

Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева

На правах рукописи

**Артюхов Александр Анатольевич**

**Сшитые гидрогели поливинилового спирта и их  
биомедицинское применение**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

02.00.06 –Высокомолекулярные соединения

Диссертация на соискание ученой степени доктора химических наук

Научный консультант  
доктор химических наук, профессор  
Штильман М.И.

**Москва – 2017**

1 Введение	6
2 Обзор литературы	11
2.1 Полимерные гидрогели – общие положения	11
2.2. Основные методы получения полимерных гидрогелей	12
2.2.1. Химически сшитые гидрогели	12
2.2.1.1. Радикальная полимеризация	12
2.2.1.2 Сшивка за счет реакций боковых групп	18
2.2.1.3 Использование ионизирующего излучения	21
2.2.1.4 Сшивка с использованием ферментов	23
2.2.2 Физические гидрогели	24
2.2.2.1 Сшивка за счет ионных взаимодействий	24
2.2.2.2 Сшивка за счет кристаллизации	26
2.2.2.3. Физические гидрогели на основе амфифильных блок- и графт-сополимеров	29
2.2.2.4 Структурирование посредством водородных связей	33
2.2.2.5 Сшивка за счет белок-белковых взаимодействий	34
2.3 Процессы гелеобразования в криоусловиях	36
3 Обсуждение результатов	40
3.1 Получение ненасыщенных производных поливинилового спирта и гидроксиэтилкрахмала	40
3.2 Получение сшитых полимерных гидрогелей	53
3.2.1 Изучение процесса синтеза сшитых полимерных гидрогелей на основе модифицированного поливинилового спирта при положительных температурах	53
3.2.1.1 Радиационно-химических синтез полимерных гидрогелей	53
3.2.1.2 Изучение процесса синтеза гидрогелей при вещественном иницировании	58
3.2.1.3 Оценка параметров структуры сетки полимерных гидрогелей	68

3.2.2 Изучение процесса синтеза сшитых гидрогелей на основе модифицированного поливинилового спирта в криоусловиях	93
3.2.2.1 Исследование закономерностей гелеобразования в криоусловиях	93
3.2.2.2 Исследование морфологии образующихся полимерных макропористых гидрогелей.	106
3.2.2.3 Исследование равновесной набухаемости гидрогелей, полученных в криоусловиях	117
3.2.2.4 Оценка параметров сетки полимерных гидрогелей, полученных в криоусловиях	124
3.2.2.5 Исследование сорбции альбумина на поверхности гидрогелей.	128
3.2.2.6 Исследование динамики выделения включённых биологически активных веществ из объема полимерных гидрогелей.	132
3.3 Изучение биосовместимости полимерных гидрогелей	145
3.3.1 Изучение токсичности полимерных гидрогелей поливинилового спирта	145
3.3.1.2 Изучение концентрации потенциально опасных соединений в составе образцов полимерных гидрогелей на основе поливинилового спирта	146
3.3.1.2 Исследование токсичности полимерных гидрогелей поливинилового спирта	151
3.3.2 Изучение токсичности полимерных гидрогелей на основе ПВС и ГЭК	166
3.4.2.1 Изучение концентрации потенциально опасных соединений в составе образцов полимерных гидрогелей на основе ПВС и ГЭК	166
3.3.2.2 Оценка токсичности гидрогелей на основе поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала с использованием экспресс-методов	172
3.3.2.3 Изучение взаимодействия с живыми объектами модельных систем, после их контакта с материалом	180
3.3.3 Исследование токсичности гидрогелей на основе ПВС дополнительно содержащих заряженные группы	199
3.3.3.1 Исследование цитотоксичности гидрогелей на основе ПВС дополнительно содержащих заряженные группы	199

3.3.3.2 Изучение хронической токсичности полимерных гидрогелей ПВС дополнительно содержащих заряженные группы	204
3.3.4 Оценка влияния состава и структуры полимерных гидрогелей на скорость их биodeградации.	207
3.3.5 Изучение возможности применения полимерных гидрогелей в качестве основы для выращивания клеток и тканей.	212
3.3.6 Изучение возможности применения разработанных полимерных гидрогелей для лечения ран и ожогов.	224
3.3.7 Изучение возможности применения гидрогелевых материалов в офтальмологии.	232
3.3.8 Изучение возможности использования разработанных гидрогелевых материалов для заполнения полостей и протоков	240
4 Экспериментальная часть	248
4.1 Модификация исходных полимеров	248
4.2 Синтез полимерных гидрогелей и изучение их свойств.	248
4.2.2 Синтез полимерных гидрогелей в присутствии инициаторов радикальной полимеризации при положительных температурах.	250
4.2.3 Синтез полимерных гидрогелей в воднозамороженных системах	250
4.2.4 Измерение модуля сдвига образцов гидрогелей	250
4.2.5 Исследование морфологии поверхности полимерных гидрогелей.	252
4.3 Изучение биосовместимости полимерных гидрогелей	255
4.3.1 Определение содержания потенциально токсичных веществ в образцах гидрогелевого материала	255
4.3.2 Изучение цитотоксичности экспериментальных образцов гидрогелевых материалов	257
4.3.3 Определение гемотоксического действия экспериментальных образцов гидрогелевых материалов	258
4.3.4 Определение раздражающего действия образцов гидрогелевых материалов	259
4.3.5 Исследование сенсibiliзирующего действия	261

