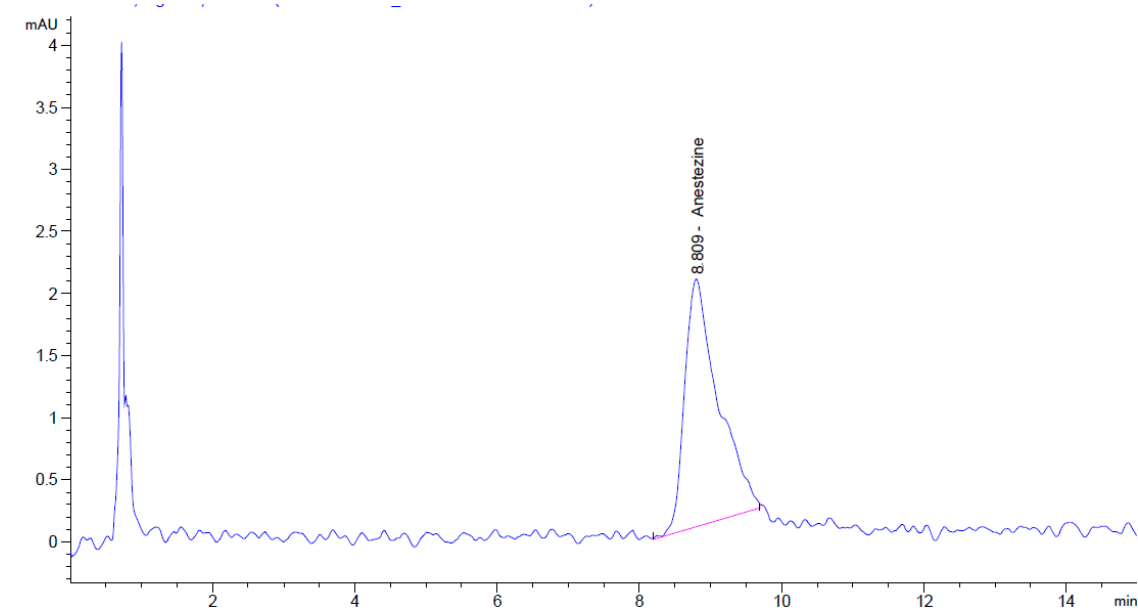


Рис. 3.9 – Типовий графік HPLC зразків з лікарським засобом.

Концентрація препарату (мг/мл) вимірювалась впродовж 25 діб, і можна побачити, що вихід у зразках з найбільшою потужністю MW випромінювання подовжений у порівнянні зі звичайним методом отримання НА-CS та зразками з меншою потужністю (таблиця 3.4).

Таблиця 3.4 – Динаміка вивільнення анестезину з часом (годин).

Зразок	4	24	48	96	144	192	240	288	336	384	480	600
НА-CS	0,41	0,459	0,542	0,586	0,62	0,69	0,72	0,74	0,82	-	-	-
НА-CS-300	0,415	0,455	0,517	0,594	0,63	0,69	0,72	0,75	0,82	-	-	-
НА-CS-600	0,433	0,498	0,559	0,621	0,66	0,735	0,76	0,8	0,87	0,9	-	-
НА-CS-800	0,41	0,476	0,596	0,689	0,73	0,8	0,84	0,87	0,95	0,974	1,01	1,03
CS	0,4	0,458	0,517	0,597	0,64	0,715	0,74	0,78	0,85	0,847	0,88	0,9

У процесі дослідження були виявлені додаткові піки (1,3-1,6 хвилини) на хроматографі, площа яких збільшувалася з часом (рис. 3.10а). Це означає деградацію гранул та вихід у розчин їх складових. Найбільш помітний ефект спостерігався після 600 годин у гранулах із чистого хітозану (рис. 3.10б). Забарвлення розчину стало помаранчево-коричневим (рис 3.11).

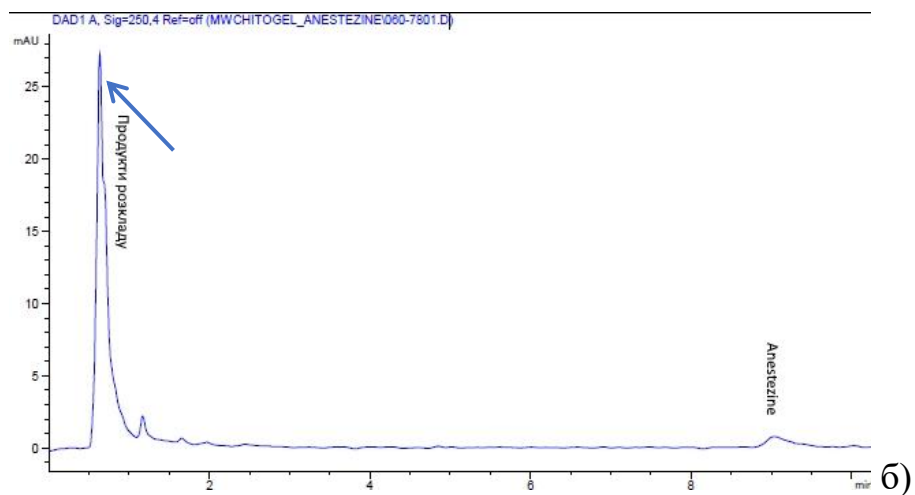
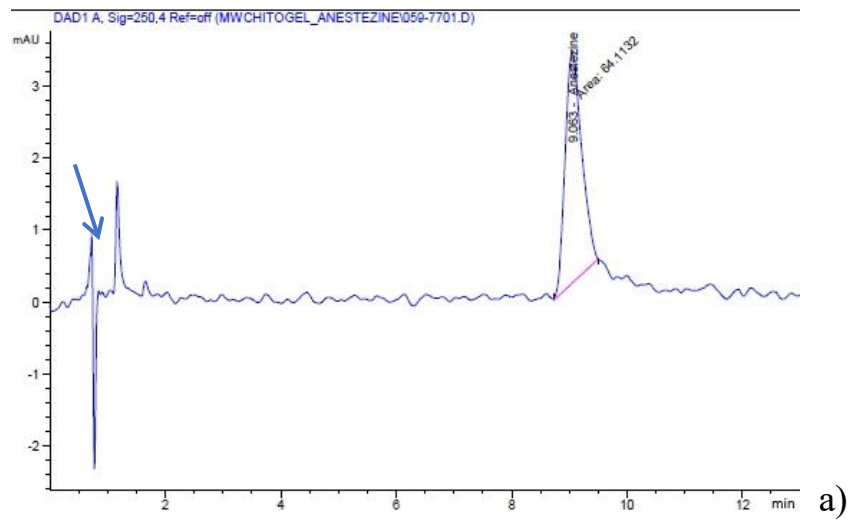


Рис. 3.10 – Хроматограми зразків: а) НА-CS-800/600 годин; б) CS/600 годин.

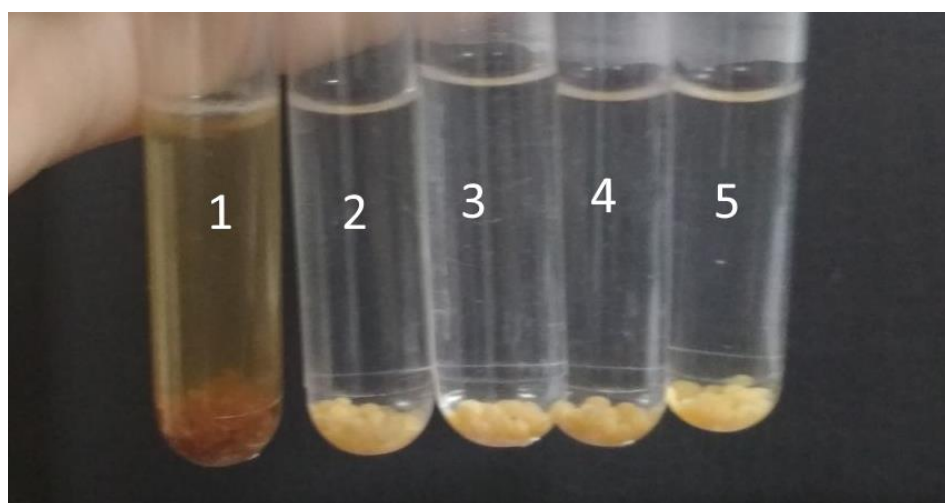


Рис. 3.11 – Порівняння забарвлення розчинів після 600 годин: 1 – CS; 2 – НА-CS-800; 3 – НА-CS-600; 4 – НА-CS-300; 5 – НА-CS.

