

На правах рукописи

Артюхов Александр Анатольевич

**Полимерные гидрогели сшитого
поливинилового спирта и его сополимеров
и их биомедицинское применение**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

02.00.06 –Высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени доктора
химических наук

Москва - 2017

Работа выполнена в Учебно-научном центре магистерской подготовки «Биоматериалы» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Научный консультант профессор, доктор химических наук,
Штильман Михаил Исаакович
руководитель Учебно-научного центра магистерской подготовки «Биоматериалы» РХТУ им. Д.И. Менделеева

Официальные оппоненты профессор, доктор медицинских наук
Гусев Сергей Андреевич
руководитель лаборатории морфологии отдела молекулярной биологии и генетики Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

профессор, доктор химических наук
Кильдеева Наталия Рустемовна
заведующая кафедрой химии и технологии полимерных материалов и нанокompозитов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технологи. Дизайн. Искусство)»

доктор технических наук
Легонькова Ольга Александровна
руководитель Отдела перевязочных, шовных и полимерных материалов в хирургии Федерального государственного бюджетного учреждения «Институт хирургии имени А.В.Вишневского» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук

Защита состоится «20» сентября 2017 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета Д 999.095.03 при РХТУ им. Д.И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в конференц-зале ауд. 443.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д999.095.03

_____ Шакир И.В.

Актуальность работы. Полимерные гидрогели находят широкое применение в различных областях, связанных с медициной и биотехнологией. Ряд уникальных свойств делают их чрезвычайно привлекательными для целого ряда динамично развивающихся областей медицинской науки, таких, как клеточная и тканевая инженерия, технология имплантатов и биологически активных систем и др. Все увеличивающееся количество публикаций, посвященных этому виду материалов, указывает на их перспективность.

Однако, несмотря на значительное количество работ, связанных с исследованием и разработкой подобных систем, вопрос создания гидрогелевого материала, который удовлетворял бы всем требованиям возможных биохимических и биомедицинских областей применения (например, степень развитости пористости, степень клеточной адгезии, токсичность, способность к биodeградации и т.п.), характеризуясь при этом доступностью, достаточно простой технологией получения и относительной дешевизной, по-прежнему, остается открытым.

С этих позиций, использование при создании полимерных гидрогелей в качестве их основы производных поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала – крупнотоннажных полимеров, обладающих высокой биосовместимостью, и широко и успешно применяемых в медицине на протяжении нескольких десятилетий, представляется весьма перспективным.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлись разработка новой группы гидрогелевых материалов, обладающих различной структурой, высокой биосовместимостью и заданной скоростью биodeградации, выявление эффективных путей их применения в областях связанных с биотехнологией и биомедициной, проведение токсикологических испытаний, получение разрешения на применение, организация производства

Для выполнения данной цели в работе решались следующие задачи:

- Разработка метода синтеза водорастворимых полимеров (макромеров) на основе поливинилового спирта (ПВС) и 2-гидроксиэтилкрахмала (ГЭК), содержащих в боковой цепи ненасыщенные группы, способных к образованию пространственных структур в результате сшивки по свободно-радикальному механизму;
- Изучение влияния различных факторов на процессы получения, строение и структуру сополимеров на основе макромеров ПВС и ГЭК, в том числе содержащих ионогенные группы;
- Исследование санитарно-токсикологических характеристик полученных гидрогелей;
- Изучение влияния строения и состава гидрогелей на их биосовместимость, способность к биodeградации и характер взаимодействия с клеточными культурами и живыми тканями;
- Выявление направлений практического применения изделий на основе разработанных гидрогелевых материалов, подготовка материалов для получения разрешения на их медицинское применение;
- Разработка основ технологии производства разработанных материалов и организация опытного производства.

Научная новизна. В работе впервые синтезированы сшитые гидрогели на основе сополимеров водорастворимых метакриловых производных ПВС и ГЭК, в том числе содержащие ионогенные группы.

Установлен характер влияния на особенности синтеза метакриловых производных ПВС и ГЭК и их сополимеров условий проведения реакций. Выявлены параметры процессов, позволяющие получать изотропные и анизотропные (пористые) гидрогели.

В опытах на различных клеточных культурах и опытных животных показана высокая биосовместимость полученных полимерных материалов. Выявлена взаимосвязь строения гидрогелей и уровня их биосовместимости. Установлен характер влияния типов клеточных культур на их способность к росту на подложках из синтезированных полимерных гидрогелей.

Установлен характер влияния строения и структуры полимерных гидрогелей на основе сополимеров макромеров ПВС и ГЭК на способность изделий из них к биodeградации в среде живых тканей.

Практическая значимость. Продемонстрирована возможность использования разработанных полимерных систем в качестве основы для материалов для замещения дефектов мягких тканей и заполнения послеоперационных полостей, высокоэффективных раневых покрытий, носителей лекарственных препаратов в офтальмологии, подложек для клеточной и тканевой инженерии, в том числе с заданными временами биodeградации в организме.

Раневое покрытие на основе макропористых полимерных гидрогелей, разработанных в данной работе, допущено к применению на территории Российской Федерации.

Изделия на основе разработанных полимерных материалов были отмечены наградами специализированных выставок и салонов, в частности: Золотой медалью Международной специализированной выставки «Мир Биотехнологии-2008», Серебряной медалью XIII Международного салона изобретений и инноваций «Архимед – 2010», Золотой медалью XV Международного салона изобретений и инноваций «Архимед – 2012», Золотой медалью 12-го Международного форума «Высокие технологии 21-го века»

Часть проводимых работ выполнялось в рамках Государственного контракта № 12411.1008799.13.033 «Организация исследований, разработок и опытно-промышленного производства полимерного биоматериала с высокой биосовместимостью и заданной скоростью биodeградации», результатом данных работ стала организация опытного производства гидрогелей медицинского назначения.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались на международных и всероссийских научных конференциях и семинарах (в виде устных докладов и с опубликованием тезисов), среди которых: XVII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. [Казань, 21-26 сентября 2003]; Международная конференция «Биологически активные полимеры: Синтез, свойства и применение» [Ташкент, 2003]; Biotechnology: State of art and prospects of development [3rd Moscow International congress, 2005]; Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005»; Biotechnology: State of the art and prospects of development [Moscow, 2007]; «New Polymers and Radioprotectors for Biology and Medicine», [Yerevan, Republic of Armenia, 2007]; Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2007»; Всероссийское совещание «Биоматериалы в медицине» [Москва, 2009]; 1st Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientist's School) [Heraklion, 2010]; Всероссийская Каргинская конференция [Москва, 2010];

14-я Пушкинская международная школа-конференция молодых ученых, [Пушино, 2010]; 2nd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientist's School [Heraklion, 2011]; Нанобиоматериалы: современные достижения и токсикологические вопросы безопасности [Москва, 2011]; XIX International Conference on Bioencapsulation [Amboise, France, 2011]; Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Problems and Safety Issues [3rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School, Heraclion, Greece, 2012]; Bionanotox 2013. 4th International conference «Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues». Crete-Greece, Heraklion 2013] ; Bionanotox 2014. 5th International conference «Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues» [Crete-Greece, Heraklion, 2015].

Публикации. По теме диссертации опубликованы 102 работы (из них 33 в изданиях, входящих в перечень ВАК для докторских диссертаций).

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка литературы из 307 наименований. Работа изложена на 307 страницах и включает 145 рисунков и 32 таблицы.

Полученные результаты и их обсуждение

Основными задачами диссертации являлись: разработка ряда модификаций гидрогелей на основе гомополимеров и сополимеров ненасыщенных производных (макромеров) поливинилового спирта (ПВС) и 2-гидроксиэтилкрахмала (ГЭК) (1), исследование их строения и физико-химических характеристик (2), изучение особенностей взаимодействия с живыми тканями (3) и поиск возможности использования разработанных гидрогелей в медико-биологических областях (4).

Следует подчеркнуть, что особенности процесса получения целевых продуктов (выбор исходных веществ, технологические схемы, очистка получаемых продуктов) выбирались с учетом необходимости их дальнейшей реализации в производственных условиях.

Для синтеза полимерных гидрогелей в данных случаях была использована радикальная гомо- и сополимеризация предварительно очищенных ненасыщенных (метакрилатных) производных исходных полимеров (макромеров). В большинстве использованных в работе процессов получения целевых продуктов применение такого подхода позволило исключить применение при формировании трехмерной полимерной сетки гидрогеля мономеров или каких-либо сшивающих агентов, в большинстве случаев обладающих высокой токсичностью и мутагенной активностью.

Данный метод синтеза в значительной степени упрощает очистку готовых изделий на основе полимерных гидрогелей, снижая тем самым потенциальные риски при их практическом применении. Следует отметить, что в отдельных случаях были использованы дополнительные мономеры, которые вводились для получения гидрогелей, содержащих функциональные группы.

Сочетание в составе гидрогелевых систем фрагментов ПВС и ГЭК - полимеров, скорости биодеструкции которых в организме заметно отличаются, позволяло в широких пределах варьировать скорость биодеградации целевых гидрогелевых продуктов посредством изменения соотношения сополимеров в составе исходных композиций.

1 Получение макромеров на основе поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала

Использувавшиеся для получения гидрогелей ненасыщенные производные были получены взаимодействием ПВС и ГЭК с глицидилметакрилатом (ГМА) в условиях, позволяющих получать продукты с количеством ненасыщенных групп достаточным для осуществления эффективной полимеризации, но не приводящим к сшивке продуктов в процессе синтеза, что обеспечило их хорошую растворимость в воде. Это позволяло получать и использовать различные модификации гидрогелей.

В качестве исходных полимеров в работе были использованы ПВС с молекулярной массой (M_n) около 13,5 кДа и содержанием остаточных ацетатных групп не более 1 мол.% и низкомолекулярный ГЭК 200/0,5 (M_w 200 кДа, степень замещения 0,5, $C2/C6=5/1$, Fresenius Kabi Deutschland, Германия), отличающиеся высокой биосовместимостью и разрешенные к использованию в составе различных лекарственных систем, в том числе инфузионных растворов.

Реакцию исходных полимеров и ГМА проводили в среде сухого диметилсульфоксида при температурах 80-100 °С и концентрации полимеров от 2 до 12 мас. % при соотношениях ГМА и ПВС от 1/50 до 1/10 моль/осново-моль. В случае ГЭК реакцию проводили в присутствии тетраметилэтилендиамина.

Исследование процесса взаимодействия ПВС и ГЭК с ГМА позволило выявить условия, позволяющие получать целевые макромеры со степенями замещения $1,5 \div 12$ мол.%, что обеспечивало эффективное образование гидрогелей при их радикальной сшивке.

Строение метакрилатных производных подтверждалось методами ИК- и ЯМР 1H -спектроскопии.

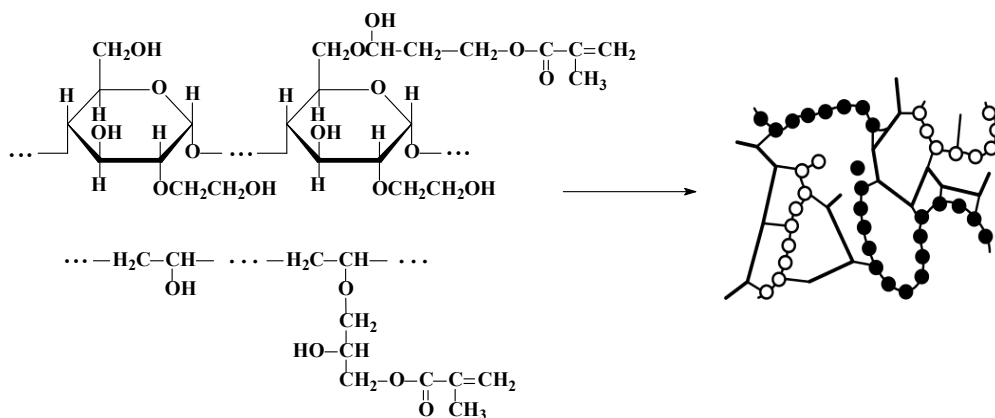
В дальнейшем для получения целевых гидрогелей, применяемых в контакте с живыми объектами, в работе были использованы ПВС с содержанием метакрилатных групп порядка $2,5 \div 5$ мол.% и ГЭК с содержанием метакрилатных групп - $5 \div 10$ мол.%. Содержание ненасыщенных групп в полимерах определяли функциональным анализом, а также с использованием ЯМР-спектроскопии.

2 Получение сшитых систем на основе макромеров поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала

Синтезированные в данной работе макромеры образовывали при полимеризации в водной среде гидрогели, обладающие в зависимости от условий синтеза различными характеристиками. Так, при проведении реакции в жидкой фазе образующиеся гидрогели имели изотропное строение. С другой стороны, в водно-замороженных системах образовывались пористые (анизотропные) гидрогели. Как показано ниже, оба этих типа гидрогелей нашли применение в ряде медико-биологических направлений.

Следует отметить, что в ряде случаев образование сшитых изотропных гидрогелей на основе данных мономеров могло быть проведено после введения в живой организм.

