

Оганнисян Арпине Сиракановна

**ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНА
В КАЧЕСТВЕ ДЕПО ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
В ОРТОПЕДИИ И ТРАВМАТОЛОГИИ**

1.5.6. – Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Отделе перевязочных, шовных и полимерных материалов в хирургии
ФГБУ "НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского" Минздрава России

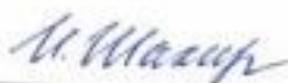
Научный руководитель:	Легоноква Ольга Александровна доктор технических наук, заведующая Отделом перевязочных, шовных и полимерных материалов в хирургии ФГБУ "НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского" Минздрава России
Официальные оппоненты:	Грин Михаил Александрович доктор химических наук, профессор "МИРЭА - Российский технологический университет", Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова, заведующий кафедрой химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии имени Н.А. Преображенского
	Давыдова Галина Анатольевна кандидат физико-математических наук, заведующая лабораторией Роста клеток и тканей Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН
Ведущая организация:	ФГБОУ ВО «Российский государственный университет имени А.Н. Косыгина (Технология. Дизайн. Искусство)»

Защита диссертации состоится «12» марта 2024 г. в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 в Российском химико-технологическом университете 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, а также на официальном сайте <http://diss.micr.ru/>.

Автореферат диссертации разослан «___» января 2024г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 99.0.027.03,
кандидат технических наук, профессор



И.В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Одной из глобальных проблем по данным Всемирной Организации Здравоохранения является остеоартроз тазобедренного сустава [Губин А.В., 2021; Тихилов Р.М., 2021; WHO (2020)]. В настоящее время наиболее распространенным и надежным методом лечения остеоартроза является тотальная артропластика, которая позволяет увеличить эффективность лечения патологии тазобедренного сустава [Очкуренко А.А., 2021; Грицюк А.А., 2019; Sun X., 2019]. Ежегодно в мире проводится более 1 миллиона артропластик тазобедренного сустава, и их количество постоянно растет [Sloan M., 2020]. По данным разных источников в России за 2018 г. проведено 72 270 эндопротезирований тазобедренного сустава, а в 2022 г. количество выполненных операций составило 89 244.

Несмотря на впечатляющий успех этого метода лечения, развитие различных осложнений, в том числе и развитие глубокой перипротезной инфекции (ППИ), неизбежно. Риск развития ППИ у пациентов сохраняется пожизненно. После первичного эндопротезирования частота ППИ составляет 0,3-2,2%, в случаях повторных операций риск развития ППИ возрастает в несколько раз, достигая 5,9-13,6% [Тихилов Р.М., 2013; Lichstein, P., 2014]. Инфекционный процесс у 25-30 % пациентов даже после saniрующих операций приобретает рецидивирующее течение и может привести к последствиям, вынуждающим удаление протеза, к развитию хронического постимплантационного остеомиелита и стойкой утрате трудоспособности. Стоимость лечения ППИ в 5-7 раз превосходит стоимость самой первичной операции [Kurtz S.M., 2012; Peel T.N., 2011; Vanhegan I. S., 2012].

Доступные в настоящее время профилактические меры, хотя и частично эффективны в борьбе с ППИ, но не учитывают патогенез инфекции. Специалисты предполагают, что в большинстве случаев (примерно 80%) инфекционные осложнения возникают в результате образования биопленок и считают, что современные методы профилактики ППИ должны быть направлены на ингибирование бактериальной адгезии [Руководство по хирургии тазобедренного сустава, РНИИТО им. Р.Р. Вредена, 2015; Romanò C. L., 2015].

В настоящее время остро стоит задача разработки средств и способов [Распоряжение Правительства РФ от 31 декабря 2020 г. № 3684-р], повышающих эффективность лечения ППИ. Ведутся работы по импрегнированию антибиотиками костного цемента и коллагеновых губок, активной обработке поверхности имплантата фармакологически активными агентами. Однако все перечисленные способы имеют целый ряд общеизвестных недостатков, в частности, антимикробное действие короткое и не обеспечивает эффективный результат.

С точки зрения профилактики ППИ целесообразно разработать средство для локального применения в форме геля, которое должно обладать пролонгированным антимикробным действием, позволять покрыть поверхность имплантата любой формы и заполнить возникающие полости, что предотвратит возможность образования биопленки. При этом гель не должен вытекать из раневой полости, после экспозиции должен легко поддаваться удалению. Следует отметить, что на фармацевтическом рынке РФ отсутствуют зарегистрированные в установленном порядке аналогичные по форме и назначению средства.

С материаловедческой точки зрения для получения геля наибольший интерес представляет материал поливинилпирролидон (ПВП), широко применяемый в фармацевтической промышленности.

Целью диссертационного исследования явилось теоретическое и экспериментальное обоснование состава и технологии получения биобезопасного гидрогеля для ортопедии и травматологии с оптимальными эксплуатационными характеристиками и пролонгированным антимикробным действием в отношении ведущих возбудителей перипротезной инфекции.

Задачи исследования

1. Разработать технологию получения биобезопасного гидрогеля на основе ПВП и фармацевтических субстанций фосфомицина и гентамицина без применения инициаторов химического сшивания.
2. Изучить реологические свойства гидрогелей ПВП при разных способах их получения и составах;
3. Определить физико-химические свойства (сорбционные, адгезионные, теплофизические) гидрогелей ПВП;
4. Изучить механизм сшивания ПВП под воздействием γ -излучения и температуры в отсутствие и присутствии фармацевтических субстанций фосфомицина и гентамицина;

5. Исследовать антибактериальные свойства гидрогелей ПВП *in vitro* и *in vivo* по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* MSSA, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*;

6. Оценить биобезопасность применения гидрогелей ПВП в условиях *in vitro* в культуре мультипотентных мезенхимных стромальных клеткок (ММСК), выделенных из подкожного жира человека и *in vivo* на лабораторных животных (белых крысах линии *Wistar*).

Методы исследования и технические средства решения задач

В диссертационной работе использовали физико-химические, гистологические, цитологические, микробиологические методы анализа.

С целью определения физико-химических свойств исследуемых полимерных композиций применяли методы ИК-спектроскопии (ИК-Фурье спектрометр «*IR Spirit, Shimadzu*»), дифференциальной сканирующей колориметрии (колориметр теплового потока «*DSC 204F1 Phoenix, NETZSCH*»), вискозиметрии (ротационные вискозиметры «*Brookfield CAP 2000+*» с системой «конус-плита» и «*Brookfield DV2T RV*» с рабочим узлом в виде коаксиальных цилиндров), анализа свободной энергии поверхности (прибор для измерения краевого угла смачивания *KRUSS*), растровой электронной микроскопии (*QUANTA 650 FEG (FEI)*), методы исследования сорбционных характеристик (весы электронные аналитические *SARTORIUS R 200D, Sartorius Göttingen GmbH*).

Эффективность применения полимерных композиций с содержанием антибиотиков оценивали микробиологическими методами исследования (бокс абактериальной воздушной среды БАВп-01-«Ламинар-С»-1,2, микробиологический инкубатор на 37 °С *Heratherm IGS 60, Thermo Scientific*, стерилизатор паровой *HVA-110 «Hirayama»*) с определением антибиотикочувствительности микроорганизмов - возбудителей хирургических инфекций.

Исследования проводились на оборудовании ФГБУ "НМИЦ хирургии им. А.В.Вишневского" Минздрава России.

