

Реферат

Выпускная квалификационная работа 89 с., 29 рис., 30 табл., источников, 1 прил.

Ключевые слова: биodeградируемые материалы, материалы медицинского назначения, модифицирование поверхности, иодсодержащие полимерные материалы.

Актуальность работы: продиктована постоянной необходимостью разработки новых материалов для медицины.

Объектом исследования являются иодсодержащие материалы на основе полимолочной кислоты.

Цель работы – получение иодсодержащих материалов на основе полимолочной кислоты и исследование их свойств.

В процессе работы проводились литературный анализ распространенных иодсодержащих материалов медицинского назначения и методов их получения, разработка метода получения иодсодержащих материалов на основе полимолочной кислоты с использованием методики «хороший/плохой растворитель»; исследование свойств полученных материалов, оценка ресурсоэффективности проекта, разработка мероприятий по охране труда и защите окружающей среды.

В результате исследования разработан метод получения иодсодержащих материалов на основе полимолочной кислоты, а также изучены свойства полученных материалов. Составлена заявка на патент № 2015154344 на предложенный способ получения иодсодержащих материалов на основе полимолочной кислоты.

Степень внедрения: результаты исследования были представлены на следующих конференциях: «Материалы и технологии XXI века», Казань, КФУ, 2014 г., «Химия и химическая технология в XXI веке», Томск, ТПУ, 2015, «3rd International Conference on Chemical Technology», Чехия, Микулов, 2015, «Nanoworkshop», Томск, ТПУ, 2016 г., «Информационно-измерительная техника и технологии», Томск, ТГУ, 2016 г. Составлена заявка на патент № 2015154344

Область применения: медицина и трансплантология.

Экономическая эффективность/значимость работы: использование биоразлагаемых материалов позволяет повысить ресурсоэффективность проекта, а также позволяет решить проблемы экологического загрязнения.

Оглавление

Введение	5
1. Обзор литературы	7
1.1 Биоразлагаемые материалы медицинского назначения.....	7
1.2 Полимолочная кислота.....	7
1.3 Иодсодержащие полимерные материалы.....	8
1.3.1 Ковалентное модифицирование полимеров иодом и его соединениями	8
1.3.2 Нековалентное модифицирование полимеров иодом и его соединениями	9
2. Объект и методы исследования	11
2.1 Объект исследования.....	11
2.2 Материалы и методы	12
2.2.1 Получение пленок из полимолочной кислоты.....	12
2.2.2 Получение матриксов из полимолочной кислоты	12
2.2.3 Модификация пленок из полимолочной кислоты в парах иода	12
2.2.5 Методы качественной и количественной оценки	13
2.2.6 Исследование антибактериальной активности полученных материалов	13
3. Расчеты и аналитика	15
4. Результаты проведенного исследования.....	16
4.1 Поверхностное модифицирование пленок из полимолочной кислоты	16
4.1.1 Выбор системы «растворитель/нерастворитель».....	16
4.1.2 Подбор условий проведения модифицирования.....	16
4.1.3 Качественная и количественная оценка результатов модификации пленок из полимолочной кислоты.....	18
4.2 Нанесение иода на поверхность матриксов из полимолочной кислоты	28
4.2.1 Антибактериальные свойства полученных материалов	36
5. Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	
Ошибка! Закладка не определена.	

Введение.....	Ошибка! Закладка не определена.
5.1 Инициация научного исследования.....	Ошибка! Закладка не определена.
5.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	Ошибка! Закладка не определена.
5.1.2 Анализ конкурентных решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	Ошибка! Закладка не определена.
5.2 Планирование научного исследования	Ошибка! Закладка не определена.
5.2.1 Организационная структура НИ	Ошибка! Закладка не определена.
5.2.2 Ограничения и допущения НИ	Ошибка! Закладка не определена.
5.2.3 План научного исследования...	Ошибка! Закладка не определена.
5.3 Бюджет научного исследования	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.1 Расчет материальных затрат ...	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.2 Расчет затрат на оборудование для научно-экспериментальных работ	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.3 Основная заработная плата исполнителей темы	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.4 Дополнительная заработная плата исполнителей темы..	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.5 Отчисления во внебюджетные фонды	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.6 Контрагентные расходы	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.7 Накладные расходы	Ошибка! Закладка не определена.
5.3.8 Формирование бюджета затрат научно-исследовательского проекта	Ошибка! Закладка не определена.
5.4 Определение ресурсной эффективности исследования	Ошибка! Закладка не определена.
Вывод.....	Ошибка! Закладка не определена.
6. Социальная ответственность	Ошибка! Закладка не определена.
Введение.....	Ошибка! Закладка не определена.

6.1 Производственная безопасность	Ошибка! Закладка не определена.
6.2 Вредные вещества	Ошибка! Закладка не определена.
6.3 Недостаточное освещение.....	Ошибка! Закладка не определена.
6.4 Производственный шум.....	Ошибка! Закладка не определена.
6.5 Микроклиматические условия	Ошибка! Закладка не определена.
6.6 Термическое воздействие	Ошибка! Закладка не определена.
6.7 Электрическое воздействие	Ошибка! Закладка не определена.
6.8 Пожаровзрывоопасность веществ и материалов	Ошибка! Закладка не определена.
6.9 Экологическая безопасность	Ошибка! Закладка не определена.
6.10 Защита в чрезвычайных ситуациях.....	Ошибка! Закладка не определена.
6.11 Правовые вопросы обеспечения безопасности ..	Ошибка! Закладка не определена.
Вывод	Ошибка! Закладка не определена.
Список используемых источников	38
Выводы	44

Введение

Биоразлагаемые полимеры нашли широкое применение в качестве материалов для изделий медицинского назначения [1]. Наиболее распространенными материалами подобного рода являются полимолочная кислота [2], полигликолевая кислота [3], поликапролактон [4], а также их сополимеры. Однако, именно полимолочная кислота получила наибольшее распространение в силу возможности получения полимера с заданными свойствами, варьируя соотношение оптических изомеров в цепи полимера [5]. Немаловажным является и тот факт, что при деградации полимолочной кислоты в организме человека полимер гидролизуеться до молочной кислоты, естественного метаболита [6].

Однако при всех перечисленных преимуществах полимолочная кислота в качестве материала для изделий медицинского назначения имеет и ряд

недостатков, главным из них является отсутствие реакционноспособных групп на поверхности полимера.

Иод и его соединения давно известны своими антибактериальными свойствами. Для медицинских целей наиболее часто используются молекулярный иод [7] и комплекс поливинилпирролидона с иодом [8]. Помимо этого, иод и его соединения часто используются в качестве рентгеноконтрастных агентов [9], в радиотерапии [10].

Таким образом, разработка иодсодержащих материалов на основе биоразлагаемого полимера является актуальной задачей, решение которой может быть применено как в медицине, так и в других отраслях жизни человека.

Целью данной работы является разработка иодсодержащих материалов на основе высокомолекулярной полимолочной кислоты и изучение их свойств.

Объектом исследования являются биоразлагаемые иодсодержащие материалы на основе полимолочной кислоты.

1. Обзор литературы

1.1 Биоразлагаемые материалы медицинского назначения

В последнее время требования к материалам, применяемым в медицине, становятся все более высокими. Они должны совмещать в себе такие свойства, как биосовместимость, биodeградируемость, а также приемлемые механические свойства. Этим требованиям соответствуют синтетические биodeградируемые полимеры, наиболее распространенными представителями которых являются поликапролактон [4], полигликолевая кислота [3], полимолочная кислота [2]. Наиболее перспективным материалом среди перечисленных является полимолочная кислота. Это биodeградируемый полимер, получаемый из растительного сырья, который гидролизуеться в организме человека до молочной кислоты, естественного метаболита, способного в дальнейшем участвовать в цикле трикарбоновых кислот [6]. Еще одним выдающимся свойством полимолочной кислоты является возможность получения полимера с заданными механическими характеристиками за счет варьирования доли D- и L- изомеров в материале [5]. Кроме того, полимолочная кислота поддается большинству технологических процессов, таких как экструзия и плавление [11]. Несмотря на представленные преимущества, полимолочная кислота обладает и рядом существенных недостатков, среди которых стоит перечислить гидрофобность, препятствующую адгезии клеток на поверхности полимера, а так же отсутствие биологической активности, связанное с недостатком реакционно активных групп на поверхности полимера (последнее можно считать недостатком лишь в некоторых случаях).

1.2 Полимолочная кислота

Полимолочная кислота является синтетическим алифатическим полиэфиром, мономером которого является молочная кислота:

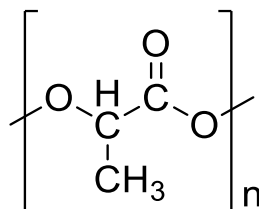


Рисунок 1. Структура полимолочной кислоты.

Молекула молочной кислоты имеет хиральный центр, поэтому она может существовать в виде двух оптических изомеров, D- и L- молочной кислот. Соотношение D- и L- изомеров в полимере влияет на такие существенные характеристики, как скорость деградации, твердость, хрупкость, растворимость и вязкость раствора. Таким образом, возможность изменения свойств

полученного полимера варьированием соотношения оптических изомеров молочной кислоты в цепи полимера позволяет получить материал с заданными физическими свойствами.

1.3 Иодсодержащие полимерные материалы

Иод и его соединения давно известны своими антибактериальными свойствами [7,8]. Кроме того, иод и его соединения используются в качестве контрастных агентов в методах исследования, основанных на применении рентгеновских лучей [9] и в радиотерапии [10]. Рассмотрим основные методы получения иодсодержащих полимерных материалов, а также их применения.

1.3.1 Ковалентное модифицирование полимеров иодом и его соединениями

В литературе встречается несколько методов, позволяющих получить полимолочную кислоту и ее сополимеры, содержащие ковалентную связь между атомами углерода и иода.

В работе [12] сополимер полимолочной кислоты и полиэтиленоксида был помечен радиоактивным изотопом иода с целью изучения распределения материала имплантов в организме крыс. Для этого сополимер растворяли в 1,4-диоксане, затем к полученному раствору добавляли иодид I^{125-} . Иодирование проводили добавлением раствора хлорамина Т в фосфатном буфере с $pH=7.4$. импланты, изготовленные из полученного полимера, вживляли в лабораторных крыс. Дальнейший анализ тканей подопытных животных позволил судить о распределении сополимера по организму животного.

Группой Beuille et al. был представлен метод иодирования полимолочной кислоты с применением N-иодсукцинимидом с целью увеличения реакционной активности полимера [13]. Иодирование проводили в кипящем бензоле (при $t=80\text{ }^{\circ}C$), в присутствии полилактида, N-иодсукцинимидом и перекиси бензоила (в соотношении 1:1:0.02). Схема и механизм реакции приведены на рисунке 2:

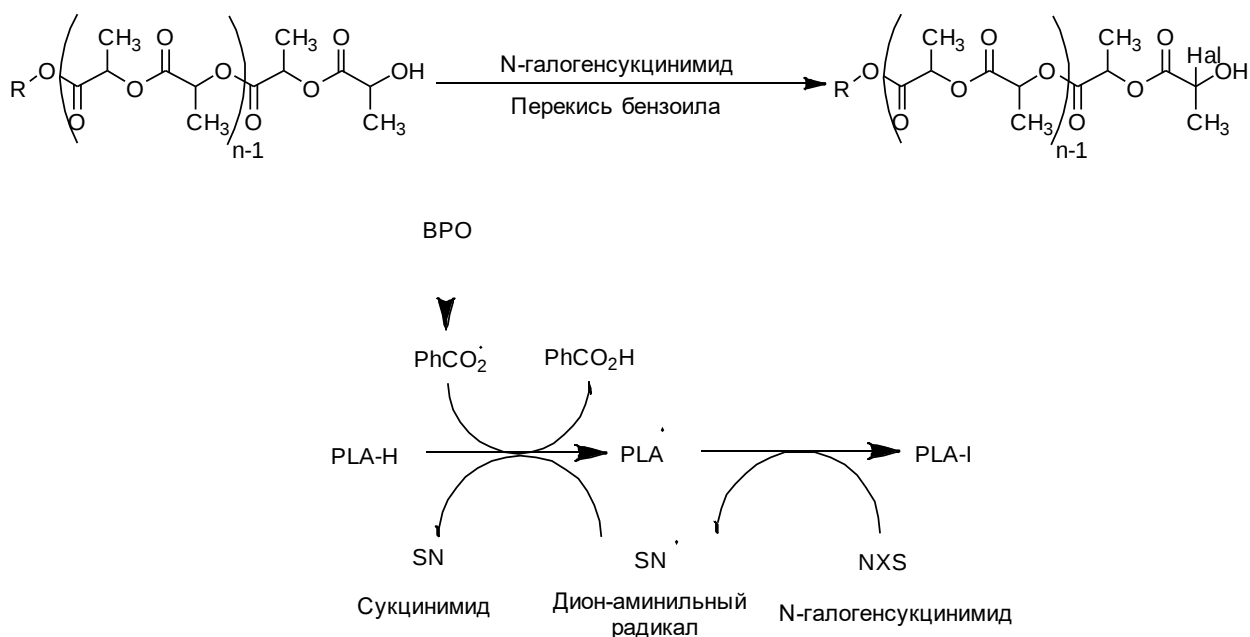


Рисунок 2. Схема и механизм ковалентного галогенирования полимолочной кислоты в присутствии N-галогенсукцинимидов.

Согласно данным ПМР, эффективность данного метода составила менее 0.5%. Данная реакция оказалась региоселективной и иодирование проходит в ω-положение молекулы полимера.

Перечисленные подходы позволяют заметно изменить свойства полимолочной кислоты и ее сополимеров, однако ковалентная модификация может непредсказуемо сказаться на механических свойствах полимера. Кроме того, перечисленные методы подразумевают растворение полимера, поэтому они не могут быть применены для поверхностной модификации готовых изделий.

1.3.2 Нековалентное модифицирование полимеров иодом и его соединениями

Нековалентное модифицирование полимера иодом и его соединениями подразумевает их нанесение на поверхность, или внесение в объем материала. Наиболее часто подобное модифицирование проводят с целью придания полимеру антибактериальных свойств, или рентгеноконтрастности.

1.3.2.1 Полимерные материалы, содержащие иод и его соединения в объеме

Большинство методов нанесения иода и его соединений на поверхность полимерных материалов основаны на обработке полимера парами иода, или растворами иода и иодсодержащих соединений.

В работе [14] описано нанесение иода из паров и растворов на волокна нейлона-6. Были найдены отличия в поглощения иода из различных сред. Авторы работы отметили, что при поглощении иода из паров на поверхности полимера он находится в молекулярном виде, тогда как при поглощении из растворов иод принимает ионную форму (вероятно, гипоиодитные структуры со связями $-O-I$), что может привести к образованию полииодидов (рис. 3).

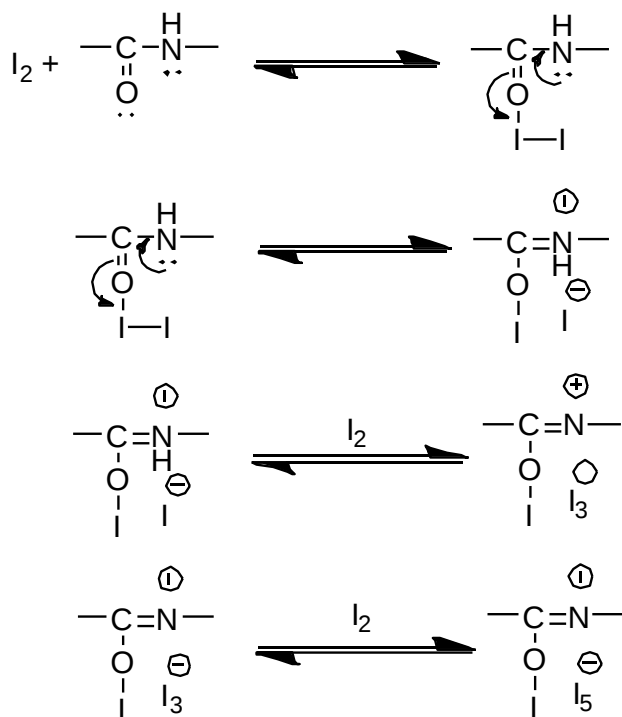


Рисунок 3. Образование полииодидов при адсорбции иода на нейлоне

Подобным образом в работе [8] иод был нанесен на поверхность коллагеновых матриц. Матрицы, полученные из коллагена ахиллесова сухожилия свиньи, погружали в водный раствор комплекса иода и поливинилпирролидона на 30 минут, затем дважды промывали водой. Полученный материал не влиял на пролиферацию клеток-предшественников, а так же способствовал начальным стадиям остеогенеза.

В патенте [16] предложен способ нанесения иодсодержащих покрытий на изделия медицинского назначения из биоразлагаемых полимеров (в том числе и полимолочной кислоты). Он заключается в погружении изделия в раствор полимера с добавкой кристаллического иода, или нанесении такого раствора из спрея. Существенным недостатком данного способа является потребность в дополнительном оборудовании, или введении дополнительной стадии. Кроме того, механические свойства и биосовместимость полимеров, раствор которых наносится на изделие, отличаются от соответствующих параметров полимолочной кислоты.

2. Объект и методы исследования

2.1 Объект исследования

Объектом исследования являются материалы на основе высокомолекулярной поли(L-молочной) кислоты PL65 (PURAC, Нидерланды). Основные физико-химические характеристики полимера представлены в табл. 1 [17].

Таблица 1 – Основные физико-химические характеристики поли(L-молочной) кислоты PL65

Параметр	Значение/описание
Внешний вид	Гранулы, цвет от белого до бежевого
Средняя молекулярная масса (данные гель-хроматографии)	1646000 г/моль
Характеристическая вязкость (хлороформ, 25°C, c=0,001 г/см ³)	0,692 м ³ /кг
Характерный угол поворота плоскости поляризации света (хлороформ, 20°C)	-158,5 °
Диапазон температур плавления (данные дифференциальной сканирующей калориметрии, 10°C/мин)	177,8-189,8 °C
Содержание воды (калориметрический метод)	Макс. 0,5%
Содержание олова	Макс. 50 ppm
Содержание остаточного растворителя	Макс. 0,01%
Содержание остаточного мономера	Макс. 0,1%
Содержание тяжелых металлов	Менее 10 ppm

Задачи:

Разработка нового типа иодсодержащих материалов на основе полимолочной кислоты.

Изучение свойств полученных материалов.

2.2 Материалы и методы

2.2.1 Получение пленок из полимолочной кислоты

В качестве исследуемого материала были выбраны пленки из полимолочной кислоты. Для получения пленок использовали полимолочную кислоту PL65 (PURAC, Нидерланды). Навеску из полимолочной кислоты растворяли в смеси $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CHCl}_3=40:60$ (об.) (PANREAC, Испания) для получения раствора концентрацией 1,7% (масс.). Время гомогенизации раствора – 12 ч. После этого 18 ± 1 г раствора наливали в сухую чашку Петри диаметром 10 см, закрывали и высушивали в парах растворителя в течение 72 ч.

2.2.2 Получение матриксов из полимолочной кислоты

Матриксы из полимолочной кислоты были получены методом электроспиннинга из 3% раствора полимера PL 38 (PURAC, Нидерланды) в трихлорметане (PANREAC, Испания). Использованные параметры системы: скорость подачи раствора – 2 мл/ч, напряжение – 20 кВ, время спиннинга – 40 минут.