Общая схема получения пространственных макромолекулярных систем на основе макромеров ПВС и ГЭК может быть представлена следующим образом:



При этом в зависимости от задач, определяемых особенностями применения получаемых гидрогелей, соотношение макромеров в получаемых гидрогелях было различным и находилось в пределах 0-100 мол.% по каждому из исходных макромеров.

2.1 Синтез полимерных гидрогелей в незамороженных растворах

При изучении процессов гелеобразования, протекающих в незамороженных растворах, на первоначальном этапе изучалась возможность радиационно-химического синтеза полимерных гидрогелей. Применение радиационного облучения считается весьма удобным инструментом для формирования гидрогелей, в том числе, и гидрогелей на основе ПВС. Изучение радиационно-химического синтеза полимерных гидрогелей проводили на базе Обнинского ФГУП НИФХИ им. Л.Я. Карпова» под руководством проф., д.х.н. Дуфлота В.Р.

Изучение динамики процесса показало, что реакции сшивки при радиационном облучении протекали достаточно эффективно, и уже на ранних стадиях процесса имело место образование полимеризата, иммобилизующего всю содержащуюся в системе воду. При этом следует отметить, что облучение в этих же условиях (температура и концентрация) раствора исходного немодифицированного ПВС не приводила к образованию сшитых структур. В этом случае облученная система представляла собой раствор существенно меньшей вязкости, что свидетельствует о заметной деструкции цепей полимера.

В то же время как для макромеров ПВС, так и макромеров ГЭК достичь значений выхода превышающего 50% гель-фракции не удалось. Основной причиной этого, очевидно, является устанавливающееся в системе динамическое равновесие между процессами сшивки с участием кратных связей боковых групп и деструкции основных цепей полимера.

Полученные при изучении процесса радиационно-химического синтеза экспериментальные данные позволили сделать вывод о невозможности достижения при применении этого метода высоких значений выхода сшитых полимерных гидрогелей, что, очевидно, не позволяет использовать этот путь синтеза для технологически эффективного получения изделий на их основе. Поэтому, в дальнейшем для получения полимерных гидрогелей на основе макромеров ПВС и ГЭК использовалась сшивка по свободно-радикальному механизму в присутствии инициаторов радикальной полимеризации.

При проведении этих процессов были использованы две окислительно-восстановительные системы, позволяющие проводить реакцию при низких температурах. В случае получения гидрогелей, которые перед применением могли быть дополнительно очищены, использовалась стандартная иницирующая система

персульфат калия - N,N,N'N'-тетраметилэтилендиамин» (ПСК–ТМЭД), обеспечивающая высокую эффективность и воспроизводимость результатов в широком интервале температур.

В случае образования из макромеров гидрогелей в среде живых тканей в качестве инициатора использовали систему «перекись водорода - аскорбиновая кислота» (ПВ-АсК) – сравнительно редко используемую при синтезе гидрогелевых материалов, преимуществом которой является ее меньшая токсичность, что дает возможность безвредного формирования полимерных гидрогелей *in vivo*.

Кроме того, была исследована сшивка мономеров при повышенных температурах в присутствии ПСК.

Изучение динамики процесса формирования изотропных полимерных гидрогелей на основе ненасыщенных производных ПВС и ГЭК показало, что в используемых условиях реакции сшивки протекают достаточно эффективно, время же за которой происходило формирование гидрогелей, изменяется в зависимости от условий процесса, от нескольких секунд до десятков минут.

Протекание процессов гелеобразования в растворах модифицированного ПВС происходило более эффективно, чем в растворах модифицированного ГЭК, в силу чего увеличение относительной доли модифицированного поливинилового спирта в смеси макромеров вело к повышению выхода сшитых полимерных гидрогелей. Особенно заметно данный эффект наблюдался в области сравнительно низких концентраций реакционной системы, при которых эффективность сшивки в растворах ГЭК достаточно мала.

Изучение составов образующихся полимерных гидрогелей показало, что соотношение звеньев сомономеров в составе гидрогелей практически во всем интервале изменяемых параметров процесса сшивки (соотношение сомономеров, тип и количество инициатора, концентрация реакционной системы и т.д.) было близко к соотношению в исходной смеси сомономеров.

2.1 Полимеризация макромеров в замороженных системах

Особое место среди полимерных гидрогелей занимают, макро - и суперпористые полимерные гидрогели, то есть гидрогелевые системы, обладающие пористостью с размером пор десятки и сотни микрометров.

Наличие в структуре таких гелей системы связанных между собой пор обеспечивают им высокую удельную поверхность, доступность функциональных групп для присоединяемых лигандов, отсутствие диффузионных затруднений при сорбции и десорбции веществ с широким спектром значений молекулярных масс, и ряд других уникальных свойств, позволяющих успешно использовать их в таких бурно развивающихся областях как клеточная и тканевая инженерия, а также в качестве компонентов систем с контролируемым выделением лекарственного вещества, материалов для имплантатов и пломбировочных материалов в хирургии, высокоэффективных сорбентов для разделения и очистки белков, а также целом ряде других областей связанных с медициной.

В данной работе для получения макропористых гидрогелей на основе ненасыщенных производных полимеров нами был использован наиболее технологичный, на наш взгляд метод - формирование трехмерной полимерной матрицы в присутствии гетерофазы замороженного растворителя (воды), когда образование сшитой макромолекулярной системы протекает в концентрированном растворе макромеров в межкристаллическом пространстве. Данный технологически

простой метод позволяет в широком интервале менять свойства получаемых гидрогелей, позволяя получать материалы с оптимальными для каждой конкретной области применения характеристиками.

Помимо гидрогелей на основе смесей макромеры ПВС и ГЭК, с целью получения пористых систем, потенциально пригодных для использования в тканевой инженерии, в криоусловиях были получены пористые гели, содержащие дополнительные кислые ($-\text{COOH}$) и основные ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$) группы. В этих случаях пористые гидрогели были синтезированы сополимеризацией макромеров ПВС с акриловой кислотой (АК) и диэтилазилметакрилатом (ДЭАЭМА).

Реакции проводили в интервале температур от минус 5 до минус 25 °С, суммарной концентрации реакционной системы от 1 до 14 мас.%. Для сшивки модифицированных ПВС и ГЭК, как и в случае процессов, проводимых при положительных температурах, использовалась иницирующая система ПСК-ТМЭД. Персульфат калия использовался в качестве инициатора и при сополимеризации модифицированного ПВС и ДЭАЭМА, однако в этом случае ускорителем распада перекиси являлся сам низкомолекулярный сомономер. В случае сополимеризации с АК была использована окислительно-восстановительная система «перекись водорода – аскорбиновая кислота». Выбор такой иницирующей системы определялся низким рН реакционной смеси, связанным с присутствием АК, что не позволяет эффективно использовать в качестве компонента иницирующей системы третичный амин.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в рассматриваемых системах рост суммарной концентрации сомономеров в реакционной смеси, равно как и увеличение концентрации инициатора, как этого и следовало ожидать, закономерно вел к ускорению и эффективности гелеобразования. При этом выход гидрогелей, по сравнению с процессами, протекающими при положительных температурах, был несколько выше.

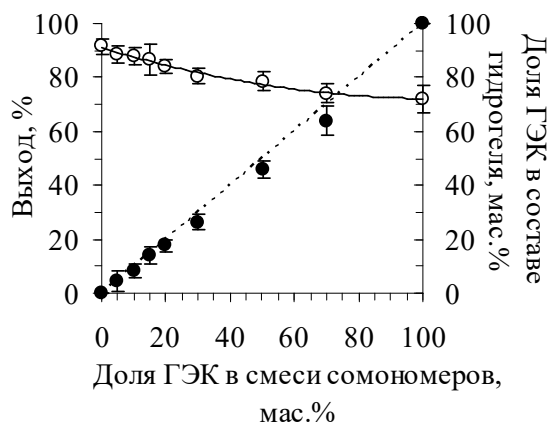


Рисунок 1 - Зависимость выхода (○) и состава (●) образующихся гидрогелей на основе сополимеров макромеров ПВС и ГЭК от соотношения макромеров в реакционной смеси.

(Суммарная концентрация сомономеров 8 г/100 мл, концентрация инициатора 2 мг/мл, температура минус 15 °С).

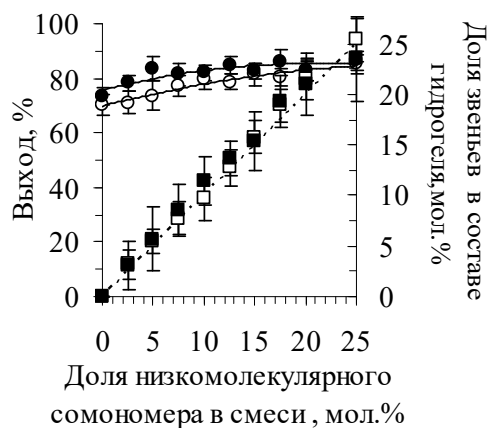


Рисунок 2 - Зависимость выхода (●, ○) и состава (■, □) образующихся гидрогелей на основе сополимеров макромеров ПВС и ГЭК от соотношения макромеров в реакционной смеси.

Смесь сомономеров : (●, ■) – ПВС-АК, (○, □)- ПВС-ДЭАЭМА

Суммарная концентрация сомономеров 7 г/100 мл, температура минус 15 °С

Изучение процессов, протекающих при различных температурах, показало, что зависимость выхода от температуры для всех изученных смесей сомономеров имела

колоколообразный вид, и максимальный выход достигался при температуре порядка минус 14 – минус 17 °С. Такой вид температурной зависимости характерен для процессов, протекающих в криоусловиях, и объясняется наличием конкурирующих явлений ускорения реакции за счет концентрирования реакционной системы при замораживании и ее замедления при снижении температуры согласно закону Аррениуса.

Изучение процессов, протекающих в реакционных системах с различным соотношением сомономеров (поливинилового спирта и гидроксипропилоккрахмала, поливинилового спирта и низкомолекулярного мономера) показало, что увеличение доли низкомолекулярного сомономера вело к увеличению как выхода сшитых гидрогелей, так и скорости гелеобразования, в то время как введение в реакционную систему модифицированного ГЭК, как и в случае гелеобразования при положительных температурах, напротив, приводило к снижению эффективности гелеобразования (рисунки 1-2).

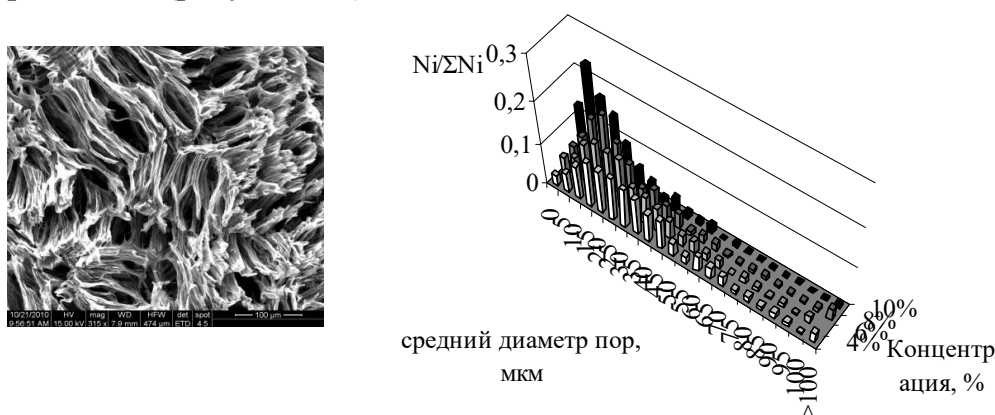


Рисунок 3 - Примеры микрофотографий образцов гидрогелей и диаграмм распределения пор по размерам

Изучение составов образующихся гидрогелей показало, что они были близки к составу реакционной смеси, хотя в случае сополимеризации макромера с низкомолекулярным мономером, при малых концентрациях как АК, так и ДЭАЭМА относительная доля звеньев низкомолекулярного сомономера, вошедших в состав образовавшегося гидрогеля несколько выше доли этого сомономера в исходной мономерной смеси (рисунки 1-2).

Исследование морфологии полученных гидрогелей производилось при помощи сканирующей электронной микроскопии. Примеры полученных микрофотографий представлены на рисунке 3.

Характер образующейся пористой структуры определяется соотношением скоростей кристаллизации и формирования полимерной фазы. В силу этого влияние различных факторов, характеризующих условия протекания процесса, различно. Так, концентрация инициатора в широком диапазоне значений этого параметра практически не сказывалась на пористости образующихся гидрогелей и характере распределения его пор по размерам. Изменение температуры и суммарной концентрации сомономеров в реакционной системе вело к более очевидному изменению характеристик пористой структуры образующихся полимерных гидрогелей. Увеличение концентрации реакционной системы вело к монотонному снижению общей пористости, увеличению доли фракции относительно мелких пор и сужению распределения пор по размерам. При изменении же температур от минус

10°C до минус 25°C происходило монотонное снижение среднего размера пор, сужение диапазона изменения размера пор и обогащение системы более мелкими порами.

3 Оценка параметров сетки полимерных гидрогелей

Характер взаимодействия полимерного гидрогеля с организмом, например срок его биodeградации, проницаемость для различных веществ и клеток и т.п., его механические физико-химические свойства в значительной степени определяются характером трехмерной полимерной сетки, образующейся при формировании гидрогеля.