Оценка безопасности применения разработанных композиций была проведена *in vitro* в культуре ММСК, выделенных из подкожного жира человека и взятых из криобанка лаборатории стволовых клеток ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, посредством визуального анализа морфологии клеток в присутствии полимерных композиций (инвертированный фазово-контрастный микроскоп *Axio Observer D.1, Carl Zeiss*) и *in vivo* на лабораторных животных, выращенных в виварии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» с применением гистологических методов исследования (установка карусельного типа «*Thermo Scientific STP120*»; микротом «*Thermo Scientific Microm HM 450*»; световой микроскоп *Axio A1.0, Carl Zeiss*). Использовалось оборудование ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Научная новизна работы

Впервые:

1. Разработан способ получения гидрогелей на основе ПВП по комбинированной технологии, сочетающей термическую обработку и γ – облучение ПВП. Приоритет и новизна исследований подтверждены Патентом РФ на изобретение № 2746709 от 19.04.2021 г. «Способ получения антимикробного геля».
2. Изучены и предложены механизмы структурирования ПВП – гидрогелей под воздействием высокой температуры и ионизирующего излучения без применения инициаторов химического сшивания, соединений, не разрешенных в медицинской практике.
3. Выявлен синергетический антибактериальный эффект при комбинации фармацевтической субстанции фосфомицина с гентамицином.
4. Доказана биобезопасность ПВП – гидрогелей в эксперименте в условиях *in vitro* - в культуре ММСК, выделенных из подкожного жира человека и в условиях *in vivo* – на лабораторных животных (белые крысы линии *Wistar*).

Теоретическая и практическая значимость

Разработан метод получения гидрогелевого материала на основе ПВП, характеризующегося пролонгированным действием антибиотиков.

Отработан методологический подход по изучению межмолекулярных взаимодействий ПВП методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Установлены особенности механизма получения ПВП-гидрогеля с оптимальными эксплуатационными характеристиками в отсутствие химических катализаторов, не разрешенных для применения в медицине.

Разработан препарат в форме нерассасывающегося гибридного гидрогеля, проявляющего пролонгированный антимикробный эффект вплоть до 4-х месяцев экспозиции, который будет зарегистрирован как медицинское изделие.

Анализ отечественного рынка медицинских изделий показал, что в настоящее время на рынке Российской Федерации отсутствует эквивалентный аналог разработанного антимикробного гидрогеля.

Показана эффективность и безопасность использования гибридных ПВП-гидрогелей в качестве депо лекарственных средств.

Результаты, представленные в работе, используются в учебном процессе МГТУ им. Н.Э. Баумана при проведении лекционных и практических занятий со студентами по направлению подготовки "Биотехнические системы и технологии", по профилям: "Биомедицинские технические системы", "Медико-технические информационные технологии", "Биофотоника и тканевая инженерия", "Мягкая материя и физика флюидов" факультета "Биомедицинская техника", а также в Отделе перевязочных, шовных и полимерных материалов в хирургии ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России представляются студентам РТУ МИРЭА по специальности «Биотехнология», «Технология и переработка полимеров и композитов», «Промышленная фармация и технология получения лекарств», проходящие учебную практику и выполняющие выпускную квалификационную работу на базе Отдела.

В ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России разработан и утвержден лабораторный регламент на производство медицинского изделия ЛР 32.50.50-001-01897239-2023 от 15.02.2023 г.

Основные положения, выносимые на защиту

Технологические решения получения гибридного гидрогеля, как депо лекарственных средств фосфомицина и гентамицина для ортопедии и травматологии.

Особенности механизма взаимодействия макромолекул ПВП под действием высокоэнергетического излучения, термической обработки и в условиях комбинированного способа получения гидрогелей в отсутствие катализаторов химического сшивания.

Синергетический антибактериальный эффект при комбинации фармацевтической субстанции фосфомицина с гентамицином.

Биобезопасность и эффективность гибридного геля.

Апробация результатов

Материалы и основные положения работы доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях – III Международном форуме «Ключевые тренды в композитах: наука и технологии», г. Москва, 20 ноября 2020 г.; *12th International Conference on «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent advances Safety – Toxicology and Ecology Issues»*, Греция, 27 сентября – 4 октября, 2021; Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», г. Москва, 26-29 октября 2021 г.; *14th International Conference on «Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent advances Safety – Toxicology and Ecology Issues»*, Греция, 11 мая 2023 г.

Публикации по теме диссертации

По материалам проведенного исследования опубликовано 9 работ, в том числе 5 публикаций в изданиях из рекомендованного перечня ВАК Минобрнауки РФ, из них 2 работы, входящие в международную реферативную базу данных *Scopus*, 1 патент на изобретение.

Достоверность научных положений и выводов

Данные получены посредством современных методов физико-химического и биологического анализа. Достоверность научных положений и выводов основывается на многократной повторности экспериментов физических, физико-механических и медико-биологических, их воспроизводимости, а также на статической обработке полученных результатов.

Личный вклад автора

Автору принадлежит определяющая роль на всех этапах диссертационного исследования: от проведения анализа литературных данных по теме диссертационной работы, разработки дизайна исследования, постановки задач и их реализации до анализа и интерпретации полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.6. – «Биотехнология». Результаты выполненного исследования соответствуют специальности по п. 8 (в части: разработка

научно-методических основ для применения и оценки безопасности использования медицинских биопрепаратов).

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 186 страницах машинописного текста, иллюстрирована 68 рисунками и 34 таблицами и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка цитируемой литературы из 317 наименований, включающего 66 отечественных и 252 зарубежных источников, приложения.

Настоящая работа выполнена в рамках НИР по государственному заданию «Разработка функциональных субстанций при эндопротезировании крупных суставов и ревизионных вмешательствах» (номер государственного учета НИОКТР ААА-А18-118021390050-8).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, обозначены цели и задачи исследования, отражены научная новизна и практическая значимость работы. **В первой главе**, представленной обзором литературы, показаны существующие на сегодняшний день все меры профилактики и лечения перипротезной инфекции, возможные причины неудовлетворительных результатов лечения и значимость создания депо антибиотиков. **Во второй главе** (экспериментальной части) описаны объекты исследования, методики получения гидрогелей с содержанием антибактериальных фармацевтических субстанций фосфомицина и гентамицина на основе поливинилпирролидона, а также методы их исследования. **В третьей главе** представлены результаты и их обсуждение.

Результаты и обсуждение

Как показано в обзоре литературы одним из возможных решений проблемы перипротезной инфекции является разработка и применение медицинского изделия местного применения в гелевой форме. Для создания такого геля перспективным материалом является ПВП. Однако его безопасность и пролонгированное действие для данного способа применения в ортопедии ранее не были доказаны. В обзоре литературы также продемонстрирована перспективность сочетания антибактериальных субстанций фосфомицина и гентамицина в борьбе с перипротезной инфекцией, которые ранее в такой комбинации не исследовались.

Дизайн исследования приведен на рис. 1:

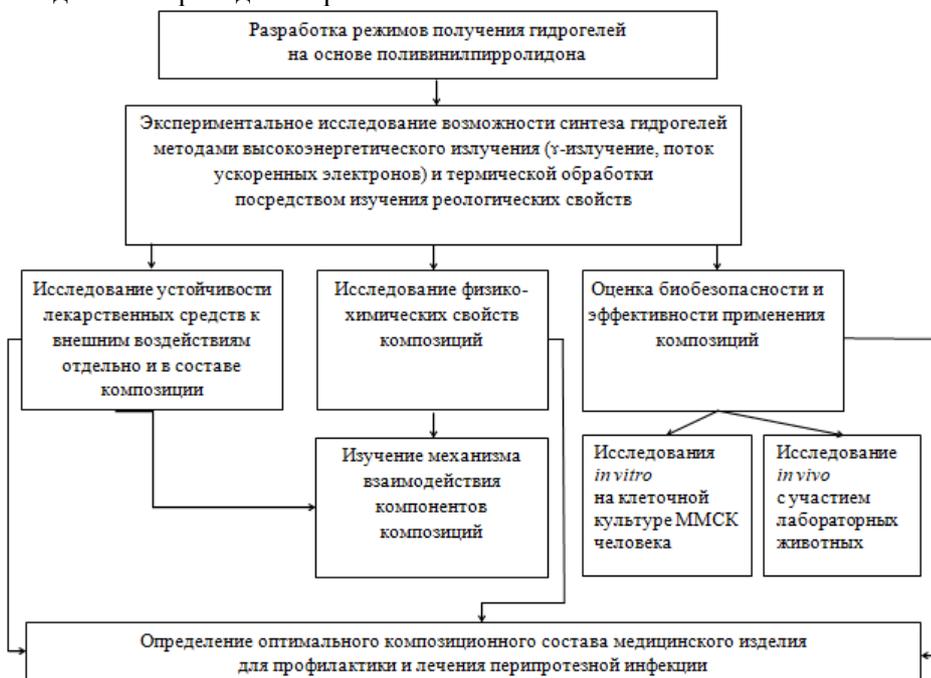


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Определение оптимальной концентрации лекарственных средств в составе полимерных композиций