2.2.3 Модификация пленок из полимолочной кислоты в парах иода

Для проведения модифицирования сухую пленку из полимолочной кислоты опускали в 10 мл смеси $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}=3/7$ (об.) или $\text{CHCl}_3:\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2=1/9$ (об.), выдерживали в течение 10 мин. После этого пленку быстро переносили в насыщенные пары иода на 30 секунд, 1, 3, 5, 7, 10, 20 и 30 минут. С целью удаления излишков иода с поверхности образец промывали в этиловом спирте. Затем пленки выдерживали под вакуумом в течение 12 часов для удаления остатков растворителей.

2.2.4 Модификация пленок из полимолочной кислоты в растворах иода

Для проведения модифицирования сухую пленку из полимолочной кислоты опускали в 10 мл смеси $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}=3/7$ (об.) или $\text{CHCl}_3:\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2=1/9$ (об.), выдерживали в течение 10 мин. После этого пленку быстро переносили в насыщенный водно-спиртовой раствор иода ($\text{C}_{\text{I}_2} = 6,5$ мг/мл) на 1, 6, 12 и 24 часа. С целью удаления излишков иода с поверхности образец промывали в

этиловом спирте. Затем пленки выдерживали под вакуумом в течение 12 часов для удаления остатков растворителей.

2.2.5 Методы качественной и количественной оценки

Полученные материалы были изучены методами УФ-спектрофотометрии (Specord 250 Plus (Analytik Jena AG, Германия)), ренгенофлюоресцентного анализа (Рентгено-флюоресцентный спектрометр Quan`X) и световой микроскопии (световой микроскоп Motic DM-111). Механические свойства полученных образцов были изучены на установке Zwick Roell z2.5 (Zwick GmbH & Co. KG, Германия). XRD-спектры образцов были получены с помощью дифрактометра Shimadzu XRD 6000. SEM-изображения поверхности полученных образцов были получены с помощью микроскопа ESEM Quanta 400 FEG.

2.2.6 Исследование антибактериальной активности полученных материалов

Антибактериальную активность материала проверяли согласно ISO 22196:2011 «Измерение антибактериальной активности на поверхности пластмасс и других непористых материалов» [18].

Все среды и растворы были приготовлены в соответствии с ISO 22196:2011. Выращивают жидкие культуры *Escherichia coli*. Готовят суспензию бактерий концентрацией $6 \cdot 10^5$ КОЕ/мл.

Нарезают исследуемый материал на квадраты 5x5 см и покровные пленки 4x4 см из полиэтилена без добавок. Все пленки перед экспериментом протирают этиловым спиртом и высушивают. Исследуемые пленки помещают на дно чашки Петри. Сверху капают 0,4 мл бактериальной суспензии и накрывают покровными пленками. Инкубируют при 37⁰С при постоянной влажности 90% 24 часа. Результаты оценивают сразу после нанесения бактерий (0 часов) и через 24 часа.

Смыв с пленки производят 10 мл питательного бульона. 10-кратные разведения делают в физиологическом растворе. 1 мл из каждого разведения помещают в чашку Петри и заливают 15 мл питательного агара и перемешивают. Переворачивают чашки и инкубируют при 37⁰С в течение 40-48 часов. Подсчитывают количество выросших колоний.

Для каждого образца, определяют количество жизнеспособных бактерий, подсчитанных по формуле (1):

$$N = (100 * C * D * V) / A \quad (1)$$

N – число жизнеспособных бактерий, извлеченных на 1 см^2 с испытуемого образца

C – среднее количество колоний для 2 повторностей

D – коэффициент разбавления

V – объем, мл, питательного бульона добавляемого у образцу

A – площадь поверхности под покровной пленкой, мм.

Для каждого образца, определяют антимикробную активность пленок в соответствии с уравнением (2):

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t \quad (2)$$

R – антибактериальная активность

U_t – среднее значение логарифма числа жизнеспособных бактерий, извлеченных из необработанных образцов после 24 ч инокуляции

U_0 - среднее значение логарифма числа жизнеспособных бактерий, извлеченных из необработанных образцов сразу после инокуляции

A_t - среднее значение логарифма числа жизнеспособных бактерий, извлеченных из обработанных образцов после 24 ч инокуляции

3. Расчеты и аналитика

Выбор и обоснование направления исследования, включающие методы решения задач и их сравнительную оценку, описание выбранной общей методики проведения научно-исследовательской работы, методы исследований, методы расчета, обоснование необходимости проведения экспериментальных работ приведены в разделах 1. Обзор литературы и 2. Объект и методы исследования (см. выше).

4. Результаты проведенного исследования

4.1 Поверхностное модифицирование пленок из полимолочной кислоты

4.1.1 Выбор системы «растворитель/нерастворитель»

Для поверхностной модификации пленок из полимолочной кислоты были использованы две системы «растворитель/нерастворитель»: толуол/этанол (3/7 по объему), предложенная ранее [19], и трихлорметан/этилацетат (1/9 по объему). Данные системы соответствуют следующим условиям:

- Растворитель является неполярным и обладает низкой температурой кипения.
- Нерастворитель является полярным.
- Растворитель и нерастворитель хорошо смешиваются.

4.1.2 Подбор условий проведения модифицирования

Как показано нашей группой, с использованием двух предложенных систем «растворитель/нерастворитель» возможно нанесение иода на поверхность пленок из полимолочной кислоты из паров и из растворов. Подбор условий нанесения осуществляли, основываясь на интенсивности характеристических полос поглощения иода на УФ-спектрах полученных образцов (290 и 470 нм). Пленки из полимолочной кислоты размером 1×2 см погружали в смесь «растворитель/нерастворитель» на 10 минут, а затем помещали в 10 мл насыщенного спиртового раствора иода, или в насыщенные пары иода на 10 минут. Затем полученные образцы промывали этиловым спиртом с целью удаления излишков иода с поверхности. УФ-спектры полученных образцов представлены на рис.4 и 5.

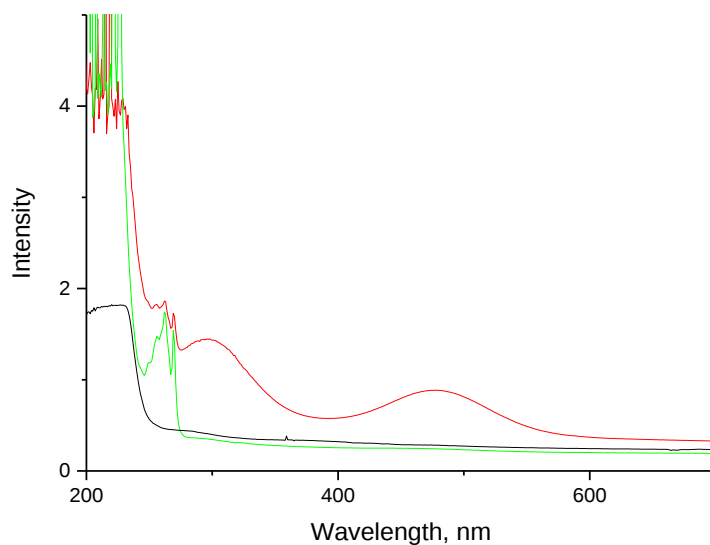


Рисунок 4. УФ-спектры образцов, полученных с использованием смеси толуол/этанол (3/7 по объему), черный спектр – исходная пленка из полимолочной кислоты, зеленый спектр – пленка из полимолочной кислоты с иодом, нанесенным из спиртового раствора, пленка из полимолочной кислоты с иодом, нанесенным из паров.

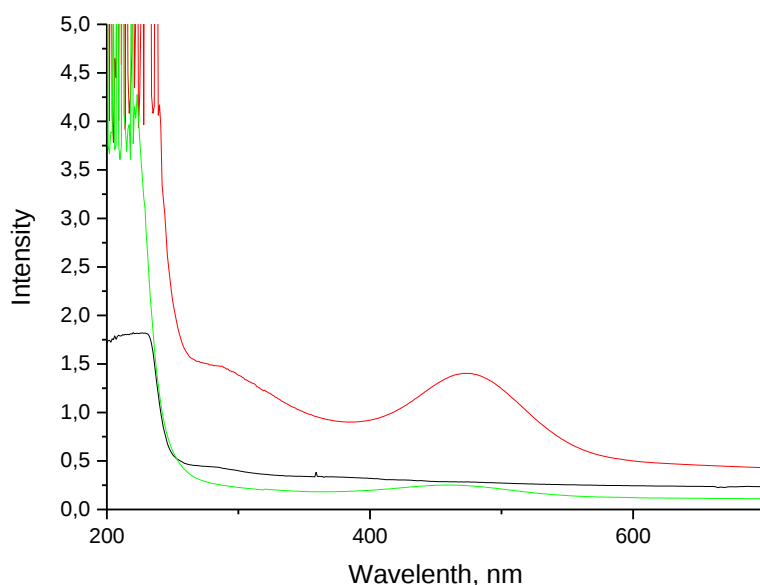


Рисунок 5. УФ-спектры образцов, полученных с использованием смеси трихлорметан/этилацетат (3/7 по объему), черный спектр – исходная пленка из полимолочной кислоты, зеленый спектр – пленка из полимолочной кислоты с иодом, нанесенным из спиртового раствора, пленка из полимолочной кислоты с иодом, нанесенным из паров.

На основании представленных данных можно сделать вывод о том, что обработка пленок из полимолочной кислоты парами иода позволяет нанести на их поверхность большее количество иода за меньший промежуток времени.

Однако было обнаружено, что количество иода, нанесенного из растворов, можно увеличить за счет разбавления спиртового раствора иода дистиллированной водой. Пленки из полимолочной кислоты размером 1×2 см были обработаны смесью толуол/этанол (3/7 по объему), а затем погружены в насыщенные растворы иода в 96% спирте и в водно-спиртовых смесях (соотношение спирта и воды 3/7 и 7/3) на 24 часа. УФ-спектры полученных образцов представлены на рисунке 6:

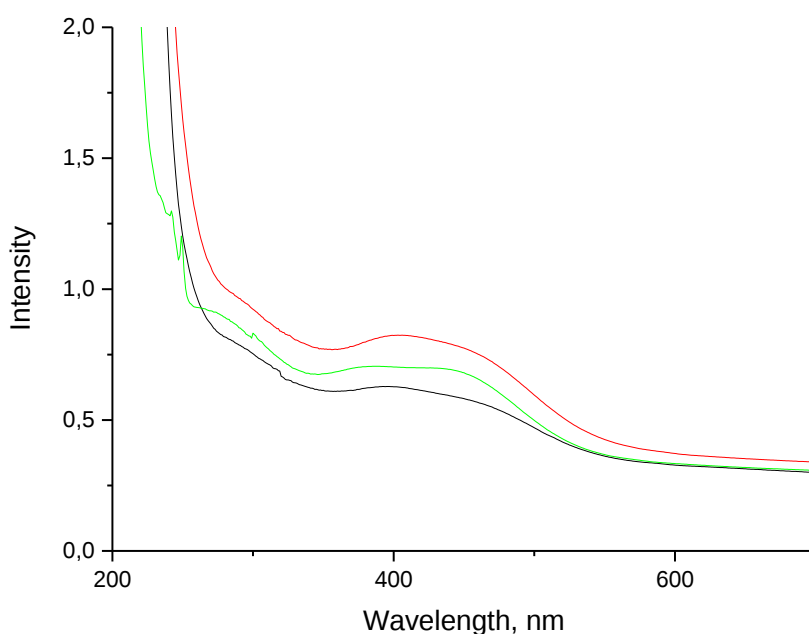


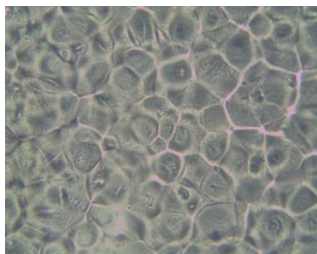
Рисунок 6. УФ-спектры пленок из полимолочной кислоты с иодом, нанесенным из спиртового и водно-спиртовых растворов. Черный спектр – иод нанесен из спиртового раствора, зеленый и красный спектры – иод нанесен из водно-спиртовых растворов (соотношение спирта и воды 7/3 и 3/7 соответственно)

Таким образом, можно сделать вывод о том, что при снижении концентрации спирта на поверхность образца наносится большее количество иода. Это явление можно объяснить частичным вымыванием нанесенного иода в спиртовых растворах.

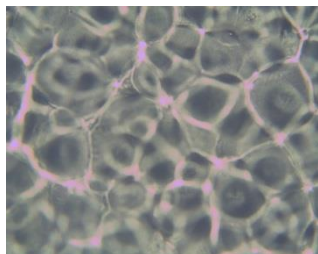
4.1.3 Качественная и количественная оценка результатов модификации пленок из полимолочной кислоты

4.1.3.1 Оптическая микроскопия полученных образцов

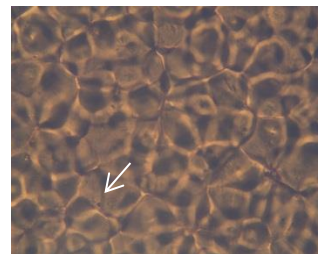
Изображения исходной и модифицированной пленки, полученные с помощью светового микроскопа Motis DM-111, представлены на рисунке 7.



Исходная пленка,
увеличение x40



Пленка, обработанная смесью
растворитель/нерастворитель,
увеличение x40



Пленка с иодом,
нанесенным из
паров, увеличение
x40

Рисунок 7. Изображение поверхности исходной и модифицированной пленок

При обработке смесью «растворитель/нерастворитель» отмечено изменение морфологии поверхности пленки, связанное с набуханием полимера. После выдерживания пленки в парах, или растворе иода она приобретает бурый цвет, что вызвано поглощением иода из внешней среды. На поверхности пленок, модифицированных в парах, можно наблюдать кристаллы иода.

4.1.3.2 Исследование стабильности полученного слоя, содержащего иод, в различных средах.

С целью изучения стабильности полученного покрытия образцы пленок с иодом, нанесенным на поверхность, были помещены в пять сред: атмосфера воздуха, вакуум, дистиллированная вода, физиологический раствор и фосфатный буфер. Выводы о стабильности иодсодержащего слоя полимера были сделаны по уменьшению интенсивности характеристических пиков иода на УФ-спектрах образцов. Спектры образцов снимали через 1, 2, 3, 5 и 7 дней после начала эксперимента. Результаты представлены на рисунках 8 и 9.

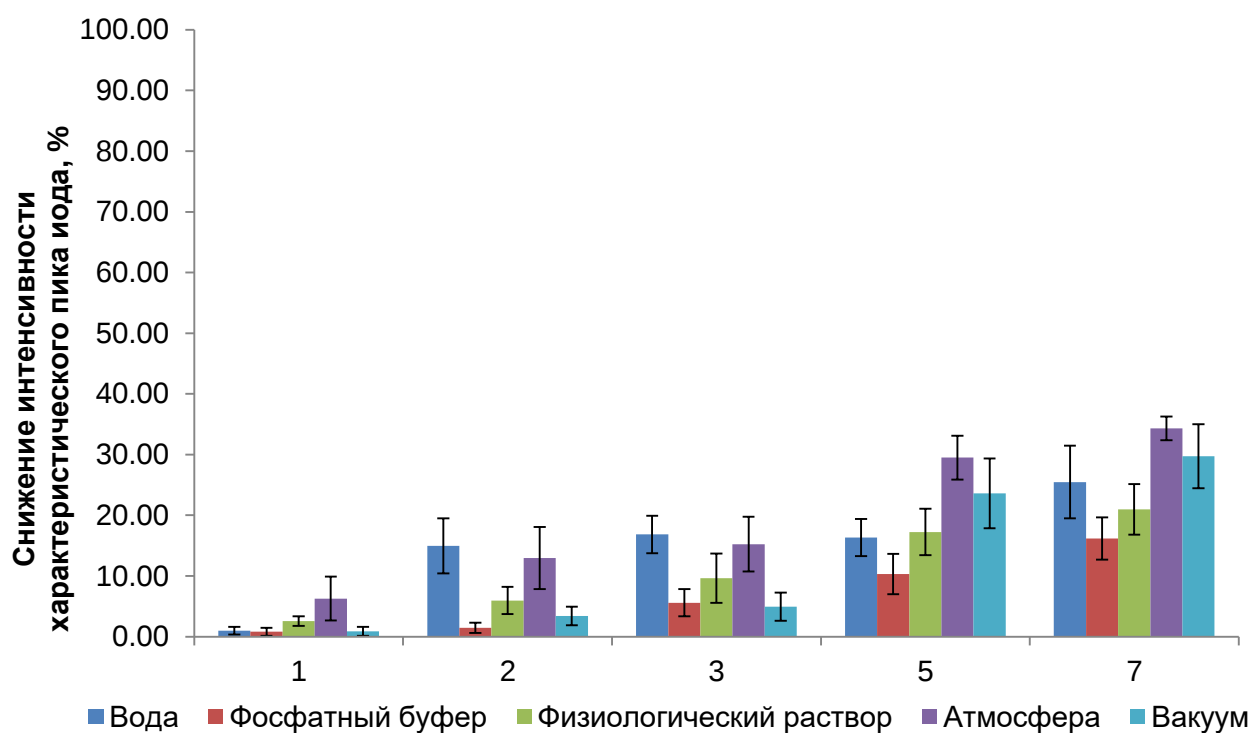


Рисунок 8. Исследование стабильности слоя иода, нанесенного из раствора

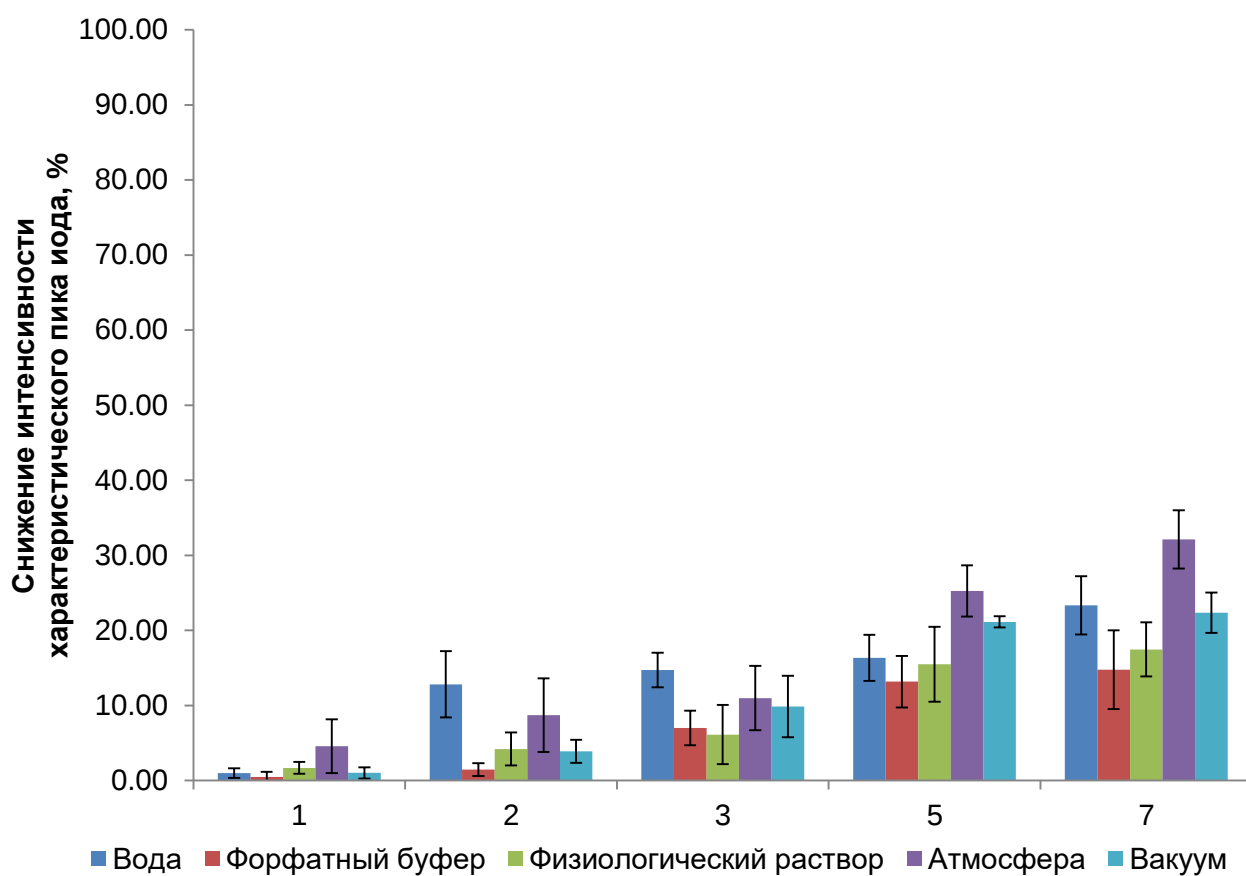


Рисунок 9. Исследование стабильности слоя иода, нанесенного из паров

Согласно полученным данным, полученные материалы наиболее стабильны в физиологическом растворе и фосфатном буфере, что позволяет сделать предположение о возможности их хранения в данных средах.