В силу этого, нами была проведена оценка характера полимерной сетки синтезированных гидрогелей на основе модифицированного поливинилового спирта (Исследования проводились совместно с Отделом полимеров и композиционных материалов ИХФ им. Н.Н.Семенова под руководством проф. С.А.Дубровского и Лабораторией структурно-морфологических исследований ИФХЭ им. А.Н. Фрумкина под руководством проф. А.Е.Чалых).

Для определения параметров структуры сетки (концентрации межузловых цепей n_c и длины - степени полимеризации межузловых цепей N) нами был использован подход, основанный на предсказаниях теории упругости полимерных сеток.

Полученные значения выборочно представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Модули упругости и характеристики степени сшивания некоторых исследованных гидрогелей, полученных на основе макромера ПВС (N - степень полимеризации межузловых цепей, n_c - концентрации межузловых цепей в сухой сетке).

Изотропные гидрогели, полученные при положительной температуре					
Концентрация макромера, г/100 мл	Степень замещения, мол. %	Концентрация инициатора, г/л	$n_c \times 10^5$, моль/см ³	N	
				из $G_{\text{преп}}$	из степени замещения
6	4,2	2	2,74	828	24
8	4,2	2	3,80	597	24
10	4,2	2	4,42	514	24
20	4,2	2	7,59	300	24
8	2,5	2	3,66	621	40
8	4,2	2	3,69	616	24
8	8,6	2	3,94	576	12
Макропористые гидрогели, полученные в криоусловиях (температура минус 15 °C)					
4	4,2	1,2	13,01	175	24
6	4,2	1,2	14,19	160	24
8	4,2	1,2	15,27	149	24
10	4,2	1,2	16,77	136	24

Как можно видеть, экспериментальные значения степени полимеризации цепей значительно превышают значения, рассчитанные по степени замещения модифицированного полимера, особенно это заметно для изотропных (монокристаллических) гидрогелей, полученных при положительных температурах. Данный факт является вполне ожидаемым в силу того, что реальная сетка имеет большое количество различных дефектов, которые не участвуют в передаче напряжений в сетке, и,

следовательно, не вносят вклад в ее модуль упругости. При этом экспериментальные значения N для изотропных гелей явным образом зависели от концентрации исходного раствора полимера и от количества инициатора, используемого для приготовления гидрогелей - большим значениям концентрации соответствовали более высокие значения степени сшивания, а при увеличении количества инициатора степень полимеризации цепей уменьшается.

Для гидрогелей же, полученных в криоусловиях, значения данной характеристики изменялись достаточно слабо и были сравнимы со значениями плотности сшивки трехмерной сетки образцов, синтезированных при положительных температурах полимеризацией достаточно концентрированных (порядка 20 г/100 мл.) растворов макромера ПВС, что, очевидно, связано с концентрированием раствора полимера в межкристаллическом пространстве при вымораживании растворителя.

Помимо метода, основанного на измерении метода упругости для изучения характера сеток синтезированных гидрогелей, была предпринята попытка определения частоты сшивания гелей на основании данных об их равновесном набухании в воде с использованием теории набухания нейтральных гелей. Однако при изучении равновесного набухания гидрогелей была обнаружена их чувствительность к добавкам низкомолекулярных электролитов, что не характерно для нейтральных гидрогелей и свидетельствует о наличии в полимерной сетке геля заряженных (ионизованных) звеньев.

4 Исследование сорбции белка на поверхности гидрогелей

Сорбция белков на поверхности является важным этапом процесса клеточной адгезии. Это связано с тем, что субстратзависимые клетки контактируют с материалами через слой адсорбированных на их поверхности по механизму «лиганд – рецептор» белков. Таким образом, модификация поверхности, потенциально, позволяет регулировать прикрепление и распространение клеток различных типов, например, остеобластов и фибробластов, влияя тем самым на их дифференциацию и рост.

Одним из возможных путей создания поверхностей, способных сорбировать белки различного строения является введение в состав материала заряженных групп. Именно этот подход и был применен нами в настоящей работе. С целью оценки сорбционной способности синтезированных макропористых гидрогелей, содержащих заряженные группы, нами была исследована иммобилизация на них модельного белка. В качестве модельного белка использовался бычий сывороточный альбумин, являющийся удобной и широко распространенной моделью для изучения свойств глобулярных белков.

Было выявлено, что большая часть альбумина 90-95% сорбируется в первые 5-6 часов, причем сорбция на аминоксодержащем носителе протекает несколько быстрее. Количество альбумина, связываемого на поверхности гидрогелей, не содержащих ионогенных групп, составляло порядка 25 ± 5 мг/г, поэтому можно констатировать, что связывание белка на поверхности синтезированных гидрогелей происходит за счет образования ионных связей между карбоксильными и аминогруппами матрицы полимерного гидрогеля с концевыми амино- и карбоксильными группами аминокислот, находящихся в связывающих доменах белка. Примечательно, что образующиеся связи достаточно прочны, и даже при продолжительной инкубации полимерного гидрогеля с включенным БСА и в дистиллированной воде, и буферных

растворах с различной ионной силой и величиной pH, нам не удалось выявить заметной десорбции белка с поверхности гидрогелевого носителя.

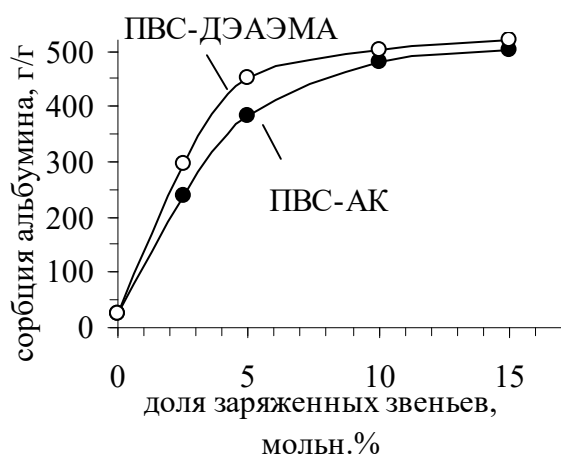


Рисунок 4 - Зависимость сорбции альбумина (мг альбумина/ г носителя) от концентрации заряженных звеньев.

В силу ионного связывания БСА на поверхности гидрогеля, количество связываемого альбумина емкость по альбумину возрастало по мере роста количества ионогенных групп, достигая максимума при ~10 мол. % (рисунок 4). Прекращение роста количества связываемого белка, связано, очевидно, с возникающими, после того как площадь монослоя молекул сорбированного альбумина приближается к площади удельной поверхности пористого гидрогеля, стерическими затруднениями

5 Взаимодействие гидрогелей с биологическими объектами

Несмотря на широкое применение различных производных поливинилового спирта и крахмала в медико-биологических областях, их санитарно-гигиенические и токсикологические характеристики исследованы недостаточно. И конечно, это относится к впервые синтезированным ненасыщенным производным и сшитым системам на их основе, полученным в данной работе. Поэтому значительное внимание в работе было уделено различным аспектам, связанным с биосовместимостью синтезированных макромолекулярных систем и в первую очередь с их токсичностью.

5.1 Оценка токсичности гидрогелей на основе макромеров ПВС и ГЭК

Для оценки токсичности использовался комплекс методов, рекомендуемых стандартами серии ISO 10993, таких как изучение гемолитической активности (гемолитический тест), цитотоксического действия с определением индекса токсичности при воздействии на биологический клеточный тест-объект, а также исследование материалов в условиях острого, подострого и хронического токсикологического экспериментов *in vivo*. Также проводились исследования по изучению раздражающего и сенсибилизирующего действия образцов полимерных гидрогелевых материалов.

Общетоксическое действие гидрогелей оценивали в остром токсикологическом эксперименте. Как было установлено, водные вытяжки из всех образцов гидрогелевых материалов были свободны от гемолитически действующих веществ. Не обнаруживалось и отрицательного воздействия на жизнеспособность биологического клеточного тест-объекта (суспензионная кратковременная культура подвижных половых клеток, приготовленная из замороженной спермы крупного рогатого скота)- индекс токсичности составил 78,0-98,0% (допустимый уровень - 70-120%).

При внутрибрюшинном введении вытяжек из образцов не отмечено гибели подопытных животных (белые беспородные мыши), изменений внешнего вида, поведения, двигательной активности по сравнению с контрольной группой. На

вскрытии макроскопически не было выявлено патологических изменений внутренних органов и тканей. Органо-соматические показатели (ОСП) подопытных животных не имели статистически достоверных отличий от аналогичных показателей контроля

Изучение образцов гидрогелей на основе ПВС и ГЭК в подостром токсикологическом эксперименте показало отсутствие местнораздражающего и сенсибилизирующего действия, о чем свидетельствовала кожная реакция в месте проведения предварительной сенсибилизации, многократных накожных аппликаций и провокационной внутрикожной пробы, а также значение показателя РСЛЛ (реакция специфического лизиса лейкоцитов), которое не превышало допустимый уровень, равный 10,0%

Изучение подострой и хронической токсичности гидрогелевых материалов проводили на беспородных белых крысах-самцах в двух группах экспериментов - с использованием водных растворов исходных макромеров и иницирующей системы (ПВ-АК) и с имплантацией заранее приготовленных пористых гидрогелей. Контрольным животным в тех вживляли образцы медицинского стекла марки ВС-3 ГОСТ 19808. В течение всего эксперимента проводили наблюдения за внешним видом поведением, двигательной активностью подопытных и контрольных животных и определяли прирост массы тела. В конце эксперимента (через 3 мес. после имплантации) животных обследовали с использованием физиологических, гематологических, биохимических методов. Состояние центральной нервной системы оценивали по способности к суммации подпороговых импульсов, то есть, определению суммационно-порогового показателя (СПП).

Кроме того, в качестве интегрального показателя состояния организма животных использовали показатель двигательной работоспособности, определяемый по времени движения на роторной установке.

У всех подопытных и контрольных животных не было обнаружено статистически достоверных изменений массы тела, суммационно-порогового показателя и двигательной работоспособности. Клинико-биохимические показатели периферической крови тоже были близки к показателям контроля. Все показатели подопытных и контрольных животных соответствовали физиологической норме. Проведенные исследования позволили констатировать, что реакция организма экспериментальных животных на введение образцов разработанных материалов заключалась на начальных стадиях в минимальной воспалительной тканевой реакции, при этом отсутствовала нейтрофильная инфильтрация и макрофагальная реакция в окружающей ткани. На начальных стадиях после имплантации формировалась тонкая соединительно-тканная капсула, что свидетельствует о сравнительной биоинертности материалов.

На последующих стадиях имела место биодеградация имплантированных образцов материалов за счёт прорастания в них соединительной ткани и макрофагальной резорбции, а также вследствие бесклеточного лизиса непроращенной части имплантата. Причем, скорость биодеградации возрастала с увеличением доли ГЭК в составе образца.

Изучение внутренних органов не обнаружило видимых отличий от контрольной группы за исключением незначительного увеличения числа купферовских клеток в печени. Можно предположить, что купферовские клетки как макрофаги реагируют на мельчайшие частицы имплантированного материала, попадающие в печень. Всё это говорит об отсутствии заметной токсичности материалов.

Помимо подкожной имплантации, рекомендуемой для изучения токсичности стандартами серии ISO 10993, изучалось взаимодействие разработанных полимерных материалов с организмом, при их имплантации в мышечные ткани, экстраплевральное пространство, спинномозговой канал, супрахороидальное пространство глаза, желчный пузырь и желчевыводящие протоки.

Во всех случаях имплантированные гидрогелевые материалы демонстрировали низкую токсичность, отсутствие ярко выраженной местной воспалительной реакции и способность к биодеградации с замещением тканями организма.

5.2 Оценка токсичности функциональных гидрогелей на основе макромеров ПВС

Поскольку одной из основных рассматриваемых областей применения макропористых гидрогелей на основе макромеров ПВС спирта содержащего заряженные группы являлось использование их в качестве 3D-матриц для выращивания клеток, для оценки их токсичности использовались стандартные методики экстракт- и контакт-тестов. Данные исследования проводились совместно с ИБХ РАН (лаборатория полимеров для биологии, проф. Е.А.Марквичева). В качестве клеточной модели использовалась линия мышечных фибробластов (L929). Для определения количества жизнеспособных клеток использовали метод МТТ-теста (колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток).

Полученные данные свидетельствовали о наличии в объеме образцов токсичных веществ, вызывающих гибель клеток на начальных этапах культивирования. На основании полученных данных был сделан вывод о необходимости дополнительной отмывки гидрогелей после проведения термической стерилизации, либо использовании альтернативных методов стерилизации.

В экстракт-тестах, проведенных для отмывки после стерилизации образцов, обнаруживаемый процент выживаемости клеток для всех образцов, вне зависимости от их состава, был близок к контролю. Таким образом, можно заключить, что разработанные полимерные гидрогели в случае использования мягких условий стерилизации, либо дополнительной отмывки перед применением характеризуются сравнительно низкой цитотоксичностью и потенциально могут быть использованы в качестве основы матриц для выращивания клеток и тканей.