4.3.6 Исследование острого общетоксического действия	263
4.3.8 Оценка биосовместимости образцов по отношению к эритроцитарной массе и лейко-тромбоцитарному слою	266
4.3.9 Оценка биосовместимости по содержанию свободного гемоглобина в надосадочной жидкости после контакта образцов с эритроцитарной массой	267
4.3.10 Оценка биосовместимости на основании микроскопических исследований эритроцитарной массы и лейко-тромбоцитарного слоя после контакта с образцами	268
5 Выводы.	270
6 Список литературы	272

## 1 Введение

Актуальность работы. Полимерные гидрогели находят широкое применение в различных областях, связанных с медициной и биотехнологией. Ряд уникальных свойств делают эти полимерные системы весьма привлекательными для ряда областей медицины и медицинской биотехнологии, таких, как тканевая и клеточная инженерия, технология имплантатов и биологически активных систем и целого ряда других. Не прекращающийся рост числа публикаций, посвященных этому типу материалов, свидетельствует о их перспективности.

В тоже время, несмотря на большое число работ в области создания подобных систем, проблема разработки гидрогелевого материала, удовлетворяющего широчайшему спектру требований возможных биомедицинских областей применения (таких как, например, степень клеточной адгезии, токсичность, развитость пористости и ее характер, биodeградируемость и т.п.) и обладающего при этом доступностью, сравнительной простотой технологии получения и относительно низкой стоимостью, по-прежнему, остается не решенной.

В силу этого, использование в качестве основы полимерных гидрогелей поливинилового спирта – крупнотоннажного синтетического полимера, характеризующегося биосовместимостью, и, в силу этого, широко и эффективно применяемого в медицине на протяжении десятков лет, представляется весьма перспективным.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования являлись разработка методов получения новых биосовместимых материалов на основе сшитых гидрогелей поливинилового спирта различной структуры и исследование возможности их применения в медико-биологических областях

Для выполнения данной цели были поставлены следующие задачи:

- синтез химически модифицированных полимеров, содержащих в боковых цепях кратные связи в количестве достаточном для образования в результате сшивки по свободно-радикальному механизму трехмерной

пространственной сетки, при незначительном изменении физико-химических характеристик такого полимера и его токсичности, по сравнению с исходным полимером (в том числе сохранение растворимости в воде); изучение закономерностей процесса модификации.

- выявление характера влияния различных факторов на процесс формирования сшитых полимерных гидрогелей на основе модифицированного поливинилового спирта, а также его сополимеров с макромерами на основе модифицированного 2-гидроксиэтилкрахмала и заряженными низкомолекулярными мономерами; определение оптимальных условий синтеза;
- исследование свойств, строения, макро- и микроструктуры образующихся гидрогелей;
- исследование токсичности синтезированных полимерных гидрогелей;
- исследование влияния строения и состава гидрогелей на его биосовместимость, способность к биодеградации и характер взаимодействия с клеточными культурами и внутренними средами организма;
- изучение возможности практического применения изделий на основе разработанных гидрогелевых материалов.

Обоснование выбора объектов исследования. Объектом настоящего исследования являлись полученные посредством радикальной полимеризации метакриловых производных поливинилового спирта полимерные гидрогели. Использование содержащего в боковой цепи кратные связи модифицированного полимера позволило получить стабильные, в отличие от физических гидрогелей (криогелей) поливинилового спирта. при нагревании химически сшитые гидрогели. В рамках работы были изучены гидрогели не только на основе «чистого» акрированного поливинилового спирта, но и материалы на основе его сополимеров с акриловыми производными 2-гидроксиэтилкрахмала, а также низкомолекулярными заряженными мономерами. Введение в состав гидрогелей 2-гидроксиэтилкрахмала сделало возможным более эффективное регулирование

скорости биодegradации гидрогелевых материалов, а введение звеньев заряженных низкомолекулярных мономеров – заметно улучшило клеточную адгезию на их поверхности.

Научная новизна. Впервые синтезированы стабильные при нагревании не требующие дополнительной фиксации структуры гидрогели на основе модифицированного поливинилового спирта и его сополимеров. Изучен процесс синтеза таких систем. Определено влияние условий синтеза на физико-химические свойства, морфологию поверхности полимерных гидрогелей, изучены их деформационные свойства и на основании полученных данных проведена оценка параметров их пространственной сетки. Выявлены корреляция между строением полимерных гидрогелей и их осмотическими свойствами. В экспериментах «in vitro» и «in vivo» продемонстрирована высокая биосовместимость полученных макропористых систем. Выявлена корреляция между составом синтезированных систем и скоростью их биодegradации, характером взаимодействия с клеточными культурами и внутренними средами организма.

Практическая значимость работы. Получены новые изотропные и макропористые гидрогелевые системы на основе поливинилового спирта, характеризующиеся высокой термической стабильностью, высокой биосовместимостью, достаточной механической прочностью, пригодные для использования в медико-биологических областях. Разработаны методики модификации исходных полимеров и синтеза целевых гидрогелевых продуктов, пригодные для промышленного масштабирования.