Эффективно действующая концентрация лекарственных средств была определена экспериментальным путем, посредством изучения антимикробной активности индивидуальных и смешанных растворов антибиотиков в зависимости от соотношений концентраций гентамицина и фосфомицина в отношении микроорганизмов *Staphylococcus aureus* MSSA, *Pseudomonas aeruginosa*,

Escherichia coli. За основу была взята минимальная концентрация гентамицина в преформированных спейсерах, интегрированных антибиотиками, составляющая 1,2 масс. %. Концентрация фосфомицина варьировалась в пределах 0,3-10,0 масс. %. В отношении вышеуказанных микроорганизмов более эффективно работает система, состоящая из 1,2 масс. % гентамицина и 5,0 масс. % фосфомицина, проявляя синергетический эффект. Диаметр зоны подавления роста микрофлоры при микробной нагрузке 10^6 КОЕ/мл составлял (74 ± 4) мм, (70 ± 5) мм, (72 ± 3) мм в случае *Staphylococcus aureus* MSSA, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* соответственно.

При разработке медицинских изделий следует учитывать, что в ряде случаев, в частности в случае изделий, контактирующих с поврежденными тканями и кровью пациента, стерилизация является обязательной процедурой. Как правило, используется радиационная стерилизация. Поскольку известен эффект влияния радиационного излучения на физико-химические свойства и биологическую активность фармацевтических субстанций, была проверена устойчивость гентамицина и фосфомицина к ионизирующему излучению в зависимости от источника и величины дозы облучения в присутствии ПВП. Выявлено, что γ -излучение и поток ускоренных электронов (УЭ) вне зависимости от дозы облучения и присутствия ПВП не влияют на антимикробную активность фармацевтических субстанций фосфомицина и гентамицина. Факт отсутствия влияния режимов обработки на химическую структуру фармацевтических субстанций был подтвержден методом ИК спектроскопии НПВО и микробиологическими исследованиями.

Таким образом, установлено, что эффективно действующая концентрация лекарственных средств фосфомицина и гентамицина составляет 5,0 масс.% и 1,2 масс. % соответственно. Такое концентрационное соотношение антибиотиков принято оптимальным, так как дальнейшее увеличение концентрации фосфомицина не влияет на антимикробную активность системы.

Реологические свойства гидрогелей ПВП при различных способах обработки

Для получения гидрогелей ПВП с оптимальной консистенцией в качестве источников внешнего воздействия были применены высокоэнергетическое излучение, температурная обработка и их сочетание.

Обязательным условием разработки режимов получения гидрогелей медицинского назначения является отсутствие применения соединений, не разрешенных в медицинской практике. В этой связи в проведенных исследованиях не были использованы инициаторы сшивания.

Высокоэнергетическим излучением в виде воздействия потока УЭ и γ -облучения (^{60}Co) обработаны растворы ПВП с концентрацией 10 – 30 масс. %. Доза облучения составляла 15 – 30 кГр. Было выявлено, что γ -облучение (^{60}Co) в дозах, превышающих 15 кГр, способствует более эффективному повышению динамической вязкости по сравнению с обработкой УЭ. Так, например, вязкость 15 масс. %-ного исходного раствора ПВП при воздействии γ -излучения (^{60}Co) дозой 30 кГр возрастает практически в 400 раз (от 0,015 до 5,70 Па \times с), в то время как вязкость того же образца при УЭ увеличивается лишь в 2 раза. Увеличение концентрации ПВП не привело к значительному увеличению вязкости. Обратило на себя внимание то, что после воздействия γ -излучения (^{60}Co) дозой 30 кГр вязкость системы с 30 масс. % ПВП ниже, чем в случае 15 масс. % ПВП. Вязкость геля, полученного из 10 масс. % раствора ПВП примерно в 2,5 раза меньше. Поэтому дальнейшие исследования были проведены для системы с содержанием ПВП 15 масс. %, полученной γ -облучением с интенсивностью 30 кГр (далее по тексту ПВП- γ). Было показано, что высокоэнергетическое излучение 15 масс. % растворов ПВП приводит к увеличению характеристической вязкости: в 1,5 раза при дозе облучения 15 кГр и в 2,5 раза при дозе 30 кГр в сравнении с необлученным раствором ПВП. По результатам определения значений средневязкостной молекулярной массы этих систем, установлено, что при высокоэнергетической обработке (γ -облучение, поток УЭ) протекают два параллельных процесса: поперечное сшивание и увеличение молекулярной массы.

В интервале скоростей сдвига $1 \times 10^2 - 1 \times 10^4 \text{ c}^{-1}$ происходит разрушение первоначальной структуры системы ПВП - γ . Глубина деструкции составляет десятки раз, при этом система обладает тиксотропностью: через 15 мин после устранения внешнего воздействия первоначальная структура восстанавливается на 87 %, через 1 ч – на 96 %.

Визуально системы с вязкостью от $2,5 \times 10^3$ до 10×10^3 мПа \times с представляют собой форму неустойчивого геля. Системы с более низкой вязкостью (до 1×10^3 мПа \times с) можно отнести к структурированным растворам. Системы с вязкостью 10×10^3 мПа \times с и более обладают устойчивой формой, что делает невозможным их нанесение на поверхность ортопедического имплантата сложной конфигурации. Для данного практического применения оптимальными являются системы с

вязкостью от 1×10^3 до 10×10^3 мПа·с. Таким образом, гидрогель ПВП- γ обладает оптимальными реологическими свойствами для данного медицинского применения. Однако, введение антибиотиков фосфомицина и гентамицина в шитую γ – облучением полимерную систему не представилось возможным. Облучение многокомпонентной системы ПВП – гентамицин – фосфомицин не привело к гелеобразованию, рис. 2. Такой результат показывает существенное ограничение протекания реакции сшивания ПВП в присутствии антибиотиков. Согласно результатам облучение приводит к гелеобразованию в системе ПВП/фосфомицин, а в системе ПВП/гентамицин гелеобразование не происходит. Это значит, что к стерическим затруднениям процесса гелеобразования приводит

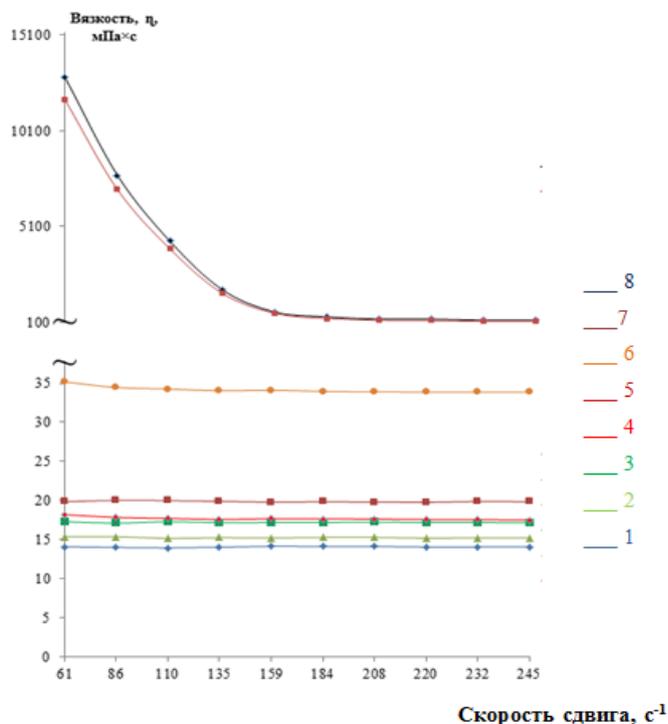


Рисунок 2 – Вязкостно-скоростные кривые систем на основе 15 масс.% ПВП с антибиотиками и без них до и после воздействия γ -излучения дозой 30 кГр, $T = 25^\circ\text{C}$:
 1,8 – раствор 15 масс. % ПВП до облучения и после;
 2,4 – раствор 15 масс. % ПВП с содержанием 1,2 масс. % гентамицина до облучения и после;
 3,7 – раствор 15 масс. % ПВП с содержанием 5,0 масс. % фосфомицина до облучения и после;
 5,6 – раствор 15 масс. % ПВП с содержанием 1,2 масс. % гентамицина и 5,0 масс. % фосфомицина до облучения и после