Таким чином, отримані матеріали довели можливість використання їх у якості систем контрольованого вивільнення лікарських засобів. Після тривалого експерименту, структура зразків збережена, що дозволяє говорити про можливість пролонгованого лікування використовуючи дані матеріали. Найкращий результат отриманий для зразку HA-CS-800. Завдяки меншій пористості, зразок поглинає більшу кількість лікарських засобів, що забезпечує довше їх вивільнення. Також, у порівнянні з іншими зразками, пік, що відповідає за деструкцію зразка має меншу площу. Використання MW технології суттєво покращує здатність до поглинання та вивільнення лікарських засобів у порівнянні з класичним методом.

3.3. Дослідження структури альгінат-апатитних плівок.

Слід зазначити, що медичні матеріали клінічного застосування вимагають належної підготовки для створення відповідної форми, що дозволить доставку, вивільнення та поглинання, а також започаткування каскаду біохімічних реакцій, що приводить до бажаного терапевтичного ефекту.

Отримані плівки досліджували на рентгенівському хроматографі для визначення чи досить гарно йони металів інкорпоровалися у структуру. Як видно з рисунку 3.12 у всіх зразках наявні піки, що відповідають йонам металів, а гідроксиапатит відповідає JCPDS 9-432. Також наявне гало на низьких кутах, що зазвичай відповідає полімерам.

Спектр FTIR був записаний за допомогою спектрофотометра PerkinElmer BX-II зі спектральним дозволом 1 cm^{-1} у діапазоні хвильових чисел $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$. Типовий спектр для отриманих зразків наведено на рисунку 3.13 (на прикладі зразку HA-Alg-Al³⁺).

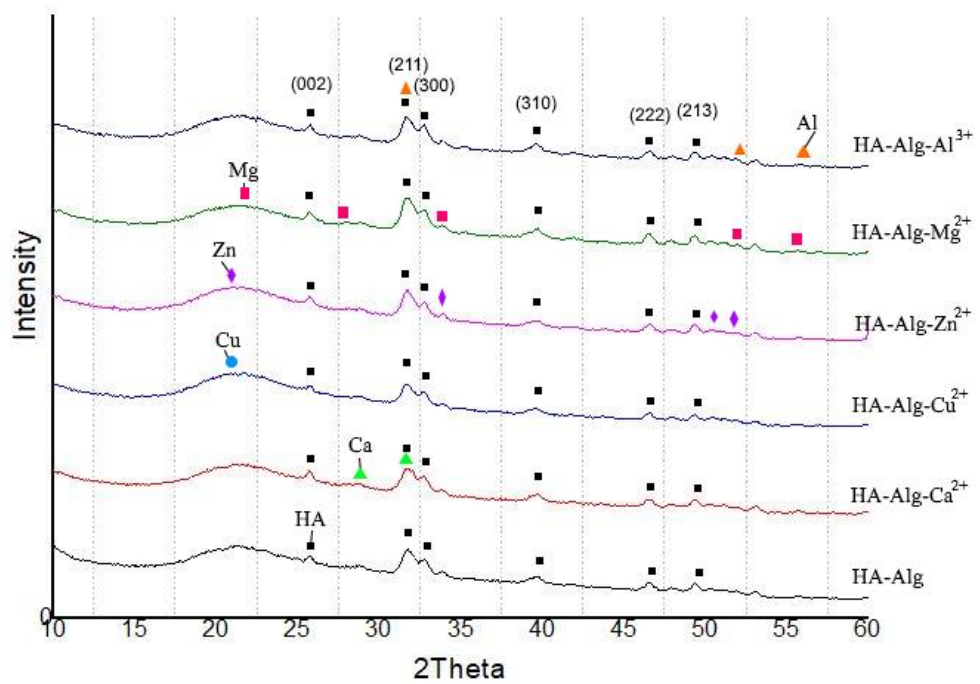


Рис. 3.12 – XRD спектри альгінат-апатитних плівок.

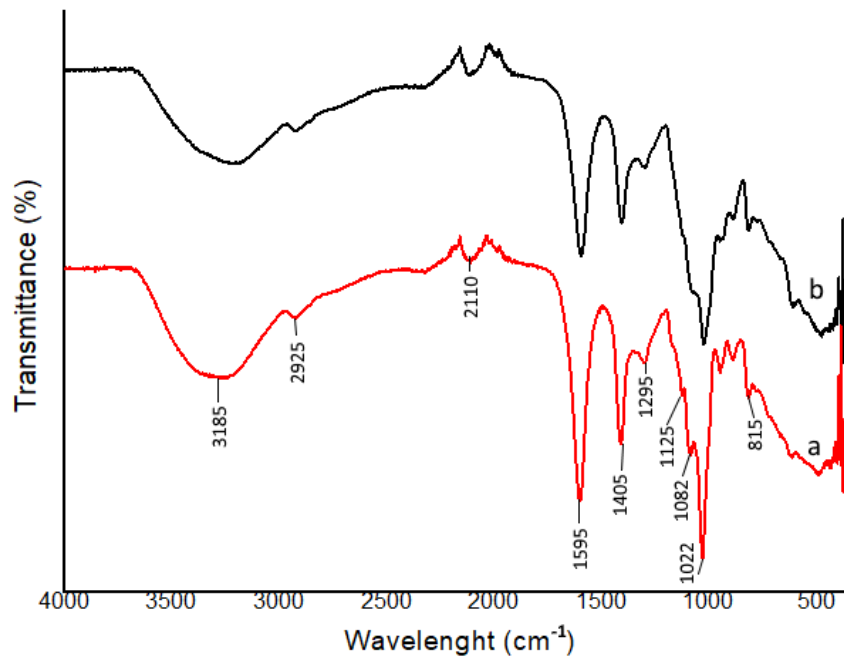


Рис. 3.13 – Типові FTIR спектри а) альгінат; б) зразок HA-Alg-Al³⁺.

Спектроскопія FTIR була використана для оцінки взаємодій HA, Alg та Me. Спектр чистого альгінату натрію використовувався для порівняння. Спектри FTIR отриманих зразків показали характерні смуги вібрації. Смуга

на рівні 632 см^{-1} відповідає лібраційній (vL) моді гідроксильної групи [57]. Слід зазначити, що смуга ОН при 632 см^{-1} є слабкою для зразка НА-Alg- Al^{3+} .

Пік Alg при 3185 см^{-1} пов'язаний з розтягом зв'язаних ОН-груп у вуглецевих кислотах. Насичений пік при 1595 см^{-1} приписується асиметричному розтягуванню вібрації карбонілу -C=O у чистих спектрах Alg. Смуга поглинання для чистого Alg навколо діапазону вібрації 1405 см^{-1} , відповідає симетричній вібрації розтягування COO- груп, яка може перекриватися смугами COO- вібрації, значно зменшила інтенсивність в спектрі плівки і змістилася до 1400 см^{-1} . Вібраційні смуги ОН для карбоксильних груп Alg при 1295 і 815 см^{-1} спостерігаються в спектрах плівок з майже ідентичною інтенсивністю.