Продемонстрирована возможность использования разработанных полимерных систем в качестве основы для имплантатов, замещающих дефекты мягких тканей и послеоперационные полости, высокоэффективных раневых покрытий, носителей лекарственных препаратов в офтальмологии, подложек для клеточной и тканевой инженерии, в том числе с заданными временами биодegradации в организме. 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»

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

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 пористых гидрогелей медицинского назначения.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались на международных и всероссийских научных конференциях и семинарах (с опубликованием тезисов), в их числе: 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 [3<sup>rd</sup> 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]; 1<sup>st</sup> 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]; Нанобиоматериалы: современные

достижения и токсикологические вопросы безопасности [Москва, 2011]; 2<sup>nd</sup> Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientist's School [Heraklion, 2011]; XIX International Conference on Bioencapsulation [Amboise, France, 2011]; Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Problems and Safety Issues [3<sup>rd</sup> Russian-Hellenic Symposium with International Participation and Young Scientists School, Heraclion, Greece, 2012]; Bionanotox 2013. 4<sup>th</sup> International conference «Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues». Crete-Greece, Heraklion 2013] ; Bionanotox 2014. 5<sup>th</sup> International conference «Biomaterials and nanobiomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues» [Crete-Greece, Heraklion, 2015].

## 2 Обзор литературы

### 2.1 Полимерные гидрогели – общие положения

Гидрогели представляют собой сшитые гидрофильные полимеры, способные набухать в воде и формировать нерастворимую трехмерную пространственную сетку. Такие сетки находятся в равновесии с водным окружением, при этом наблюдается баланс упругих напряжений поперечных сшивок и осмотического давления раствора. Вследствие способности поглощать и удерживать значительные объемы жидкости гидрогели стали предметом пристального изучения не только с позиций выявления фундаментальных закономерностей поведения набухших полимерных систем, но и с позиций их практического применения в целом ряде областей. Например, в качестве материалов для контактных линз и разделения белков, матриц для выращивания клеток и тканей, систем с контролируемым выделением лекарственных препаратов [1 - 11].

Как уже упоминалось выше, для предотвращения растворения гидрофильных полимерных цепей в водных средах в гидрогелях должны присутствовать межмолекулярные связи. Природа таких связей может быть различна. Сетка гидрогеля может быть зафиксирована посредством переплетения молекул, гидрофобных взаимодействий, ионных, либо водородных связей. В этом случае гели принято называть «гелями 2-го рода», «физическими гелями», «обратимыми», [1, 6, 12]. Гидрогели, представляющие собой ковалентно сшитые сетки, обычно называют гелями «1-го рода», «необратимыми» или «химическими» [1, 6, 12]

Начиная с пионерских работ Вихтерле [13] для создания полимерных гидрогелей разработано большое число различных методов и подходов. Для ряда практических областей применения, например, связанных с созданием биodeградируемых материалов важным требованием является лабильность создаваемых в гидрогелевых материалах межмолекулярных связей.

Для ковалентно сшитых гелей в физиологических условиях такие связи могут разрушаться как под воздействием ферментативных систем, так и с

участием низкомолекулярных соединений, преимущественно посредством гидролиза [11]. Безусловно, огромный интерес в этом случае представляет кинетика распада системы, или иными словами наличие контролируемых параметров, способных регулировать динамику биодеградации гидрогеля.

В тоже время, способность к биодеградации не является единственным фактором, определяющим применимость того или иного гидрогеля для использования в биологических областях. Не менее важными требованиями является биосовместимость самого полимерного гидрогеля и низкая токсичность продуктов его деградации, которые должны, либо метаболизироваться в нетоксичные соединения, либо выводиться из организма посредством почечной фильтрации.

При соблюдении этих условий полимерные гидрогели, как правило, характеризуются неплохой биосовместимостью. Их гидрофильная поверхность характеризуется низким значением свободной поверхностной энергии при взаимодействии с биологическими жидкостями, что приводит к весьма низкой адгезии белков и клеток на их поверхности. Помимо этого мягкость и упругость гидрогелей минимизирует механическое раздражение окружающих тканей [6, 14-17]. Природа же продуктов биодеградации гидрогелей может быть оптимизирована на стадии разработки гидрогелевого материала посредством подбора состава полимерных блоков, формирующих гидрогель.

## 2.2. Основные методы получения полимерных гидрогелей

### 2.2.1. Химически сшитые гидрогели

#### 2.2.1.1. Радикальная полимеризация

##### 2.2.1.1.1. Радикальная полимеризация с участием мономеров

Химически сшитые гидрогели могут быть получены посредством радикальной полимеризации низкомолекулярных мономеров в присутствии бифункциональных сшивающих агентов.

Наиболее известными гидрогелевыми системами, полученными таким образом, являются гидрогели на основе поли-(2-гидроксиэтилметакрилата) (поли-

ГЭМ, рНЕМА). Такие гидрогели, получаемые полимеризацией 2-гидроксиэтилметакрилата в присутствии подходящего сшивающего агента, например, этиленгликольдиметакрилата, были впервые описаны Вихтерле (Wichterle) и Лим (Lim) в 60-е годы прошлого столетия [13]. За последующие десятилетия при помощи данного метода было получено огромное число разнообразных полимерных гидрогелей [18].