С целью изучения хронической токсичности и реакции тканей на синтезированные полимерные макропористые гидрогели, содержащие заряженные группы проводились эксперименты по их имплантации. В качестве экспериментальных животных выступали нелинейные белые половозрелые крысы. Образцы гидрогелей имплантировали в мышечные ткани экспериментальных животных. Забор материала осуществлялся на 7, 21 сутки и спустя 2,3,4,6 месяцев.

Материалом для гистологических и гистохимических исследований служили образцы мышечной ткани, изъятые из места имплантации.

При изучении полученных в результате эксперимента биологических материалов было установлено, что при имплантации всех исследованных образцов гидрогелей, содержащих заряженные группы, на ранних сроках (7 дней, 21 день), наблюдается воспалительная реакция грануляционного характера с образованием фиброзной капсулы без рубцевания.

При этом степень развитости воспалительной реакции, о которой можно было судить по величине отека, толщине и строению фиброзной капсулы и количеству лимфоцитов, была различна для образцов различного строения. Интенсивность

воспалительной реакции возрастала с ростом количества звеньев низкомолекулярного сомомера в составе гидрогеля. Причем, для гидрогелей содержащих звенья ДЭАЭМА эта зависимость была выражена более очевидно, нежели для гидрогелей со звеньями АК.

При продолжительных сроках имплантации имело место постепенное замещение имплантата тканями организма. Практически для всех имплантированных образцов гидрогелей уже спустя 3 месяца макроскопически имплантат не обнаруживался, однако при микроскопическом исследовании полученных на этих сроках имплантации гистологических препаратов можно было обнаружить фрагменты гидрогелевого материала, распределенных в объеме новообразовавшихся тканей.

Таким образом, на основании полученных данных можно утверждать, что разработанные полимерные гидрогели, содержащие ионогенные группы, в целом, характеризуются достаточной биосовместимостью и способностью к биодеградации с замещением собственными тканями организма. При этом скорость процесса биодеградации и тип и морфология тканей, образующихся в области имплантата, определяется химическим составом полимерных гидрогелей.

5.3 Биодеградация гидрогелей

При имплантации образцов макропористых полимерных гидрогелей на основе поливинилового спирта в рамках изучения их хронической токсичности, было установлено, что распад этого типа материалов происходит за счёт биодеградации под действием макрофагов после прорастания в них соединительной ткани. Причем, динамика деградации изотропных гидрогелей заметно уступает динамике биодеградации макропористых образцов. Последний факт в сочетании с отсутствием заметного бесклеточного лизиса непророщенной части имплантата может свидетельствовать о значимом влиянии степени развитости пористой структуры гидрогеля, определяющей доступность его внутреннего объема для растущих тканей, на процесс его биодеградации.

С целью проверки данного предположения был проведен эксперимент по изучению динамики биодеградации образцов полимерных гидрогелей с различной пористостью.

Эксперимент проводили на беспородных крысах-самцах. Образцы представляли собой цилиндры диаметром 0,7 мм и длиной 1 см.

Из эксперимента животные выводились спустя 1,2,3,4,6 месяцев. Материалом для гистологических исследований служили образцы мышечной ткани, изъятые из места имплантации.

Было установлено, что степень развитости пористой структуры существенно влияла на динамику биодеградации имплантированных образцов - с ростом общей пористости и среднего размера скорость изменения размера имплантированного образца снижалась (рисунок 5).

Таким образом, изменяя пористую структуру полимерных гидрогелей, определяемую условиями проведения процесса гелеобразования, можно в определенной степени влиять на характер их поведения при контакте с внутренними средами организма. Однако стоит отметить, что интервал, в котором может изменяться скорость биодеградации разработанных гидрогелей на основе «чистого» поливинилового спирта, сравнительно узок, а сроки биодеградации достаточно велики для целого ряда практических задач.

В силу этого, как это отмечалось ранее, нами были разработаны полимерные гидрогели на основе ПВС и ГЭК. В этом случае наличие фазы ГЭК, характеризующегося способностью к бесклеточному лизису должно было увеличивать скорость биодеградации таких гидрогелей по сравнению с материалами на основе «чистого» поливинилового спирта.

Данное предположение было подтверждено при проведении имплантационных экспериментов в рамках изучения хронической токсичности подобных полимерных гидрогелей.

С целью более детального изучения данной зависимости был проведен эксперимент по изучению динамики биодеградации образцов полимерных гидрогелей различного состава. Эксперимент проводили аналогично эксперименту с образцами с различной пористостью.

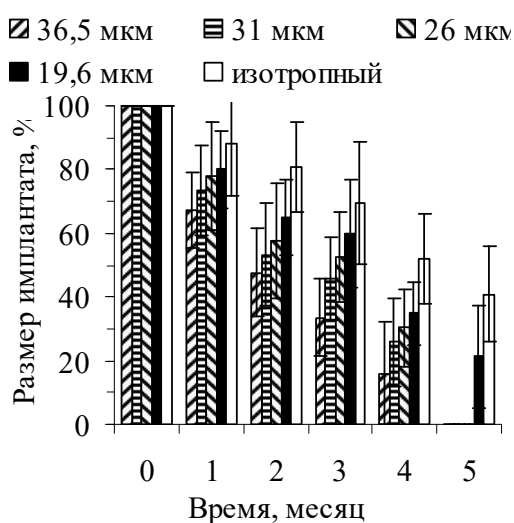


Рисунок 5 - Динамика изменения размеров имплантированных образцов гидрогелей ПВС с различным размером пор

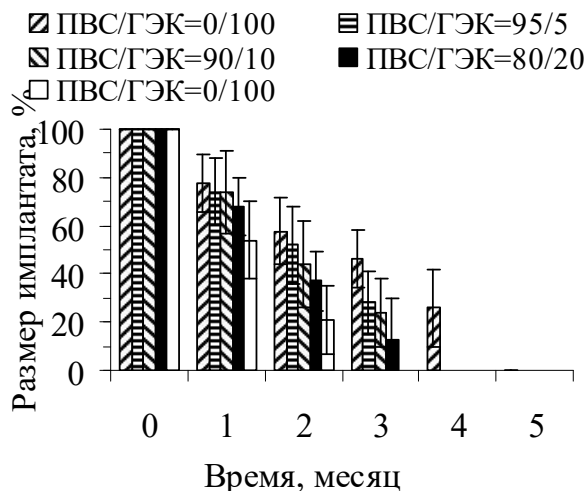


Рисунок 6 - Динамика изменения размеров имплантированных образцов гидрогелей на основе ПВС и ГЭК с различным содержанием ГЭК

Полученные экспериментальные данные приведены на рисунке 6. Как можно видеть, даже небольшое количество введенного в состав гидрогеля ГЭК приводит к заметному ускорению биодеградации введенного имплантата. Данный факт, очевидно, связан с ускорением фрагментирования образца вследствие ферментативного бесклеточного лизиса участков ГЭК, упрощающим биодеструкцию макромолекул материала макрофагами и гигантскими клетками инородного тела.

Таким образом, было показано, что полученные гидрогели на основе макромеров ПВС и ГЭК обладали высокой биосовместимостью, а регулирование их состава позволяет получать материалы с заданной скоростью биодеградации.

Ускорение биодеградации полимерных гидрогелей, как это было показано в предыдущем разделе, наблюдалось и при введении в их состав звеньев акриловой кислоты и диэтиламиноэтилметакрилата. Как можно видеть (рисунок 7 и 8), и в данном случае даже при сравнительно небольшом изменении состава гидрогелей удавалось наблюдать заметное ускорение его биодеградации.

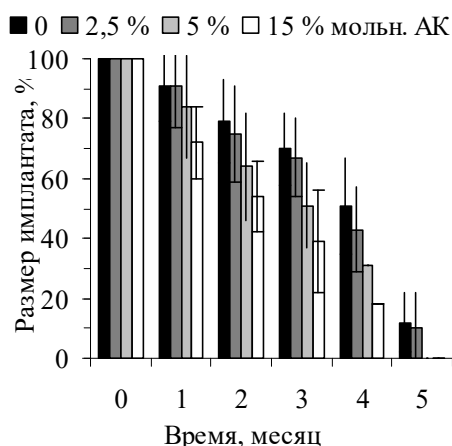


Рисунок 7 - Динамика изменения размеров имплантированных образцов гидрогелей на основе ПВС и АК различного состава

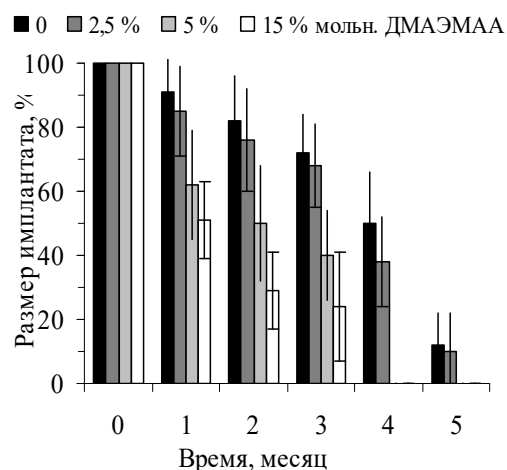


Рисунок 8 - Динамика изменения размеров имплантированных образцов гидрогелей на основе ПВС и ДЭАЭМА различного состава

Однако, по сравнению с материалами, содержащими 2-гидроксиэтилкрахмал, «заряженные» гидрогели вызывали более заметную воспалительную реакцию, возрастающую по мере роста содержания звеньев акриловой кислоты и ДЭАЭМА. Данный факт, очевидно, несколько снижает спектр возможных применений подобных материалов в изделиях, контактирующих с внутренними средами организма.

6 Применение гидрогелей на основе макромеров ПВС и ГЭК

6.1 Исследование возможности использования в качестве матриц для выращивания клеток и тканей

Отсутствие заметной токсичности и способности к биодegradации, продемонстрированные образцами полученных полимерных гидрогелей делает их привлекательными с позиций использования в качестве основы для матриц для выращивания клеток и тканей.

В силу этого нами было проведено исследование взаимодействия образцов разработанных макропористых гидрогелей с культурами клеток различных типов. На первом этапе проводилось изучение макропористых гидрогелей на основе «чистого» поливинилового спирта (работы проводились совместно с НИИ СП им. Н.В. Склифосовского под руководством проф. М.М. Голдина)

Для исследования использовали следующие типы клеток:

- линия диплоидных клеток эмбриона человека (ЛДКЧ);
- фибробласты кожи кадавера (ФКК);
- перевиваемая линия клеток тимуса поросенка (ЛПК тимуса поросенка);
- клетки эмбриональной печени человека (КЭПЧ).

Во всех случаях при контакте с культурами клеток образцы исследуемых гидрогелевых материалов не проявляли признаков заметной токсичности: клетки сохраняли прозрачность, четкую очерченность, имели характерную для культур морфологию, не содержали включений. Структурная целостность клеток тестируемых культур не претерпевала видимых изменений на протяжении всего срока культивирования.

Присутствие образцов гидрогелевого материала в культуре практически не влияло на пролиферативную активность клеток (таблица 2). Однако процесс

заселения макропористых гидрогелей клетками ЛДКЧ и ФКК был выражен весьма слабо, появление отдельных клеток на поверхности материала отмечалось лишь на 3-4-е сутки после посева. Можно предположить, что это обусловлено миграцией фибробластов ЛДКЧ и ФКК из сформировавшегося к тому времени плотного монослоя.

При этом количество прикрепленных на поверхности образцов клеток составило к концу 4 суток 0,01-0,02 тыс./см², к концу 5-х суток - 0,03-0,04 тыс./см², к концу 7-х суток - 0,05-0,1 тыс./см², что указывает на весьма низкую скорость заселения. При этом по истечении 7-х суток популяция фибробластов линии ЛДКЧ и ФКК на поверхности образцов была представлена в виде разрозненных, далеко расположенных друг от друга клеток, что указывает на отсутствие у них пролиферативной активности. На основании этого может быть сделан вывод о том, что в течение эксперимента заселение образцов гидрогелевого материала клеточными компонентами происходило исключительно за счет миграции отдельных клеток.

Таблица 2- Индексы пролиферации культур клеток в контроле и в присутствии исследуемых материалов

Тип клеток*		Количество клеток (на лунку), 10 ⁻³			Индекс пролиферации	
		посадка	контроль	образец	контроль	образец
ФКК	суспензия	130	250	236	1,92	1,81
	монослой	115	240	235	2,08	1,04
ЛДКЧ	суспензия	32	32	36	1	1,1
ЛПК тимуса поросенка	суспензия	30	280	268	9,3	8,93
	монослой	20	287	280	14,3	14
КЭПЧ	суспензия	110	178	187	1,62	1,7

* ФКК - фибробласты кожи кадавера, ЛДКЧ - линия диплоидных клеток эмбриона человека, ЛПК - перевиваемая линия клеток, КЭПЧ - клетки эмбриональной печени человека.

Выявленный факт низкой пролиферативной активности, очевидно, может быть обусловлен избыточной гидрофильностью поверхности поливинилового спирта, ведущей к низкой адгезии данных типов клеток на поверхности субстрата, поскольку все клетки на поверхности образцов имели округлую или овальную форму, не характерную для распластанных фибробластов линии ЛДКЧ и ФКК.