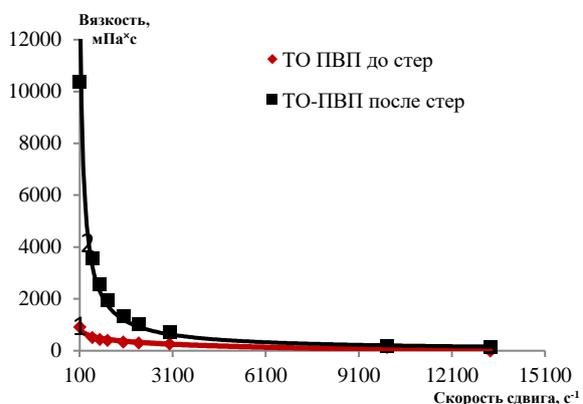


Рисунок 3 – Вязкостно-скоростные кривые гидрогелей ПВП – ТО, $T = 25^\circ\text{C}$:
 1 – до γ -обработки;
 2 – после γ -обработки

молекула гентамицина (в виду ее большей громоздкости).

Следующим этапом было изучение влияния термической обработки на свойства ПВП. Физико-химические свойства порошкообразного ПВП после термической обработки в диапазоне температур 140 – 180 $^\circ\text{C}$ претерпевают изменения. Наиболее оптимальным режимом является нагревание при 160 $^\circ\text{C}$ в течение 6 ч. Данный режим приводит к образованию продукта, не способного растворяться в воде, но хорошо набухающего в ней (ПВП-ТО). Его ограниченное набухание заканчивается образованием геля. С использованием ПВП-ТО получены гидрогели в двух вариантах: на основе только ПВП-ТО и ПВП-ТО с немодифицированным ПВП в массовом соотношении 5:1 (далее по тексту ПВП – комб).

Отмечается схожее поведение гидрогелей ПВП – ТО и ПВП-комб с гидрогелем ПВП – γ : неньютоновоский характер, тиксотропность (в среднем структура через 1 ч восстанавливается на 95 %). Дополнительная γ – обработка продукта дозой 15 кГр – с целью стерилизации, приводит к увеличению вязкости: значение вязкости в случае

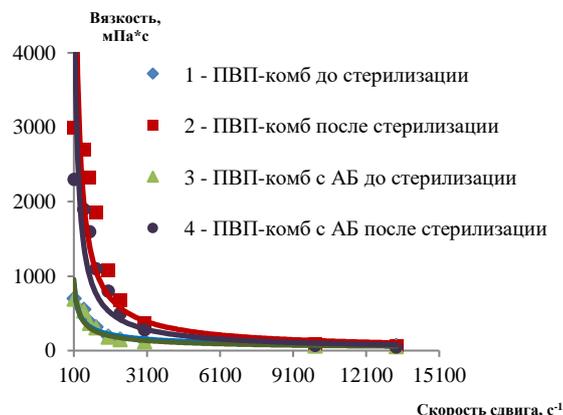


Рисунок 4 – Вязкостно-скоростные кривые гидрогелей ПВП-комб без АБ и с АБ до и после стерилизации $T = 25^\circ\text{C}$:
 1 – гидрогель ПВП-комб без АБ до γ -обработки;
 2 – гидрогель ПВП-комб без АБ после γ -обработки;
 3 – гидрогель ПВП-комб с АБ до γ -обработки;
 4 – гидрогель ПВП-комб с АБ после γ -обработки

ПВП-ТО становится 11×10^3 мПа·с (первоначальное значение 1×10^3 мПа·с), что находится на пределе значений для практического применения, рис. 3. Система теряет свойства текучести.

Гидрогели ПВП-комб после дополнительной обработки γ -излучением сохраняют свойство текучести, что зафиксировано в патенте РФ на изобретение № 2746709 от 19.04.2021 г. «Способ получения антимикробного геля». В полимерной системе происходит увеличение вязкости с 700 мПа·с до 2500 мПа·с (рис. 4,) как за счет увеличения ММ, так и дополнительной сшивки ввиду наличия в ней немодифицированного ПВП.

Гибридные гидрогели ПВП (содержащие антибиотики) хорошо адгезируют к металлической поверхности. Экспериментальные данные по определению значений свободной поверхностной энергии образцов гидрогелей и металлического образца приведены в табл. 1, согласно которым хорошая смачиваемость металлической поверхности из медицинского *NiTi* гибридными гидрогелями происходит за счет дисперсной составляющей, а плотное прилегание должно предотвратить образование биопленки, что далее подтверждается гистологически в эксперименте *in vivo*.

Таблица 1 – Энергетические характеристики поверхности медицинского *NiTi* и гидрогелей ПВП

Образец	Общая поверхностная энергия (γ), мДж/м ²	Дисперсионная составляющая поверхностной энергии (γ^d), мДж/м ²	Полярная составляющая поверхностной энергии (γ^p), мДж/м ²
Металлическая поверхность из медицинского <i>NiTi</i>	$34,2 \pm 1,6$	$25,8 \pm 1,3$	$8,4 \pm 0,5$
Гибридный гидрогель ПВП – ТО	$63,7 \pm 1,9$	$24,1 \pm 1,1$	$39,6 \pm 1,5$
Гибридный гидрогель ПВП – комб	$66,0 \pm 1,8$	$20,9 \pm 1,1$	$45,1 \pm 1,6$

Гидрогель ПВП-комб характеризуется относительно низкой степенью набухания (величина равновесного набухания – 130 %), что делает его атравматичным.

Исследования межмолекулярных взаимодействий в гидрогелях методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО)

Для изучения межмолекулярных взаимодействий в гидрогелях ПВП был применен метод НПВО. Были сняты ИК-спектры системы ПВП/вода до и после воздействия γ -излучения, спектры ПВП до и после термообработки. Интерпретацию спектров выполняли с использованием характеристических частот.

ИК-спектр после γ -излучения несколько отличается от ИК-спектра немодифицированной системы ПВП/вода. Замечены изменения в интенсивности полос поглощения функциональных групп при волновых числах $1466,23$ см⁻¹; ($1419,16 - 1424,86$) см⁻¹; ($1379,22 - 1374,94$) см⁻¹; ($1319,32 - 1322,17$) см⁻¹; ($1226,61 - 1215,20$) см⁻¹, для которых определены отношение оптических плотностей при данных длинах волн и внутреннего стандарта ($1634 - 1652$ см⁻¹). Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Относительная интенсивность полос поглощения в ИК – спектрах исходного водного раствора ПВП и модифицированного раствора ПВП воздействием ионизирующего излучения

№	Волновое число, ν , см ⁻¹	Соотношение $D/D_{\text{вн.ст}}$		D''/D'
		Исходный раствор ПВП (D')	Модифицированный раствор ПВП (D'')	
1	1466,23	$0,076 \pm 0,003$	$1,333 \pm 0,060$	$17,518 \pm 0,9$
2	1419,16 - 1424,86	$0,058 \pm 0,002$	$0,352 \pm 0,015$	$6,100 \pm 0,3$
3	1374,94 - 1379,22	$0,012 \pm 0,001$	$0,079 \pm 0,003$	$6,337 \pm 0,3$
4	1319,32 - 1322,17	$0,023 \pm 0,001$	$0,089 \pm 0,004$	$3,859 \pm 0,2$

Изменение относительной интенсивности полос поглощения, представленных в табл. 2, позволяет предположить, что реакции сшивания могут происходить по схемам, продемонстрированным на рис. 5, то есть по карбонильной группе (рис. 5,1) и основной цепи (рис. 5,1). В табл. 3 представлены результаты анализа ИК-спектров ПВП до и после термообработки. Значимое изменение в величинах относительной интенсивности полос поглощения функциональных групп было при волновом числе $1373,52$, отражающего изменения функциональной группы $\text{CH}_2-\text{CH}-$, что свидетельствует о том, что

сшивка макромолекул ПВП в случае термообработки происходит в основном с участием группы $\text{CH}_2 - \text{CH} -$ либо по главной цепи полимера (рис. 6,1), либо по лактамному кольцу (рис. 6,2).