4.1.3.3 Механические свойства полученных материалов

Влияние предложенного метода нанесения иода на поверхность пленок из полимолочной кислоты на механические свойства полимера было исследовано на установке Zwick Roell z2.5 (Zwick GmbH & Co. KG, Германия). Результаты исследования представлены в таблице 2:

Таблица 2 – Механические свойства полученных образцов

	Модуль эластичности, МПа	Прочность на разрыв, МПа	Относительное удлинение, %
Пленка из ПМК	2382,5	63,11	146,5
Пленка из ПМК, обработанная смесью «растворитель/нерастворитель» составом толуол/этанол (3/7 по объему) в течение 10 минут	1281,8	53,25	164,3
Пленка из ПМК, обработанная смесью «растворитель/нерастворитель» составом толуол/этанол (3/7 по объему) в течение 10 минут с иодом, нанесенным из насыщенного водно- спиртового раствора ($C_{I_2} =$ 6,5 мг/мл) в течение 48 ч (концентрация иода на поверхности 0.03 ± 0.008 г/см ²)	1554	47,81	136,3
Пленка из ПМК, обработанная смесью «растворитель/нерастворитель» составом толуол/этанол (3/7 по объему) в течение 10 минут с	2426	40,84	114,3

иодом, нанесенным из паров иода в течение 7 минут (концентрация иода на поверхности 0.04 ± 0.0083 г/см ²)			
--	--	--	--

При обработке полимера смесью «растворитель/нерастворитель» выбранного состава наблюдается увеличение относительного удлинения. Также, согласно полученным данным, нанесение иода из растворов ведет к менее значительным изменениям прочности на разрыв и относительного удлинения. В свою очередь, при нанесении иода из паров отмечено несущественное изменение модуля эластичности.

4.1.3.4 Исследование динамики нанесения иода на поверхность пленок из полимолочной кислоты из паров и растворов

Для изучения динамики нанесения иода из паров и растворов пленки из полимолочной кислоты были обработаны смесью толуол/этанол (3/7 по объему), или трихлорметан/этилацетат (1/9 по объему), и помещены в насыщенный водно-спиртовой раствор иода ($C_{I_2} = 6,5$ мг/мл) на 6, 12, 24 и 48 часов, или в пары иода на 30 секунда, 1, 3, 5, 7, 10, 20 и 30 минут. Качественная оценка количества поглощенного иода была проведена методом УФ-спектрофотометрии.

Для определения концентрации иода на поверхности пленок, его десорбировали 2 мл спирта в течение суток, концентрацию иода в полученном спиртовом растворе вычисляли по калибровочным графикам.

С целью построения калибровочных графиков были приготовлены спиртовые растворы иода с концентрацией 0,00008 г/мл, 0,00006 г/мл, 0,00005 г/мл и 0,00003 г/мл. Интенсивность характеристических пиков поглощения иода на УФ-спектрах приготовленных растворов и ее зависимости от концентрации представлены на рисунке 10.

Концентрация	Длина волны 290 нм	Длина волны 360 нм	Длина волны 440 нм
--------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

3E-05	0.7453	0.4373	0.2173
5E-05	1.0191	0.5873	0.2979
6E-05	1.1458	0.6376	0.3347
8E-05	1.3534	0.7716	0.4156

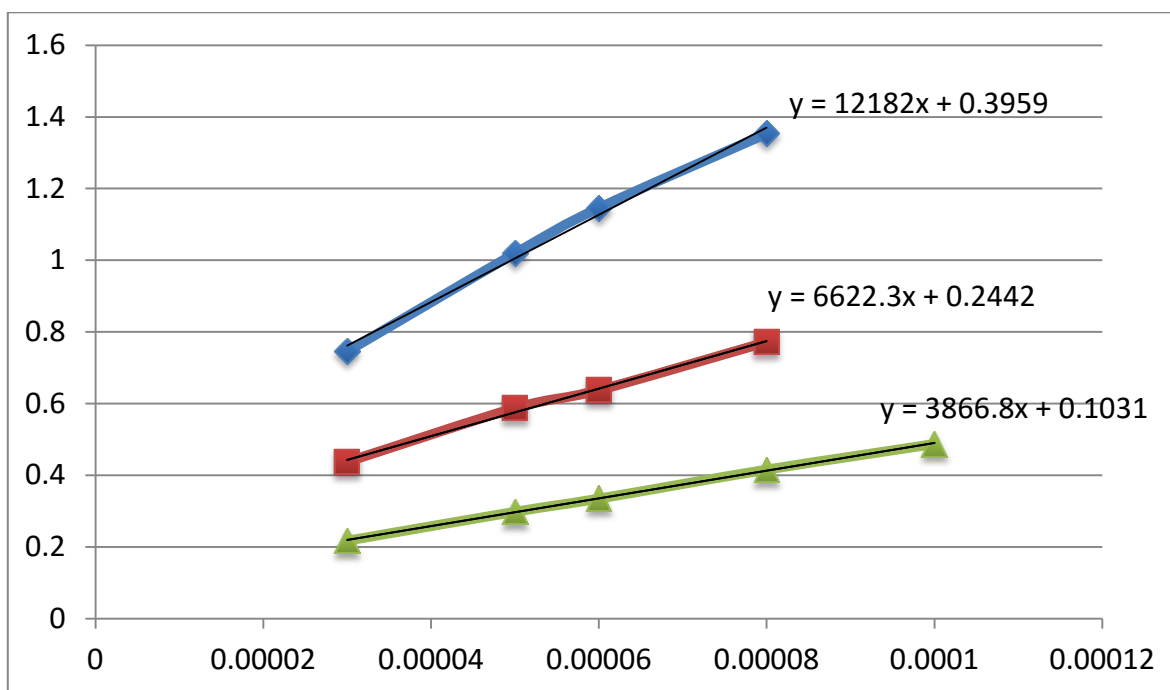


Рисунок 10. Интенсивность поглощения калибровочных растворов иода и ее зависимость от концентрации

Факт полной десорбции иода с поверхности образца после 24 часов выдерживания в спирте был подтвержден методом РФЛА:

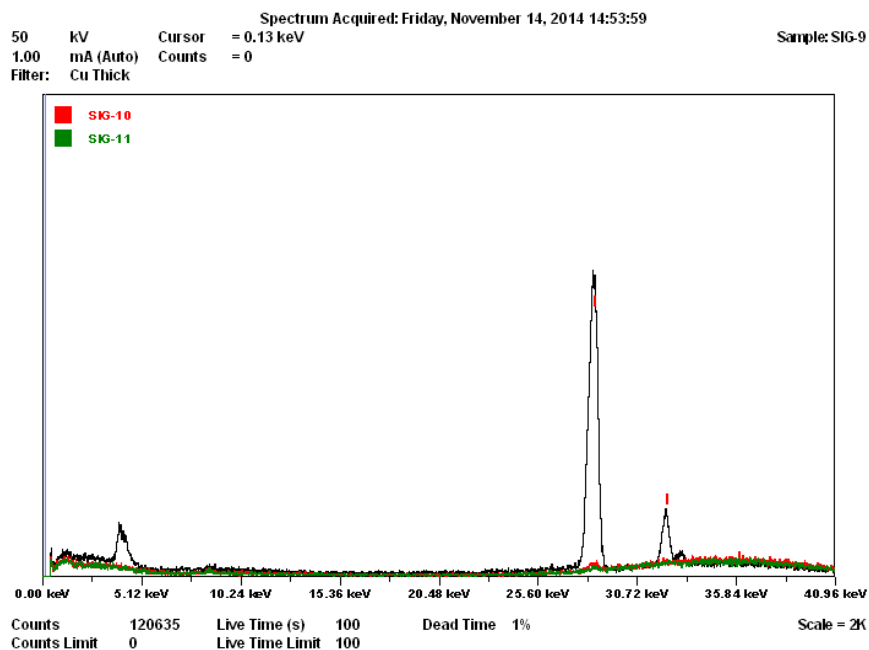


Рисунок 11. РФЛА-спектры полученных образцов:

Красный спектр – исходная пленка из полимолочной кислоты, черный спектр – пленка из полимолочной кислоты с иодом, нанесенным из паров, зеленый спектр – спектр пленки, обработанной в парах иода после выдерживания в этаноле в течение суток

На полученных спектрах наблюдаются три пика, соответствующие атомам иода, на 3, 27,1 и 32 кэВ. После выдерживания образца в этиловом спирте в течение 24 часов окраска пленок, свидетельствующая о наличии иода в поверхностном слое, пропадает и снова становятся прозрачными, а на спектрах РФЛА пиков иода не наблюдается, что свидетельствует о полной десорбции иода из образца.

Зависимости количества иода, нанесенного на образец с использованием каждой из систем растворителей, продемонстрированы на рисунках 12-15:

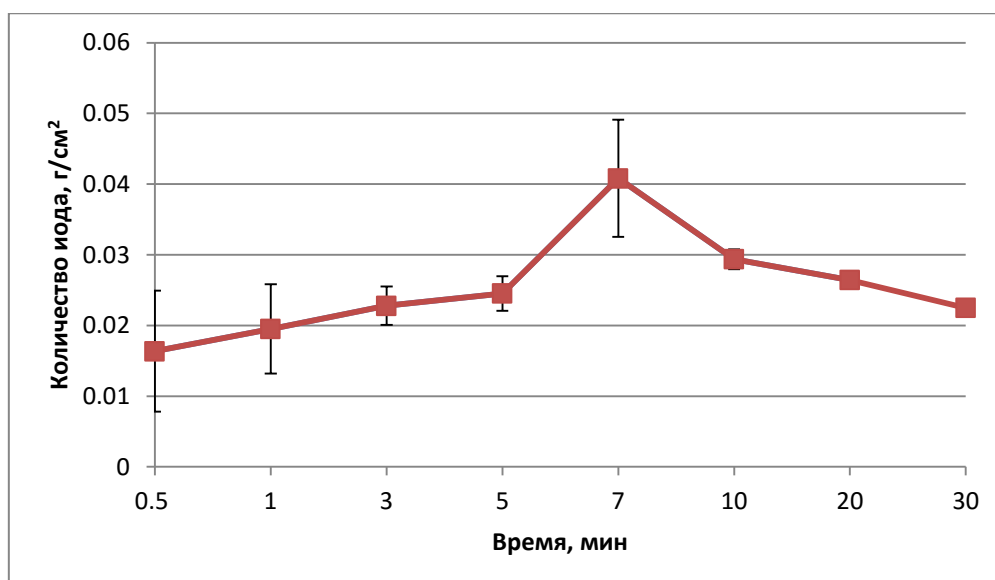


Рисунок 12. Зависимость количества иода, нанесенного на поверхность образца из паров, с использованием системы толуол/этанол (3/7 по объему), от времени нанесения

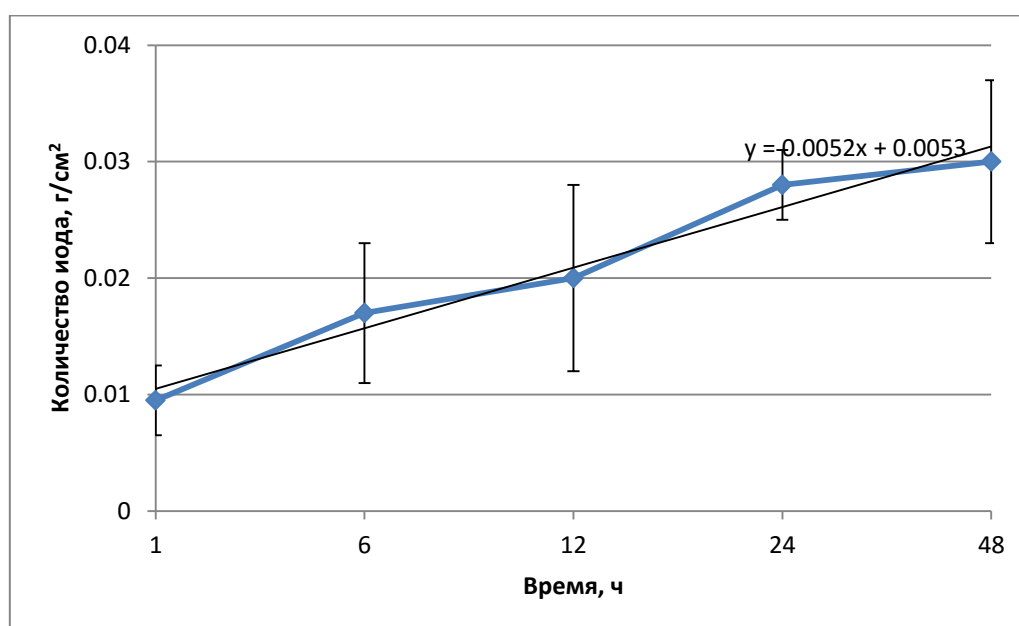


Рисунок 13. Зависимость количества иода, нанесенного на поверхность образца из насыщенного водно-спиртового раствора ($C_{I_2} = 6,5$ мг/мл), с использованием системы толуол/этанол (3/7 по объему), от времени нанесения

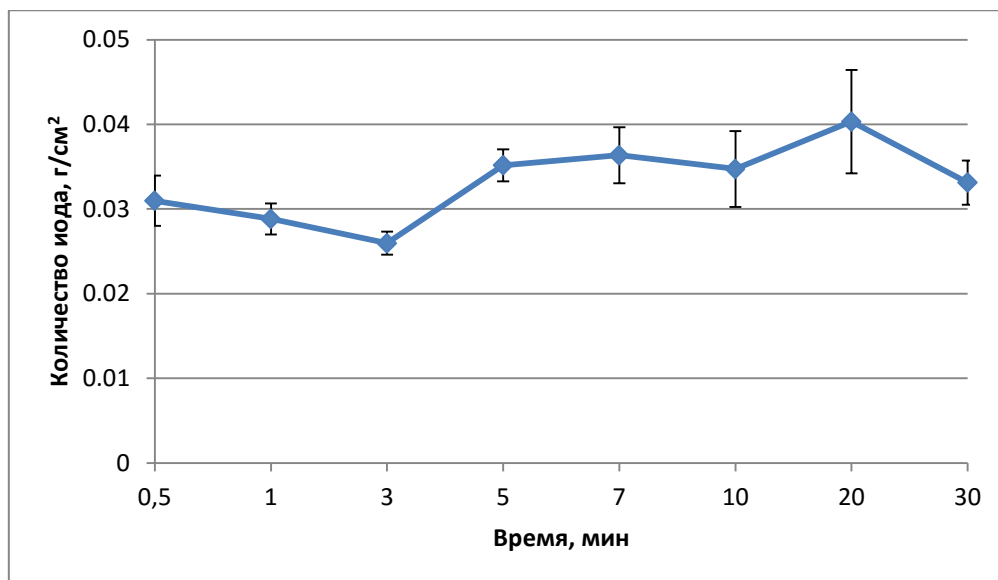


Рисунок 14. Зависимость количества иода, нанесенного на поверхность образца из паров, с использованием системы трихлорметан/этилацетат (1/9 по объему), от времени нанесения

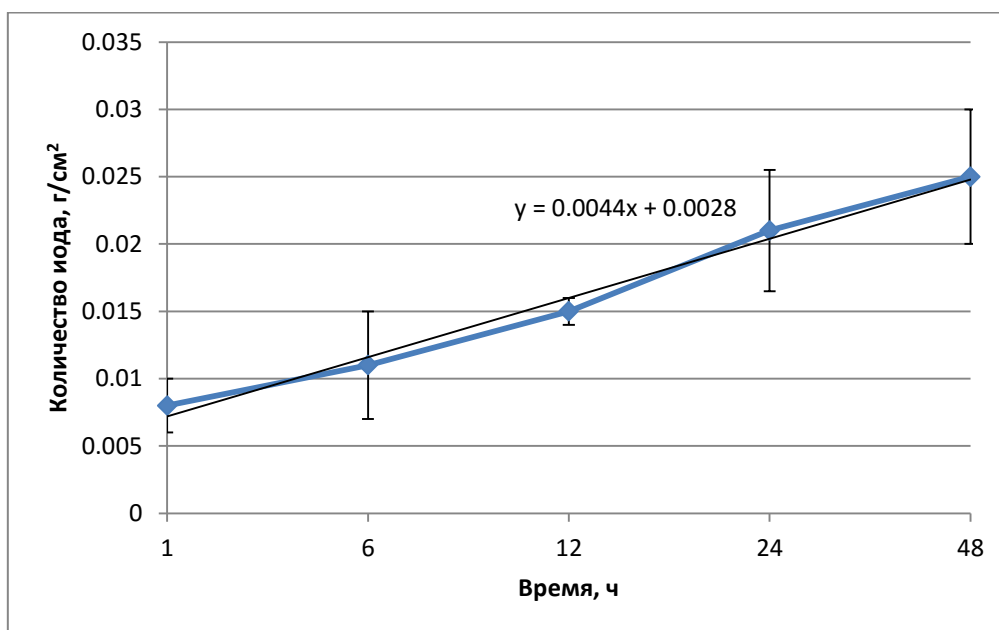


Рисунок 15. Зависимость количества иода, нанесенного на поверхность образца из насыщенного водно-спиртового раствора ($C_{I_2} = 6,5$ мг/мл), с использованием системы трихлорметан/этилацетат (1/9 по объему), от времени нанесения

Таким образом, с помощью подобранных режимов возможно нанесение примерно до 0,04 г иода на сантиметр поверхности образца. Однако

использование системы толуол/этанол (3/7 по объему) позволяет достичь этой концентрации за меньший промежуток времени.

4.1.3.5 Антибактериальные свойства полученных материалов

По результатам количественного анализа, наибольшее количество иода на поверхность пленок из полимолочной кислоты было нанесено при обработке полимера смесью толуола и этанола в соотношении 3 к 7 с последующим выдерживанием в парах иода в течение 7 минут. Так как именно иод является агентом, проявляющим антибактериальные свойства, была проверена антибактериальная активность материала, содержащего наибольшее количество иода на поверхности. Результаты измерения антибактериальной активности полученного материала представлены в табл. 1:

Таблица 3 - Число жизнеспособных бактерий после 24 ч инкубации на полимерных пленках с антимикробными добавками

№ п/п	Образец	Число жизнеспособных бактерий (N), извлеченных на 1 см ² , КОЕ/см ²	
		0 часов	24 часов
1	Пленка из полимолочной кислоты (контроль)	$2,0 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$
2	Пленка из полимолочной кислоты, обработанная смесью толуол/этанол (3/7 по объему) с иодом, нанесенным на поверхность из паров в течение 7 минут (концентрация иода на поверхности 0.04 ± 0.0083 г/см ²)	$2,0 \cdot 10^5$	5

В соответствии с формулой (2) рассчитали антибактериальную активность полученного материала:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t = 3,85$$

Согласно полученным данным, полученные материалы на основе полимолочной кислоты проявляют антибактериальную активность.