Для контролю стабільності отриманих плівок та їх здатності поглинати проводили дослідження на набрякання. Набрякання досліджувалося у двох формах:

- 1) у розчині PBS;
- 2) у пористих губках просочених розчином імітуючих ясна (рис. 3.14).

Проводили набрякання у двох розчинах PBS з рН рівними 4,6 та 7,3 впродовж години. У ротовій порожнині людини середовище має кислий рН. Було поставлено за мету створення плівок для заповнення порожнин ясен, що зберігають свою форму впродовж декількох годин, після чого розкладаються. Як бачимо з рисунку 3.14 при кислому рН у зразках з Me (окрім Al) спостерігається менше набрякання ніж у зразку без металів. Треба зазначити, що отримані результати відповідають набряканню при 100% вологості.

Також проводили експеримент при вологості приблизній до природньої. У цьому випадку, плівка залишається стабільною впродовж 2-7 діб. На рисунку 3.15 зображено стан плівки після двох діб набрякання.

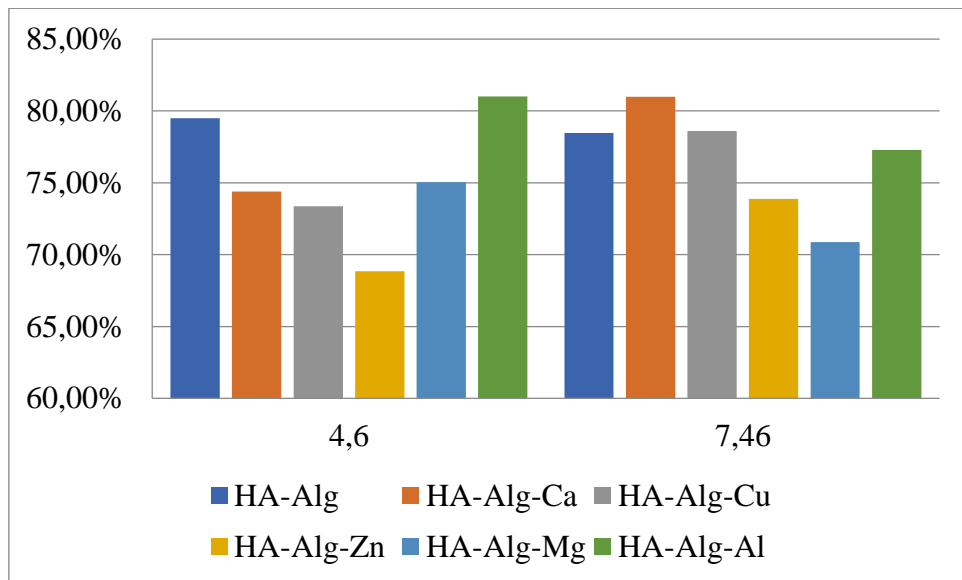


Рис. 3.14 – Ступінь набрякання плівок у розчині PBS при рН=4,6 та 7,46.

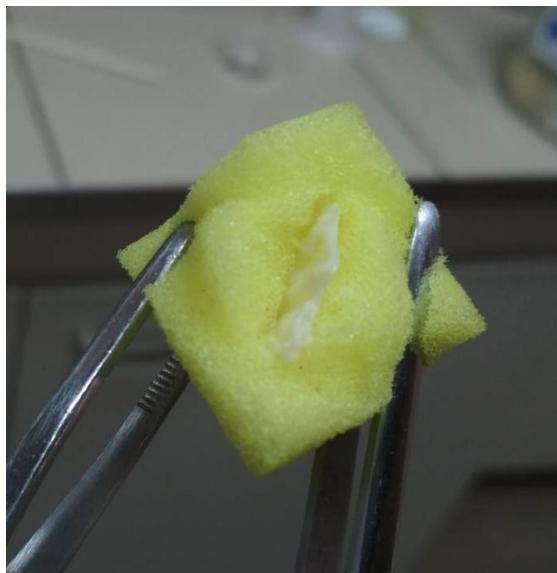


Рис. 3.15 – Набрякання у губках, імітуючих ясна.

Таким чином, отримані плівки мають рівномірну гладку форму, гнучкі, тримають форму при розтягуванні. Вони показують гарні результати при експозиції в розчині PBS. У водних розчинах відбувається суттєве набрякання протягом перших 30 хвилин.

РОЗДІЛ 4. БЕЗПЕКА ЖИТТЄДІЯЛЬНОСТІ ТА ОХОРОНА ПРАЦІ ПРИ РОБОТІ В ЛАБОРАТОРІЇ

Головним завданням охорони праці є створення на підприємствах здорових і безпечних умов праці, що виключають виробничий травматизм і профзахворювання. Основними засобами вирішення цього завдання є забезпечення безпеки обладнання і технологічних процесів, комплексна механізація виробництва та його автоматизація, ліквідація важкої фізичної праці.

Центральне місце у системі законодавства України про охорону праці є Закон “Про охорону праці” від 14.10.1992 р., а у 2002 р. його викладено у новій редакції. Він містить 9 розділів, що встановлюють загальні положення з охорони праці, гарантії працівників на охорону праці, організацію охорони праці на виробництві, стимулювання охорони праці, державне управління охороною праці, державний нагляд і громадський контроль за охороною праці, відповідальність за порушення законодавства про охорону праці. Окремий розділ присвячено нормативно-правовим актам з охорони праці, який визначає види, порядок опрацювання, прийняття та їх скасування.

Робота виконувалася з хімічними речовинами, електроустаткуванням в лабораторному приміщенні, тому розділ буде присвячений розгляду хімічної та електробезпеки.

Під час роботи на комп'ютері на користувача можуть впливати наступні небезпечні та шкідливі фактори:

- Електричний струм і випромінювання;
- Перенапруження зору під час роботи з електронними приладами, монітором, особливо при нераціональному розташуванні екрана відносно очей.

Вимоги до устаткування робочого місця:

- Освітлювальні установки повинні забезпечувати рівномірне освітлення і не повинні утворювати засліплюючих відблисків на клавіатурі, а також на екрані монітора.
- При роботі з комп'ютером та іншою периферійною технікою не допускається розташування робочого місця в приміщеннях без природного освітлення, без наявності природної або штучної вентиляції.
- Кут нахилу екрана монітора або ноутбука відносно вертикалі повинен складати 10-15 градусів, а відстань до екрана - 500-600 мм.
- Кут зору екрана повинен бути прямим та становити 90 градусів.
- Для захисту від прямих сонячних променів повинні передбачатися сонцезахисні пристрої (плівка з металізованим покриттям, регульовані жалюзі з вертикальними панелями та ін.).
- Освітлення повинно бути змішаним (природним та штучним).
- Сумарний час безпосередньої роботи з персональним комп'ютером та іншою оргтехнікою протягом робочого дня має бути не більше 6 годин, для педагогів — не більше 4 годин у день.
- Тривалість безперервної роботи з персональним комп'ютером та іншою оргтехнікою без регламентованої перерви не повинна перевищувати 2-х годин. Через кожну годину роботи слід робити перерву тривалістю 15 хв.
- Під час регламентованих перерв, з метою зниження нервово-емоційного напруження, стомлення зорового аналізатора, усунення впливу гіподинамії та гіпокінезії, запобігання розвитку познотонічного стомлення, слід виконувати комплекси вправ для очей або організовувати фізкультурні паузи.

4.1. Основні правила безпеки при роботі в хімічній лабораторії.

4.1.1. Загальні вимоги безпеки при роботі з комп'ютером та лабораторними приладами.

- До самостійної роботи з комп'ютером, та будь-яким лабораторним приладдям допускаються особи, які ознайомлені з інструкцією з охорони праці, не мають протипоказань за станом здоров'я та пройшли медичний огляд.