Таблица 3 – Относительная интенсивность полос поглощения ИК – спектров исходного ПВП и ПВП – ТО

№	Волновое число, ν , cm^{-1}	$D/D_{\text{вн.ст}}$		D''/D'
		ПВП исходный (D')	ПВП – ТО (D'')	
1	1457,67-1460,52	$0,182 \pm 0,009$	$0,157 \pm 0,006$	$0,881 \pm 0,040$
2	1419,16 -1420,58	$0,434 \pm 0,215$	$0,461 \pm 0,020$	$1,062 \pm 0,009$
3	1373,52	$0,097 \pm 0,004$	$0,134 \pm 0,006$	$1,381 \pm 0,005$
4	1315,04 -1316,47	$0,075 \pm 0,003$	$0,067 \pm 0,030$	$0,902 \pm 0,019$
5	1228,04	$0,063 \pm 0,003$	$0,065 \pm 0,003$	$1,032 \pm 0,002$

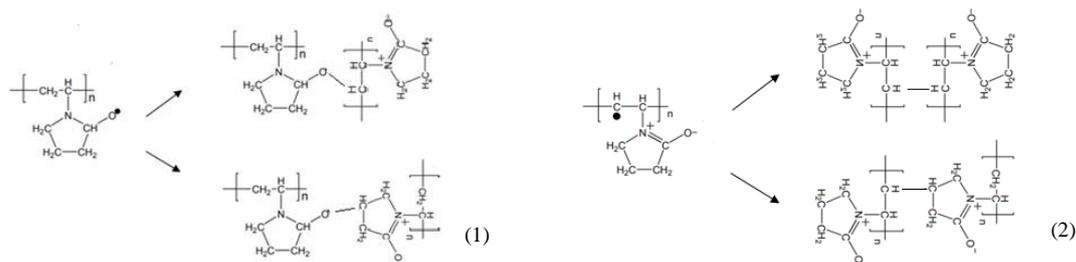


Рисунок 5 – Механизм «сшивания» ПВП под воздействием высокоэнергетического излучения

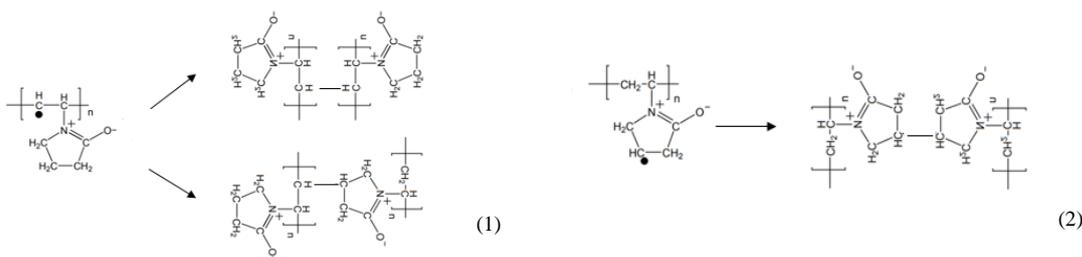


Рисунок 6 – Механизм «сшивания» ПВП при термообработке

В случае комбинированного метода естественно, что присутствуют все обсужденные выше механизмы сшивания.

Для изучения межмолекулярных взаимодействий компонентов внутри гибридных гидрогелей, содержащих фосфомицин и гентамицин, при разных способах получения проанализированы ИК-спектры полимерных систем до и после добавления антибиотиков. Анализ ИК-спектров полимерных систем показал, что после добавления антибактериальных фармацевтических субстанций изменения произошли в области волновых чисел $1100 - 980 \text{ cm}^{-1}$: после добавления гентамицина появился слабый пик в области 1072 cm^{-1} (асимметричное валентное колебание связи $\text{C} - \text{O} - \text{C}$ в гетероцикле гентамицина); после добавления фосфомицина появился пик не только в области волнового числа 1072 cm^{-1} , но и в области 982 cm^{-1} (асимметричные валентные колебания эпокси группы); в присутствии обеих фармацевтических субстанций ИК-спектр идентичен с ИК-спектром системы с фосфомицином и отличается лишь интенсивностью пика при волновом числе 1072 cm^{-1} . Интенсивность пиков, характерных для исходного ПВП, не изменились.

Таким образом, вне зависимости от способа получения, в гибридных гидрогелях взаимодействие между компонентами композиции отсутствует как в системах в исходном состоянии, так и после γ -обработки.

Оценка плотности сшивания ПВП методом ДСК

Свойства гидрогелей были охарактеризованы методом ДСК, данные представлены в табл.4.

Оценку плотности сшивания провели по методу Нильсена по уравнению: $T_g - T_{g0} = \frac{k_N}{M_c}$, где T_g – температура стеклования сшитого полимера; T_{g0} – температура стеклования «несшитого»

полимера; $k_N=3,9 \times 10^4$ (г*К)/моль – коэффициент, не зависящий от природы системы; M_c – молекулярная масса фрагмента между узлами сетки.

Таблица 4 – Удельная теплоемкость и молекулярная масса фрагментов между узлами сетки (M_c) шитого ПВП разными технологическими приемами

Композиция	Температура стеклования, T_g , °С	M_c
ПВП _{исх} (в форме порошка)	168,2	–
Гидрогель ПВП – γ	171,8	$1,0 \times 10^4$
ПВП – ТО(в форме порошка)	171,3	$1,2 \times 10^4$
Гидрогель ПВП – ТО после воздействия γ - облучения	183,2	$0,3 \times 10^4$

Таким образом, после воздействия γ -облучения и температуры получают системы с одинаковой плотностью сшивания. В результате γ -облучения термообработанного ПВП M_c уменьшается, то есть происходит дополнительная сшивка, что также было показано по результатам исследований по изучению межмолекулярных взаимодействий методом ИК-спектроскопии НРВО.

Антимикробная активность ПВП – гидрогелей в условиях *in vitro* и *in vivo*

Зависимость зоны угнетения гидрогеля от посевной дозы тест-микроорганизма на примере гибридного гидрогеля ПВП–комб в отношении госпитальных штаммов *Staphylococcus aureus* MSSA и MRSA приведены в табл.5.

Таблица 5 – Оценка антимикробного действия гибридных гелей в зависимости от степени обсемененности в условиях *in vitro* в отношении *Staphylococcus* MSSA и MRSA

Композиция	Посевная доза тест микроорганизма, КОЕ/мл	Зона угнетения роста тест-культуры, мм			
		1-е сутки	2-е сутки	7-е сутки	9-е сутки
Гибридный гидрогель ПВП – комб	10^8	70 ± 6	60 ± 5	55 ± 5	40 ± 4
	10^6	72 ± 6	65 ± 5	55 ± 5	45 ± 5
	10^2	80 ± 7	70 ± 6	60 ± 6	50 ± 5



Рисунок 7 – Динамика изменения антимикробной активности в эксперименте в условиях *in vivo* с применением гибридного гидрогеля ПВП – комб в отношении госпитальных штаммов *Staphylococcus aureus*

в течение 4 месяцев, рис. 7. Изъятые образцы гибридных гидрогелей были исследованы при степени обсемененности *Staphylococcus aureus* 10^6 КОЕ/мл, соответствующей уровню обсемененности гнойной раны.

После имплантации гидрогеля в организм подопытного животного, первое наблюдение проводилось через 7 дней от начала эксперимента. Извлеченный из организма животного образец геля сохранил свои антимикробные свойства на ~31 % от первоначальной активности. По результатам второго наблюдения, через 14 дней от начала эксперимента, антимикробная активность

Гибридный гидрогель ПВП – комб *in vitro* проявляет сохранность высокой антимикробной активности, о чем свидетельствует одинаковая большая остаточная величина зоны подавления роста как микроорганизмов *Staphylococcus aureus* MSSA, так и *Staphylococcus aureus* MRSA (к концу эксперимента образцы гидрогеля сохранили свою антимикробную активность на 55 - 75 % от первоначального значения); высвобождение антимикробных средств происходит в первые сутки, при этом гидрогель продолжает эффективно «работать» даже при высокой степени обсемененности (10^8 КОЕ/мл) в течение 9-и суток.