4.2 Нанесение иода на поверхность матриц из полимолочной кислоты

Следующим этапом работы стало апробирование метода «растворитель/нерастворитель», реализованного для тонких пленок из полимолочной кислоты, на трехмерных структурах, а именно – на матрицах, полученных методом электроспиннинга.

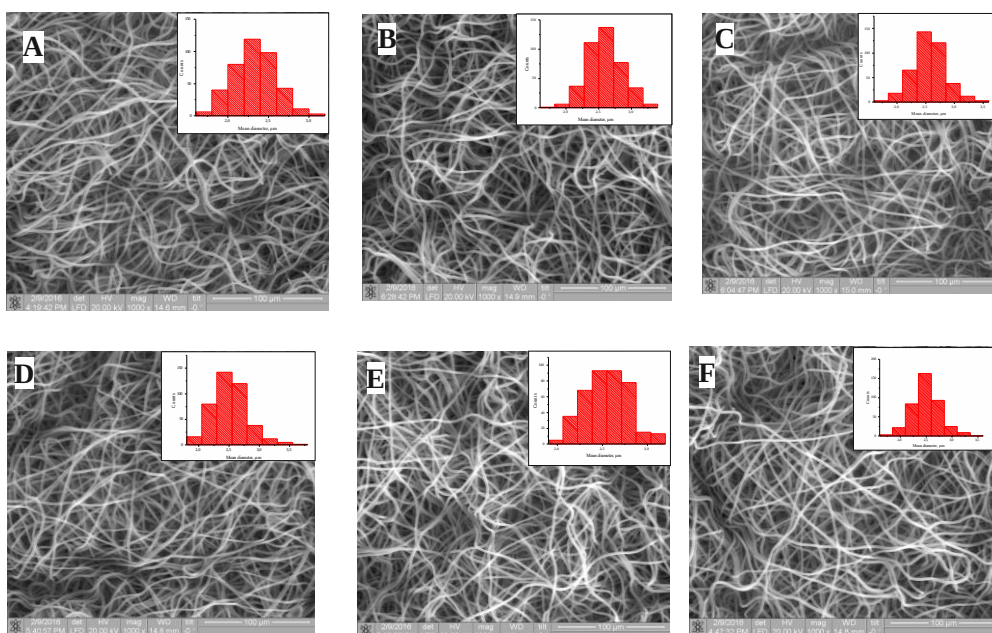
Первым этапом работы стал подбор смеси растворителей, не влияющей на морфологию и кристаллическую структуру матрикса.

4.2.1 Подбор системы «растворитель/нерастворитель»

4.2.1.3 Влияние обработки смесью

«растворитель/нерастворитель» на морфологию матриц из полимолочной кислоты

Для оценки влияния обработки матриц смесью «растворитель/нерастворитель» на их морфологию, применяли метод сканирующей электронной микроскопии (SEM). Для этого, образцы площадью 2×2 см обрабатывали в течение 10 минут смесями толуола и этанола в различных соотношениях (0,5/9,5; 0,6/9,4; 0,7/9,3; 0,8/9,2; 0,9/9,1 и 1/9 по объему). Результаты исследования приведены на рисунке 16.



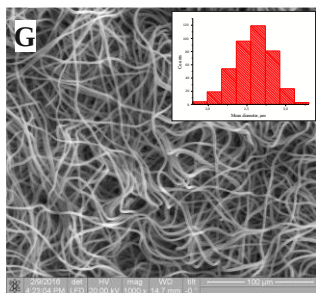


Рисунок 16. SEM изображения полученных образцов:

А – исходный матрикс из полимолочной кислоты; В – матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,5/9,5; С - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,6/9,4; D - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,7/9,3; Е - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,8/9,2; F - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,9/9,1; G - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 1/9)

По результатам сканирующей электронной микроскопии, полученные матриксы демонстрируют одномодальное распределение среднего диаметра волокон. Существенных изменений в структуре волокон (склеек, или разрывов) не обнаружено. Таким образом, для последующего модифицирования была выбрана смесь «растворитель/нерастворитель» состава толуол/этанол=1/9 (по объему), так как она содержит большее количество растворителя, а значит более активный желатинизированный слой полимера.

Влияние обработки смесью «растворитель/нерастворитель» на кристаллическую структуру матриксов из полимолочной кислоты

С целью изучения кристаллической структуры полученных материалов применяли метод дифракции рентгеновских лучей (XRD). XRD-спектры образцов приведены на рисунке 17.

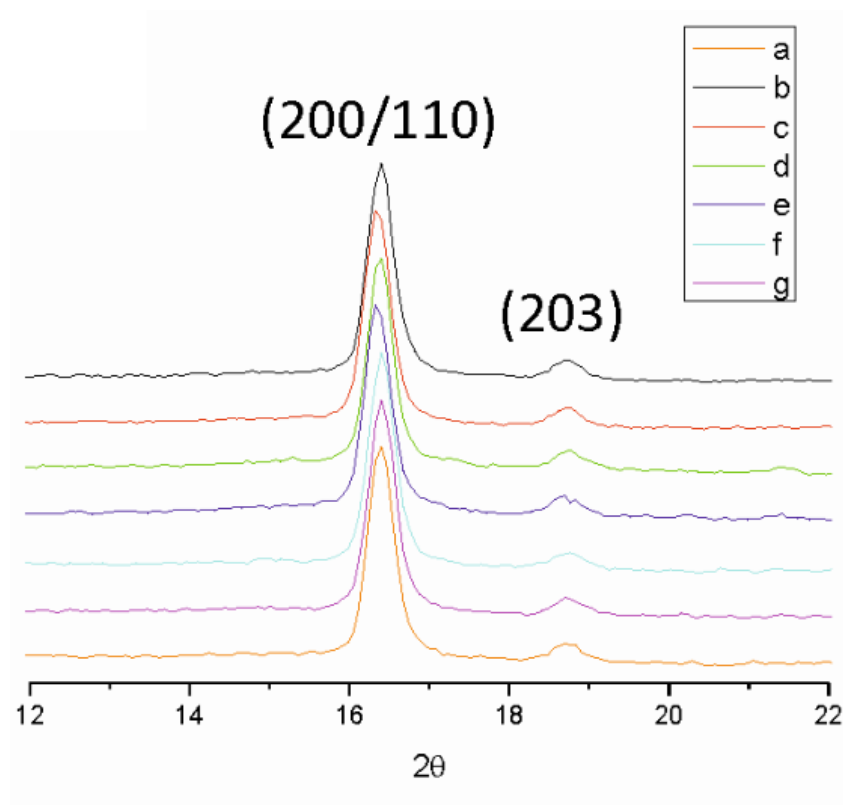


Рисунок 17. XRD-спектры полученных образцов:

А – исходный матрикс из полимолочной кислоты; В – матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,5/9,5; С - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,6/9,4; D - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,7/9,3; Е - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,8/9,2; F - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,9/9,1; G - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 1/9)

На XRD-спектрах полученных материалов не наблюдается появления новых рефлексов, что позволяет судить о том, что кристалличность материала осталась прежней и образования новых фаз не произошло. По уравнению Дебая-Шеррера (3) были посчитаны средние размеры кристаллов полимера. Результаты расчета представлены в таблице 3.

$$l_c = \frac{k\lambda}{\cos\theta\sqrt{\beta^2 - \beta_r^2}} \quad (3)$$

λ – длина волны, β – ширина пика на полувысоте, β_r – уширение пика аппаратом, θ – угол дифракции, $k=0,9$.

Таблица 4 – Средние размеры кристаллов полимолочной кислоты

Образец	Средний размер кристалла, нм
A	21,61±0,38
B	21,05±0,32
C	21,05±0,31
D	21,24±0,55
E	21,61±0,33
F	20,69±0,53
G	21,07±0,83

, где A – исходный матрикс из полимолочной кислоты; B – матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,5/9,5; C - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,6/9,4; D - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,7/9,3; E - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,8/9,2; F - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 0,9/9,1; G - матрикс из полимолочной кислоты, обработанный смесью толуол/этанол в соотношении 1/9)

Таким образом, при обработке матриксов из полимолочной кислоты смесями толуола и этанола в выбранных соотношениях кристаллическая структура полимера не изменяется. По результатам анализа, с целью дальнейшего модифицирования так же была выбрана система толуол/этанол=1/9 (по объему).

Исследование динамики нанесения иода на поверхность матриксов из полимолочной кислоты из паров и растворов

С целью изучения динамики нанесения иода на поверхность матриксов из полимолочной кислоты образцы материала размером 2×2 см и массой 0,0123 г, предварительно обработанные смесью толуол/этанол=1/9 (по объему) помещали в пары иода на 0,5; 1; 3; 7 и 10 минут или в насыщенный водно-спиртовой раствор иода ($C_{I_2} = 6,5$ мг/мл) на 1; 6; 24 и 48 часов при

температуре 40 °С, промывали этиловым спиртом для удаления излишков иода в течение 5 секунд и растворяли в 2 мл дихлорметана.

Количество иода в матриксе определяли методом УФ-спектрофотометрии. С этой целью были сняты УФ-спектры и построен калибровочный график растворов иода в дихлорметане концентрациями 0,0005%, 0,001%, 0,002%, 0,003% и 0,004% (рис. 18):

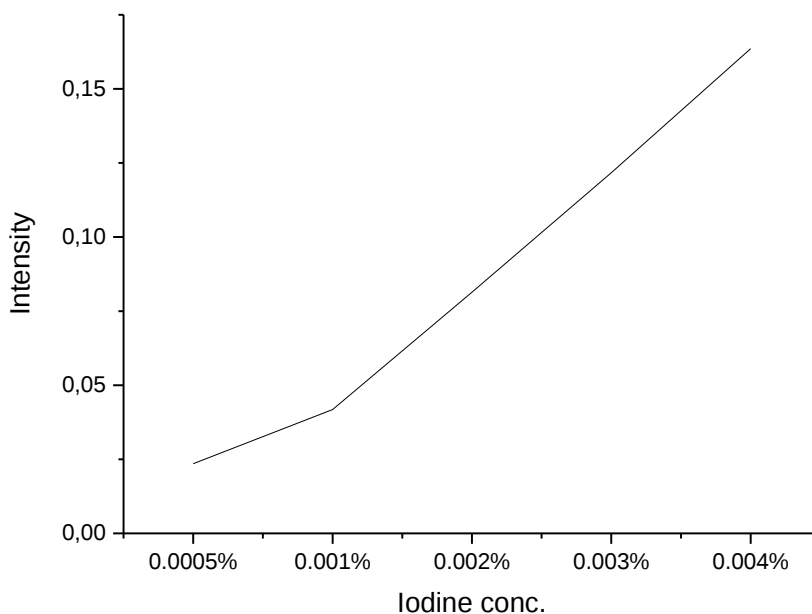
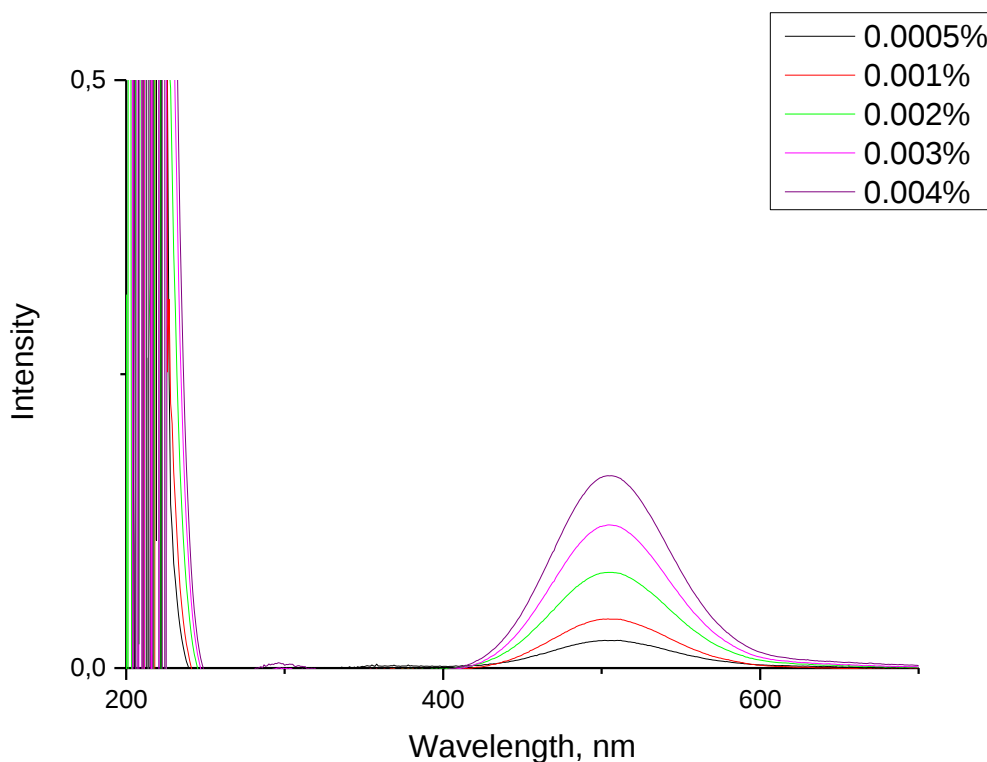


Рисунок 18. УФ-спектры и калибровочный график для растворов иода в дихлорметане (максимум поглощения на длине волны 500 нм)

Однако, при добавлении в калибровочные растворы образцов матриксов наблюдался гипсохромный сдвиг и максимум поглощения переместился на длину волны 360 нм (рис. 19):

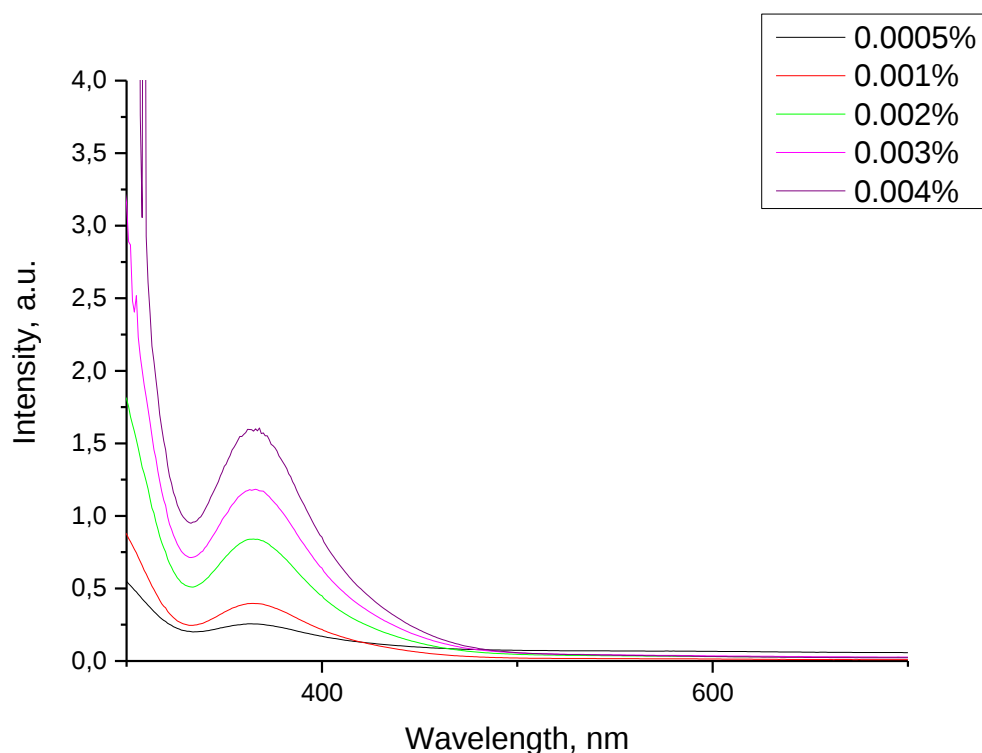


Рисунок 19. УФ-спектры растворов полимолочной кислоты PL 38 в дихлорметане с различными концентрациями иода

При более высоких концентрациях иода подобный эффект не наблюдался (рис. 20)

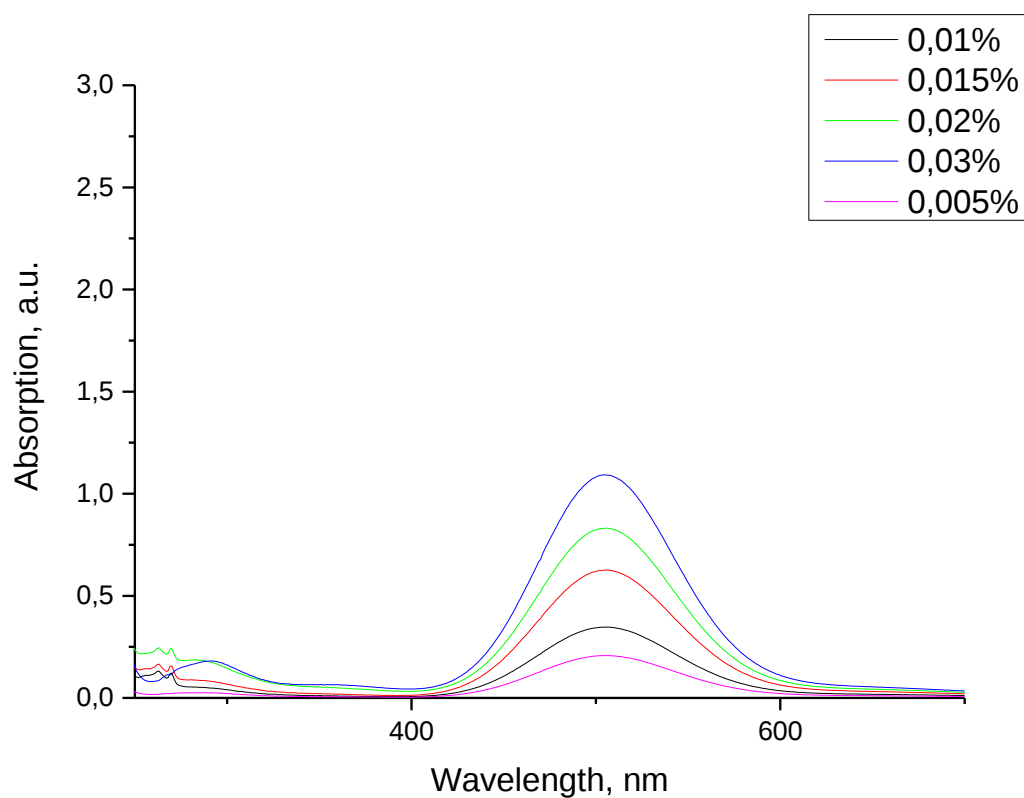


Рисунок 20. УФ-спектры растворов полимолочной кислоты PL 38 в дихлорметане с различными концентрациями иода

Исходя из полученных данных, было построено два калибровочных графика для растворов иода и полимолочной кислоты в дихлорметане, поглощающих на разных длинах волн (рис. 21 и 22).