- Студентам забороняється приступати до роботи, не погодивши плану роботи з керівником.

- В лабораторії забороняється вживати їжу, пити, чи палити. Забороняється розташовувати сторонні предмети поблизу приладів та хімічних реактивів.

- У приміщенні кабінету та на робочому місці необхідно підтримувати чистоту і порядок, проводити систематичне провітрювання.

- Всі хімічні реактиви слід зберігати тільки в відповідному посуді з етикетками. Утилізацію реактивів проводять відповідно до техніки безпеки при роботі з лабораторними речовинами.

- Про всі виявлені під час роботи несправності обладнання необхідно доповісти керівнику, у випадку поломки необхідно припинити роботу до усунення аварійних обставин. При виявленні можливої небезпеки, попередити оточуючих та негайно повідомити керівнику.

- Після закінчення користування водою та електроприладами необхідно закрити крани, якими користувалися та вимкнути електроприлади. Йдучи з лабораторії, перевірити закінчення хімічних процесів та чи увімкнені вода і електричний струм на столах, під тягою та у зовнішніх шахтах.

4.1.2. Вимоги безпеки перед початком роботи з комп'ютером (ноутбуком) та лабораторними приладами.

- Оглянути та переконатися у справності обладнання, електропроводки. У разі виявлення несправностей, до роботи не приступати.

Повідомити про це керівника і, тільки після усунення несправностей і його дозволу, приступити до роботи.

- Перевірити освітлення робочого місця, за необхідності, вжити заходів до його нормалізації.
- Перевірити наявність та надійність захисного заземлення устаткування.
- Перевірити справність вимикачів та інших органів управління персональним комп'ютером та оргтехніки.
- Перед початком роботи необхідно ознайомитися з керівництвом по роботі з пристроями.
- Увімкнути монітор, перевірити стабільність та чіткість зображення на екрані, переконатися у відсутності запаху диму від комп'ютера та техніки.

4.1.3. Вимоги безпеки під час роботи з комп'ютером, ноутбуком та лабораторним приладдям.

- Вмикають пристрої тільки вимикачами. Проведення увімкнення за допомогою вилки у розетку відбувається тільки за присутності керівника.
- Забороняється знімати захисні пристрої з обладнання і працювати без них.
- Не дозволяється допускати до комп'ютера та лабораторної техніки сторонніх осіб, які не беруть участі в роботі.
- Забороняється переміщати та переносити системний блок, монітор, принтер, будь-яке обладнання, яке знаходиться під напругою.
- Забороняється під час роботи пити будь-які напої, приймати їжу.
- Забороняється будь-яке фізичне втручання у пристрій комп'ютера, лабораторних приладів під час їх роботи.
- Забороняється залишати увімкнене обладнання без нагляду.
- Забороняється класти предмети на комп'ютерне обладнання, монітори, екрани та оргтехніку.

- Необхідно суворо виконувати загальні вимоги з електробезпеки та пожежної безпеки.
- Необхідно також вимикати обладнання від мережі при тривалому простої.
- Забороняється самостійно проводити ремонт чи діагностику електричних пристроїв.
- Комп'ютер, будь-які його периферійні пристрої, оргтехніку необхідно використовувати у суворій відповідності з експлуатаційною документацією до них.
- Під час виконання роботи необхідно бути уважним, не звертати уваги на сторонні речі, ретельно спостерігати за роботою пристроїв.
- Про всі виявлені несправності та збої в роботі апаратури необхідно повідомити безпосередньо інженера з обслуговування комп'ютерної техніки або завідувача.

4.1.4. Вимоги безпеки після закінчення роботи з лабораторними приладами та комп'ютером.

- Вимкнути комп'ютер та іншу використовувані лабораторні пристрої від електромережі, для чого необхідно вимкнути тумблери, а потім акуратно витягнути штепсельні вилки з розетки.
- Протерти зовнішню поверхню комп'ютера чистою вологою тканиною. При цьому не допускається використання розчинників, одеколону, препаратів в аерозольній оболонці.
- Прибрати робоче місце.
- Ретельно провітрити приміщення з персональним комп'ютером та лабораторною технікою.

4.1.5. Вимоги техніки безпеки та безпеки життєдіяльності в аварійних ситуаціях при роботі з комп'ютером та лабораторним приладами.

- Якщо на металевих частинах обладнання виявлено напругу (відчуття струму), заземлюючий провід обірваний, необхідно вимкнути обладнання, негайно доповісти керівникові про несправності електрообладнання і без його вказівки до роботи не приступати.

- При припиненні подавання електроенергії, вимкнути обладнання.

- При появі незвичного звуку, запаху паленого, мимовільного вимкнення комп'ютера та/чи техніки, негайно припинити роботу і поставити до відома керівника.

- При виникненні пожежі негайно вимкнути обладнання, знеструмити електромережу за винятком освітлювальної мережі, повідомити про пожежу всім працівникам і приступити до гасіння осередку пожежі наявними засобами пожежогасіння.

- При нещасному випадку необхідно, насамперед, звільнити потерпілого від травмуючого фактора, звернутися до медпункту, зберегти, по можливості, місце травмування в тому стані, в якому воно було на момент травмування.

4.1.6. Правила роботи з кислотами та горючими речовинами:

- Розведення сірчаної кислоти проводять переливанням кислоти у воду, а не навпаки, і тільки в жаростійких і порцелянових склянках, тому що при цьому відбувається значне виділення тепла.

- Переливати концентровані HNO_3 , H_2SO_4 і HCl можна лише при увімкненій тязі у витяжній шафі. Дверцята шафи повинні бути, по можливості, прикриті.

- При роботі з концентрованими кислотами необхідно одягати захисні окуляри.

- Забороняється при роботі з етиловим ефіром, спиртом, бензолом, ацетоном та іншими горючими та легкозаймистими рідинами (ЛЗР)

проводити нагрівання на відкритому вогні, на сітці, поблизу відкритого полум'я або у відкритих посудинах. Слід мати на увазі, що органічні рідини можуть займатися при відсутності відкритого полум'я, при падінні на сильно нагріту поверхню.

- Забороняється ЛЗР виливати у відра, смітники, щоб уникнути пожежі від випадково кинутого сірника.

- При перенесенні кислот і лугів необхідно дотримуватись правил: переноска кислоти однією людиною дозволяється у відповідному скляному посуді місткістю не більше 5 літрів у спеціальних кошиках.

- Забороняється злив в каналізацію кислот і лугів без попередньої їх нейтралізації.

ВИСНОВКИ

У роботі наведені результати досліджень впливу умов синтезу на структуру кінцевих композитних матеріалів, представлені результати дослідження отриманих композитів та плівок на ступінь набрякання та пористість, а також на швидкість вивільнення лікарських засобів.