Существенным достоинством данного метода является то, что целый ряд характеристик гидрогелей, в том числе и их набухаемость, может регулироваться посредством варьирования количества сшивающего агента в реакционной смеси. Свойства конечных гидрогелевых систем, разумеется, могут изменяться также и посредством подбора соответствующего мономера или условий проведения процесса. Так, например, использование в качестве мономера, или одного из сомономеров, акриловой кислоты позволяет получать рН-чувствительные [19], а N-изопропилакриламида – термочувствительные [20] гидрогели. Полимеризация в замороженных растворах [21-23], или в присутствии различных порогенов [24-27], позволяет получать пористые системы.

#### 2.2.1.1.2. Радикальная полимеризация с участием макромеров

Помимо полимеризации смесей виниловых мономеров химически сшитые гидрогели могут быть получены сополимеризацией водорастворимых полимеров, модифицированных полимеризуемыми группами. Целый ряд водорастворимых (синтетических, полусинтетических и природных) полимеров к настоящему моменту был использован для получения гидрогелей с использованием такого технического решения.

Очевидно, первым таким полимером, стал декстран. В работе Эдмана (Edman) и сотрудников [28] декстран в водной среде модифицировали глицидилакрилатом. Гидрогель формировали при добавлении иницирующей системы «персульфат – третичный амин», помимо модифицированного декстрана для увеличения частоты сшивки в раствор добавлялось некоторое количество N,N,N',N'-метилден-бис-акриламида. Полученные таким образом гели были

использованы в качестве микрочастиц для иммобилизации ферментов [29] и систем с контролируемым выделением лекарственного вещества [30,31].

В дальнейшем с использованием разработанного Эдманом метода были получены гидрогели и на основе других как синтетических, так и водорастворимых полимеров: альбумина [32], гидроксиэтилкрахмала [33-35], полиаспартамида [36 -38], поливинилового спирта [39] и гиалуроновой кислоты [40].

В тоже время, так как согласно этому методу модификация полимера проводится в водной среде, степень замещения последнего, обыкновенно, достаточно мала и трудно контролируема вследствие гидролиза глицидилметакрилата (глицидилакрилата) в процессе реакции.

С целью устранения этого недостатка метода, рядом исследователей модификация полимера проводилась в среде апротонных растворителей, так, например, в работе [41] модификация декстрана проводилась в среде диметилсульфоксида в присутствии каталитических количеств 4-(N,N-диметиламино)пиридина. В этом случае наблюдалось практически количественное связывание ГМА с полимером, и степень замещения могла быть легко контролируема. Анализ продуктов ферментативного гидролиза модифицированного вышеописанным способом декстрана с использованием методов ЯМР- [42] и масс-спектрологии [43] показал, что в использованных условиях преимущественно протекает реакция переэтерификации и присоединение в ее результате к цепям декстрана метакрилатных групп. Предложенная методика была использована также для модификации инулина [44] и сахарозы [45].

Акрилатные (метакрилатные) группы могут быть введены в водорастворимые полимеры также с использованием и других классов соединений. Так метакрилоилхлорид (акрилоилхлорид) был использован для модификации гидроксипропилцеллюлозы [46], гидроксиэтилкрахмала [47], хитозана [48], поливинилового спирта [48, 49], ангидридом метакриловой кислоты для получения гидрогелей в работе [50] модифицировали декстран. Для

замещения содержимого хрусталика глаза в работе [51] была использована фотоотверждаемая композиция на основе поливинилового спирта, полученного посредством модификации хлорангидридом коричной кислоты. Производные поливинилового спирта, способные к фотосшивке описаны также и в работе [52]. Однако в этом случае для модификации использовалась реакция полимера с метакриламидоацетальдегид-диметилацеталем. Способный к фотополимеризации декстран получали также посредством реакции с малеиновым ангидридом.

Помимо этого, (мет)акриловые группы могут быть введены в состав моно- и дисахаридов используемых для синтеза гидрогелей, при использовании в качестве катализатора ферментов [53-55]. В этом случае, как правило, процесс проводят с высоким выходом продукта (до 75 %) в среде безводного пиридина. В отличие от химических методов, при использовании ферментативных методов образующиеся продукты обладают очень хорошей региоселективностью.

Метакрилатные группы, соединенные с водорастворимым полимером, достаточно легко гидролизуются при температурах близких к физиологическим [56]. В тоже время, после полимеризации метакриловые эфиры очень устойчивы к гидролизу [57,58]. Это означает, что гидрогели, полученные на основе таких полимеров, могут деградировать в физиологических условиях лишь в том случае, если имеется фермент, гидролизующий основную цепь полимера.

Данный факт был продемонстрирован для гидрогелей на основе альбумина [33], крахмала [34] и декстрана [59]. В тоже время, хотя, например, метакрилированный декстран может быть полностью гидролизован с использованием декстраназы [43]. При этом было показано, что распад такого гидрогеля возможен лишь в том случае, если степень замещения (число метакрилированных групп на 100 глюкозных звеньев) была менее 4. Для гелей из декстрана с промежуточными степенями замещения – от 4 до 7 имела место частичная деградация, для гелей же из сильно замещенного декстрана (степень замещения более 7) деградация практически не наблюдалась [59-61].

Альтернативой ферментативно деградируемым гидрогелям могут быть гидрогели, способные к биодеструкции под действием химических агентов. Такие

гели были получены посредством присоединения полимеризуемых групп к водорастворимому полимеру через гидролизуемый фрагмент.