В культуре клеток тимуса поросенка заселение образцов было отмечено уже по истечении суток. На поверхности гидрогелевого материала были выявлены одиночные клетки тимуса поросенка, а также небольших группы по 2-7 клеток, что указывает на наличие у них пролиферативной активности. Прикрепленные на материале изделий клетки тимуса поросенка имели характерную для них форму и нормальные значения ЦКМ. Вместе с тем, количество прикрепленных клеток в составе образцов не превышало 5 тыс./см² по истечении 5-ти суток наблюдения и 10-12 тыс./см² – 10 суток, то есть, заселенность образцов клетками всё же была достаточно низкой.

В отличие от вышеописанных культур клеток, в эксперименте со стволовыми клетками печени человека через 24 часа культивирования наблюдалось активное прикрепление и концентрирование клеток на поверхности гидрогелевого материала.

По истечении суток культивирования основная масса клеток была всё ещё сосредоточена в верхних слоях и на поверхности образцов гидрогелей, однако отдельные клетки обнаруживались уже и в объеме образца. Клетки на поверхности и в объеме гидрогелевого материала характеризовались фенотипом, свойственным недифференцированным клеткам: крупное ядро окружено узким ободком цитоплазмы.

На протяжении последующей культивации клетки эмбриональной печени человека мигрировали вглубь матрикса и к 14-м суткам равномерно заселяли весь его объем, при этом клетки по-прежнему сохраняли фенотип недифференцированных клеток, а, следовательно, и способность к делению и дифференцированию.

Таким образом, разработанные пористые гидрогели на основе сшитого ПВС являются нетоксичным для целого ряда клеточных культур, однако адгезия клеток на их поверхности, как правило, отсутствует, или является недостаточной. В тоже время, для некоторых типов клеток материал демонстрирует удовлетворительные матриксные свойства.

Одним из путей улучшения адгезии и пролиферации клеток на поверхности биоинертных полимерных носителей является изменение их поверхностного заряда посредством введения в их состав заряженных групп.

Внедрение на поверхность носителя заряженных групп обеспечивает наличие необходимых активных участков, вследствие чего становится возможным адсорбция различных биомолекул, первую очередь белков. Существенно, что белки, имея на своей поверхности как положительно, так и отрицательно заряженные группы, могут сорбироваться на поверхности носителей, имеющих различный заряд. Именно через этот слой, адсорбированные клетки взаимодействуют с полимерными поверхностями.

В рамках настоящей работы изучались как «положительно», так и «отрицательно» заряженные носители, на основе макропористых гидрогелей ПВС дополнительно содержащих функциональные группы ДЭАЭМА и АК, соответственно. Исследования проводились с использованием культур клеток мышинных фибробластов линии L929 и человеческих мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (работы проводились совместно ИБХ РАН, лаборатория полимеров для биологии, проф. Е.А.Марквичева).

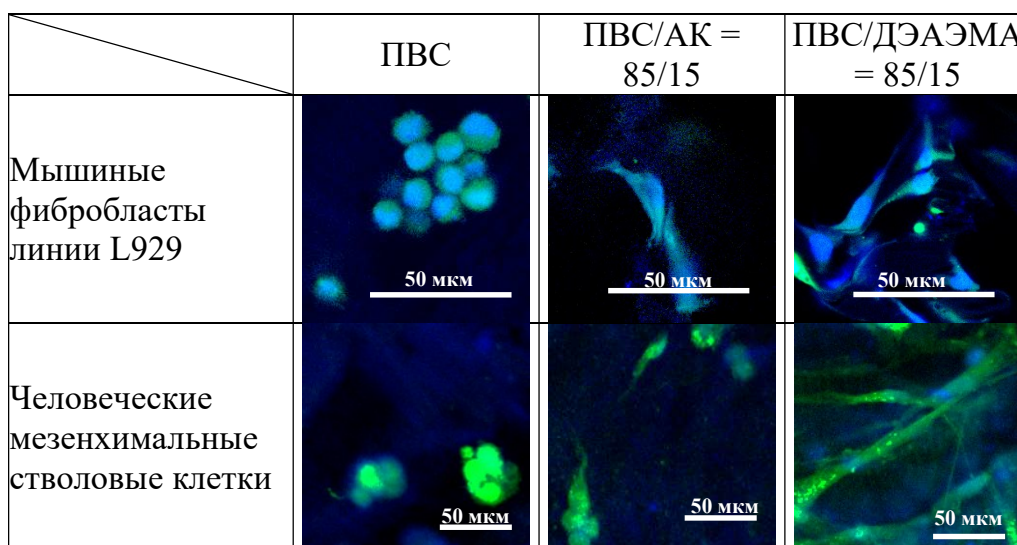


Рисунок 9 - Конфокальные микрофотографии мышинных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток на полимерных гидрогелях. Срок культивирования 7 дней

Клетки высевали на поверхности гидрогелевых носителей и культивировали в течение 1 недели. Как можно видеть на фотографиях (Рисунок 9), по истечении 7 дней культивирования на поверхности всех образцов обнаруживались жизнеспособные клетки. Однако их количество и морфология в значительной степени зависели от состава гидрогелевого материала. В образцах, представляющих собой носители на основе «чистого» поливинилового спирта, клетки находились преимущественно в составе крупных агрегатов, что еще раз подтверждает сделанный вывод о незначительной адгезии и пролиферации клеток на поверхности таких носителей. Введение же в состав материалов заряженных групп приводило к распластыванию клеток на поверхности носителя и более заметному заселению его клетками. Как можно видеть, введение в состав гидрогеля небольших количеств заряженных сомономеров приводило к увеличению количества клеток веретенообразной формы, а при дальнейшем увеличении количества заряженных групп имело место их распластывание и закрепление на поверхности носителя. При этом введение звеньев ДЭАЭМАА приводило к более явному эффекту, нежели введение звеньев АК, что особенно заметно для культуры мезенхимальных стволовых клеток. Как можно видеть, распластывание клеток в этом случае наблюдалось лишь на поверхности образцов содержанием звеньев акриловой кислоты порядка 15 мол. %.

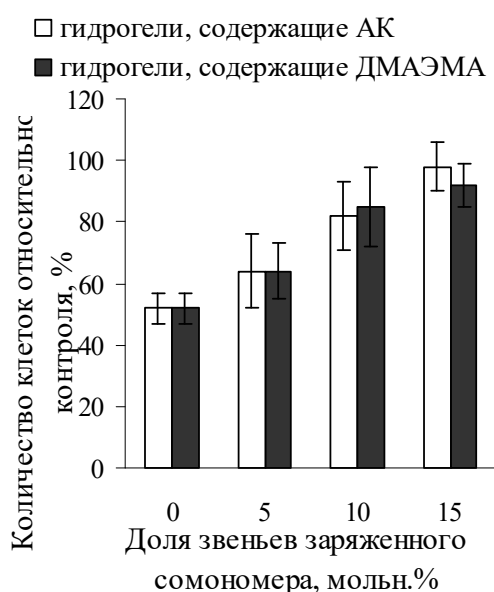


Рисунок 10 – Зависимость роста клеток мышинных фибробластов линии L929 от состава гидрогелей. Время культивирования 7 дней. (За 100% принято количество клеток монослоя, растущих в стандартных условиях)

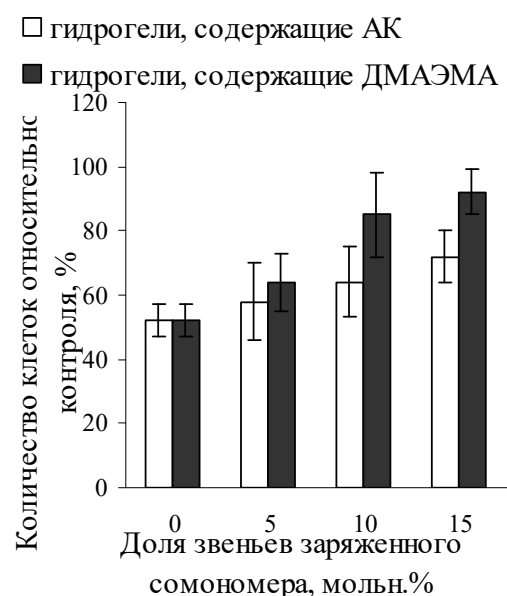


Рисунок 11 – Зависимость роста МСК от состава гидрогелей. Время культивирования 7 дней. (За 100% принято количество клеток монослоя, растущих в стандартных условиях)

Для количественной оценки роста клеток на разработанных полимерных гидрогелях использовали метод МТТ. Как можно видеть из приведенных зависимостей (рисунки 10-11), пролиферация клеток имела место во всех образцах, но ее скорость была различна для использованных в работе типов клеток. Как можно видеть, скорость роста числа клеток зависела от типа, заряженного сомономера и его количества в составе гидрогелевого материала. Наиболее заметное ускорение роста

числа жизнеспособных клеток имело место для гидрогелей, содержащих положительно заряженный ДЭАЭМА, и возрастало по мере роста доли низкомолекулярного сомомера в составе гидрогелей.

Данный факт, очевидно, связан с продемонстрированным выше улучшением адгезии и клеток на таких полимерных носителях. Для гидрогелей, содержащих звенья акриловой кислоты, улучшение роста клеток было не столь очевидным, что также хорошо соотносится с результатами микроскопических исследований. Тем не менее, и в этом случае имело место ускорение темпов роста клеток по сравнению с гелями на основе «чистого» поливинилового спирта.

Таким образом, можно утверждать, что введение в состав полимерных гидрогелей поливинилового спирта заряженных групп положительно влияет на поведение клеток при их культивации на поверхности таких гидрогелей, улучшая, в частности их адгезию и распластывание, что является необходимым условием для нормального роста и пролиферации. Данный факт позволяет рассматривать такие полимерные системы как перспективные материалы для создания матриксов для клеточной и тканевой инженерии для определенных типов клеток.

6.2 Использование сшитых гидрогелей ПВС в качестве раневых покрытий

Комплекс демонстрируемых разработанными макропористыми полимерными гидрогелями свойств – развитая пористость, способность к сорбции и удерживанию больших объемов жидкости, биосовместимость, низкая токсичность, пластичность, позволял сделать предположение о принципиальной возможности создания на их основе высокоэффективных раневых покрытий. С целью проверки данного предположения нами была проведена оценка полученных ранее результатов и проведен ряд дополнительных исследований, позволивших проверить данное предположение. (Работы проводились совместно РМАПО РАМН под руководством проф. С.М. Чудных).

Изучение закономерностей влияния полимерных гидрогелевых материалов на течение раневого процесса проводилось на примере ожоговой раны. В качестве экспериментальных животных выступали крысы, раны площадью 4 см² наносились под эфирным наркозом в межлопаточной области.

Было обнаружено, что у экспериментальных животных в первой (гнойно-некротической фазе) раневого процесса раны ожидаемо характеризовались высокой степенью гидратации как раневых, так и околораневых тканевых структур, сопровождавшейся нарушением локальной гемомикроциркуляции, приведшей к нарушению обменных процессов в области раны. При этом, однако, благодаря наличию у находившегося на поверхности раны макропористого гидрогелевого материала хороших сорбционных свойств, имела место хорошо выраженная дегидратация тканевых структур, сопровождавшаяся элиминацией из области раны токсинов и медиаторов воспалительного процесса.

Во второй фазе раневого процесса (фаза грануляции) раны экспериментальных животных характеризовались отсутствием перифокального отека и гиперимии. Основным заданием лечения в этот период раневого процесса является защита грануляционной ткани от механической травмы, высыхания, профилактика повторного инфицирования и стимуляция регенеративно-репаративных процессов. Используемый гидрогелевый материал полностью отвечал этим требованиям.

В третьей фазе раневого процесса у экспериментальных животных используемый гидрогелевый материал обеспечил реорганизацию грануляционной

ткани, направленную на формирование гистоструктур, характерных для нормальной кожи.

По сравнению с контрольной группой, в которой для лечения использовали коммерческое раневое покрытие на основе окисленной целлюлозы, у животных экспериментальной группы реорганизация грануляционной ткани в кожу происходило в 2-2,5 раз быстрее, что приводило к заметному сокращению сроков заживления с $19,27 \pm 1,4$ у контрольной группы животных, до $9,1 \pm 1,1$ суток у животных экспериментальной группы.

Существенно, что у животных экспериментальной группы на местах бывших ран были расположены сформированные кожные покровы с меньшим количеством волос, не возвышавшиеся над окружающей кожей и имевшие идентичный с ней цвет. У животных же, входивших в контрольную группу, на месте ран наблюдалось формирование рубцов бледно-розового цвета, имевших гладкую поверхность, и также не возвышавшихся над уровнем окружающей кожи.

Все вышеизложенное дало возможность сделать вывод о высокой эффективности исследованного гидрогелевого материала при лечении ран. В силу этого данный материал стал основой для разработанного нами раневого покрытия «ММ-Гель», получившего сертификат соответствия и допущенного для применения на территории Российской Федерации.