Поскольку экспериментальные образцы гибридного гидрогеля ПВП – комб в условиях *in vitro* продемонстрировали высокую антимикробную активность, исследования были продолжены в условиях *in vivo*

образца геля составляла 25 – 26% от первоначального значения. К 28-му дню уменьшилось до 21%, к 60-му дню – до 14% и дальше осталось неизменным до 120 дня эксперимента, при зоне подавления 10 мм.

В условиях *in vivo* основная часть антибактериальных средств высвобождается из полимерной матрицы в первые семь суток после имплантации, причем скорость высвобождения лекарственных средств в 2,5 раза выше, чем в условиях *in vitro*.

Оценка токсичности и адгезионных свойств ПВП – гидрогелей в культуре клеток

Для оценки адгезивных свойств ПВП – гидрогелей и отсутствия их токсичности были использованы клетки с высоко выраженными адгезивными свойствами – ММСК, выделенные из подкожного жира человека. Серией экспериментов было показано, что тестируемые в культуре ММСК гели не токсичны, клетки способны к ним прикрепляться и пролиферировать.

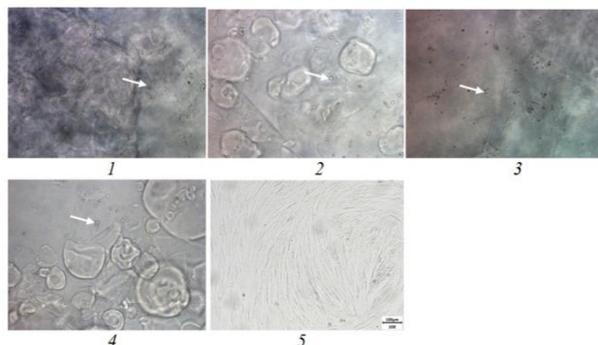


Рисунок 8 – Морфология ММСК на 1-е сутки культивирования: 1 – гидрогель ПВП – ТО; 2 – гибридный гидрогель ПВП – ТО; 3 – гидрогель ПВП – комб; 4 – гибридный гидрогель ПВП – комб; 5 – контроль. Ув. $\times 100$. Стрелками указаны клетки «ошаренной» формы.

Согласно результатам эксперимента во всех экспериментальных образцах через 24 часа после культивирования на наложенных препаратах и даже в промежутках между частицами наложенного геля – на пластиковом дне пробирки, в отличие от контрольного образца, где хорошо визуализируются узкие вытянутые веретенообразные клетки, отмечены клетки округленной («ошаренной») формы (рис. 8). Только в гидрогеле ПВП – комб визуализировались единичные распластанные клетки. Следует отметить, что, несмотря на нехарактерную для ММСК форму, что говорит о «стрессовом»

состоянии клеток в «новой», для них не привычной среде, клетки были прочно прикреплены к поверхности исследуемых полимерных композиций.

Выживаемость клеток в среде исследуемых полимерных композиций составила $(97 \pm 0,04)\%$; $(85 \pm 0,1)\%$; $(92 \pm 0,5)\%$; $(80 \pm 0,01)\%$ для гидрогеля ПВП – ТО, гибридного гидрогеля ПВП – ТО, гидрогеля ПВП – комб, гибридного гидрогеля ПВП – комб соответственно.

ММСК на 5 сут культивирования распластывались и формировали монослой как на пустотах пластика, так и на матрицах. Было выявлено некоторое снижение скорости формирования монослоя в образцах (гибридных гидрогелей ПВП–ТО и ПВП–комб), содержащих антибиотики, табл. 6, рис. 9.

Таблица 6 – Оценка формирования монослоя

№	Название образца	№ опыта	Количество клеток в 10 спонтанно выбранных полях зрения в объективе (ув: $\times 400$)										Ср.
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	Гидрогель ПВП – ТО	1	33	30	29	27	35	31	28	32	32	33	31 \pm 3
		2	32	31	28	28	31	34	29	31	33	32	
		3	28	29	31	31	33	32	30	30	31	34	
2	Гибридный гидрогель ПВП – ТО	1	57	68	61	63	68	59	65	67	67	64	64 \pm 4
		2	59	66	62	62	67	60	64	68	65	66	
		3	62	65	60	64	65	62	62	65	66	68	
3	Гидрогель ПВП – комб	1	37	29	30	31	35	37	34	35	38	30	34 \pm 3
		2	31	35	29	32	36	36	37	31	34	35	
		3	29	32	32	34	35	37	36	32	35	34	
4	Гибридный гидрогель ПВП – комб	1	69	63	68	59	62	68	67	65	67	66	65 \pm 3
		2	65	67	62	65	64	66	65	67	68	64	
		3	64	68	60	67	65	65	66	66	65	67	
5	Контроль	1	110	100	99	103	111	107	105	108	108	107	106 \pm 4
		2	107	102	100	109	101	99	103	110	107	108	
		3	105	101	102	110	104	103	108	104	110	109	

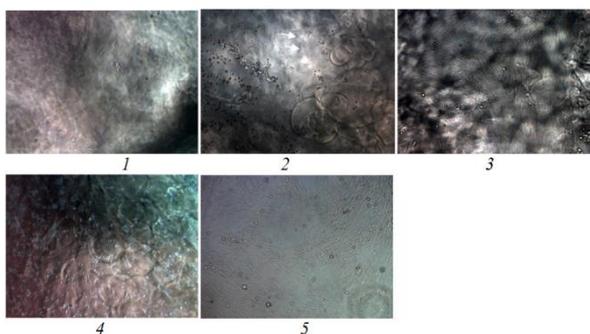


Рисунок 9 – Морфология ММСК на 5-е сутки культивирования:
1 – гидрогель ПВП – ТО; 2 – гибридный гидрогель ПВП – ТО; 3 – гидрогель ПВП – комб; 4 – гибридный гидрогель ПВП – комб; 5 – контроль. Ув. $\times 100$

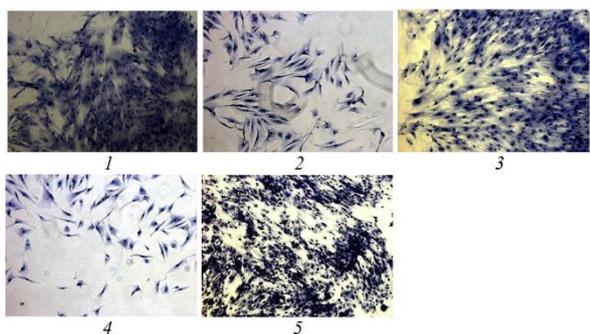


Рисунок 10 – Морфология ММСК на 5-е сутки культивирования в окрашенных по Гимза препаратах:
1 – гидрогель ПВП – ТО; 2 – гибридный гидрогель ПВП – ТО; 3 – гидрогель ПВП – комб; 4 – гибридный гидрогель ПВП – комб; 5 – контроль. Ув. $\times 100$

Так, в лунках с нанесенными образцами гибридных гидрогелей ПВП – ТО и ПВП – комб ММСК ПЖТ формировали монослой на 31 % и 34% соответственно, рис. 9(2) и 9(4). В образцах гидрогелей ПВП – ТО и ПВП – комб ММСК ПЖТ формировали монослой на 64% и 65% соответственно, рис. 9 (1) и 9 (3).

Морфологическим анализом ММСК были выявлены изменения в морфологии клеток в гибридных гидрогелях ПВП – ТО и ПВП – комб по сравнению с контролем и этими же гидрогелями без антибиотиков, рис. 10: клетки в препаратах с антибиотиками укрупнились, принимали более округлую форму «звезды», уплощались.