Хаббелем (Hubbell) с сотрудниками был синтезирован макромер, содержащий центральный блок полиэтиленгликоля с присоединенной через фрагмент олигомера  $\alpha$ -гидроксикарбоновой кислоты концевой акрилатной группой, обеспечивающей сшивку по свободно-радикальному механизму в присутствии соответствующего инициатора.

Полученные на основании такого макромера гидрогели деградировали с образованием в качестве продуктов распада полиэтиленгликоля, молочной кислоты (или другой  $\alpha$ -гидроксикислоты, в зависимости от строения макромера) и олигоакриловой кислоты. Время деградации варьировалось от 1 дня до 4 месяцев и определялось строением макромера и, в первую очередь, типом распадающейся связи [62].

Скорость деградации гидрогелей на основе вышеописанных макромеров может быть также ускорена посредством использования при получении геля в качестве одного из сомономеров акриловой кислоты, обеспечивающей «кислые» значения pH [63]. Такие гидрогели были использованы в качестве основы для систем контролируемого выделения белков [64-66].

Аналогичный подход может быть применен и к другим полимерам, например, декстрану или поливинилового спирту. В работе [67] в боковые цепи декстрана вводили заместитель, представляющий собой олигомерную  $\alpha$ -гидроксикарбоновую кислоту с концевым метакрилатным или метакрилоилоксиэтильным остатком. Время деградации гидрогелей, полученных на основе таких макромеров, при физиологических условиях находилось в интервале от 1 дня до более 3 месяцев и определялось типом эфирной связи, частоты сшивки гидрогеля и длины спейсера из поли- $\alpha$ -гидроксикислоты [58, 68]. Существенно, что время биodeградации таких гелей, обладающих хорошей биосовместимости как в форме имплантатов, так и в виде инъектируемых микросфер, *in vivo* (при подкожной имплантации крысам) было весьма близким к

времени деградации *in vitro* [69-71]. Данный факт подтверждает механизм деградации, обусловленный преимущественно химическим гидролизом.

Данные деградируемые декстрановые гидрогели были использованы в качестве основы для систем с контролируемым выделением белков, используемых в фармацевтических системах [58,72,73]. Существенно, что поскольку размер пор в таких гидрогелях был заметно меньше размера включаемого белка, выделение последнего происходило лишь при биодеградации гидрогелевой матрицы, и таким образом скорость выделения белка определялась скоростью распада гидрогелевого материала в организме [74, 75].

В работе [76] для модификации поливинилового спирта использовались модифицированные гидроксиэтилметакрилатом полигликолиды с концевыми карбоксильными и винильными группами. Модифицированный таким образом поливиниловый спирт сшивали под воздействием ультрафиолетового облучения в присутствии фотоинициатора. Таким образом, полимерный каркас гидрогеля обладал гидролизуемыми при взаимодействии со средами организма межмолекулярными сшивками, состоящими из цепей полигликолевой кислоты.

Продукт, полученный посредством взаимодействия ангидрида янтарной кислоты и моно-2-(акрилоилокси)этилсукцината, был использован для модификации поливинилового спирта в работе [77]. В этом случае молекула вещества, использованного для замещения содержала пять гидролизуемых групп. Образовавшийся после модификации макромер сшивали в процессе фотополимеризации.

Несколько иной подход для получения на основе макромеров с кратными связями, гидрогелей, содержащих биодеструктируемые фрагменты полимолочной кислоты, был применен в работах Джанга (Zhang) и сотрудников. В этом случае на первоначальном этапе посредством взаимодействия декстрана с акрилоилхлоридом [78] или аллилизотиоцианатом [79] были получены ненасыщенные производные декстрана, которые затем сополимеризовали в среде диметилформамида с поли-(D,L-молочной кислотой), содержащей две концевые акрилатные группы.

Полимеризацию проводили при облучении ультрафиолетом. Физико-химические свойства, и в частности равновесная набухаемость, полученных таким путем гидрогелей определялась соотношением модифицированных декстрана и полимолочной кислоты, степенью замещения декстрана и продолжительностью облучения [78]. Синтезированные гидрогели были использованы в качестве матрицы для выделения альбумина, скорость выделения которого зависела от состава гидрогеля и определялась соотношением скоростей диффузии белка и деградации полимерной матрицы [80].

#### 2.2.1.2 Сшивка за счет реакций боковых групп

Водорастворимые полимеры обязаны своей растворимостью наличием в боковых цепях функциональных групп (преимущественно, OH, COOH, NH<sub>2</sub>), которые могут быть использованы для формирования гидрогелей, например, с участием сшивающих агентов.

Сшивка водорастворимых полимеров, содержащих боковые гидроксильные группы, может быть осуществлена с использованием глутарового альдегида [81, 82]. Эта реакция протекает в сравнительно жестких условиях – низкие значения pH, повышенные температуры. В случае же аминоксодержащих полимеров реакция с использованием этого же реагента протекает в значительно более мягких условиях и приводит к образованию, азометиновых производных (оснований Шиффа).

Данный процесс был детально изучен на примере сшивки различных белковых соединений, таких, например, как альбумин [83], желатин [84,85], а также аминоксодержащих полисахаридов [86].

Однако вследствие того, что Гутаровой альдегид является токсичным соединением, даже его незначительные концентрации ведут к ингибированию клеточного роста. В силу этого разработан ряд альтернативных путей сшивки.

Так, например, сообщается об использовании для сшивки желатина полиальдегидов, полученных посредством частичного окисления декстрана [87].