В рамках апробации данного раневого покрытия проводилось сравнение его эффективности при лечении хронических ран с традиционными перевязочными средствами (работы проводились на базе ФФМ МГУ им.М.В. Ломоносова Д.Е.Лесовым). Был проведен анализ результатов лечения 120 пациентов, страдающих хроническими ранами, различной этиологии.

Проведенное исследование показало, что использование раневого покрытия ММ-Гель ведет к заметно лучшим, с позиций полноты заживления хронических ран, результатам по сравнению с традиционными раневыми покрытиями. На основании полученных результатов можно утверждать, что для всех пациентов использование данного раневого покрытия вело к полному восполнению дефектов тканей с образованием нормальных анатомических структур, сопровождающемуся, что немаловажно, заметным снижением болевых ощущений в области дефекта и приводящему к быстрой регенерации кожных покровов. Весьма существенно, что внешний вид, упругость и эластичность образованной в процессе заживления дермы заметно отличаются от рубцовой ткани и близки к аналогичным характеристикам нормальной кожи.

6.3 Использование гидрогелевых материалов на основе сшитого ПВС образуемых *in vivo*

Одним из преимуществ, изотропных полимерных гидрогелей, разработанных в рамках данной работы, является возможность их формирования непосредственно во внутренних средах и полостях организма. Данный факт делает возможным разработку на их основе систем для малоинвазивной хирургии, которые могут быть использованы в целом ряде практических применения, в частности для эмболизации кровеносных сосудов, протоков (например, желчного), заполнения полостей и послеоперационных дефектов и т.д.

В силу этого нами была изучена возможность такого использования разработанной отверждаемой системы. В качестве экспериментальной модели нами

была выбрана облитерация желчного пузыря. (Работы проводились совместно МГМСУ им. А.Е.Евдокимова под руководством проф. С.М. Чудных).

На первом этапе эксперимент проводился на животных. Полученные результаты показали, что при введении разработанной отверждаемой *in vivo* полимерной композиции в полость желчного пузыря происходит полная биодеградация образующегося в результате сшивки гидрогеля с замещением его разрастаниями плотной фибропластической ткани и облитерацией полости желчного пузыря.

Положительные результаты эксперимента на животных позволили перейти к клиническому этапу исследований. На этом этапе исследования отверждаемая композиция была применена у 11 больных острым холециститом с целью облитерации желчного пузыря. В данную группу были включены пациенты пожилого и старческого возраста, находившиеся на лечении в ГКБ №68 г. Москвы с 2009 по 2011г. Все пациенты были госпитализированы более чем через 72 часа от начала приступа, оперативное вмешательство им было противопоказано в связи с наличием тяжелых сопутствующих заболеваний и высоким операционно-анестезиологическим риском.

В результате контрольных УЗИ, через 2 суток после имплантации, было установлено, что объем желчного пузыря соответствовал объему введенного в него материала, с неутолщенной однородной стенкой, без перифокального воспаления и увеличения печени.

В случае наличия положительной клинико-эхографической картины холецистостому с баллонным катетером удаляли, пациента выписывали из стационара. Ни один из случаев применения в клинике исследуемого полимерного материала не явился причиной, приведшей к тяжелым осложнениям и летальности.

Для изучения отдаленных результатов применения разработанного материала в постгоспитальном периоде удалось провести наблюдение за 6 больными через 1, 3, 6, 12 месяцев путем повторных вызовов в клинику, телефонного анкетирования, УЗИ в динамике. При повторном эхографическом исследовании после имплантации гидрогелевого материала у пациентов была отмечена тенденция к уменьшению размеров полости желчного пузыря, что может свидетельствовать об эффективности использования данного метода для облитерации полости желчного пузыря. Рецидивы заболевания за рассматриваемый период отмечены не были.

В заключение данного раздела следует отметить, что помимо вышеупомянутых областей применения разработанные гидрогелевые материалы было предложено использовать для заполнения дефектов мягких тканей и послеоперационных полостей в торакальной и абдоминальной хирургии, в качестве основы систем различного назначения в офтальмологии, в нейрохирургии и ряде других областей. Данные изделия в настоящий момент находятся на различных стадиях доклинических и клинических испытаний и более детально рассмотрены в тексте диссертации и публикациях из списка литературы автореферата.

7 Выводы

1 Путем радикальной полимеризации водорастворимого модифицированного глицидилметакрилатом поливинилового спирта, а также его смесей с модифицированным глицидилметакрилатом 2-гидроксиэтилкрахмалом, либо заряженными низкомолекулярными мономерами получены биосовместимые изотропные и пористые гидрогели, способные к биodeградации с заданной скоростью, пригодные для медико-биологического использования.

2 Исследованием процесса модификации поливинилового спирта и гидроксиэтилкрахмала глицидилметакрилатом, выявлены условия, позволяющие синтезировать продукты с заданной степенью замещения, в том числе, растворимые в воде.

3 Установлен характер влияния на протекание процесса сшивания концентрационного, температурного, временного и иных факторов.

4 Исследованием модуля упругости и равновесного набухания полученных пространственных полимерных систем определены степени их сшивания. Исследована характеристика термодинамического состояния системы гель – вода. Необычное поведение гелей, полученных в присутствии персульфатов, в воде и их чувствительность к добавкам низкомолекулярных электролитов объяснены наличием в полимерной сетке геля заряженных (ионизованных) звеньев. Проведена оценка степени ионизации сетки, предложен возможный механизм возникновения ионогенных групп.

5 Электронно-микроскопическими исследованиями показано, что полученные гидрогели, образующиеся в воднозамороженных системах, представляют собой материалы с развитой пористой структурой и размером открытых пор от единиц до сотен микрометров, причем общая пористость и средний размер пор снижаются по мере роста концентрации полимера и снижения температуры процесса, но практически не зависят от концентрации инициатора в реакционной смеси. Путем анализа кривых «напряжение-деформация» продемонстрировано, что на частоту сшивки полимерной фазы гидрогелей в наибольшей степени оказывает влияние количество введенного инициатора и в меньшей степени – концентрация полимера и температура образования гидрогеля.

6 В опытах на клетках и экспериментальных животных установлена высокая степень биосовместимости полученных полимерных систем. Показана их способность к биodeградации с замещением собственными тканями организма. Продемонстрирована возможность регулирования скорости биodeградации посредством варьирования состава полимерного гидрогелевого материала и его пористости.

7 Продемонстрирована возможность использования разработанных гидрогелевых материалов для создания ряда изделий медико-биологического назначения: матриц для культивирования различных типов клеток, высокоэффективных раневых покрытий (получено разрешение на применение), материалов для заполнения дефектов мягких тканей, облитерации желчного пузыря при остром холецистите и ряда других областей.

8 Список литературы

Статьи в изданиях, входящих в перечень ВАК

- 1 Michálek J., Přadný M., Artyukhov A., Šlouf M., Smetana K. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 3. Hydrogels as carriers for immobilization of proteins // *Journal of Materials Science: Material in Medicine*. — 2005. — Vol. 16, № 8. — 783-786 p. (импакт-фактор JCR 2,451)
- 2 Штильман М.И., Артюхов А.А., Золотайкина Т.С., Коршак А.Ю., Горчаков А.В., Тсатсакис А.М. Сшитые макропористые полимерные гидрогели поливинилового спирта: исследование влияния условий синтеза // *Пластические массы*. — 2005. — №12. — 27-29 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,240)
- 3 Артюхов А.А., Штильман М.И., Чалых А.Е., Золотайкина Т.С., Тсатсакис А.М. Макропористые гидрогели поливинилового спирта: исследование формирования структуры // *Пластические массы*. — 2006. — № 1. — 27-31 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,240)
- 4 М.И. Штильман, А.А. Артюхов, А.Е. Чалых, О.В. Семенчук, А.М. Тсатсакис. Криогели ионогенных мономеров. // *Пластические массы*. — 2006. — №3. — 21-25 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,240)
- 5 Shtilman M.I., Artyukhov A.A., Zolotaikina T.S., Korshak A.Yu., Gorchakov A.V., Tsatsakis A.M. Crosslinked macroporous polymeric hydrogels of polyvinyl alcohol: a study of the influence of the synthesis conditions // *International Polymer Science and Technology*. — 2006. — Vol. 33, № 10 — 25-29 p.
- 6 Shtilman M.I., Artyukhov A.A., Chalykh A.E., Semenchuk O.V., Tsatsakis A.M. Cryogels of ionogenic molecules // *International Polymer Science and Technology*. — 2007, Vol. 34, № 3. — 41-46 p.
- 7 Артюхов А.А., Чудных С.М., Филатов В.Н., Рыльцев В.В., Медушева Е.О., Кусков А.Н., Тсатсакис А.М., Восканян П.С., Штильман М.И. Сшитые макропористые полимерные гидрогели поливинилового спирта: осмотические свойства и поведение при контакте с живыми тканями // *Пластические массы*. — 2007. — № 7. — 11-14 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,240)
- 8 Шишкин М.М., Штильман М.И., Юлдашева Н.М., Артюхов А.А. О возможности применения сшиваемого поливинилового спирта в качестве носителя лекарственных веществ для интравитреального введения. (Экспериментальное исследование) // *Вестник национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова*. — 2010. — Т. 5, № 1. — 16-21 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,118)
- 9 Шишкин М.М., Штильман М.И., Юлдашева Н.М., Артюхов А.А. Супрахороидальная имплантация биодеградирующего имплантата «ММ-гель» в качестве носителя лекарственных веществ (Экспериментальное исследование) // *Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова*. — 2010, Т. 5, № 2. — 71-76 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,118)
- 10 Артюхов А.А., Голунова А.С., Пашкова Л.И., Кусков А.Н., Лесовой Д.Е., Фомина А.П., Штильман М.И. Макропористые полимерные гидрогели поливинилового спирта, содержащие аминокгруппы // *Пластические массы*. — 2010. — № 4. — 15-21 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,240)
- 11 Лесовой Д.Е., Кузнецов Н.Ю., Артюхов А.А., Штильман М.И., Чудных С.М. Восстановительная терапия тяжелых дефицитов мягких тканей в экспериментальной ожоговой ране с использованием гидрогелевого раневого покрытия ММ-Гель-Р // *Биомедицина*. — 2010, № 4. — 33-39 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,371)
- 12 Artyukhov A.A., Shtilman M.I., Kuskov A.N., Pashkova L.I., Tsatsakis A.M., Rizos A.K.. Polyvinyl alcohol cross-linked macroporous polymeric hydrogels: structure

- formation regularities investigation // Journal of non-crystalline solids. — 2010. — Vol.357, №2. — 700 -706 p. (импакт-фактор JCR 1,825)
- 13 Sukhanova T., Semenikhina M., Artyukhov A., Prudchenko I., Shtilman M., Markvicheva E. Delta-sleep inducing peptide entrapped in polymer matrices for biomedical applications // FEBS Journal. — 2010. — Vol. 277. — 250-251 p. (импакт-фактор JCR 4,237)
- 14 Artyukhov A.A., Shtilman M.I. Kuskov A.N. Fomina A.P., Lisovyy D.E. Golunova A.S. Tsatsakis A.M. Macroporous polymeric hydrogels formed from acrylate modified polyvinyl alcohol macromers // Journal of polymer research. — 2011 —Vol. 18, № 4. — 667-673 p. (импакт-фактор JCR 1,969)
- 15 Артюхов А.А., Голунова А.С., Штильман М.И. Макропористые гидрогели сшитого поливинилового спирта, содержащие карбоксильные группы // Энциклопедия инженера-химика. — 2011. — №11. — 13-21 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,299)
- 16 Дроздова М.Г., Акасов Р.А., Зайцева-Зотова Д.С., Голунова А.С., Артюхов А.А., Прудченко И.А., Штильман М.И., Марквичева Е.А. Криогели на основе модифицированного поливинилового спирта для тканевой инженерии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2011. — Т. 7, № 4. — 27-28 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,075)
- 17 Лесовой Д. Е., Артюхов А. А., Чудных С. М., Штильман М. И. Макропористые полимерные гидрогели поливинилового спирта как материал для местного лечения ран // Все материалы. Энциклопедический справочник. — 2011. — №12. — 19-27 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,599)
- 18 Sukhanova T.V., Artyukhov A.A., Prudchenko I.A., Golunova A.C., Semenikhina M. A., Shtilman M.I., Markvicheva E.A.. Entrapment and in vitro release of delta_sleep inducing peptide from polymer hydrogels based on modified polyvinyl alcohol // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. — 2012. — Vol. 6, №. 2. — 149–155 p
- 19 Хатьков И.Е., Чудных С.М., Кулезнева Ю.В., Штильман М.И., Сидорук А.А., Артюхов А.А. Новые малоинвазивные методы лечения больных острым холециститом // Эндоскопическая хирургия. — 2012. — №1. — 3-8 p. (импакт-фактор РИНЦ 0,506)
- 20 Вериге Е.Н., Киселева Т.Н., Штильман М.И., Рамазанова К.А., Артюхов А.А., Кружкова Г.В., Садовская Е.П., Лаврентьева Н.В.. Ультразвуковое сканирование орбиты с использованием иммерсионной среды у больных с субатрофией и анафтамальмом // Офтальмология. — 2012. — Т. 9, № 2. — 39-42 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,275)
- 21 Вериге Е.Н., Гундорова Р.А., Киселева Т.Н., Штильман М.И., Рамазанова К.А., Артюхов А.А., Кружкова Г.В., Садовская Е.П., Лаврентьева Н.В., Пряхина И.А. . Возможности комплексного ультразвукового исследования орбиты в оценке прогноза результатов протезирования при субатрофии и микрофтальме // Офтальмология. — 2012. — Т. 9. № 4. — 52-57 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,275)
- 22 Вериге Е.Н., Киселева Т.Н.. Штильман М.И., Рамазанова К.А., Артюхов А.А., Кружкова Г.В., Садовская Е.П., Лаврентьева Н.В. Комплексная оценка состояния опорно-двигательной культи при анофтальме в отдаленные сроки наблюдений // Российский офтальмологический журнал. — 2012. — №4. — 4-9 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,332)
- 23 Артюхов А.А., Голунова А.С., Штильман М.И. Макропористые гидрогели сшитого поливинилового спирта, содержащие карбоксильные группы // Все материалы. Энциклопедический справочник. — 2012. — №1. — 17-24 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,599)