За результатами досліджень можна сформулювати наступні висновки:

1. Використання мікрохвильового випромінювання на стадії синтезу суттєво скорочує час формування гідроксиапатиту (з 24 годин до 15 хвилин).
2. За даними XRD параметри НА, отриманого під дією MW за 15 хвилин та класичним методом є ідентичними.
3. Збільшення потужності MW збільшує ступінь набрякання композитів та зменшує їх пористість.
4. Доведено, що синтезовані під дією MW композити на основі НА та CS можуть виконувати роль систем доставки лікарських засобів з пролонгованим їх вивільненням.
5. Збільшення MW потужності при синтезі композитів збільшує термін вивільнення Анестезину з їх складу.
6. Тест на біоактивність альгінат-апатитних плівок свідчить, що деструкція матеріалів з вивільненням НА та лікарського препарату в оточуюче середовище відбувається протягом 7 діб, що є достатнім для забезпечення лікувального ефекту при використанні плівок у якості чіпів для ясневих кишень при пародонтиті.
7. Розроблена методика виготовлення кап – комбінованих виробів на основі апатиту та альгінату для домашньої профілактики захворювань зубів та ротової порожнини за рахунок насичення їх активними речовинами.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] M. Sadat-Shojai, M. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi; Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures; *Acta Biomaterialia*; 2013; 9; 7591–7621.
- [2] W. Bojar, M. Kucharska, T. Ciach, Ł. Koperski, Z. Jastrzębski, M. Szałwiński, Bone regeneration potential of the new chitosan-based alloplastic biomaterial, *J. Biomater. Appl.* 28 (2014) 1060–1068.
- [3] M. A. Meyers, P. Chen, A. Y. Lin, Y. Seki; Biological materials: Structure and mechanical properties; *Progress in Materials Science*; 2008; 53; 1–206.
- [4] Dorozhkin, S. V. (2017). Calcium orthophosphates (CaPO₄): Occurrence and properties. *Morphologie*, 101(334), 125–142.
- [5] M. H. Uddin, T. Matsumoto, M. Okazaki, A. Nakahira, T. Sohmura; Biomimetic Fabrication of Apatite Related Biomaterials; *Biomimetics Learning from Nature*; Amitava Mukherjee (Ed.); 2010; InTech; (ISBN: 978-953-307-025-4).
- [6] S. Markovic, L. Veselinovic, M. J. Lukic, L. Karanovic, I. Bracko, N. Ignjatovic, D. Uskokovic; Synthetical bone-like and biological hydroxyapatites: a comparative study of crystal structure and morphology; *Biomed. Mater.*, 2011, 6; 1-14.
- [7] Баринов С. М. Биокераміка на основі фосфатів кальцію /Баринов С. М., Комлев В. С. - М.: Наука, 2005. - 204с., Вересів А. Г. Хімія неорганічних біоматеріалів на основі фосфатів кальцію / А. Г. Вересів, В. І. Путляев, Ю. Д. Третьяков // Ж. Рос. хім. т-ва Д. І. Менделєєва. - 2004.- № 4.- С. 52-64.
- [8] Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126.
- [9] Chitosan-apatite composites: synthesis and properties / L. F. Sukhodub, L. B. Sukhodub, I. V. Chorna // *Biopolymers and cell*. - 2016. - Vol. 32, № 2. - С. 83-97.

[10] Tsiourvas, D., Sapalidis, A., & Papadopoulos, T. (2016). Hydroxyapatite/chitosan-based porous three-dimensional scaffolds with complex geometries. *Materials Today Communications*, 7, 59–66.

[11] Diaz-Gomez, L., García-González, C. A., Wang, J., Yang, F., Aznar-Cervantes, S., Cenis, J. L., ... Alvarez-Lorenzo, C. (2017). Biodegradable PCL/fibroin/hydroxyapatite porous scaffolds prepared by supercritical foaming for bone regeneration. *International Journal of Pharmaceutics*, 527(1-2), 115–125.

[12] Bhattacharjee, P., Kundu, B., Naskar, D., Kim, H.-W., Bhattacharya, D., Maiti, T. K., & Kundu, S. C. (2015). Potential of inherent RGD containing silk fibroin–poly (ϵ -caprolactone) nanofibrous matrix for bone tissue engineering. *Cell and Tissue Research*, 363(2), 525–540.

[13] Suchanek, W. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants [Text] / W. Suchanek, M. Yashimura // *J. Mater. Res.* – 1998. – V. 13 (1). – P. 94-117.

[14] Chaudhari, A., Vig, K., Baganizi, D., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., ... Pillai, S. (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1974. .

[15] Uswatta, S. P., Okeke, I. U., & Jayasuriya, A. C. (2016). Injectable porous nano-hydroxyapatite/chitosan/tripolyphosphate scaffolds with improved compressive strength for bone regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 505–512.

[16] A.S. Stanislavov, L.F. Sukhodub, L.B. Sukhodub, V.N. Kuznetsov, K.L. Bychkov, M.I. Kravchenko, Structural features of hydroxyapatite and carbonated apatite formed under the influence of ultrasound and microwave radiation and their effect on the bioactivity of the nanomaterials, *Ultrason. Sonochem.* 42 (2018) 84–96.

[17] Sukhodub, L. B., Sukhodub, L. F., Prylutsky, Y. I., Strutynska, N. Y., Vovchenko, L. L., Soroca, V. M., ... Ritter, U. (2018). Composite material based on hydroxyapatite and multi-walled carbon nanotubes filled by iron: Preparation,

properties and drug release ability. *Materials Science and Engineering: C*, 93, 606–614.

[18] Sukhodub, L. F., Sukhodub, L. B., Litsis, O., & Prylutsky, Y. (2018). Synthesis and characterization of hydroxyapatite-alginate nanostructured composites for the controlled drug release. *Materials Chemistry and Physics*, 217, 228–234.

[19] M.B. Dreifke, N.A. Ebraheim, A.C. Jayasuriya, Investigation of potential injectable polymeric biomaterials for bone regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. A* 101 (2013) 2436–2447.

[20] T. Zhou, J. Wu, J. Liu, Y. Luo, Y. Wan, Fabrication and characterization of layered chitosan/silk fibroin/nano-hydroxyapatite scaffolds with designed composition and mechanical properties, *Biomed. Mater.* 10 (2015) 045013.

[21] Chen, G.B., Lv, Y.G., Dong, C.J., Yang, L., Effect of internal structure of collagen/hydroxyapatite scaffold on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* (2015) 99-108.

[22] V.P. Mantripragada, A.C. Jayasuriya, Injectable chitosan microparticles incorporating bone morphogenetic protein-7 for bone tissue regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102 (2014) 4276–4289,

[23] F. Croisier, C. Jerome, Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 780–792.

[24] Cunniffe, G. M., Curtin, C. M., Thompson, E. M., Dickson, G. R., & O'Brien, F. J. (2016). Content-Dependent Osteogenic Response of Nanohydroxyapatite: An in Vitro and in Vivo Assessment within Collagen-Based Scaffolds. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(36), 23477–23488.

[25] K.G.H. Desai, H.J. Park, Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying, *J. Microencapsul.* 22 (2005) 179–192.

[26] Chen, G., Dong, C., Yang, L., & Lv, Y. (2015). 3D Scaffolds with Different Stiffness but the Same Microstructure for Bone Tissue Engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(29), 15790–15802.

[27] V.P. Mantripragada, A.C. Jayasuriya, IGF-1 release kinetics from chitosan microparticles fabricated using environmentally benign conditions, *Mater. Sci. Eng., C Mater. Biol. Appl.* 42 (2014) 506–516.

[28] I.H. Bae, B.C. Jeong, M.S. Kook, S.H. Kim, J.T. Koh, Evaluation of a thiolated chitosan scaffold for local delivery of BMP-2 for osteogenic differentiation and ectopic bone formation, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013) 878930.

[29] W. Pon-On, N. Charoenphandhu, J. Teerapornpantakit, J. Thongbunchoo, N. Krishnamra, I.M. Tang, Mechanical properties, biological activity and protein controlled release by poly(vinyl alcohol)-bioglass/chitosan-collagen composite scaffolds: a bone tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng., C Mater.* 38 (2014) 63–72.

[30] A. Sadiasa, S.K. Sarkar, R.A. Franco, Y.K. Min, B.T. Lee, Bioactive glass incorporation in calcium phosphate cement-based injectable bone substitute for improved in vitro biocompatibility and in vivo bone regeneration, *J. Biomater. Appl.* 28 (2014) 739–756.

[31] B. Yu, Y. Zhang, X. Li, Q. Wang, Y. Ouyang, Y. Xia, B. Yu, B. Lin, S. Li, Y. Fan, Y. Chen, The use of injectable chitosan/nanohydroxyapatite/collagen composites with bone marrow mesenchymal stem cells to promote ectopic bone formation in vivo, *J. Nanomater.* 2013 (2013) 8.