Такие гидрогели показали неплохую биосовместимость, как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* и были использованы для лечения ран [88].

В работе [89] описан метод получения сшитые изотропные гидрогели на основе поливинилового спирта посредством его реакции с диизоцианатами, а также описаны свойства синтезированных подобным образом гидрогелей.

В работе Darwis et al. [90] для модификации использовалась реакция межмолекулярного ацеталирования с использованием формальдегида при повышенных температурах в присутствии каталитических количеств серной кислоты. Такой подход позволяет в широких пределах регулировать степень сшивки, так как последняя, как следует из приведенных авторами данных, прямо пропорциональна концентрации ацилирующего агента.

Ангидриды многоосновных кислот также используются для сшивки поливинилового спирта с целью получения гидрогелей на его основе. Например, в работе [91] было предложено получение сшитых гидрогелей на основе поливинилового спирта при помощи реакции с диангидридом этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Полисахариды могут быть сшиты, например, с использованием 1,6-гексаметилендиизоцианата [92], дивинилсульфона [93], 1,6-гексадибромида [94] и ряда других реагентов [11, 95].

Как правило, свойства полимерных сеток, полученных с использованием вышеописанных методов, могут достаточно легко изменяться посредством регулирования концентраций полимера и сшивающего агента в реакционной системе. Однако же, как правило, такие реакции проводят в среде органических растворителей, вследствие наличия взаимодействия воды с используемыми для сшивки сшивающими агентами.

Кроме того, обычно, используемые реагенты характеризуются высокой токсичности, что требует качественной отмывки готовых гидрогелей от непрореагировавшего сшивающего агента. Следствием этого является то, что «загрузка» лекарственного препарата в такой гидрогель возможна лишь после его формирования и завершения экстракции [93,94]. Это приводит к тому, что при

включении сравнительно крупных белковых молекул включение последних возможно лишь в поры, размер которых больше размера белка, в силу чего, скорость выделения в таких системах, обыкновенно, имеет первый порядок, и весьма высока. Помимо этого, в силу значительной химической стабильности сшивок деградация гидрогеля возможна лишь при разрушении основной цепи полимера под воздействием ферментов [30] .

Crescezi с сотрудниками описали синтез гидрогелей на основе полисахаридов с использованием реакций поликонденсации Пассерини и Уги [96,97]. В конденсации Пассерини карбоновая кислота и альдегид или кетон взаимодействуют с изонитрилом с образованием  $\alpha$ -(акрилокси)амида. В реакции Уги в ранее описанную реакционную смесь в конце реакции добавляют амин, что приводит к образованию  $\alpha$ -(ациламино)амида. Эти реакции протекают в воде при слегка кислом рН при комнатной температуре.

Поскольку при использовании для сшивки реакции Пассерини образуются гидрогели со сложноэфирными связями в межцепных сшивках, их деградация происходила при комнатной температуре при рН 9,5. Время деградации варьировалось в зависимости от их состава от 1 до 8 дней. В гидрогелях же, полученных по реакции Уги, в составе сшивок присутствовали амидные группы, поэтому они были достаточно стабильны в вышеописанных условиях.

В работе [98] описаны гидрогели ПЭГ, сшитые гидролизуемым полиротаксаном. Для получения гидрогелей  $\alpha$ -циклодекстрины были «надеты» на цепи ПЭГ и ограничены объемными биodeградируемыми сложноэфирными группами. Затем гидроксильные группы полидекстрина активировали карбонилдиимидозолом и сшивали при помощи ПЭГ-бисаминов. Вследствие гидролизуемости сложноэфирных связей такие гели были способны к деградации, время которой, в зависимости от состава гидрогелей, составляло от 200 до 500 часов. Разработанные гели было предложено использовать в качестве подложек для регенерации мягких тканей.

### 2.2.1.3 Использование ионизирующего излучения

Высокоэнергетическое излучение, в частности гамма-излучение и пучки электронов, широко используется для полимеризации ненасыщенных соединений. Так растворы водорастворимых полимеров, содержащих кратные связи, могут быть желированы с использованием жесткого излучения [29].

Гидрогели также могут быть получены радиационной полимеризацией в растворах смеси монофункциональных мономеров и соответствующего сшивающего агента [99].

Кроме того, некоторые полимеры под воздействием жесткого излучения могут быть переведены в гелеобразное состояние и при отсутствии в их составе ненасыщенных групп. При облучении водных растворов полимеров возможно образование радикалов на полимерной цепи, например, посредством гомолитического распада С-Н связей.

Помимо этого, радиолиз молекул воды может вести к образованию гидроксил-радикалов, которые могут атаковать полимерную цепь, что также ведет к образованию макрорадикала. Рекомбинация макрорадикалов на различных цепях ведет к образованию ковалентных сшивок и, в конечном итоге, к формированию трехмерной сшитой структуры [100]. Поскольку образующиеся макрорадикалы могут реагировать с кислородом, как правило, облучение проводят в атмосфере инертного газа (азота, аргона). Поливиниловый спирт [101], полиэтиленгликоль [102-104] и полиакриловая кислота [105] являются типичными представителями полимеров, способных сшиваться под воздействием жесткого облучения.

Свойства формируемых при облучении гидрогелей, в частности, их набухаемость и проницаемость определяются концентрацией полимера в растворе и дозой облучения, обыкновенно, плотность сшивки растет с ростом концентрации и дозы облучения.