- 24 Чудных С.М., Кулезнева Ю.В., Штильман М.И., Сидорук А.А., Артюхов А.А. Чрескожные ультразвуковые вмешательства у больных острым холециститом // Диагностическая и интервенционная радиология. — 2012. — Т.6, №4. — 51-58 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,068)
 - 25 Суханова Т.В., Артюхов А.А., Прудченко И.А., Голунова А.С., Семенихина М.А., Штильман М.И., Марквичева Е.А Включение и высвобождение *in vitro* дельта-сон индуцирующего пептида из полимерных гидрогелей на основе модифицированного поливинилового спирта // Биомедицинская химия. — 2013. — Том. 59, № 1. — 65-75 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,668)
 - 26 Дуфлот А.В., Китаева Н.К., Артюхов А.А., Дуфлот В.Р., Штильман М.И. Радиационно-химический синтез и свойства гидрогелей на основе модифицированного поливинилового спирта // Все материалы. Энциклопедический справочник. — 2013. — № 2. — 31-38 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,599)
 - 27 Sukhanova T.V., Artyukhov A.A., Gurevich Y.M., Semenikhina M.A., Prudchenko I.A., Shtilman M. I., Markvicheva E.A.. Delta-sleep inducing peptide entrapment in the charged macroporous matrices // Materials Science and Engineering: C. — 2014. — V.42. — 461–465 p. (импакт-фактор JCR 3,420)
 - 28 Чудных С.М., Кулезнева Ю.В., Сидорук А.А., Штильман М.И., Артюхов А.А. Облитерация полости желчного пузыря «ММ-гелем» (клинико-экспериментальное исследование) // Хирург. — 2014. — № 8. — 66-74 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,075)
 - 29 Сидорук А.А., Чудных С.М., Кулезнева Ю.В., Штильман М.И., Артюхов А.А., Королук Г.М., Николин О.П. Новые малоинвазивные методы лечения острого холецистита // Хирург. — 2014. — № 10. — 55-68 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,075)
 - 30 Моргачёва А. А., Артюхов А. А., Панов А. В., Гордиенко М. Г., Межуев Я.О., Штильман М. И. Синтез поливинилового спирта с метакрилатными группами и гидрогелей на его основе // Журнал прикладной химии. — 2015. — Т. 88, вып. 4. — 617-621 с. (импакт-фактор JCR 0,302, импакт-фактор РИНЦ 0,322)
 - 31 Артюхов А.А., Моргачева А.А., Кусков А.Н., Штильман М.И. Биodeградируемые макропористые полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала // Все материалы. Энциклопедический справочник. — 2016. — № 4. — 2-8 с. (импакт-фактор РИНЦ 0,599)
 - 32 Моргачёва А.А., Артюхов А.А., Флегонтов П.А., Жаворонок Е.С., Штильман М.И., Панов А.В. Новые метакрилатосодержащие производные гидроксиэтилкрахмала // Журнал общей химии. — 2016. — Т. 86, № 4. — 699-704 с. (импакт-фактор JCR 0,481, импакт-фактор РИНЦ 0,457)
 - 33 Drozdova M. G., Zaytseva-Zotova D. S., Akasov R. A., Golunova A.S., , Artyukhov A.A., Udartseva O.O, Lisovyy D.E., Shtilman M.I., Markvicheva E. A. Macroporous modified poly (vinyl alcohol) hydrogels with charged groups for tissue engineering: Preparation and *in vitro* evaluation // Materials Science and Engineering: C. — 2017. — Vol. 75. — 1075-1082 p. (импакт-фактор JCR 3,420)
- Статьи в прочих изданиях*
- 34 Артюхов А.А., Штильман М.И., Козлов В.С., Коршак А.Ю. Сшитые криогели поливинилового спирта // Успехи в химии и химической технологии. — М.: Минобразования России. — 2004. — Т.18, №2(42). — 34-36 с.
 - 35 Чалых А.Е., Штильман М.И., Артюхов А.А. Строение пористых гидрогелей // Структура полимеров. — 2004. — 35-41 с.
 - 36 Чалых А.Е., Штильман М.И., Артюхов А.А. Упругие свойства криогелей поливинилового спирта // Структура полимеров. — 2004. — 42-46 с.

- 37 Артюхов А.А., Штильман М.И., Золотайкина Т.С., Горчаков А.В. Разработка технологии получения новых полимерных гидрогелей для медицины и биотехнологии // Успехи в химии и химической технологии. — М.: Минобразования России. — 2005. — Т.19, №2(50). — С.93-95
 - 38 Кузнецов Н.Ю., Лесовой Д.Е., Письменная Ю.В., Артюхов А.А. Морфологические изменения в экспериментальных глубоких ожоговых ранах кожи при местном лечении ксенопротекторами // Актуальні проблеми сучасної медицини: вісник Української медичної стоматологічної академії. — 2009. — Т. 9, выпуск 4 (28), ч. 3. — 201-203 с.
 - 39 А.С. Голунова, А.А. Артюхов, А.П. Фомина, М.И. Штильман. Пористые полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта и его производных, содержащих заряженные группы // Успехи в химии и химической технологии. — М.: Минобразования России. — 2010. — Т.25, № 4. — 24-32 с.
 - 40 Фомина А.П., Лесовой Д.Е., Артюхов А.А., Штильман М.И. Биodeградируемые полимерные гидрогели на основе производных крахмала и поливинилового спирта. Успехи в химии и химической технологии. — М.: Минобразования России. — 2011. — Т 25, № 3 (119). — 83-87 с.
 - 41 Сидорова А.С., Голунова А.С., Артюхов А.А., Штильман М.И. Сорбция белка на поверхности макропористых полимерных гидрогелей на основе модифицированного поливинилового спирта // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. — М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева. — 2012. — Том 26, № 1 (130) — 88-93 с.
- Тезисы конференцій*
- 42 Shtilman M.I., Artyukhov A.A., Kozlov V.S., Tsatsakis A.M. // New polymer carriers for protein immobilization. Biocatalysis-2001: Fundamentals & Application. — 2001. — p. 85.
 - 43 Přádný M., Artyukhov A., Michálek J., Syková E., Vacík J. Macroporous hydrogels based on copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate with positively and/or negatively charged comonomers for protein immobilization // 43-st Microsymposium, Prague Meetings on Macromolecules. Polymer Biomaterials: Biomimetic and Bioanalogous Systems. — 2004, 64 p.
 - 44 Артюхов А.А., Штильман М.И., Тсатсакис А.М., Горчаков А.В., Коршак А.Ю. Сшитые макропористые гидрогели поливинилового спирта для медицины и биотехнологии // Биотехнология: Состояние и перспективы развития. — 2005. — 49 с.
 - 45 Артюхов А.А., Штильман М.И., Горчаков А.В., Коршак А.Ю. Сшитые макропористые гидрогели поливинилового спирта для медицины и биотехнологии // Материалы Международной конференции студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2005». Секция «Химия», Т. 1. — М.: 2005. — 55 с.
 - 46 Артюхов А.А., Золотайкина Т.С., Кусков А.Н. Штильман М.И., Тсатсакис А.М. Макропористые полимерные гидрогели поливинилового спирта как носители лекарственных препаратов // Биотехнология: Состояние и перспективы развития. — 2006. — 97 с.
 - 47 P. S. Voskanyan, A. A. Artyukhov, M. I. Shtilman. Cross-linked macroporous hydrogels for medicine and biotechnology // International Conference «New Polymer Systems for Biotechnological and Biomedical Applications». — 2005. — 194 p.
 - 48 Артюхов А.А., Фомина А.П., Кусков А.Н., Штильман М.И., Восканян П.С., Клочков А.В., Богославец Я.Б., Тсатсакис А.М. Сшитые макропористые полимерные гидрогели для медицины и биотехнологии. // Биотехнология: Состояние и перспективы развития. — 2007. — 58 с.

- 49 Штильман М.И., Ташмухамедов Р.И., Кусков А.Н., Артюхов А.А., Брудзь С.П. Полимеры для создания биологически активных и лекарственных систем // Биотехнология: Состояние и перспективы развития. — 2007. — С.111.
- 50 Артюхов А.А., Штильман М.И. Макропористые гидрогели сшитого поливинилового спирта – новые материалы для медицины. // Всероссийская конференция «Молодые ученые и инновационные химические технологии». — 2007. — 62-63 с.
- 51 Артюхов А.А., Фомина А.П., Богославец Я.Б., Штильман М.И. Новые макропористые полимерные гидрогели для медицины и биотехнологии // Международная конференция студентов и аспирантов по фундаментальным наукам «Ломоносов-2007», Секция «Химия». — 2007. — Т. 1. — 55 с.
- 52 A.A. Artyukhov, P.S. Voskanyan, M.I. Shtilman. Polyvinyl alcohol macroporous hydrogel as a new materials for medicine // Proceeding of International Conference «New Polymers and Radioprotectors for Biology and Medicine». — International Science and Technology Center, 2007. — 16-17 p.
- 53 Строганова Е.Е., Штильман М.И., Артюхов А.А., Ивахина Н.А. Пористые биоконпозиты на основе кальцийфосфатного ситалла, модифицированного ПВС— 2007. — 71-72 с.
- 54 Артюхов А.А., Штильман М.И., Пашкова Л.И., Лукина Ю.С. Биоконпозиционные биодegradируемые материалы для регенерации костной ткани // Тезисы Всероссийского совещания «Биоматериалы в медицине». — М.: ИМЕТ, 2009. — 11-12 с.
- 55 Artyukhov A.A., Shtilman M.I., Fomina A.P., Lesovoy D.E., Kuskov A.N., Tsatsakis A.M., Rizos A.K. Macroporous polymer hydrogels formed from acrylate modified polyvinylalcohol macromers // 6th Internnatioal Discussion Meeting on Relaxation in Complex Systems (6IDMRCS). — 2009. — 239 p.
- 56 Суханова Т.В., Гуревич Я.М., Артюхов А.А., Ефремов Е.С., Чикин Л.Д., Прудченко И.А., Штильман М.И., Марквичева Е.А. Включение дельта-сон индуцирующего пептида в полимерные матрицы // Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича. — 2009. — 368-369 с.
- 57 Новикова И.Г., Артюхов А.А. Ермоленко Ю.В. Синтез и спектральные характеристики новых функциональных материалов на основе иммобилизованных в полимерном геле органических реагентов // XXV международная Чугаевская конференция по координационной химии. — АНО ЦИК «Русский запад», 2009. — 130-131 с.
- 58 Фомина А.П., Артюхов А.А., Голунова А.С., Лесовой Д.Е., Штильман М.И. Пористые полимерные гидрогели на основе производных поливинилового спирта и крахмала. // Биотехнология: Состояние и перспективы развития. — 2010. — 332 с.
- 59 Artyukhov A.A., Fomina A.P., Golunova A.S., Kuskov A.N., Lisovyy D.E., Shtilman M.I. Polyvinyl alcohol macroporous hydrogels as new materials for medicine // 1st Russian – «Hellenic Symposium on Polymeric Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». — 2010. — 34 p.
- 60 Fomina A.P., Artyukhov A.A., Golunova A.S., Lisovyy D.E., Shtilman M.I. Polymeric hydrogels on the basis of polyvinyl alcohol and starch derivatives // 1st Russian – «Hellenic Symposium on Polymeric Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». — 2010. — 59 p.
- 61 A.A. Artyukhov, A.S. Golunova, A.N. Kuskov, A.V. Goryachaya, D.E. Lisovyy, M.I. Shtilman. Drug controlled release systems on the basis of macroporous polymeric