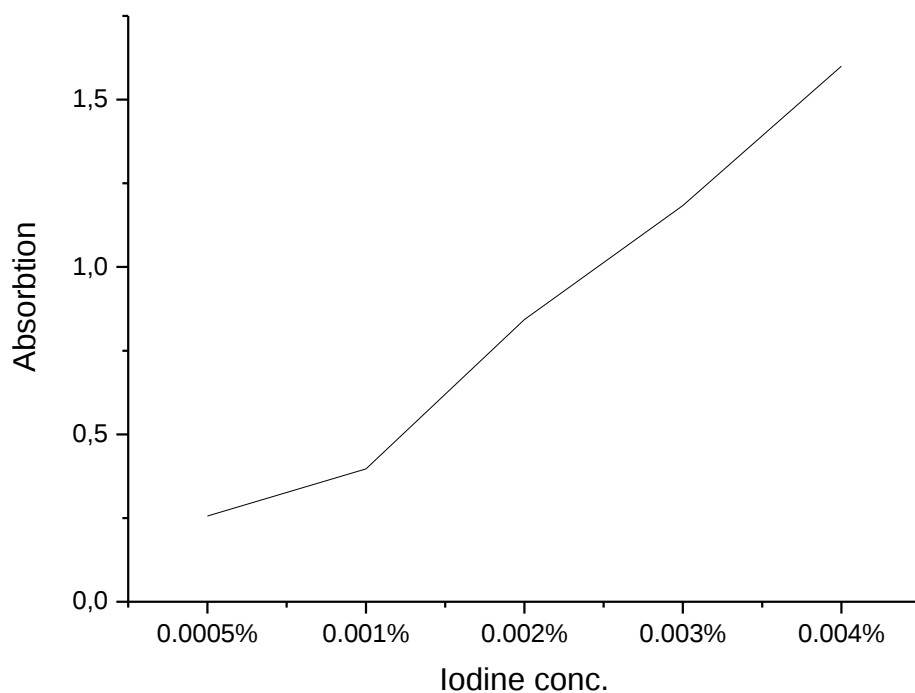


Рисунок 21. Калибровочный график для растворов иода и полимолочной кислоты, поглощающих на длине волны 360 нм

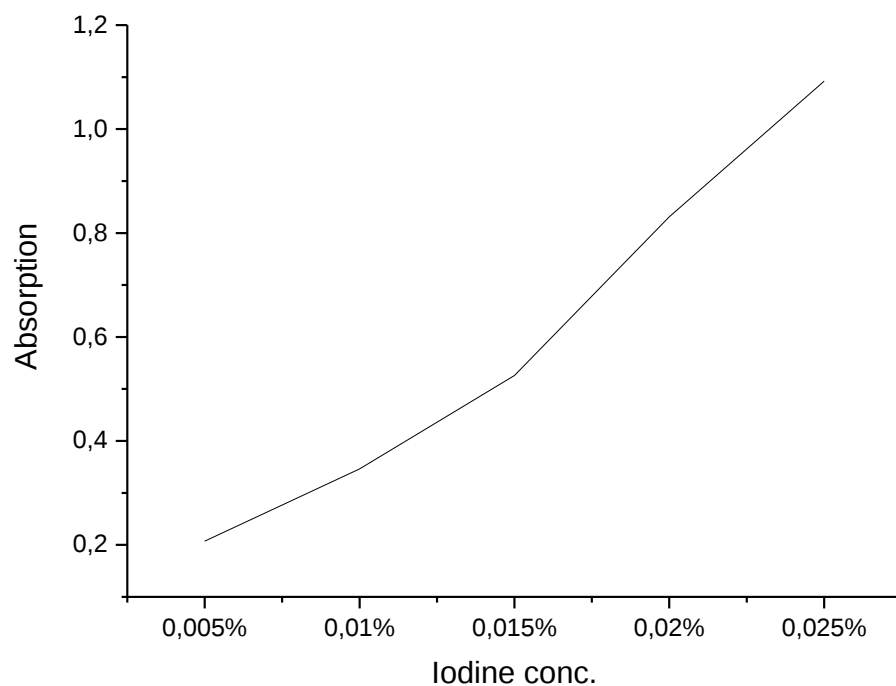


Рисунок 22. Калибровочный график для растворов иода и полимолочной кислоты, поглощающих на длине волны 500 нм

Графики зависимости количества иода, нанесенного из паров и растворов, представлены на рис. 23 и 24:

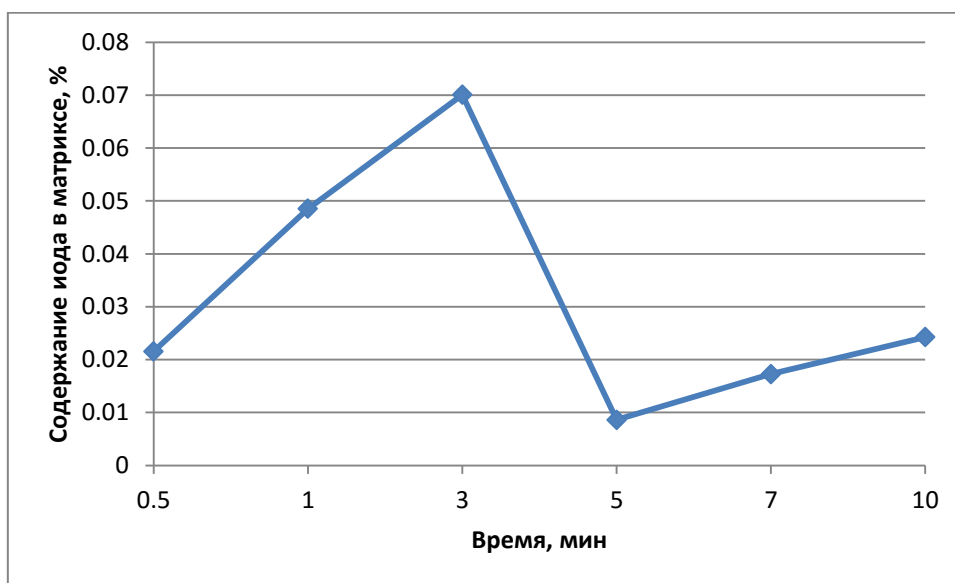


Рисунок 23. Зависимость количества иода, нанесенного из паров на поверхность матрикса из полимолочной кислоты, от времени нанесения

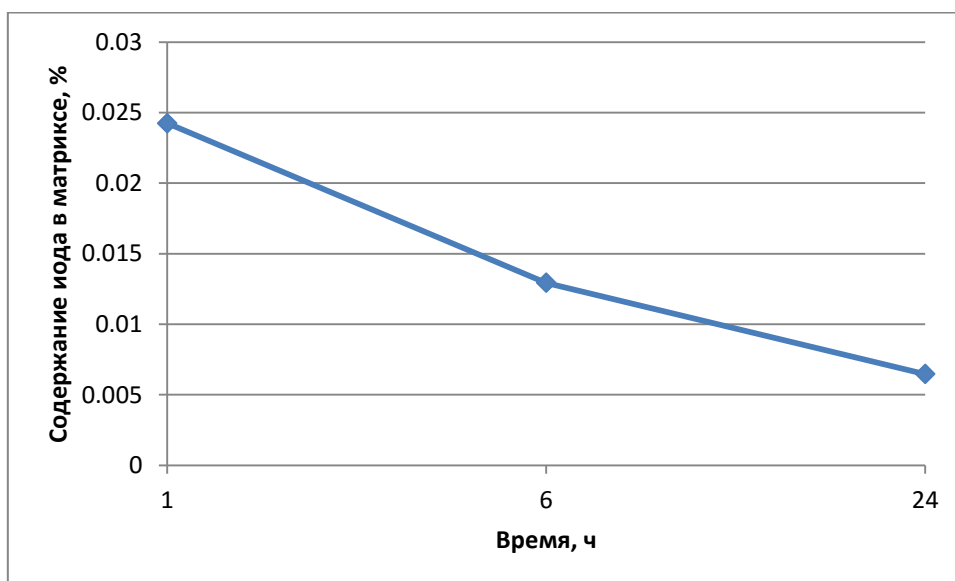


Рисунок 24. Зависимость количества иода, нанесенного из водно-спиртового раствора иода ($C_{I_2} = 6,5$ мг/мл) на поверхность матрикса из полимолочной кислоты, от времени нанесения

Таким образом, при нанесении иода на поверхность матрикса из паров при температуре 40°C максимальная концентрация иода в матриксе составляет 0.07% и достигается за три минуты обработки. При нанесении же из растворов наблюдается спад концентрации иода в матриксе с первого часа обработки.

4.2.2 Антибактериальные свойства полученных материалов

Для проверки антибактериальной активности были выбраны матриксы из полимолочной кислоты с иодом, нанесенным из паров. Как было показано выше, при температуре 40 °С наибольшая концентрация иода в матриксе достигается при трех минутах обработки парами иода. Поэтому была проведена проверка антибактериальной активности образцов матриксов, обработанных парами иода в течение 30 секунд, а так же 1 и 3 минут (концентрации иода 0,02%, 0,05% и 0,07% соответственно).

Для проверки антибактериальной активности готовили суспензию *E. coli* концентрацией $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Образец материала размером 1×1 см погрузили в 1 мл приготовленной суспензии. Спустя 24 часа культивирования, 0,1 мл выдержанной бактериальной суспензии поместили в чашки Петри на мясо-пептонный агар. Спустя 24 часа культивирования производили подсчет выросших колоний. Результаты эксперимента представлены на рис. 25:

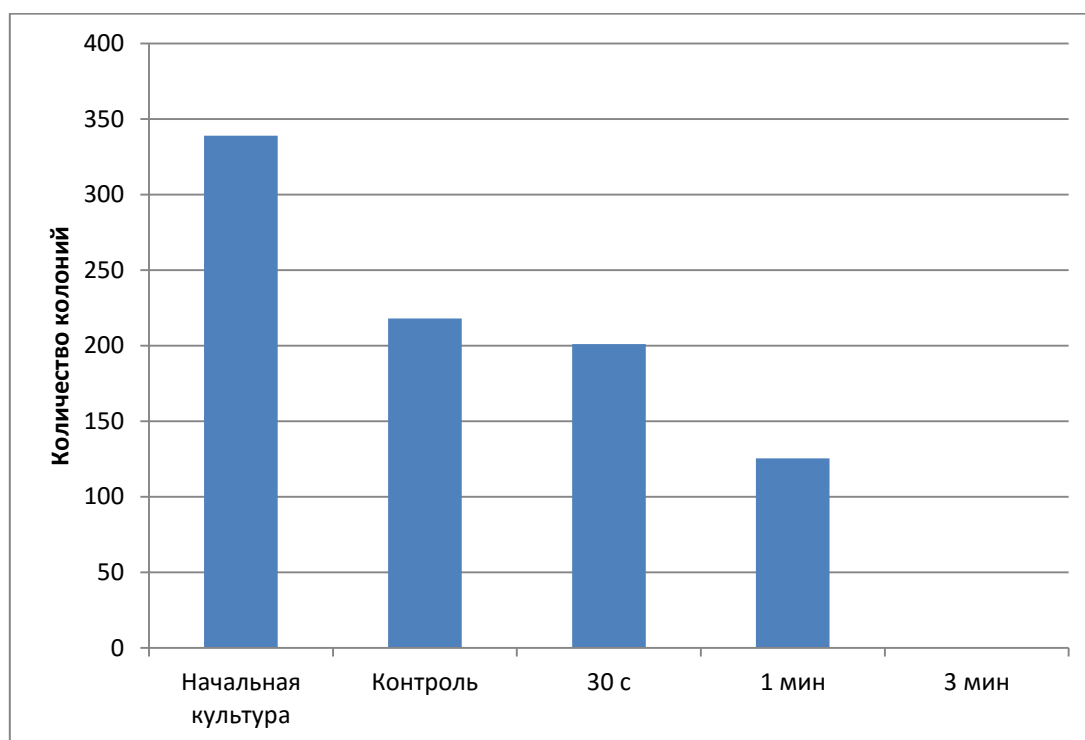


Рисунок 25. Количество колоний, выросших в присутствии материалов с различным содержанием иода

По представленным данным видно, что полученный материал проявляет антибактериальную активность по отношению к *E. coli*. Стоит отметить, что антимикробные свойства проявлял и контрольный образец (матрикс из полимолочной кислоты без нанесенного иода), однако это возможно объяснить несоблюдением условий хранения образцов, а именно – контрольный образец и образцы с нанесенным иодом хранились вместе.

Список публикаций студента

1. Goreninsky S. I. , Stankevich K. S. , Efimova E. V. , Danilenko N. V. , Tverdokhlebov S. I. , Filimonov V. D. New preparation method of PLA-based biomaterials containing molecular iodine layer on their surface // Recent advances on Mathematical Models for Engineering Science : Proceedings of the 12th International Conference on Mathematical Biology and Ecology, East Lansing, September 20-22, 2015. - Greece: WSEAS Press, 2015 - p. 25-30;
2. Efimova E. V. , Stankevich K. S. , Goreninsky S. I. , Danilenko N. V. , Surgutskaya N. S. , Bolbasov E. N. , Akhmedov S. D. , Tverdokhlebov S. I. Investigation of the temperature treatment influence on the composite material made of polylactic acid and magnetic nanoparticles // International Conference on Nanoscience, Nanotechnology and Advanced Materials: Abstracts, Rushikobda, December 14-17, 2015. - Rushikobda: Gitam University, 2015 - p. 69;
3. Goreninsky S. I. , Stankevich K. S. , Efimova E. V. , Danilenko N. V. , Surgutskaya N. S. , Trusova M. E. , Bolbasov E. N. , Tverdokhlebov S. I. , Akhmedov S. D. Development of coronary stents coated with magnetic nanoparticles for atherosclerosis treatment // International Conference on Nanoscience, Nanotechnology and Advanced Materials: Abstracts, Rushikobda, December 14-17, 2015. - Rushikobda: Gitam University, 2015 - p. 133;
4. Filimonov V. D. , Stankevich K. S. , Goreninsky S. I. , Danilenko N. V. , Tverdokhlebov S. I. Novel Multilayer Functional Hybrid Biomaterials on the Base of Polylactic Acid // 3rd International Conference on Chemical Technology: Book of Abstracts, Mikulov, April 13-15, 2015. - Prague: CSIC, 2015 - p. 49;
5. Горенинский С. И. , Станкевич К. С. , Филимонов В. Д. , Твердохлебов С. И. Биоразлагаемые иодосодержащие материалы на основе полимолочной кислоты // Материалы и технологии XXI века: сборник тезисов всероссийской школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Казань, 11-12 Декабря 2014. - Казань: КФУ, 2014 - С. 27;
6. Горенинский С. И. , Станкевич К. С. Иодсодержащие материалы на основе полимолочной кислоты // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, посвященной 115-летию со дня рождения профессора Л.П. Кулёва: в 2 т., Томск, 25-29 Мая 2015. - Томск: ТПУ, 2015 - Т. 2 - С. 265-267;

7. Заявка на патент РФ «Способ нанесения иода и его соединений на поверхность изделий из полимолочной кислоты», № 2015154344.

Список используемых источников

1. Bioabsorbable Implants: Review of Clinical Experience in Orthopedic Surgery / Ambrose C.G., Clanton T.O. // *Annals of Biomedical Engineering Society* – 2004. – Vol. 32, №1. – P. 171-177.
2. Factorial design optimization and characterization of poly-lactic acid (PLA) nanoparticle formation for the delivery of grape extracts / Fernández K., Aburto J., Von Plessing C., Rockel M., Aspé E // *Food Chemistry* – 2016. – Vol. 207. – P. 75-85.
3. Application of Polyglycolic Acid Sheets and Fibrin Glue Spray to Bone Surfaces During Oral Surgery: A Case Series / Rokutanda S., Yanamoto S, Yamada S., Naruse T, Inokuchi S., Umeda M. // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* – 2015. – Vol. 73, №5. – P. 1017.
4. Bioactive PCL matrices with a range of structural & rheological properties / Douglas P., Kuhs M., Sajjia M., Khraisheh M., Walker G., Collins M.N., Albadarin A.B. // *Reactive and Functional Polymers.* - 2016. – Vol. 101. – P. 54-62.
5. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application / Tian H., Tang Z., Zhuang X., Chen X., Jing X. // *Progress in Polymer Science.* – 2012. – Vol. 37. – P. 237–280.
6. Synthesis and degradability of copolyesters of 2, 5-furandicarboxylic acid, lactic acid, and ethylene glycol / Wu H., Wen B., Zhou H., Zhou J., Yu Z., Cui L., Huang T., Cao F. // *Polymer Degradation and Stability.* – 2015. – Vol. 121. – P. 100-104.
7. Iodine-modified nanocrystalline titania for photo-catalytic antibacterial application under visible light illumination / Lin H., Deng W., Zhou T., Ning S., Long J., Wang X // *Applied Catalysis B: Environmental.* – 2015. – Vol. 176. – P. 36-43.
8. Incorporation of bioactive polyvinylpyrrolidone–iodine within bilayered collagen scaffolds enhances the differentiation and subchondral osteogenesis

- of mesenchymal stem cells / Jiang Y., Chen L., Zhang S., Tong T., Zhang W., Liu W., Xu G., Tuan R.S., Heng B.C., Crawford R., Xiao Y., Ouyang H.W. // *Acta Biomaterialia*. – 2013. – Vol. 9. – P. 8089-8098.
9. Stability of radiopaque iodine-containing biomaterials / Yvette B.J. Aldenhoff Y.B.J., Kruft M.-A. B., Pijpers A.P., Van der Veen F.H., Bulstra S.K., Kuijer R., Leo H. Koole L.H. // *Biomaterials*. – 2002. – Vol. 23. – P. 881-886.
 10. Predictive factors for urinary toxicity after iodine-125 prostate brachytherapy with or without supplemental external beam radiotherapy / Eriguchi T., Yorozu A., Kuroiwa N., Yagi Y., Nishiyama T., Saito S., Toya K., Hanada T., Shiraishi Y., Ohashi T., Shigematsu N. // *Brachytherapy*. – 2016. – Vol. 15, № 3. – P. 288-295.
 11. Poly(lactic acid) modifications / Rasal R.M., Janorkar A.V., Hirt D.E. // *Progress in Polymer Science*. - 2010, Vol. 35, № 3. – P. 338-356.
 12. 125I-labeled PLA/PEO Block Copolymer: Biodistribution Studies in Rats / Novakova K., Lazhnick M. // *Journal of Bioactive and compatible polymers*. - 2002, Vol.17, № 4. – P. 285-296.
 13. Regioselective Halogenation of Poly(lactide) by Free-Radical Process / Beuille E., Darcos V., Coudane J., Lacroix-Desmazes P., Nottelet B. // *Macromolecular reaction engineering*. - 2014, Vol. 8, № 2. – P. 141–148.
 14. Absorption of iodine on nylon-6 / Singhal J.P., Ray A.R. // *Trends Biomater. Artif. Organs*. – 2002, Vol. 16, № 1. – P. 46-51.
 15. Iodine-Containing Coating with Prolonged Antimicrobial Activity Based on Water-Insoluble Polymer Matrix / Davydov A. B., Belyh S. I., Kravets V. V. // *Biomedical Engineering*. – 2013. – Vol. 46, № 6. – P. 237-240.
 16. Shikani A.H., Domb A.J. Anti-infective polymer-iodine coating for blood collection and delivery systems: US Patent 5,695,458 A, US, 1997.
 17. PURAC. Certificate of analysis 1004002769.
 18. ISO 22196:2011 «Измерение антибактериальной активности на поверхности пластмасс и других непористых материалов»

19. Surface Modification of Biomaterials Based on High-Molecular Polylactic Acid and Their Effect on Inflammatory Reactions of Primary Human Monocyte-Derived Macrophages: Perspective for Personalized Therapy // Stankevich, K. S., Gudima, A., Filimonov, V. D., Klüter, H., Mamontova, E. M., Tverdokhlebov, S. I., Kzhyshkowska, J. // Mater. Sci. Eng. C. – 2015. – Vol. 51. – P. 117–126.
20. Конвенция МОТ о безопасности при работе с химическими веществами, 1990;
21. Генеральное соглашение между общероссийскими объединениями профсоюзов, общероссийскими объединениями работодателей и Правительством Российской Федерации на 2014 - 2016 годы;
22. ГОСТ 12.1.007-76. Классификация вредных веществ и общие требования безопасности;
23. СанПиН 2.2.1 2.1.1.1278-03. Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий;
24. СН 2.2.4/2.1.8.562-96. 2.2.4. Физические факторы производственной среды. 2.1.8. Физические факторы окружающей природной среды. Шум на рабочих местах, в помещениях жилых, общественных зданий и на территории жилой застройки. Санитарные нормы;
25. СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений;
26. ГОСТ Р 12.1.019-2009. Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты;
27. Федеральный закон от 22.07.2008 N 123-ФЗ (ред. от 13.07.2015) "Технический регламент о требованиях пожарной безопасности";
28. Федеральный закон от 30.12.2009 N 384-ФЗ (ред. от 02.07.2013) "Технический регламент о безопасности зданий и сооружений";
29. Трудовой кодекс Российской Федерации от 2016 г.