Гидрогели на основе полиаминокислот были получены при  $\gamma$ -облучении раствора полипентапептидов. Полипептиды, состоящие из блоков GVGVP (G-глицин, V-валин, P-пролин), равно как и соответствующие полипентапептиды

были синтезированы при помощи технологии рекомбинантной ДНК и имели молекулярную массу от 88 до 102 кДа. Также, как и в случае остальных полимеров, равновесная набухаемость таких гидрогелей снижалась с ростом дозы облучения. Также, в силу того, что полипептиды с блоками GVGVP характеризуется наличием нижней критической температуры растворения около 30°C, гидрогели на их основе обладали значительной термочувствительностью [106,107].

В отличие от вышеперечисленных полимеров растворимых в воде и способных образовывать совместные растворы с другими гидрофильными полимерами, значительная часть природных полимеров, например, полисахаридов нерастворима в воде или плохо совмещается с водными растворами других полимеров. Однако же использование радиационных методов делает возможным создание гидрогелевых композиций на базе подобных полисахаридов, за счет образования привитых сополимеров. Например, в работе [108] описано получение полимерных гидрогелей на основе привитых сополимеров ПВС и ряда крахмалов, а в работе [109] ПВС и  $\alpha$ -циклодекстрина. В обоих случаях полученные системы характеризовались приемлемой механической прочностью, а также неплохими эластическими и адсорбционными свойствами.

Таким образом, как можно видеть, использование радиационного процесса для формирования гидрогелей является довольно эффективным и изящным техническим решением, делающим возможным получение различных системы на полимерных гидрогелевых систем. Преимуществом данного подхода к формированию гидрогелей являются мягкие условия при которых проводится процесс (комнатная температура, физиологические значения pH), а также отсутствие необходимости использования каких-либо сшивающих агентов.

Однако данному методу присущ и ряд существенных недостатков. В частности, при получении гидрогелей, используемых в качестве основы систем с контролируемым выделением, биологически активные компоненты не могут быть «загружены» в них перед сшивкой, в силу того, что существует вероятность их повреждения при облучении.

Помимо этого, даже при достаточно малых дозах облучения вполне вероятен радиолиз основных цепей полимера с образованием высокотоксичных продуктов при. А большое число полимеров не может быть полностью переведено в гель даже при очень больших дозах облучения порядка  $10^3 - 10^5$  Мрад, в силу чего в равновесии с гелем всегда находится растворимая часть – золь.

Кроме того, при облучении некоторых полимеров (например, полиэтиленгликоля и поливинилового спирта) наблюдается образование поперечных С-С-связей, в силу чего гидрогели, полученные на их основе при воздействии жесткого излучения, могут быть неспособными к биодegradации.

#### 2.2.1.4 Сшивка с использованием ферментов

В работе [110] описывается оригинальный метод использования фермента для синтеза гидрогелей на основе ПЭГ. В рамках этого метода ПЭГ был функционализован глутаминовой группой (ПЭГ-Гл). Затем к раствору модифицированного таким образом полимера добавляли поли(лизин-ко-фенилаланин), а затем транsgлутаминазу, что приводило к формированию трехмерной структуры гидрогеля. Используемый фермент катализировал реакцию между  $\gamma$ -карбоксамидной группой ПЭГ-Гл и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина с образованием амидной группы. Свойства образующегося геля варьировались в достаточно широких пределах посредством изменения соотношения между полимерами в реакционной смеси.

В последующих работах [111] поли(лизин-ко-фенилаланин) был заменен на функционализированный ПЭГ, содержащий концевые остатки лизина. Формирование гидрогеля также происходило при добавлении к смеси макромеров транsgлутаминазы. Скорость гелеобразования определялась структурой и составом макромеров, соотношением реагентов и концентрацией фермента и составляла, обыкновенно, от 5 до 30 минут. В силу того, что формирование геля протекает в мягких условиях и достаточно легко контролируется, такие системы представляются весьма перспективными для использования в качестве отверждаемых *in situ* гидрогелевых систем.

Трансглутаминаза является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым ферментом на основании данного явления в работе [112] была разработана триггерная желирующая система, состоящая из «нагруженных»  $\text{Ca}^{2+}$  липосом, фибриногена и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой трансглутаминазой. Такая система была стабильна при комнатной температуре, но быстро переходила в гелеобразное состояние при нагревании до  $37\text{ }^\circ\text{C}$  вследствие разрушения липосом и выхода из них ионов кальция, активирующих фермент. Авторы предполагают, что благодаря такой температурной зависимости система может быть использована в качестве матрикса для доставки биоактивных веществ, например, при лечении ран.

### 2.2.2 Физические гидрогели

Физические гидрогели также привлекают неослабевающее внимание исследователей. Преимуществом этого типа гидрогелевых систем является отсутствие необходимости использования сшивающих агентов при их получении. На данный момент разработан целый ряд методов получения таких гидрогелей.