В цитоплазме появились вакуоли, которые отсутствовали в клетках контрольной группы, и наблюдались изменения в хроматине клеточных ядер. ММСК на гидрогеле ПВП – ТО на 5-е сутки были эквивалентны контролю, что может свидетельствовать о его успешном применении в качестве матрицы для их культивирования. Клетки имели веретеновидную форму, крупное овальное ядро с 2-3 ядрышками и с мелкозернистым хроматином.

Адгезивная способность ММСК ПЖТ в отношении поверхности гидрогелей была высокая, табл. 7:

Таблица 7 – Оценка адгезивной способности ММСК ПЖТ в отношении поверхности гидрогелей ПВП

№	Название образца	Количество клеток, прикрепившихся на поверхность гидрогелей (%)			
		1	2	3	Сред.
1	Гидрогель ПВП – ТО	86,0	86,01	85,99	$86 \pm 0,01$
2	Гибридный гидрогель ПВП – ТО	81,9	82,3	82,1	$82 \pm 0,2$
3	Гидрогель ПВП – комб	81,03	80,99	81,01	$81 \pm 0,02$
4	Гибридный гидрогель ПВП – комб	79,4	78,8	79,2	$79 \pm 0,3$

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии токсичности ПВП и высокой адгезивной способности ПВП – гидрогелей в отношении клеток человека, выделенных из подкожного жира.

Исследование биобезопасности местного применения ПВП – гидрогелей *in vivo*

На первом этапе необходимо было оценить реакцию тканей экспериментальных животных при введении гидрогелей с разными вязкоупругими свойствами в отсутствие в их составе лекарственных препаратов с целью определения влияния механического воздействия имплантатов.

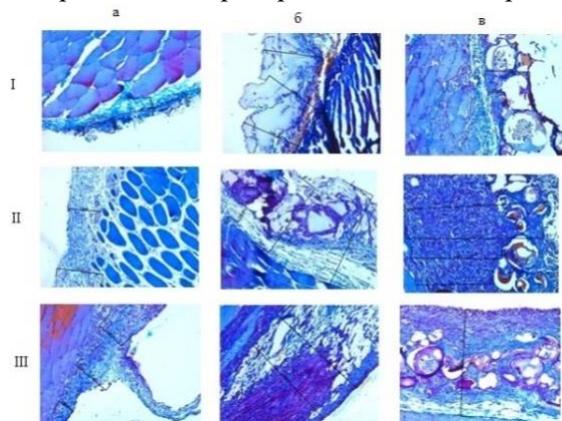


Рисунок 11 – Морфометрия образцов мягких тканей в динамике. Окраска по Маллоури, ув. $\times 100$:

а – ткани, при использовании Мезогеля;
 б – ткани, при использовании гидрогеля ПВП – γ ;
 в – ткани, при использовании гидрогеля ПВП – ТО;
 строка I – 3-и сутки эксперимента;
 строка II – 7-е сутки эксперимента;
 строка III – 14-е сутки эксперимента

инфильтрации лимфоидными клетками характеризуется как асептическое воспаление. Подобная реакция была замечена лишь вблизи введенных гелей и не имела распространение в более глубокие слои тканей. Окраска образцов по Маллоури позволила определить толщины соединительной ткани, значения приведены в табл. 8, рис. 11, из которых видно, что в тканях, подверженных меньшим механическим воздействиям, в данном случае определяемым вязкоупругими свойствами гелей, толщина соединительной ткани меньше.

Таблица 8 – Динамика изменения толщины соединительной ткани после введения испытуемых образцов

Сроки наблюдения (сутки)	Толщина образования соединительной ткани, мкм		
	при использовании гидрогеля ПВП – γ	при использовании гидрогеля ПВП – ТО	при использовании Мезогеля
3-и	$3,36 \pm 0,31$	$2,43 \pm 0,18$	$1,02 \pm 0,09$
7-е	$4,92 \pm 0,37$	$7,01 \pm 0,45$	$2,18 \pm 0,18$
14-е	$5,88 \pm 0,40$	$5,70 \pm 0,42$	$1,54 \pm 0,13$

На протяжении всего эксперимента показатели лейкоформулы животных не выходили за пределы референтных значений, что свидетельствует об отсутствии усугубляющих факторов.

Поскольку исследования показали, что гидрогели на основе ПВП, вне зависимости от способа изготовления не оказывают токсического действия на мягкие ткани и организм в целом, а выявленная незначительная асептическая воспалительная реакция в окружающих тканях свидетельствует об адекватной местной реакции тканей на введение инородного вещества, то дальнейшие исследования были направлены на изучение реакции тканей при длительном локальном использовании гидрогелей.

После введения гидрогелей в ходе эксперимента не наблюдали изменений в общем состоянии и поведении животных: в послеоперационном периоде не наблюдали признаков боли, дистресса, состояние послеоперационной раны было удовлетворительное, без признаков воспаления и инфицирования. Результаты в силу их идентичности представлены для случая использования гибридного гидрогеля ПВП – комб.

Макроскопическим методом исследования показано, что на сроках наблюдения до 120 суток от начала эксперимента место расположения гидрогеля спокойное. Гидрогель прилегает к мышечной фасции свободно. На месте имплантации свободной жидкости не выявлено.

Эксперимент был проведен на малых сроках экспозиции имплантата. Для достижения результата использовали гидрогели ПВП – γ ($\eta=12 \times 10^3$ мПа \times с), ПВП – ТО ($\eta=10 \times 10^3$ мПа \times с) и зарегистрированный препарат Мезогель (РУ № ФСР 2010/08895 от 14.10.2021 г.), отличающийся от ПВП – гидрогелей вязкоупругими свойствами ($\eta=2,2 \times 10^3$ мПа \times с).

При макроскопическом исследовании мягких тканей животных после имплантации гидрогелей не было выявлено наличие бактериальной микрофлоры (признаков воспаления). Только при применении гидрогеля ПВП – γ на 3-и сутки эксперимента, было замечено утолщение тазовой конечности в области бедра из-за увеличения объема самого гидрогеля примерно в 3 раза, что сохранилось на протяжении всего периода эксперимента (14 суток).

В результате во всех макроскопически исследуемых образцах тканей после введения 3-х типов гелей, различающиеся разными вязкоупругими свойствами, наличие воспалительной реакции не было выявлено. Присутствующая реакция в виде

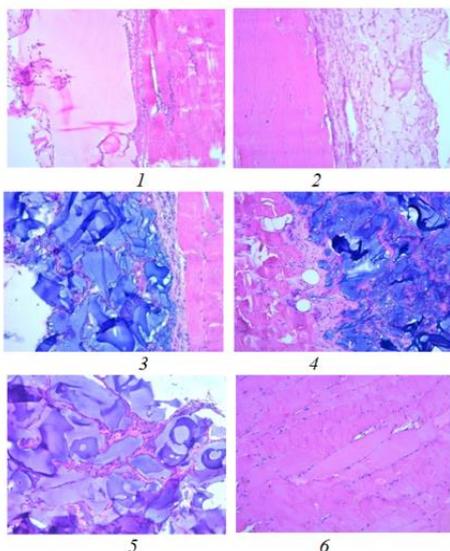


Рисунок 12 – Гистологическая картина мышечной ткани животных в динамике: 1 – 7-е сутки; 2 – 14-е сутки; 3 – 120-е сутки; 4 – 180-е сутки; 5 – 365-е сутки; 6 – интактный контроль. Гематоксилин и эозин. Ув. 100х

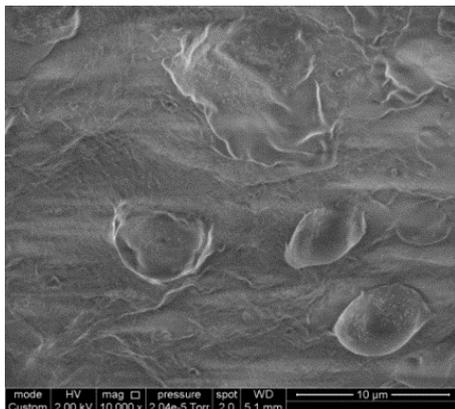


Рисунок 13 – Микрофотография гибридного гидрогеля ПВП-комбв окружении соединительной ткани, полученная на РЭМ, ув. $\times 10\,000$, срок имплантации 180 суток