30. ГОСТ 12.0.230-2007. Система стандартов безопасности труда. Системы управления охраной труда. Общие требования
31. Приказ Минздравсоцразвития России от 12.04.2011 N 302н (ред. от 05.12.2014) "Об утверждении перечней вредных и (или) опасных производственных факторов и работ, при выполнении которых проводятся обязательные предварительные и периодические медицинские осмотры (обследования), и Порядка проведения обязательных предварительных и периодических медицинских осмотров (обследований) работников, занятых на тяжелых работах и на работах с вредными и (или) опасными условиями труда", рег. 21.10.2011.

Выводы

- 1) Предложен способ получения иодсодержащих материалов на основе полимолочной кислоты, основанный на применении смеси «растворитель/нерастворитель». Подана заявка на патент (№ 2015154344). Разработанный метод может быть применен как к пленкам, так и к сложным трехмерным структурам, таким как матриксы, полученные методом электроспиннинга.
- 2) Изучены такие свойства разработанных материалов, как стабильность иодсодержащего слоя в различных средах, а также механические свойства в зависимости от способа нанесения иода на поверхность полимера.
- 3) Продемонстрированы антибактериальные свойства полученных материалов.
- 4) Показана эффективность метода с позиций финансовой и ресурсной эффективности.
- 5) Проведен анализ вредных и опасных факторов, возникающих при выполнении работ, а также разработан комплекс мероприятий, направленных на минимизацию их последствий.

Приложение А

Раздел 4

Результаты проведенного исследования

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ДМ41	Горенинский Семен Игоревич		

Консультант кафедры БИОХ :

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Потапов А.С.			

Консультант – лингвист кафедры иностранных языков ФТИ :

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Старший преподаватель	Сумцова О.В.			

1. Results of the conducted research

1.1 Surface modification of thin films made of poly(lactic) acid

1.1.1 Selection of the solvent/non-solvent system

Two solvent/non-solvent mixtures were used for the surface modification of poly(lactic) acid (PLA) films: toluene and ethanol (3/7, v/v), the system that was reported earlier, and trichloromethane/ethyl acetate (1/9, v/v). Listed mixtures meet the following requirements:

- The solvent is nonpolar and has low boiling point;
- The non-solvent is polar;
- Solvent and non-solvent are miscible.

1.1.2 Selection of the modification parameters

As it was demonstrated by our group, using “solvent/non-solvent” systems, it is possible to apply iodine on the surface of poly(lactic) acid films from the solution or vapors. Modification conditions were selected with respect to the intensity of characteristic absorption peaks of iodine on UV-spectra of the obtained samples (290 and 470 nm). PLA films with size of 1×2 cm were treated with “solvent/non-solvent” mixture for 10 minutes and then were exposed to the saturated ethanol solution of iodine or iodine vapors for 10 minutes. Obtained samples were washed with ethanol to remove excessive iodine. UV-spectra of the obtained samples are presented in Fig.4 and 5:

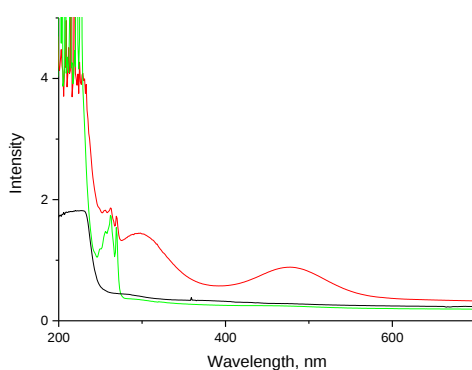


Figure 4. UV-spectra of the samples, obtained using toluene/ethanol mixture (3/7, v/v), black spectrum – PLA film, green spectrum – PLA film with iodine, adsorbed from ethanol solution, red spectrum – PLA film with iodine, adsorbed from vapors.

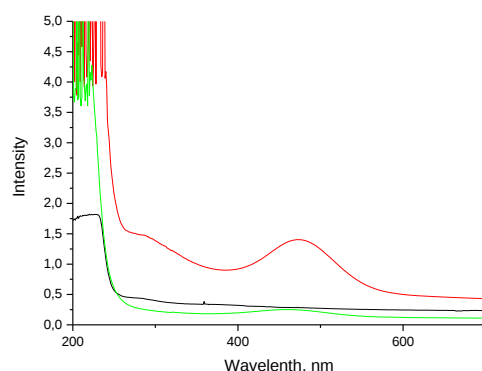


Figure 5. UV-spectra of the samples, obtained using trichloromethane/ethyl acetate mixture (1/9, v/v), black spectrum – PLA film, green spectrum – PLA film with iodine, adsorbed from ethanol solution, red spectrum – PLA film with iodine, adsorbed from vapors.

According to the obtained data, exposure of the PLA films, treated with “solvent/non-solvent” mixture to iodine vapor allows applying more iodine in short period of time.

However, it was observed that the amount of iodine, applied from the solution, may be increased by dilution of the solution with distilled water. PLA films with size of 1×2 cm were treated with toluene/ethanol (3/7, v/v) mixture for 10 minutes and then exposed to the solutions of iodine in ethanol and water-ethanol mixtures (3/7 and 7/3, v/v) for 24 hours. UV-spectra of the obtained samples are shown in the figure 6:

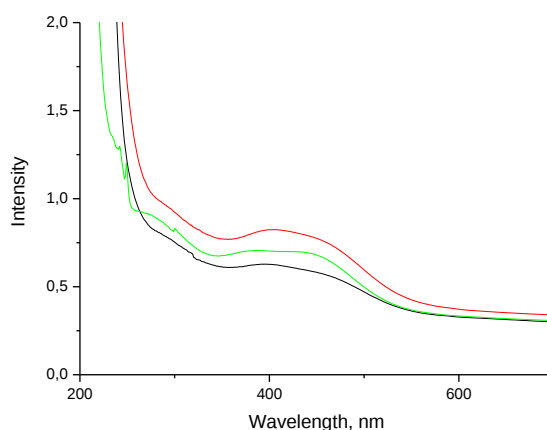


Figure 6. UV-spectra of PLA films with iodine, absorbed from ethanol and water-ethanol solutions of iodine. Black spectrum – iodine was absorbed from ethanol solution, green and red spectra – iodine was absorbed for water-ethanol solutions (7/3 and 3/7, v/v, respectively)

Thus, it may be concluded, that an amount of iodine, absorbed from the solution increases with decrease of ethanol concentration. That fact may be explained by partitive desorption of iodine with ethanol from the films surfaces.

1.1.3 Quantitive and qualitative analysis of the PLA films modification

1.1.3.1 Optical microscopy of the obtained samples

Images of the original and modified films, obtained using Motic DM-111 light microscope, are shown in the fig. 7:

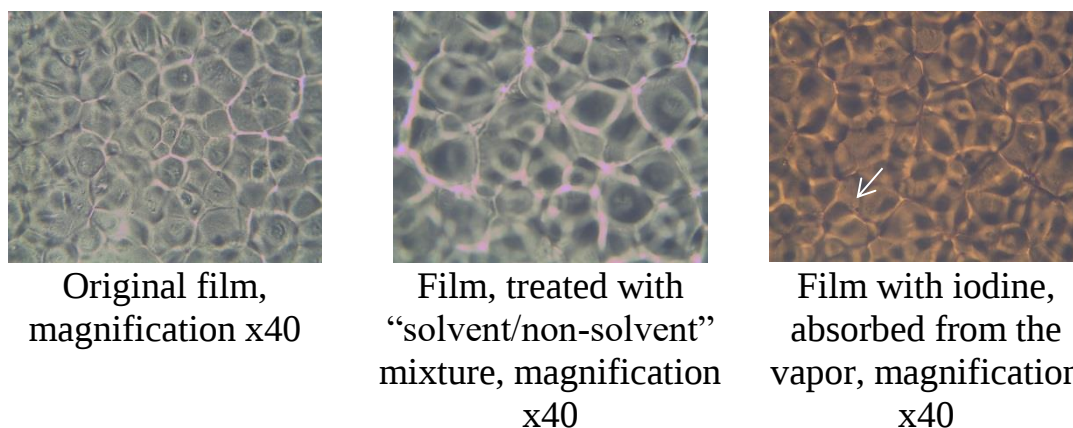


Figure 7. Images of the original and modified PLA films

Changes of the surface morphology as a result of the polymer swelling were found for the films, treated with “solvent/non-solvent” mixture. After the exposure of the film to iodine vapors colorless film turned brown due to iodine absorption. On the surface of the films, modified in iodine vapors, iodine crystals formation was observed.

1.1.3.2 Stability studies of the iodine-containing layer in different media

For the stability studies of the produced materials, samples of thin films with iodine absorbed on the surface were exposed to five media: atmosphere, vacuum, distilled water, physiological fluid and phosphate buffer. Iodine-containing layer stability was analyzed relying on the intensity of the characteristic absorption peaks of iodine on UV-spectra of the obtained samples (290 and 470 nm). UV-spectra of the samples were recorded after 1, 2, 3, 5 and 7 days of the experiment. The results are shown in the fig. 8 and 9:

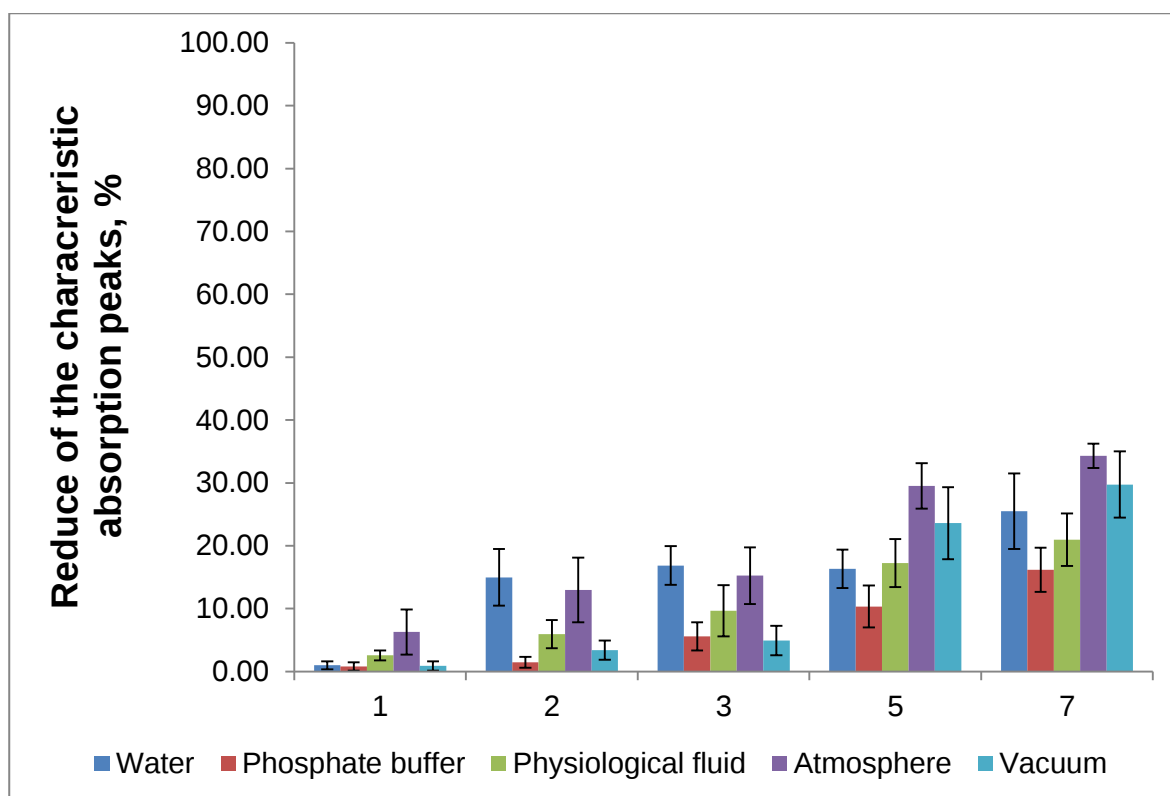


Figure 8. Stability of iodine-containing with iodine, absorbed from the solution

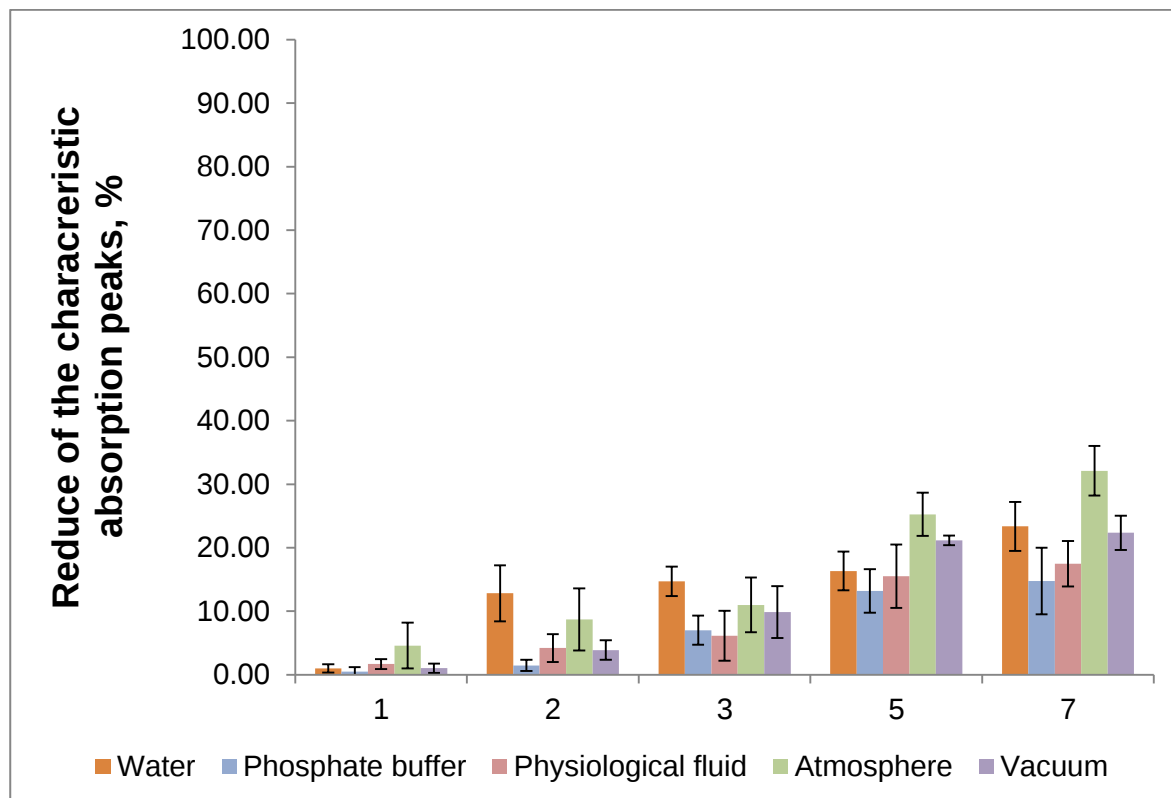


Figure 9. Stability of iodine-containing with iodine, absorbed from the vapors

According to the presented data, obtained materials are more stable in physiological fluid and phosphate buffer. Thus, it is possible to store such materials in this media.

1.1.3.3 Mechanical properties of the obtained materials

The influence of suggested method of iodine application on the surface of PLA films on the mechanical properties of the polymer was investigated using Zwick Roell z2.5 (Zwick GmbH & Co. KG, Germany) equipment. The results are presented in Table 2:

Table 2. Mechanical properties of the obtained materials

	Elasticity modulus, MPa	Tensile strength, MPa	Elongation, %
PLA film	2382,5	63,11	146,5
PLA film, treated with “solvent/non-solvent” mixture (toluene/ethanol, 3/7, v/v) for 10 minutes	1281,8	53,25	164,3
PLA film, treated with “solvent/non-solvent” mixture for 10 minutes with iodine, applied from the solution ($C_{I_2} = 6,5 \text{ мг/мл}$) for 48 h (iodine concentration on the surface 0.03 ± 0.008 g/cm^2)	1554	47,81	136,3
PLA film, treated with “solvent/non-solvent” mixture with iodine, absorbed from the vapors for 7 (iodine concentration on the surface 0.04 ± 0.0083 g/cm^2)	2426	40,84	114,3

Increase of the material elongation was observed after the “solvent/non-solvent” treatment. Also, absorption of iodine from the solution leads to less changes of elongation and tensile strength. On the other hand, elasticity modulus was insignificantly changed with absorption of iodine from vapor.

1.1.3.4 Studies of the iodine absorption dynamics on the surface of PLA films from the solution and vapors

In order to investigate absorption dynamics of iodine, PLA films were treated with “solvent/non-solvent” mixtures with compositions of toluene/ethanol (3/7, v/v) or trichloromethane/ethyl acetate (1/9, v/v) and exposed to the saturated solution of iodine in water-ethanol mixture ($C_{I_2} = 6,5 \text{ мг/мл}$) for 6, 12, 24 and 48 hours, or to iodine vapors for 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 20 and 30 minutes. Amount of absorbed iodine was assessed by means of UV-spectroscopy.

Absorbed iodine was desorbed from the samples with size of $1 \times 1 \text{ cm}$ with 2 ml of ethanol during 24 hours. Concentration of iodine in obtained solutions was calculated using calibration lines.