[32] H.H.K. Xu, C.G. Simon, Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility, *Biomaterials* 26 (2005) 1337–1348.

[33] P. Nahar-Gohad, N. Gohad, C.C. Tsai, R. Bordia, N. Vyavahare, Rat aortic smooth muscle cells cultured on hydroxyapatite differentiate into osteoblast-like cells via BMP2-SMAD-5 pathway, *Calcif. Tissue Int.* 96 (2015) 359–369.

[34] Bagherifard, S. (2017). Mediating bone regeneration by means of drug eluting implants: From passive to smart strategies. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1241–1252.

[35] Komlev, V. S., Barinov, S. M., & Koplik, E. V. (2002). A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. *Biomaterials*, 23(16), 3449–3454.

[36] Eliaz, N., & Metoki, N. (2017). Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials*, 10(4), 334.

[37] Kolmas, J., Krukowski, S., Laskus, A., & Jurkitewicz, M. (2016). Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications. *Ceramics International*, 42(2), 2472–2487.

[38] Krajewski A, Kirsch M, Ravaglioli A, Mazzocchi M. A survey on the drug delivery systems. In: Ravaglioli A, Krajewski A, editors. *Drug delivery systems. Proceedings of the Sixth International Meeting and Seminar on Ceramics, Cells and Tissues*. Faenza: CNR, 2000, p. 3–13.

[39] Paul W, Sharma CT. Development of porous spherical hydroxyapatite granules: application towards protein delivery. *J Mater Sci: Mater Med* 1999;10:383–8.

[40] Bagherifard, S. (2017). Mediating bone regeneration by means of drug eluting implants: From passive to smart strategies. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1241–1252.

[41] Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science* 1984;226:630–6.

[42] Di Silvio L, Bonfield W. Biodegradable drug delivery system for the treatment of bone infection and repair. *J Mater Sci: Mater Med* 1999;10:653–8.

[43] Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N, Ono K. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. *J Bone Jt Surg* 1992;74-B:600–4.

[44] D. Loca, J. Locs, A. Dubnika, V. Zalite, L. Berzina-Cimdina, Porous hydroxyapatite for drug delivery in: M. Mucalo (Ed.), Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications, Woodhead Publishing series in Biomaterials, Cambridge, UK, 2015, pp. 189-209.

[45] Pérez-Lozano, P., García-Montoya, E., Orriols, A., Miñarro, M., Ticó, J. R., & Suñé-Negre, J. M. (2005). A new validated method for the simultaneous determination of benzocaine, propylparaben and benzyl alcohol in a bioadhesive gel by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39(5), 920–927.

[46] Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 101(2-3), 157–170.

[47] Вересов А. Г. Химия неорганических биоматериалов на основе фосфатов кальция / А. Г. Вересов, В. И. Путляев, Ю. Д. Третьяков // Ж. Рос. хим. об-ва Д. И. Менделеева. – 2004. – № 4. – С. 52–64.

[48] Cheung, R., Ng, T., Wong, J., & Chan, W. (2015). Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*, 13(8), 5156–5186.

[49] Kaynak Bayrak, G., Demirtaş, T. T., & Gümüşderelioglu, M. (2017). Microwave-induced biomimetic approach for hydroxyapatite coatings of chitosan scaffolds. *Carbohydrate Polymers*, 157, 803–813.

[50] Beşkardeş, I. G., Demirtaş, T. T., Durukan, M. D., & Gümüşderelioglu, M. (2012). Microwave-assisted fabrication of chitosan-hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(11), 1233–1246.

[51] Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K.-H., & Kim, S.-K. (2015). Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 269–281.

[52] I. Liakos, L. Rizzello, I.S. Bayer, P.P. Pompa, R. Cingolani, A. Athanassiou, Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 176–183.

[53] Sukhodub L.B. Antimicrobial activity of Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ ions doped chitosan nanoparticles // Annals of Mechnikov Institute.- 2015.-N1.-P. 39-43.

[54] Danilchenko SN, Kukharenko OG, Moseke C [et al.] Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strain from diffraction line broadening // Cryst. Res. Technol. 2002. Vol. 37. № 11. P. 1234–1240.

[55] N. Pramanik, S. Mohapatra, P. Bhargava, P. Pramanik, Chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite (HAp)-poly (ethylene co vinyl alcohol) (EVA) nanocomposite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications, Mater. Sci. Eng. C, vol. 1, 2009, pp. 228–236.

[56] W.A. Soskolne, H.M. Proskin, A. Stabholz, Probing depth changes following 2 years of periodontal maintenance therapy including adjunctive controlled–release of Chlorhexidine, J. Periodontol. 74 (2003) 420–427.

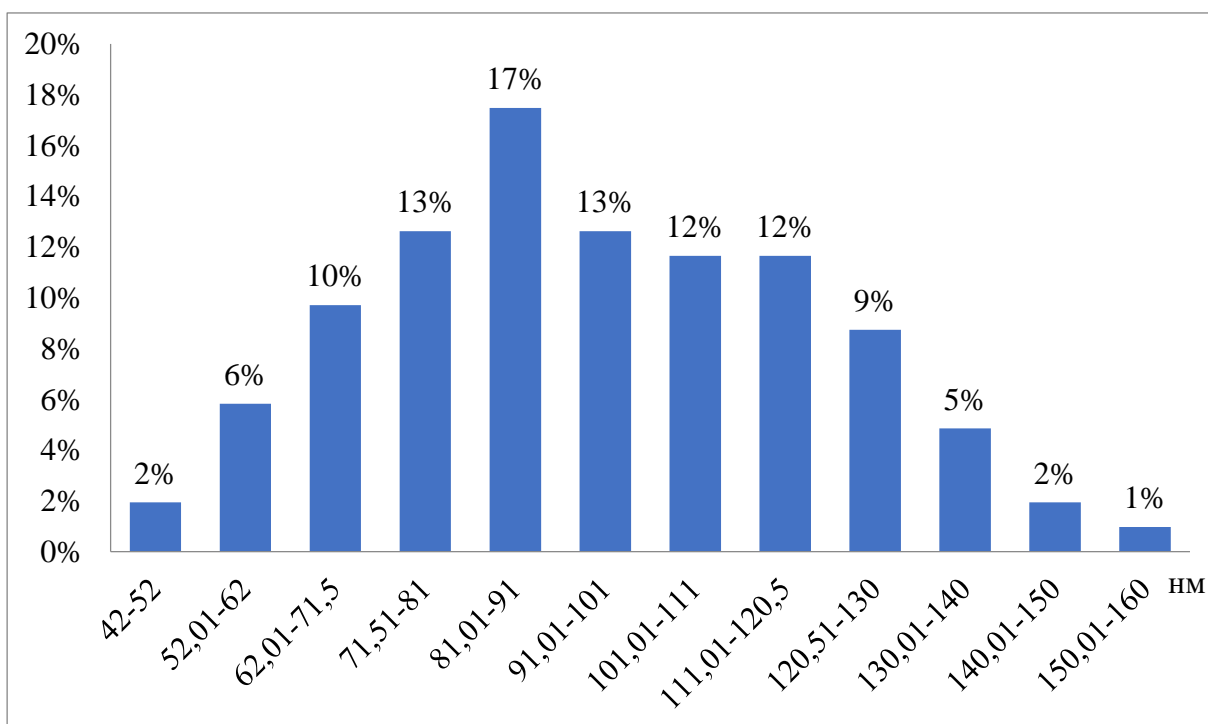
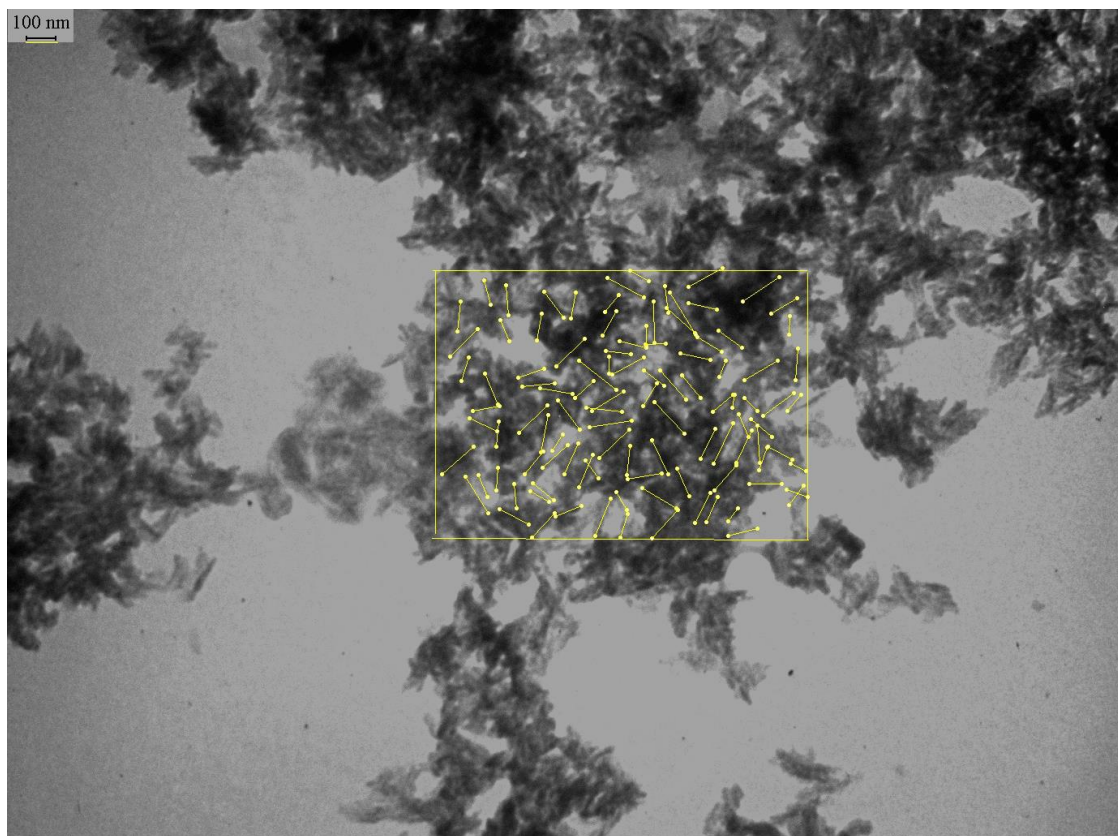
[57] J. Arends, J. Christoffersen, M.R. Christoffersen, H. Eckert, B.O. Fowler, J.C. Heughebaert, G.H. Nancollas, J.P. Yesinowski, S.J. Zawacki, A calcium hydroxyapatite precipitated from an aqueous solution; an international multimethod analysis, J. Cryst. Growth 3 (1987) 512–532.