Изучение местной реакции тканей на имплантацию гидрогеля гистологическим методом показало, что мышечная ткань на протяжении всего эксперимента не претерпевает критических патологических изменений, рис. 12: везде наблюдается чёткая поперечно полосатая исчерченность мышечной ткани, пучки миоцитов равномерные, трофика тканей не нарушена. На 7-е сутки эксперимента в прилегающих к месту локализации гидрогеля мышцах выявлена незначительная воспалительная реакция в виде небольшого скопления клеток лимфоидного ряда между пучками мышечных волокон. Наличие в тканях эозинофилов может свидетельствовать о развитии индивидуальной местной аллергической реакции, которая к 14-м суткам снижается и не имеет критического диагностического значения. Исследования в последующие контрольные точки отбора материала на 21-е, 28-е, 60-е и 90-е сутки эксперимента показало практически идентичную микрокартину с таковой на 14 сутки. На 120-е сутки образцы гидрогеля уже обрамлены волокнами соединительной ткани, рис.12(3). К 180-м суткам в препарате выражено срастание гидрогеля с мышечной тканью, характеризуется данный процесс наличием неровного края на стыке, плавным вхождением соединительнотканых волокон вглубь прилегающего гидрогеля. Волокна соединительной ткани располагаются хаотично в массе геля и прорастают по всей площади наблюдаемого объекта, рис. 12 (4).

На 365-е сутки эксперимента в месте введения гидрогеля выявлено обрастание его частиц волокнами соединительной ткани, рис. 12 (5).

Факт прорастания гидрогелей соединительной тканью подтвердился при более детальном изучении образцов с помощью РЭМ, рис. 13. Гидрогель хорошо адгезирован к поверхности окружающих тканей, при этом его можно извлечь без травматизации окружающих мягких тканей.

Морфологическое строение паренхиматозных и лимфоидных органов до конца эксперимента соответствовало анатомо-физиологической норме, что говорит об отсутствии общетоксического действия составляющих гидрогелей на организм экспериментальных животных.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ ПО РАБОТЕ

1. Разработана комбинированная технология получения биобезопасных гидрогелей на основе ПВП и фармацевтических субстанций фосфомицина и гентамицина, сочетающая термическую обработку и γ -облучение без применения инициаторов химического сшивания.
2. Установлено, что для практического применения при перипротезной инфекции оптимальными являются системы с вязкостью от 1×10^3 до 10×10^3 мПа \cdot с, которые получают использованием сочетания методов термической обработки и γ -облучения (комбинированным методом). Внешнее механическое воздействие приводит к разрушению первоначальной структуры гидрогелей, но при этом системы обладают свойством тиксотропии, и в течение 1 часа вязкость восстанавливается до 96%.
3. Применение комбинированной технологии обеспечивает получение гидрогеля с вязкостью – 2500 ± 350 мПа \cdot с, величиной равновесного набухания – 130 %, адгезионными свойствами в отношении NiTi поверхности ($\gamma^d = 20,9 \pm 1,1$ мДж/м 2 ; $\gamma^p = 45,1 \pm 1,6$ мДж/м 2).
4. Показано, что процесс структурирования макромолекул ПВП сочетает в себе одновременное прохождение процессов увеличения молекулярной массы полимера и образования поперечных связей между его макромолекулами. Под воздействием γ – облучения образование поперечных связей происходит между атомами кислорода карбонильной группы и углерода основной цепи или

пирролидонового кольца, а в случае термообработки – в основном с участием группы $\text{CH}_2 - \text{CH}$ – по главной цепи полимера или по лактамному кольцу. Установлены отсутствие взаимодействия гентамицина и фосфомицина с макромолекулами сшитого ПВП в гибридном гидрогеле, стабильность антибиотиков к γ – облучению, что в сочетании с тиксотропными свойствами обеспечивает пролонгированный антибактериальный эффект медицинского изделия.

5. Установлено, что одновременное применение фосфомицина и гентамицина приводит к синергетическому антибактериальному эффекту, развитие которого проявляется при концентрации 5 масс. % по фосфомицину и 1,2 масс. % по гентамицину. Антибактериальный эффект гидрогеля ПВП *in vivo* сохраняется в течение 4-х месяцев.

6. Доказана биобезопасность гибридного ПВП – гидрогеля в эксперименте в условиях *in vitro* - в культуре ММСК (выживаемость клеток в среде гидрогелей ПВП составила 80 – 97 %) и в условиях *in vivo* – на белых крысах линии *Wistar* при имплантировании материала в мышечную ткань бедра (гидрогель не оказывает токсического действия на мягкие ткани и организм в целом: наличие воспалительной реакции не было выявлено, присутствующая реакция вблизи имплантированного геля в виде инфильтрации лимфоидными клетками характеризуется как асептическое воспаление; на протяжении всего эксперимента показатели лейкоформулы животных не выходили за пределы референтных значений; морфологическое строение паренхиматозных и лимфоидных органов в течение эксперимента соответствовало анатомо-физиологической норме).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Патент на изобретение

1. Способ получения антимикробного геля. Патент РФ на изобретение 2746709 С1. Авторы: Легонькова О.А., Божкова С.А., Терехова Р.П., Ахмедов Б.А., **Оганнисян А.С.**, Гордина Е.М., Винокурова Т.И., Чилилов А.М. Опубликовано: 19.04.2021. Бюлл. № 11.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

2. Легонькова О.А. Свойства поливинилпирролидоновых гелей после стерилизующих воздействий / О.А. Легонькова, В.Г. Васильев, С.А. Божкова, Р.П. Терехова, **А.С. Оганнисян**, М.М. Григорьев, Т.И. Винокурова, А.М. Чилилов, Б.Г. Ахмедов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. – Т. 22. – № 11. – С. 19-24.

3. **Оганнисян А.С.** Гистологические исследования ответной реакции организма животных на применение антимикробного геля локального воздействия / **А.С. Оганнисян**, В.В. Стаффорд, О.А. Легонькова, Б.Г. Ахмедов, С.А. Божкова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24. – № 10. – С. 23-30.

4. Легонькова О.А. Сравнительная оценка поведения гелей на основе поливинилпирролидона в условиях *in vitro* и *in vivo* / О.А. Легонькова, **А.С. Оганнисян**, В.В. Стаффорд, Р.П. Терехова, Б.Г. Ахмедов // Биотехнология. – 2021. – Т. 37. – № 4. – С. 85-90.

5. Савченкова И.П. Мезенхимные подобные стромальные клетки из подкожного жира человека и полимерные гидрогели на основе поливинилпирролидона: токсичность и адгезия / И.П. Савченкова, Д.Г. Коровина, Е.В. Викторова, **А.С. Оганнисян**, О.А. Легонькова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. – Т. 26. – № 3. – С. 27-32.

6. Легонькова О.А. Гидрогели с адгезионными свойствами для профилактики и лечения перипротезной инфекции / О.А. Легонькова, **А.С. Оганнисян**, Б.Г. Ахмедов // Клеи. Герметики. Технологии. – 2023. – № 9. – С. 2-8.

Публикации в других изданиях

7. Легонькова О.А. Общие и специфические особенности биодеструкции медицинских имплантатов на основе синтетических полимеров / О.А. Легонькова, **А.С. Оганнисян**, Т.И. Винокурова // Высокотехнологическая медицина. – 2020. – Т. 7. – № 4. – С. 17-25.

8. Легонькова О.А. Экспериментальное исследование возможности применения полимерного геля как локального депо антимикробных препаратов / О.А. Легонькова, **А.С. Оганнисян**, В.В. Стаффорд, Б.Г. Ахмедов, С.А. Божкова, Р.П. Терехова // Политравма. – 2022. – № 3. – С. 67-73.

9. Божкова С.А. Оригинальные полимерные гели как средство предупреждения имплантат-ассоциированного остеомиелита в эксперименте / С.А. Божкова, В.А. Конев, Г.И. Нетьлько, Е.М. Гордина, Л.О. Анисимова, О.А. Легонькова, В.В. Трушников, **А.С. Оганнисян**, Б.Г. Ахмедов // Сибирское медицинское обозрение. – 2023. – № 3. – С. 34-42.