Calibration lines were plotted according to the intensity of characteristic absorption peaks of iodine. Absorption intensity and its dependence from the concentration of the solution are shown in fig. 10:

Concentration	Wavelength 290 nm	Wavelength 360 nm	Wavelength 440 nm
3E-05	0.7453	0.4373	0.2173
5E-05	1.0191	0.5873	0.2979
6E-05	1.1458	0.6376	0.3347
8E-05	1.3534	0.7716	0.4156

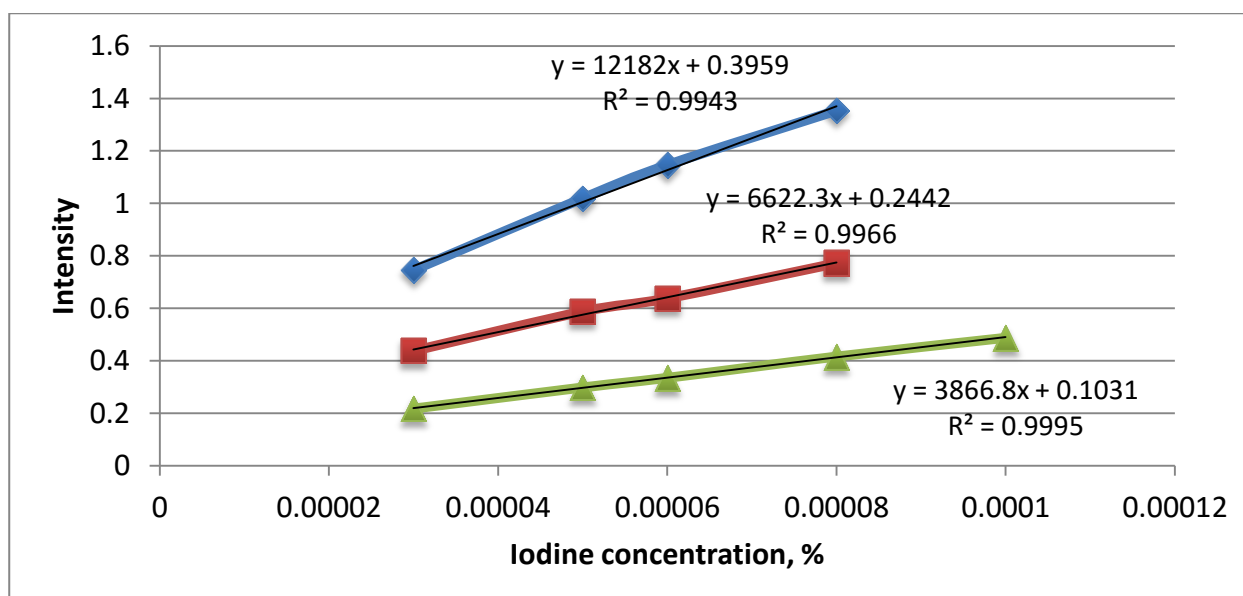


Figure 10. Absorption intensities of the calibration solutions and its dependence on iodine concentration

Total desorption of iodine was confirmed by X-ray fluorescence analysis (XRF):

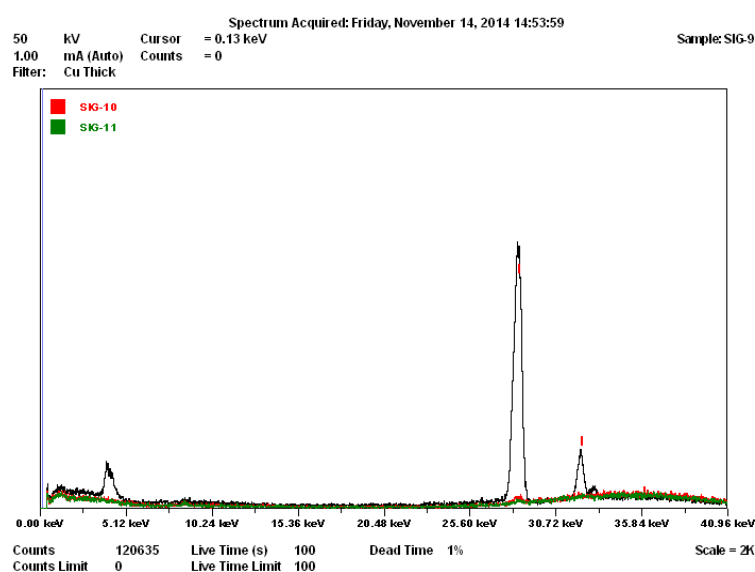


Figure 11. XRF spectra of the following samples:

red spectrum – original PLA film; black spectrum – PLA film with iodine on the surface; green spectrum – PLA film with iodine after 24 hours in ethanol

XRF spectrum of iodine-containing sample is presented by three peaks on 3, 27.1 and 32 keV. After the treatment with ethanol for 24 hours, PLA film with iodine-containing layer loses its brown color and becomes colorless. Peaks of iodine were not observed on XRF spectra of the samples, treated with ethanol. Changes of the

amount of absorbed iodine with time for both “solvent/non-solvent” are presented in fig. 12-15:

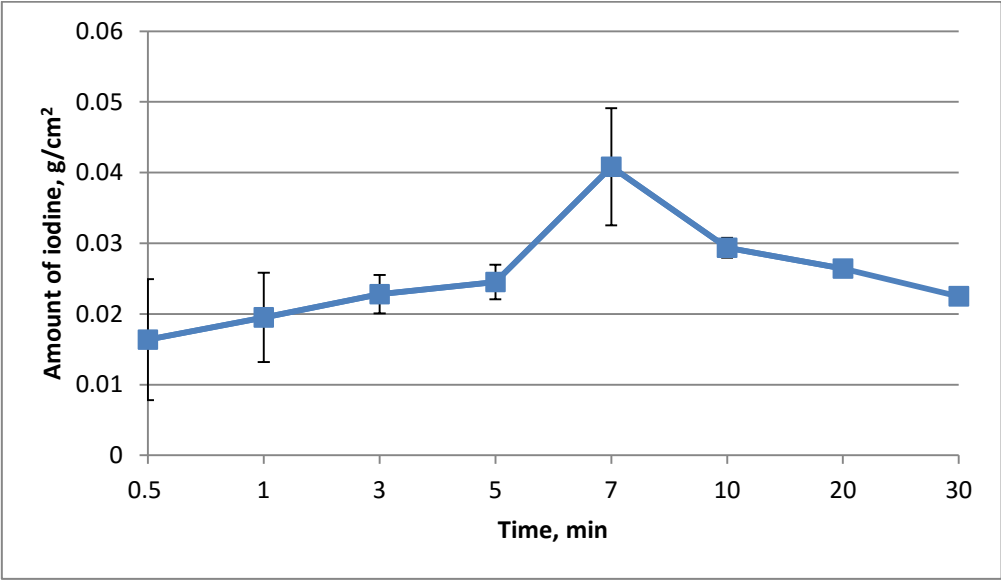


Figure 12. Changes of the amount of iodine absorbed from vapor with time for PLA films, treated with toluene/ethanol (3/7, v/v) system

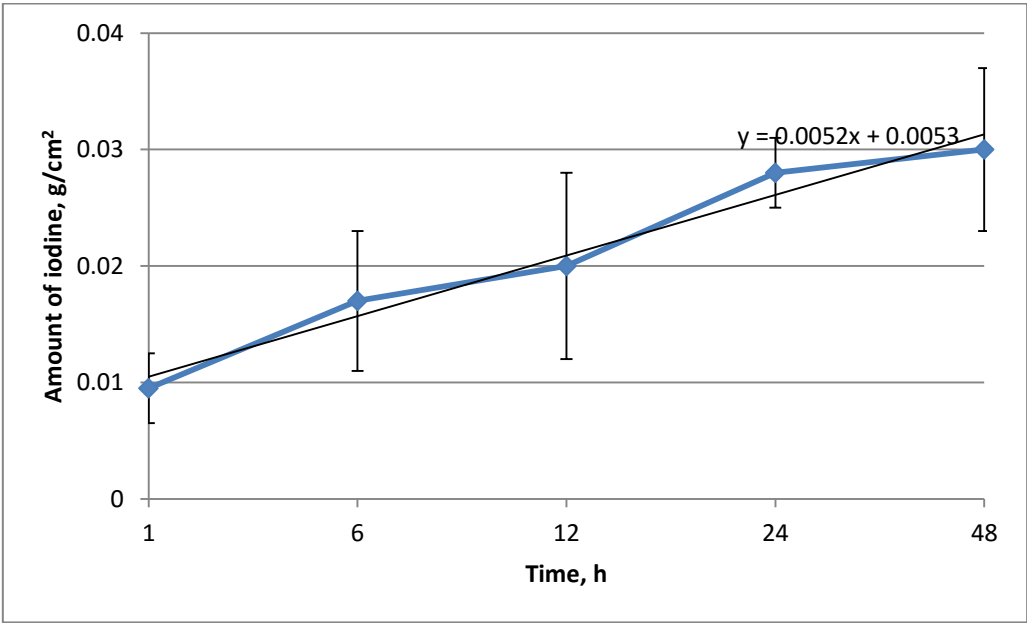


Figure 13. Changes of the amount of iodine absorbed from saturated water-ethanol solution ($C_{I_2} = 6.5 \text{ mg/ml}$) with time for PLA films, treated with toluene/ethanol (3/7, v/v) system

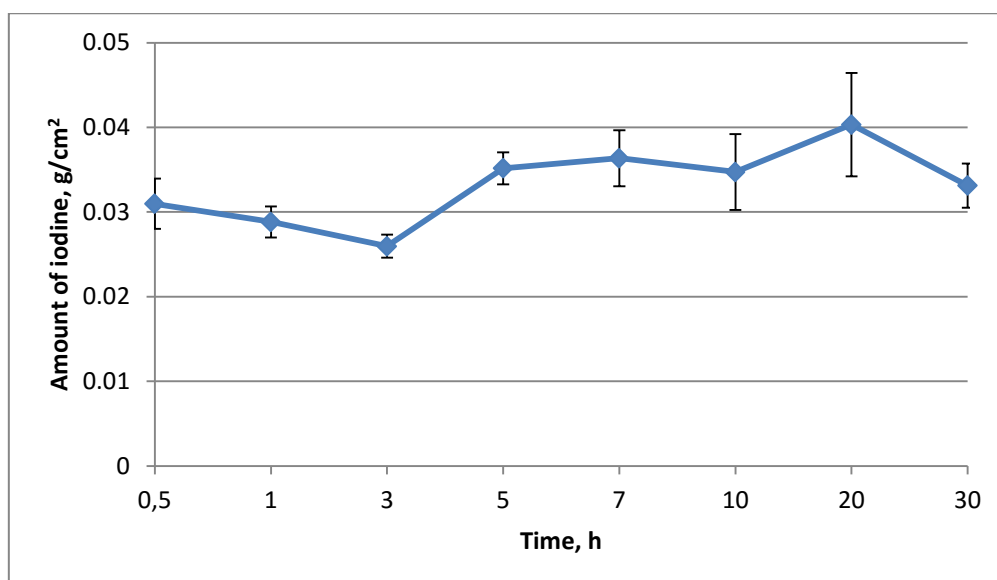


Figure 14. Changes of the amount of iodine absorbed from vapor with time for PLA films, treated with trichloromethane/ethyl acetate (1/9, v/v) system

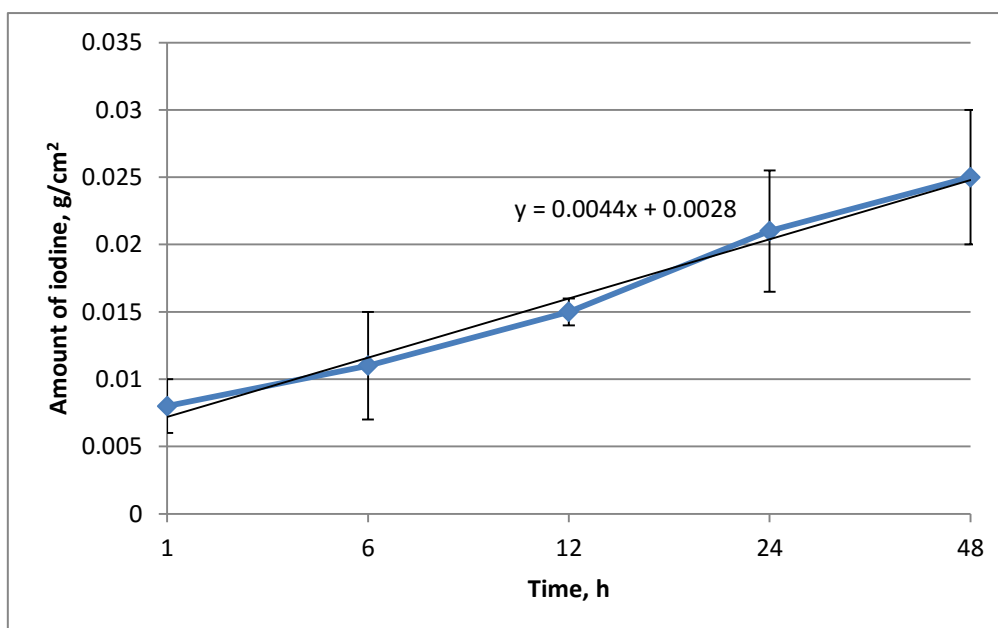


Figure 15. Changes of the amount of iodine absorbed from saturated water-ethanol solution ($C_{I_2} = 6.5$ mg/ml) with time for PLA films, treated with trichloromethane/ethyl acetate (3/7, v/v) system

Thus, using both “solvent/non-solvent” systems it is possible to achieve concentration of iodine near 0.04 g per square centimeter of the PLLA film during the absorption from vapor. But this concentration may be applied in less period of time using mixture of toluene and ethanol (3/7, v/v). During adsorption from solution, iodine concentration increases in 48 hours of exposure.

1.1.3.5 Antibacterial properties of the obtained materials

According to the quantitative analysis of iodine concentration in the obtained materials, maximum concentration of iodine was achieved by using of toluene and ethanol mixture (3/7, v/v) and exposure in iodine vapors for 7 minutes. As iodine is an antibacterial agent, antibacterial properties of the material with maximum concentration of iodine on the surface were investigated. The results of antibacterial activity measurements are presented in table 3:

Table 3 – The amount of viable bacterial cells before and after 24 hours of incubation on polymer films with antibacterial additives

Sample	The amount of viable bacterial cells (N), extracted from 1 cm ² , CFU/cm ²	
	0 hours	24 hours
PLA film (control)	2,0*10 ⁵	3,5*10 ⁵
PLA film, treated with toluene/ethanol (3/7, v/v) mixture, exposed to iodine vapors for 7 minutes (iodine concentration on the surface 0.04±0.0083 g/cm ²)	2,0*10 ⁵	5

Antibacterial activity of the material was calculated according formula (2):

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t = 3,85$$

According to this calculation, obtained PLA-based materials demonstrate antibacterial activity.

1.2 Adsorption of iodine on the surface of PLA scaffolds

1.2.1 Selection of the “solvent/non-solvent” system

1.2.1.1 Influence of the “solvent/non-solvent” treatment on the morphology of PLA scaffolds

In order to investigate the influence of the “solvent/non-solvent” treatment on the structure of PLA scaffolds, scanning electron microscopy (SEM) was used. Samples with size of 2×2 cm were treated with mixtures of toluene and ethanol in different

proportions (0.5/9.5, 0.6/9.4, 0.7/9.3, 0.8/9.2, 0.9/9.1, 1/9, v/v, respectively) for 10 minutes. The results are shown in figure 16:

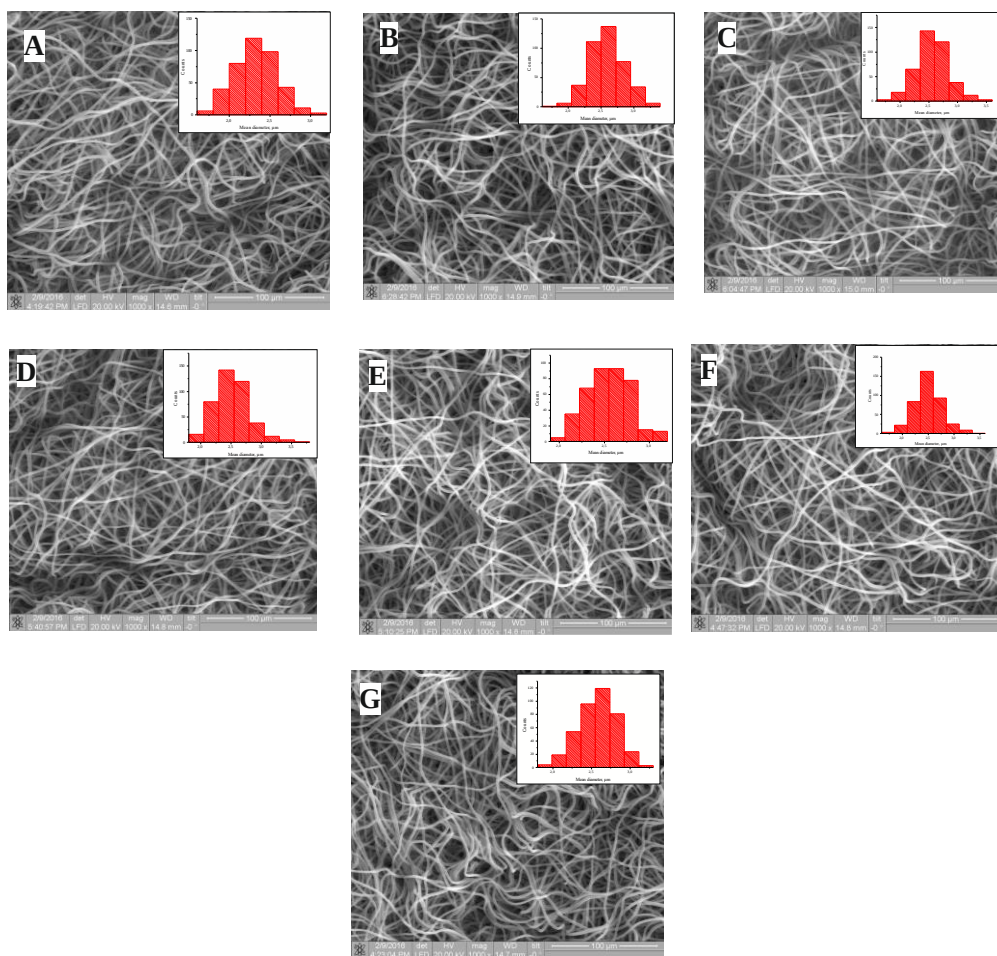


Figure 16. SEM images of the obtained samples:

A – original PLA scaffold; B – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.5/9.5; C – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.6/9.4; D – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.7/9.3; E – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.8/9.2; F – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.9/9.1; G – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 1/9

Obtained scaffolds demonstrate unimodal distribution of mean fibers diameter. Crucial changes in scaffolds morphology (such as cutting or gluing of the fibers) were not observed. Thus, “solvent/non-solvent” system with composition of toluene and ethanol (1/9, v/v) was chosen as it contains more solvent for pre-swelling of the polymer.

1.2.1.2 Influence of the “solvent/non-solvent” treatment on the crystal structure of PLA scaffolds

X-ray diffraction analysis (XRD) was used for investigations of the crystal structure of the materials. XRD patterns of the obtained samples are shown in the figure 17:

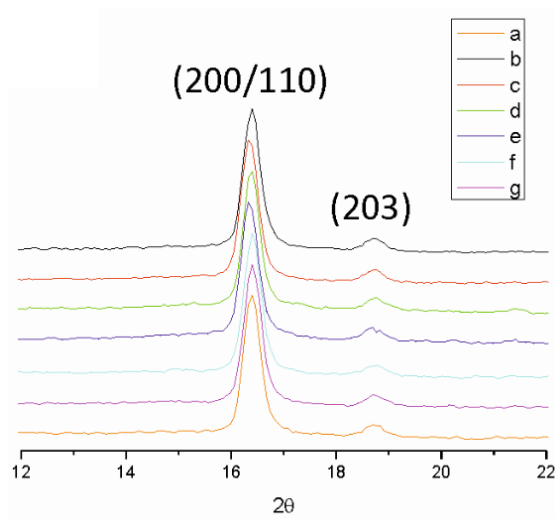


Figure 17. XRD patterns of the obtained samples: A – original PLA scaffold; B – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.5/9.5; C – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.6/9.4; D – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.7/9.3; E – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.8/9.2; F – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.9/9.1; G – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 1/9

New reflexes were not appeared on the XRD patterns of the obtained samples. Thus, crystallinity of the material was not changed and new phases were not formed. Average sizes of the polymer crystallites were calculated according to Scherrer's equation (3):

$$l_c = \frac{k\lambda}{\cos\theta\sqrt{\beta^2 - \beta_r^2}} \quad (3)$$

, where: λ – wavelength, nm; β – peak width at a half-high, β_r – peak broadening, θ – diffraction angle, $k=0,9$.