- hydrogels containing nano-aggregates of N-vinylpyrrolidone amphiphilic polymers // 1st Russian – «Hellenic Symposium on Polymeric Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». — 2010. — 59 p.
- 62 Д.Е. Лесовой, Н.Ю. Кузнецов, А.А. Артюхов, М.И. Штильман, С.М. Чудных. Восстановительная терапия тяжелых дефицитов мягких тканей в экспериментальной ожоговой ране с использованием гидрогелевого раневого покрытия ММ-Гель-Р // VI научно-практическая конференция «Биомедицина и Биомоделирование». — 2010. — 15 с.
- 63 Фомина А.П., Артюхов А.А., Голунова А.С., Лесовой Д.Е., Штильман М.И. Полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта и производных крахмала // V Всероссийская Каргинская Конференция «Полимеры - 2010». — 2010. — 54 с.
- 64 Суханова Т.В., Артюхов А.А., Семенихина М.А., Чикин Л.Д., Прудченко И.А., Штильман М.И., Марквичева Е.А. Включение дельта-сон индуцирующего пептида в макропористые матрицы на основе поливинилового спирта // Биология – наука XXI века: 14-я Пущинская международная школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. — 2011. — 289-290 с.
- 65 M. Drozdova, D. Zaytseva-Zotova, R. Akasov, A. Golunova, M. Semenikhina, A. Artyukhov, E. Andreeva, M. Shtilman, E. Markvicheva. Macroporous scaffolds based on modified poly(vinyl alcohol) for tissue engineering: cytotoxicity study // Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues. — 2011. — 24 p.
- 66 A.A. Artvukhov, D.E. Lesovoy, A.S. Golunova, A.P. Fomina, M. I. Shtilman. Crosslinked macroporous hydrogel of polyvinyl alcohol for medicine and biotechnology // Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues. — 2011. — 31 p.
- 67 A.S. Golunova, D.S. Zaytseva-Zotova, M.A. Semenikhina, M.G. Drozdova, R.A. Akasov, A.A. Artyukhov, E.A. Markvicheva, M.I. Shtilman. Macroporous polymer hydrogel matrices tailored for cell growth promotion // Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues. — 2011. — 32 p.
- 68 A.P. Fomina. A.A. Artyukhov, D.E. Lisovyy, M.I. Shtilman. Macroporous hydrogels based on starch // Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues. — 2011. — 32 p.
- 69 D.E. Lesovoy, A.A. Artyukhov, S.M. Chudnykh, P.S. Krizyna, M. I. Shtilman. A tissue-engineered artificial skin grown to resemble the native skin // Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues. — 2011. — 56 p.
- 70 Drozdova M., Zaytseva-Zotova D., Tsoy A., Akasov R., Prudchenko I., Golunova A., Artyukhov A., Shtilman M., Grandfils Ch., Markvicheva E. Entrapment of PDLA microbeads loaded with TRAP-6 within modified macroporous PVA hydrogel for tissue engineering // XIX International Conference on Bioencapsulation. — 2011. — 512 p.
- 71 Суханова Т.В., Селезнева И.И., Гаврилюк Б.К., Давыдова Г.А., Прудченко И.А., Семенихина М.А., Артюхов А.А., Штильман М.И., Марквичева Е.А. Применение полифенольных соединений в тканевой инженерии // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии. Сборник трудов международной Интернет-конференции. — 2011. — 245-246 с.
- 72 Артюхов А.А. Макропористые полимерные гидрогели как новые материалы для медицины // Нанобиоматериалы: современные достижения и токсикологические вопросы безопасности: сб. докладов международной научной конференции.- М.:НП «Центр развития современных образовательных технологий», 2011. — 23-24 с.

- 73 М.Г. Дроздова, Р.А. Акасов, Д.С.Зайцева-Зотова, А.С. Голунова, А.А. Артюхов, И.А. Прудченко, М.И. Штильман, Е.А. Марквичева. Криогели на основе модифицированного поливинилового спирта как биоматериалы для регенеративной медицины // Нанобиоматериалы: современные достижения и токсикологические вопросы безопасности: сб. докладов международной научной конференции.- М.:НП «Центр развития современных образовательных технологий», 2011. — 25-26 с.
- 74 M. Drozdova, D. Zaytseva-Zotova, R. Akasov, A. Golunova, M. Semenikhina, A. Artyukhov, E. Andreeva, M. Shtilman, E. Markvicheva. Macroporous scaffolds based on modified poly(vinyl alcohol) for tissue engineering: cytotoxicity study // Нанобиоматериалы: современные достижения и токсикологические вопросы безопасности: сб. докладов международной научной конференции. — М.:НП «Центр развития современных образовательных технологий», 2011. — 88-89 с.
- 75 Fomina A.P. Artyukhov A.A., Lisovyy D.E., Shtilman M.I. Macroporous hydrogels based on starch derivatives // Нанобиоматериалы: современные достижения и токсикологические вопросы безопасности: сб. докладов международной научной конференции. — М.:НП «Центр развития современных образовательных технологий», 2011. — 90 с.
- 76 Artvukhov A.A., Lesovoy D.E., Golunova A.S., Fomina A.P., Shtilman M. I. Crosslinked macroporous hydrogel of polyvinyl alcohol for medicine and biotechnology. // Нанобиоматериалы: современные достижения и токсикологические вопросы безопасности: сб. докладов международной научной конференции. — М.:НП «Центр развития современных образовательных технологий», 2011. — 104-105 с.
- 77 D.E. Lesovoy, A.A. Artyukhov, S.M. Chudnykh, P.S. Krizyna, M. I. Shtilman. A tissue-engineered artificial skin grown to resemble the native skin // // Нанобиоматериалы: современные достижения и токсикологические вопросы безопасности: сб. докладов международной научной конференции.- М.:НП «Центр развития современных образовательных технологий», 2011. — 108-109 с.
- 78 A.S. Golunova, D.S. Zaytseva-Zotova, M.A. Semenikhina, M.G. Drozdova, R.A. Akasov, A.A. Artyukhov, E.A. Markvicheva, M.I. Shtilman. Macroporous polymer hydrogel matrices tailored for cell growth promotion // Нанобиоматериалы: современные достижения и токсикологические вопросы безопасности: сб. докладов международной научной конференции. — М.:НП «Центр развития современных образовательных технологий», 2011. — 110-111 с.
- 79 Дубровский С.А., Сорокина Н.В., Артюхов А.А., Штильман М.И. Необычные осмотические свойства гидрогелей поливинилового спирта, получаемых через макромеры // «Полимеры 2012». XIII Ежегодная научная конференция отдела полимеров и композиционных материалов Сборник трудов. — М.: ИХФ РАН, 2012. — 125 с.
- 80 Саркисов П.Д., Строганова Е.Е., Михайленко Н.Ю., Штильман М.И., Бучилин Н.В., Артюхов А.А., Пронина Е.В., Шешина Н.А. Синтез и исследование композиционных биоматериалов на основе кальцийфосфатных стекол, ситаллов и поливинилового спирта // VIII Российская ежегодная конференция молодых научных сотрудников и аспирантов «Физико-химия и технология неорганических материалов». — М.: ИМЕТ, 2011. — 28
- 81 Artvukhov A.A., Lesovoy D.E., Golunova A.S., Shtilman M. I. Crosslinked macroporous hydrogel of polyvinyl alcohol for medicine // Bionanotox 2012 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 3rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School. — 2012. — 38 p.

- 82 Drozdova M., Sidorova A., Golunova A., Artyukhov A., Shtilman M., Markvicheva E. Study of cytotoxicity of macroporous scaffolds based on poly (vinylalcohol) modified with 2-hydroxyethyl methacrylate // Bionanotox 2012 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 3rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School. — 2012. — 51 p.
- 83 Штильман М.И., Артюхов А.А., Горячая А.А., Кусков А.Н., Шашкова И.М. Биоматериалы – важнейшее направление современной медико-биологической индустрии. // Химия биологически активных веществ [Межвузовский сборник научных трудов]. — Саратов: Изд-во «КУБиК», 2012 – 398 с. — с. 33.
- 84 Golunova A.S., Zaytseva-Zotova D.S., Drozdova M.G., Akasov R.A., Artyukhov A.A., Markvicheva E.A., Shtilman M.I. Macroporous polymer hydrogels with charged surface for the cell cultivating // Bionanotox 2012 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 3rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School. — 2012. — 52 p.
- 85 Fomina A.P., Artyukhov A.A., Lesovoy D.E., Shtilman M.I. Porous hydrogels on the basis of modified starch and PVA // Bionanotox 2012 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 3rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School. — 2012. — 52 p.
- 86 A.V. Dufлот, N.K. Kitaeva, M.I.Shtilman, A.A. Artyukhov, V.R. Dufлот. Radiation crosslinking of polyvinyl alcohol modified with glycidyl methacrylate // Bionanotox 2012 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 3rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School. — 2012. — 54-55 p.
- 87 Shtilman M.I., Voskanyan P.S., Artyukhov A.A. Biodegradable polymeric materials for healing of wounds and burns // Radiation safety challenges in 21st Century.— 2012. — 103 p.
- 88 Lisovyy D. E., Chudnykh S. M, Artyukhov A.A., Shtilman M.I. Macroporous hydrogels versus conventional dressings in the treatment of chronic wounds: a retrospective study // Bionanotox 2013 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 3rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School. — 2013. — 40 p.
- 89 Chudnykh S.M., Lisovyy D.E., Kulezneva Yu.V., Sidoruk A.A., Artyukhov A.A., Shtilman M.I. New minimally invasive methods of treatment of acute cholecystitis with use of modified PVA // Bionanotox 2013 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 3rd Russian-Hellenic Symposium with International Participations and Young Scientists School. — 2013. — 54 p.
- 90 Artyukhov A. A., Morgacheva A. A., Shtilman M. I. Porous polymeric hydrogels // Bionanotox 2014 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 5rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School. — 2014. — 24 p.
- 91 Markvicheva E., Drozdova M., Demina T., Artyukhov A., Shtilman M., Akopova T., Vikhoreva G., Grandfils Ch. Biodegradable fibers and microcarriers as promising matrices for regenerative medicine // Bionanotox 2014 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 5rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School. — 2014. — 12 p.
- 92 Троянкин А.Ю., Артюхов А.А., Штильман М.И., Моргачева А.А., Жукова А.А., Кальянова К.В., Меньшутина Н.В. Процесс получения макропористых биосовместимых частиц гидрогелей на основе поливинилового спирта //

Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни». — М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», 2014. — 149-150 с.

- 93 Drozdova M., Akasov R., Zaytseva-Zotova D., Golunova A., Artyukhov A., Andreeva E., Shtilman M., Markvicheva E. // Bionanotox 2014 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 5rd Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School. — 2014. — 21 p.
- 94 Artyukhov A.A., Morgacheva A.A., Shtilman M.I. Porous polymeric hydrogels on the basis of polyvinyl alcohol and starch derivatives // The International Conference «Biotechnology and quality of life». — 2014. — 84 p.
- 95 Markvicheva E., Drozdova M., Demina T., Zlobina M., Artyukhov A., Shtilman M., Akopova T., Grandfils Ch. Polymer biodegradable matrices with enhanced surface properties for tissue engineering // Bionanotox 2015 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 6rd Russian-Hellenic Symposium with International Participations and Young Scientists School. — 2015. — 37 p.
- 96 Drozdova M., Artyukhov A., Burov S., Shtilman M., Markvicheva E.. Polymer macroporous scaffolds modified for promoting stem cell attachment and // Bionanotox 2015 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 6rd Russian-Hellenic Symposium with International Participations and Young Scientists School. — 2015. — 38-39 p.
- 97 Shtilman M. I., Artyukhov A. A., Goryachaya A. V., Klimenko O. V., Kulikov P. P., Kuskov A. N., Mezhev Ya. O., Morgacheva A. A., Osadchenko S. V. Construction of synthetic polymeric biomaterials // Bionanotox 2015 «Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues». 6rd Russian-Hellenic Symposium with International Participations and Young Scientists School. — 2015. — 8 p.
- 98 Артюхов А.А., Моргачева А.А., Штильман М.И. Полимерные гидрогели для медицины и биотехнологии // Материалы VIII Московского Международного Конгресса «Биотехнология: Состояние и Перспективы Развития». — М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии», 2015. — 6 с.
- 99 Дроздова М.Г., Артюхов А.А., Штильман М.И., Марквичева Е.А. Композитные макропористые гидрогели на основе поливинилового спирта и гидроксиапатита для регенерации костной ткани // XXVIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». — 2016. — 169 с.

Патенты

- 100 Макропористый гидрогелевый материал и изделия на его основе: патент 23208313 Рос. Федерация / Артюхов. А.А., Штильман М.И., Восканян П.С., Тсатсакис А.М. — № 2006125842/15; заявл. 19.07.2006; опубл. 10.07.2008 , Бюл. № 18.
- 101 Иммерсионная среда для проведения объемной эхографии орбиты при анофтальме и субатрофии глаза и способ проведения объемной эхографии орбиты при анофтальме и субатрофии глаза: патент 2470589 Рос. Федерация / Гундорова Р.А., Киселева Т.Н., Вериге Е. Н., Штильман М. И., Рамазанова К.А., Артюхов А.А., Кружкова Г.В., Лаврентьева Н. В. — 2011143429/14; опубл. 27.12.2012, Бюл. № 36.
- 102 Гидрогелевый материал на основе сшиваемого поливинилового спирта: патент 2543895 Рос. Федерация / Артюхов А.А., Кусков А.Н., Штильман М.И., Пашкова Л.И. — № 2013122707/05; опубл. 10.03.2015, Бюл. № 7.