ПУБЛІКАЦІЇ

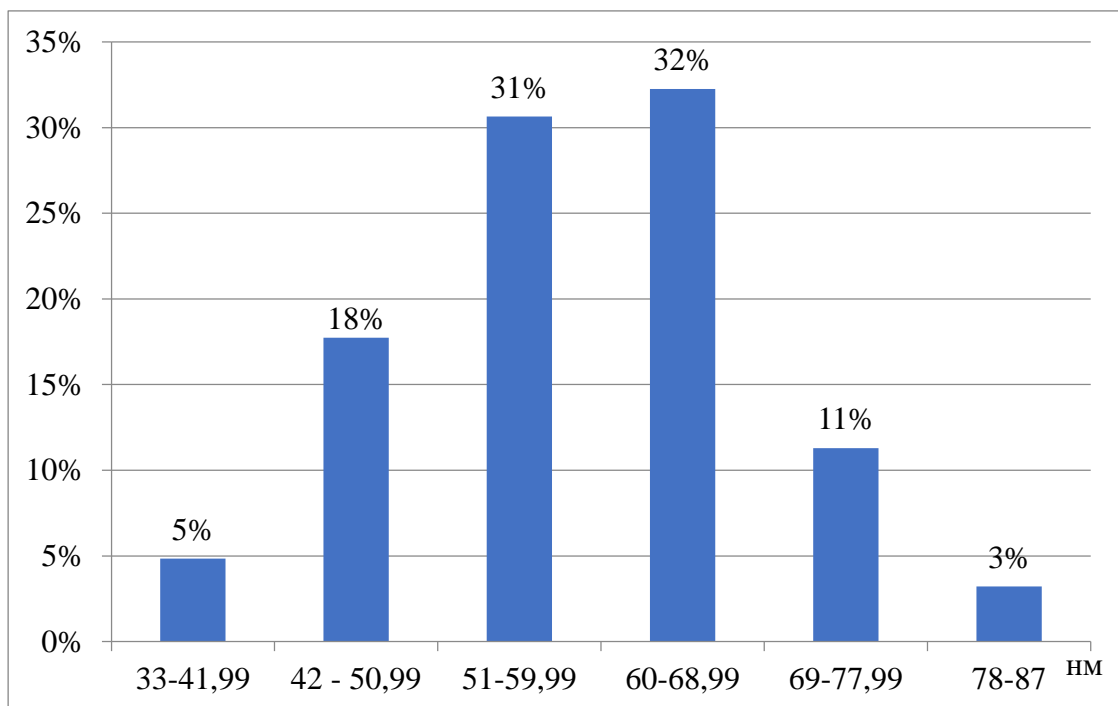
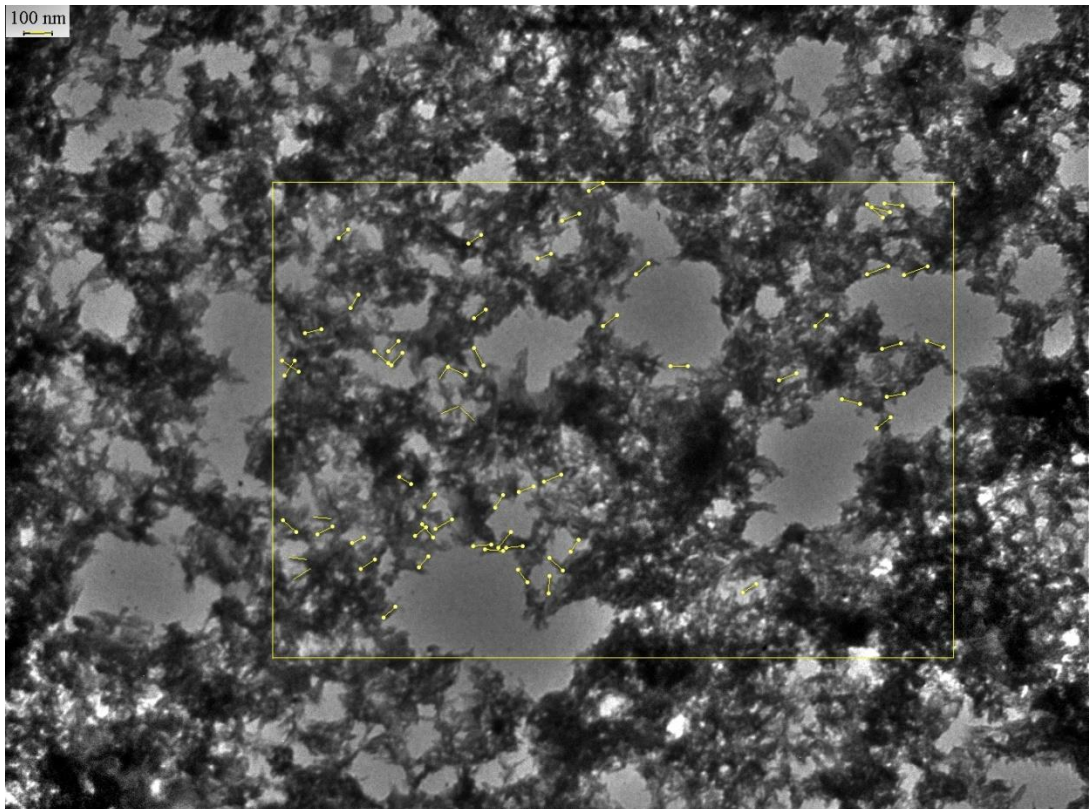
1. "Nanostructured polymer-apatite scaffolds for dental application: structure and properties" Sukhodub L.B, [Kumeda M.O.](#), Sukhodub L.F. International research and practice conference: Nanotechnology And Nanomaterials (NANO-2018) : Kyiv, Ukraine, 27-30 August, 2018, . – Sumy : Sumy State University, 2018. P.39
2. "Microwave assisted formation of the Chitosan/Hydroxyapatite scaffold for bone tissue regeneration" Sukhodub L.B., [Kumeda M.O.](#), Gapon V.I, Sukhodub L.F. Nanomaterials: Applications & Properties (NAP-2018) : 7th International Conference, Odessa, Ukraine, 10-15 September, 2018. – Sumy : Sumy State University, 2018. – V. 4. – Pages: 04NNLS30-1 - 04NNLS30-4.
3. "Hydroxyapatite/chitosan composite formation under the influence of microwave radiation" [Kumeda M.O.](#), Sukhodub L.B. Sukhodub L.F. Topical issues of theoretical and clinical medicine: International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists, Sumy, Ukraine, 17-19 October, 2018. – Sumy : Sumy State University, 2018, P. 120.
4. "Influence of pH value on the nanocrystalline hydroxyapatite structure" Gapon V.I, [Kumeda M.O.](#), Sukhodub L.B. Sukhodub L.F. Topical issues of theoretical and clinical medicine: International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists, Sumy, Ukraine, 17-19 October, 2018. – Sumy : Sumy State University, 2018, P. 117.