Table 3 – Average sizes of PLA crystallites

Sample	Average size, nm
A	21,61±0,38
B	21,05±0,32
C	21,05±0,31
D	21,24±0,55
E	21,61±0,33
F	20,69±0,53

G	21,07±0,83
---	------------

A – original PLA scaffold; B – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.5/9.5; C – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.6/9.4; D – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.7/9.3; E – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.8/9.2; F – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 0.9/9.1; G – PLA scaffold, treated with toluene and ethanol mixture in proportions of 1/9

Thus, “solvent/non-solvent” treatment of the PLA scaffolds with listed mixtures had no effect on crystal structure of the material. Solvents mixture containing toluene and ethanol in proportions of 1/9 (v/v) was also selected.

1.2.2 Studies of the iodine absorption dynamics on the surface of PLA scaffolds from the solution and vapors

For the investigation of the dynamics of iodine absorption on the surface of PLA scaffolds samples with size of 2×2 cm and mass of 0.123 g were treated with mixture of toluene and ethanol (1/9, v/v) and then exposed to the iodine vapors for 0.5, 1, 3, 5, 7 and 10 minutes or to iodine solution in water-ethanol mixture for 1, 6, 24 and 48 hours at a temperature of 40 °C. Than excessive iodine was removed by washing the samples with ethanol for 5 seconds. The obtained samples were dissolved in 2 ml of dichloromethane.

Iodine concentration in the prepared solutions was determined by means of UV-spectroscopy. For that purpose, UV-spectra of calibration solutions of iodine in dichloromethane (0.0005%, 0.001%, 0.002%, 0.003% и 0.004%) were recorded and calibration line was plotted (figure 18):

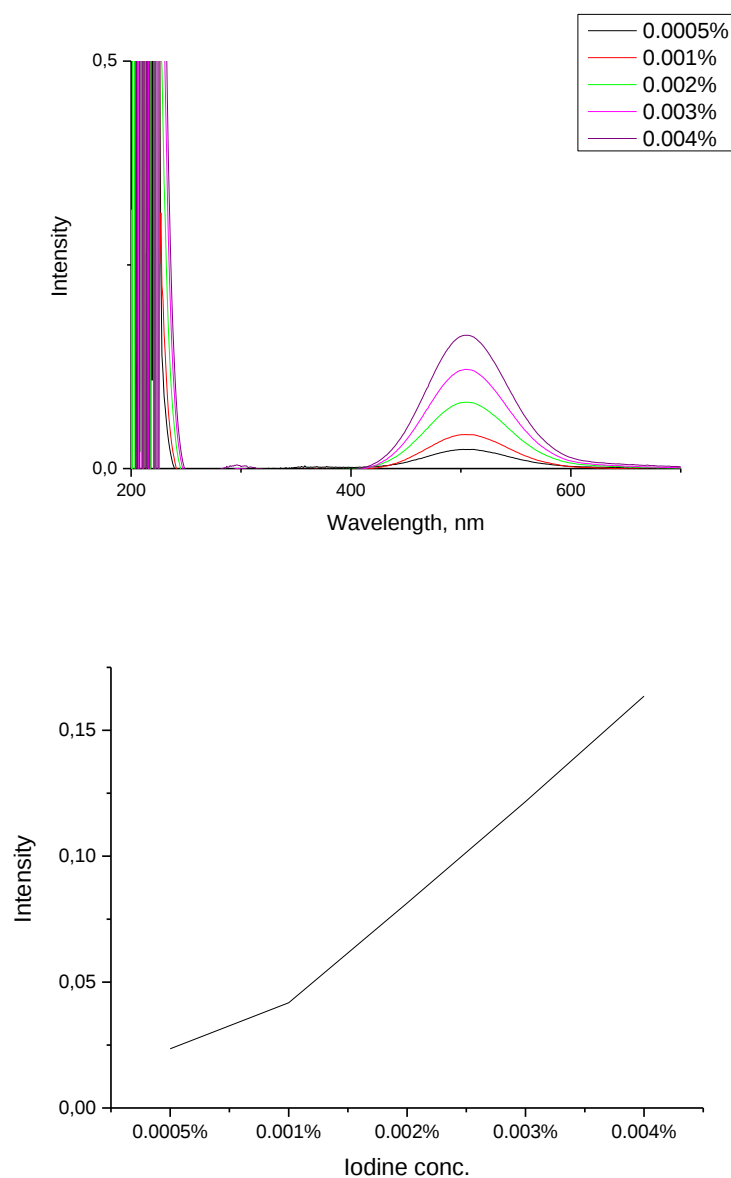


Figure 18. UV-spectra of iodine solutions in dichloromethane and calibration line (adsorption maximum at 500 nm)

However, after the addition of PLA scaffolds to the calibration solutions hypsochromic shift was observed and adsorption maximum moved to 360 nm (fig. 19):

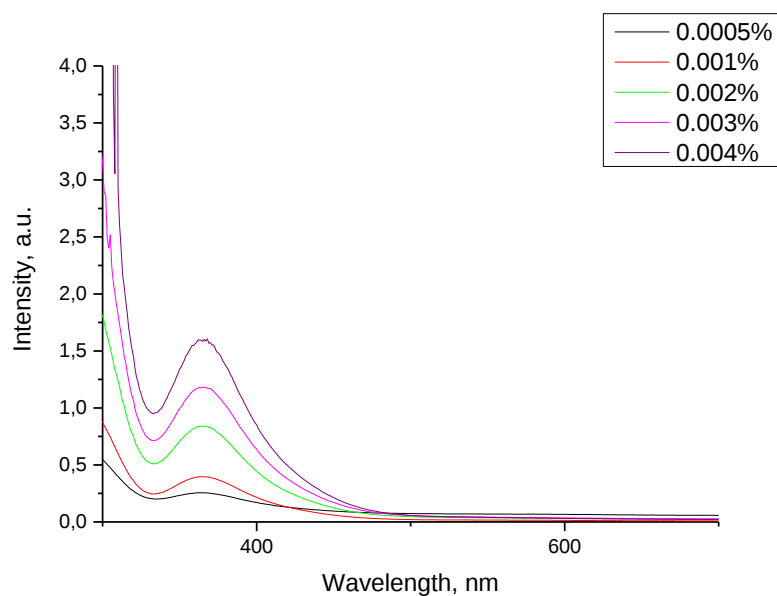


Figure 19. UV-spectra of the solutions of iodine with PLA in dichloromethane

For the solutions with higher concentrations of iodine such effect was not observed (fig. 20):

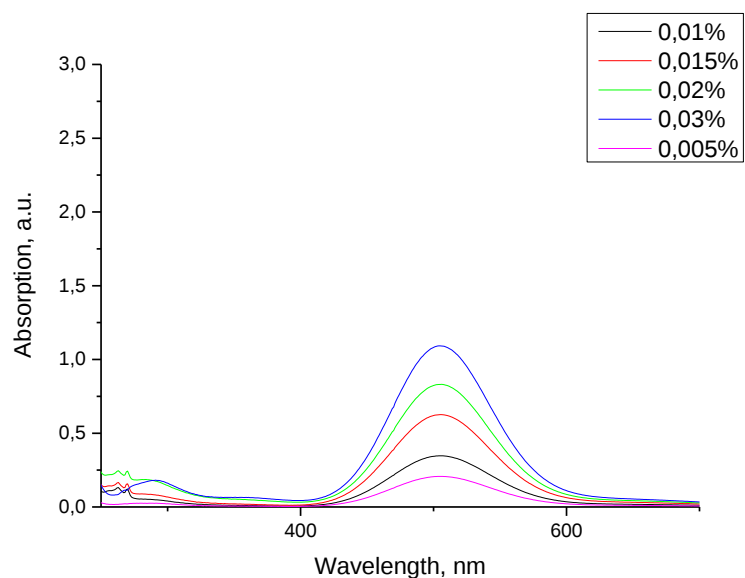


Figure 20. UV-spectra of the solutions of iodine with PLA in dichloromethane

Thus, two calibration graphs for the solutions of iodine and PLA in dichloromethane with absorption maximums at different wavelengths were plotted (figure 21 and 22):

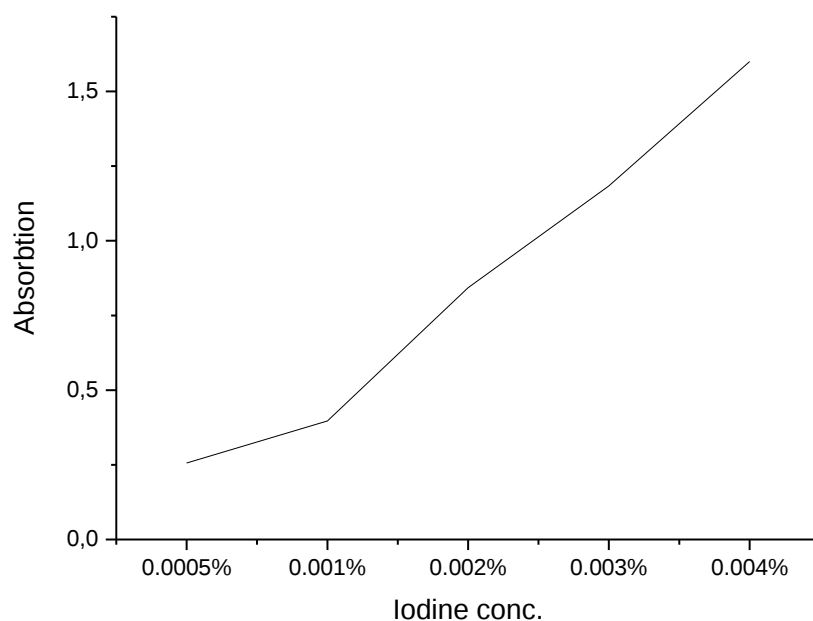


Figure 21. Calibration line for the solutions of iodine and PLA in dichloromethane with adsorption maximum at 360 nm

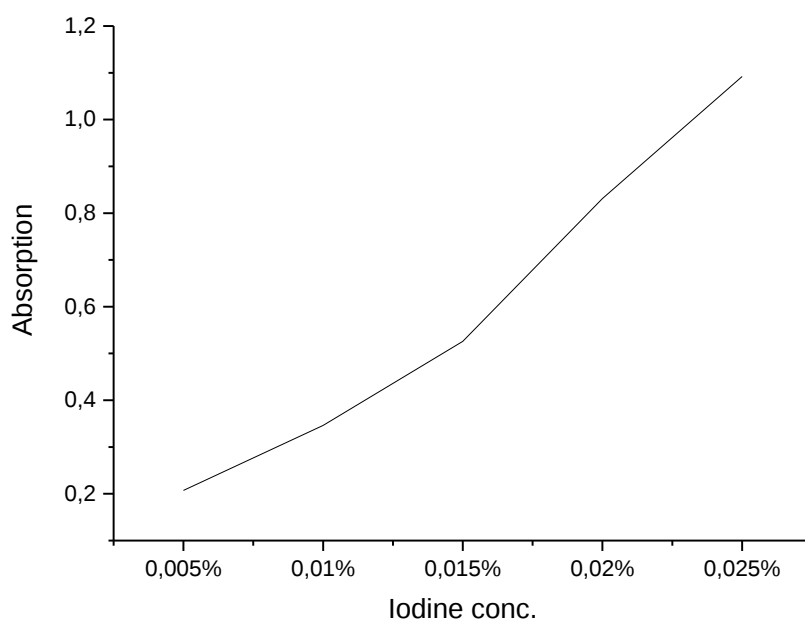


Figure 22. Calibration line for the solutions of iodine and PLA in dichloromethane with adsorption maximum at 500 nm

Dependency if the amount of absorbed iodine from time is plotted in fig. 23 and 24:

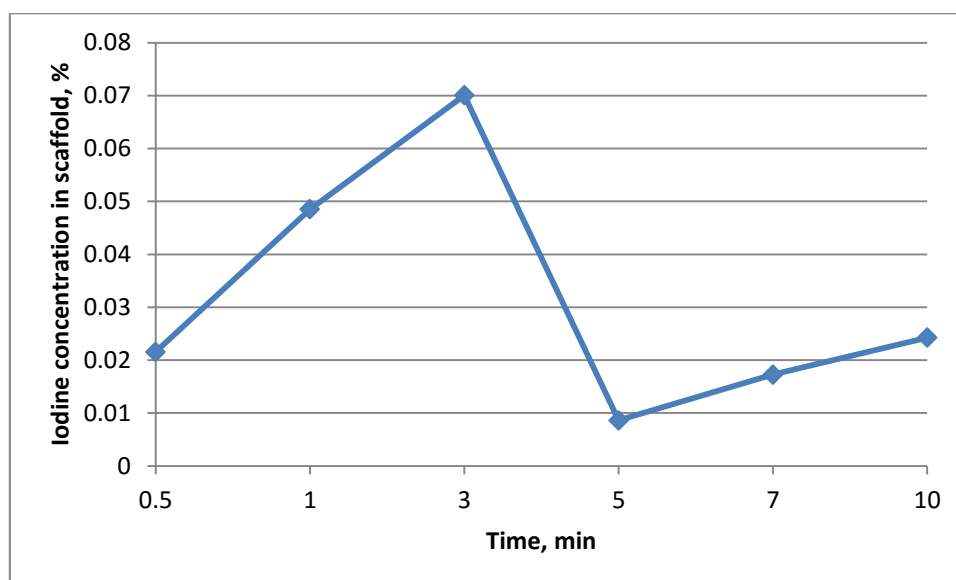


Figure 23. Dependency of the amount of iodine absorbed from vapors from time of treatment

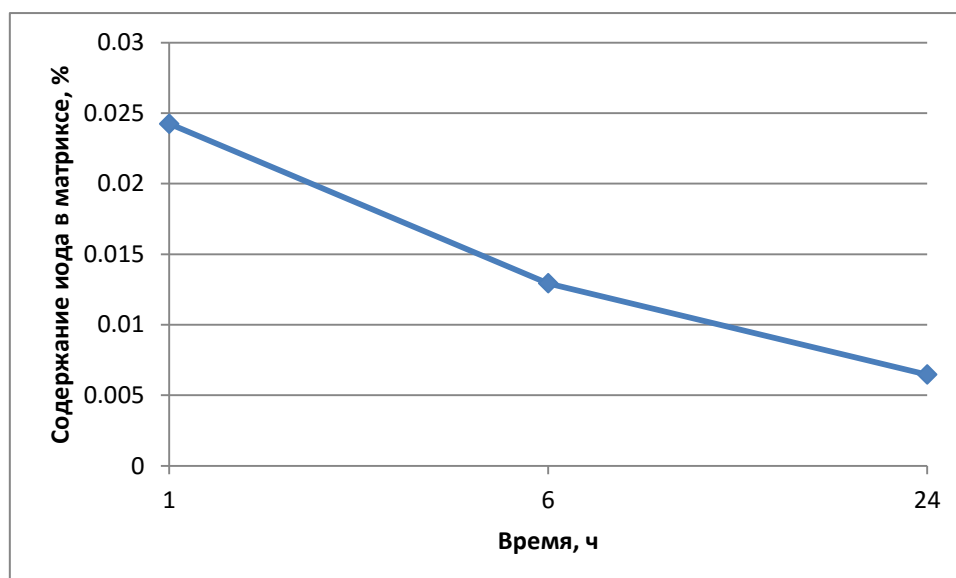


Рисунок 24. Dependency of the amount of iodine absorbed from water-ethanol solution ($C_{I_2} = 6,5 \text{ mg/ml}$) from time of treatment

It was observed, that during iodine absorption from vapors maximum concentration of iodine (0.07%) was achieved after 3 minutes of treatment. During absorption from the solution here was a decrease of iodine concentration from the first hour of treatment.

1.2.3 Antibacterial properties of the obtained materials

Antibacterial properties of the PLA scaffolds with iodine absorbed from vapors were tested. As it was shown before, at a temperature of 40 °C maximum concentration of iodine was achieved after 3 minutes of treatment in iodine vapors. Thus, PLA

scaffolds, treated with iodine vapors for 0.5, 1 and 3 minutes (with concentrations of iodine of (0.02%, 0.05% and 0.07%, respectively) were tested.

For the determination of antibacterial activity suspension of *E. coli* with concentration of 5×10^5 CFU/ml was prepared. Samples with size of 1×1 cm were placed in 1 ml of the prepared suspension. After 24 hours of incubation, 0.1 ml of each suspension was placed on beef-extract agar in Petri dish. After 24 hours cultivation grown colonies were counted. The results of the experiment are shown in the fig. 25:

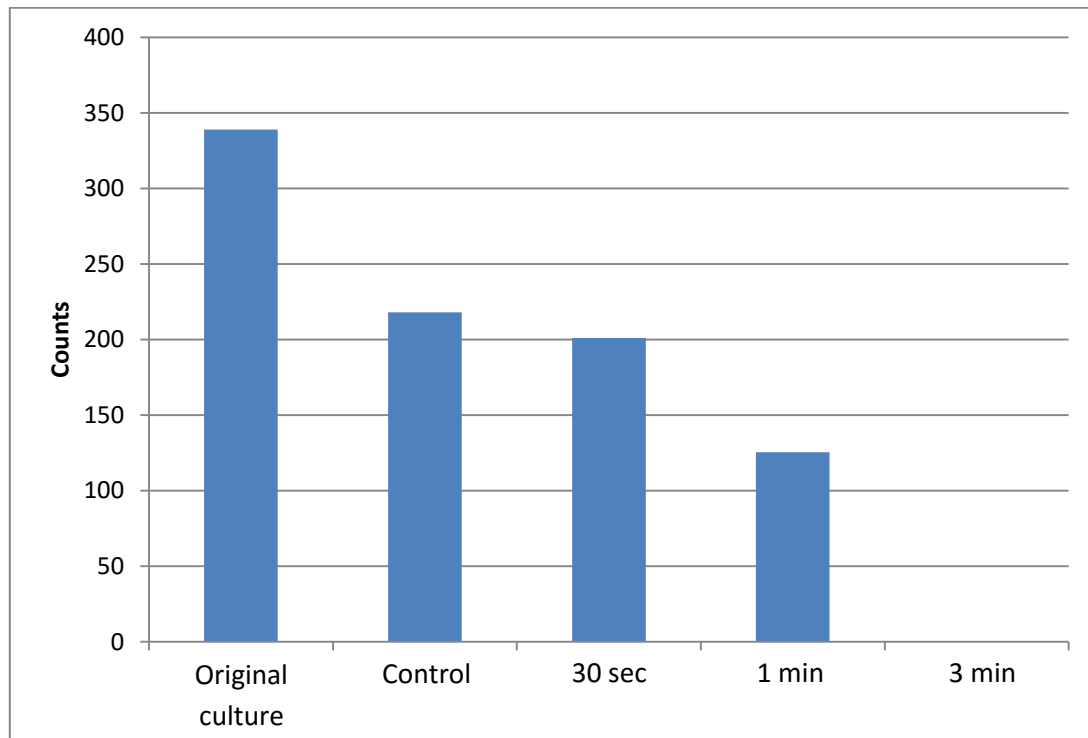


Figure 25. Counts of the colonies grown in presence of materials with different concentrations of iodine

The obtained data show, that produced materials demonstrate antimicrobial activity against *E. coli*. Noteworthy, control sample (PLA scaffold without iodine) also demonstrated antimicrobial activity. However, that fact may be explained by incompliance of the materials storage (control samples were stored with samples with absorbed iodine).