ДОДАТОК А
РОЗПОДІЛ РОЗМІРІВ КРИСТАЛІТІВ У ХІТОЗАН-АПАТИТНИХ ЗРАЗКАХ

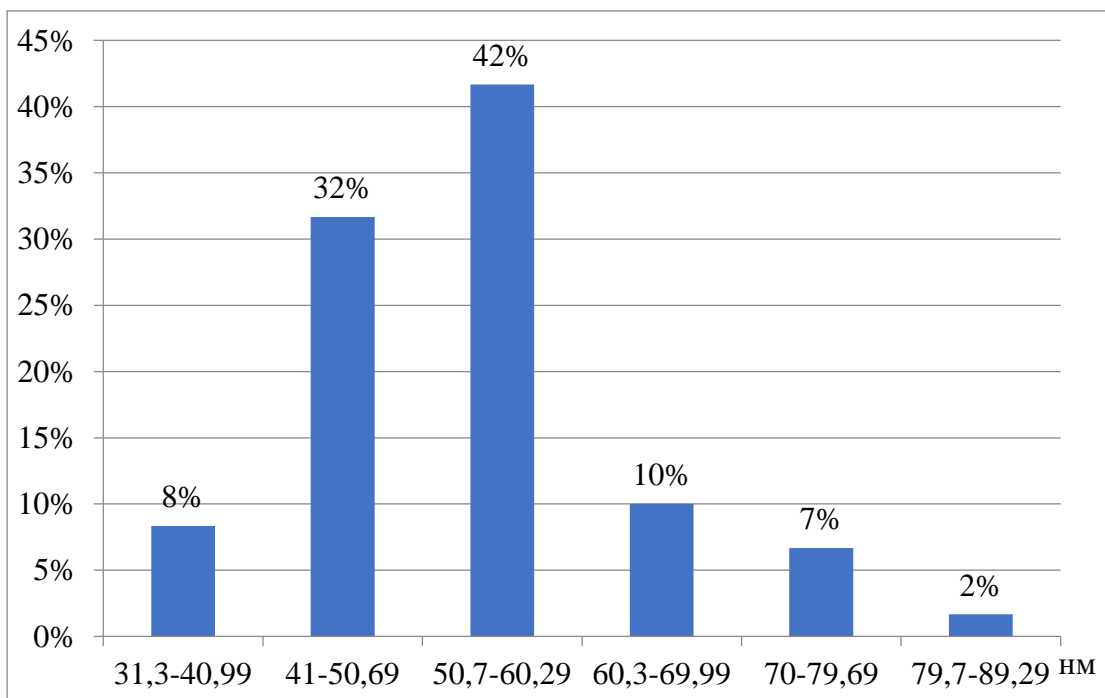
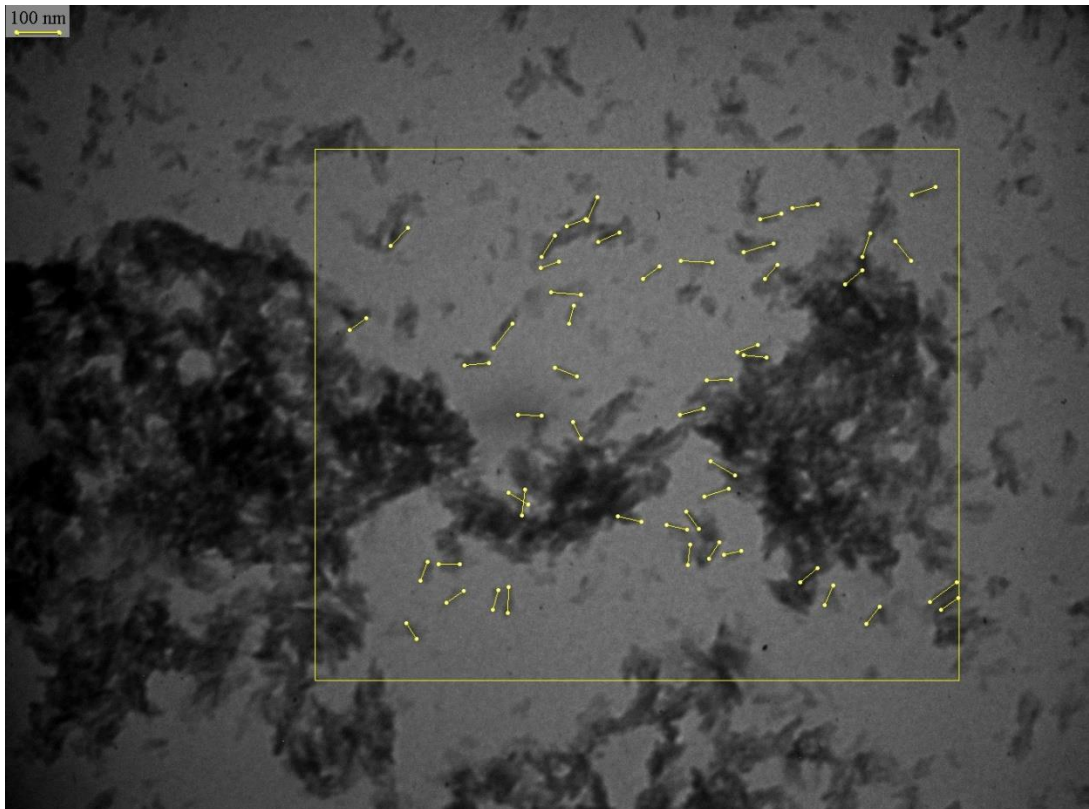
Зразок HA-CS



Зразок HA-CS-300



Зразок HA-CS-600



Зразок HA-CS-800