#### 2.2.2.1 Сшивка за счет ионных взаимодействий

Наиболее известным примером полимера, который может быть желирован за счет ионных взаимодействий является альгинат, представляющий собой полисахарид, содержащий остатки маннуроновой и глюкуроновой кислот, и способный к сшивке в присутствии ионов кальция [113]. Однако существенным фактом является то, что альгинатные гели могут быть дестабилизированы при экстракции ионов кальция хелатирующими агентами. Сшивка альгинатов возможна при комнатной температуре и физиологических значениях pH. Вследствие этого альгинатные гели очень часто используются в качестве матрицы для инкапсуляции клеток [114] и выделения различных белков [115]. В последнем случае скорость выделения белка из альгинатных носителей, как правило, получаемых в виде микрочастиц посредством распыления раствора альгината натрия в раствор хлорида кальция, может быть снижена покрытием поверхности катионными полимерами, например хитозаном [116,117], либо полилизинном [117].

Синтетическим полимером, растворы которого, также, как и растворы альгинатов желируются в присутствии ионов кальция, является поли(ди(карбоксилатофенокси)фосфазен) (ПКФФ). В работе [118] описано получение на основе этого полимера гидрогелевых микросфер и изучен процесс их биodeградации. Продемонстрировано, что биodeградация протекает при физиологических условиях и ее скорость может регулироваться посредством добавления в состав гидрогеля чувствительных к гидролизу глицинатных групп.

Наиболее известным примером поликатионных полимеров, которые могут быть желированы, соответственно, добавлением к их раствору соответствующих анионов является хитозан – биополимер, состоящий из случайно-связанных  $\beta$ -(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и получаемый деацетилированием хитина. Гидрогели на основе хитозана могут быть получены, например, воздействием на раствор полимера натрий глицеролфосфатом [119].

Примечательно, что в присутствии этой соли, растворы хитозана остаются жидкими при температуре ниже комнатной, но достаточно быстро желируются при нагревании. Температура, при которой происходит переход «золь-гель» снижается с увеличением степени деацетилирования. Системы, которые являющиеся жидкими при комнатной температуре, но отверждающиеся при 37 °C вводили подкожно крысам, перед введением экспериментальным животным в раствор вводили биологические материалы, хондроциты и белки. Изучение гистологических препаратов подтвердило эффективность подобной доставки стимулирующих рост хрящей и костной ткани белков в организм [119].

Сшивание путем добавления ионов не обязательно требует наличия ионных групп в полимере для формирования гидрогеля. Так, декстран, в котором отсутствуют ионные сайты связывания для катионов, образует гидрогель в присутствии ионов калия. Механизм данного явления был выяснен Watanabe и соавторами [115], которые показали, что ионный радиус иона калия очень близок по размеру с размером «клетки», образуемой шестью атомами кислорода глюкозидных звеньев трех полимерных цепей, что может вести к образованию

микроструктуры. Тем не менее, такой декстран/калиевый гидрогель нестабилен в воде и поэтому малопригоден для практического применения.

Каррагенаны, полисахариды, состоящие из звеньев 1,4- $\alpha$ -D-галактозы и 1,3- $\beta$ -D-галактозы с различным содержанием сульфо-групп, способны формировать гидрогели как в присутствии ионов, например, калия, так и в отсутствие солей. Однако, гели, полученные в присутствии ионов металлов, более стабильны [120]. Помимо взаимодействия с ионами металлов, гидрогели могут быть получены посредством взаимодействия с полианионами с поликатионами. Например, гели хитозана могут быть получены воздействием декстрансульфата или полифосфорной кислоты [121]. Такие системы, показавшие низкую токсичность, было предложено использовать в качестве весьма эффективных систем доставки доксирубина.

#### 2.2.2.2 Сшивка за счет кристаллизации

Типичным примером гидрогелей, формирующихся за счет формирования кристаллических доменов, является поливиниловый спирт. Гидрогели поливинилового спирта могут формироваться в растворах этого полимера при его длительном хранении уже при комнатной температуре. Однако такие системы имеют низкую механическую прочность. При замораживании же и последующем оттаивании растворов поливинилового спирта образуются гели, характеризующиеся высокой механической прочностью и эластичностью [122].

Свойства образующихся гидрогелей зависят от молекулярной массы полимера, его концентрации, температуры и времени замораживания, а также количества циклов «замораживание–оттаивание». Более детально процессы, протекающие при замораживании, в том числе и растворах поливинилового спирта, будут рассмотрены в отдельной главе данного обзора. Здесь же отметим тот факт, что общепринятой точкой зрения является то, что считать, что гелеобразование в замороженных растворах поливинилового спирта происходит за счет формирования кристаллитов поливинилового спирта, выполняющих функцию физически сшитых доменов, обеспечивающих связывание цепей [122].

Гидрогели поливинилового спирта, получаемые замораживанием его растворов, термически обратимы, то есть переходят в раствор при нагревании, однако при определенных условиях могут быть получены сравнительно стабильные гидрогели, пригодные для применения в медико-биологических областях. Так в работе [123] описаны гидрогели, которые были стабильны при температуре 37 °С. Такие гидрогели были использованы в качестве систем с контролируемым выделением белка, бычий сывороточный альбумин вводили в раствор перед замораживанием. Было показано, конформация выделяемого белка остается неизменной, а кинетика его выделения подчиняется закону Фика [124].

Свойства образующихся гидрогелей могут также регулироваться добавлением к раствору некоторых полимеров, например, альгината, до замораживания. С ростом концентрации альгината плотность сшивки гидрогеля растет, о чем можно судить по снижению скорости выделения модельного лекарственного соединения [125,126].

Поли-L-молочная кислота (П-L-МК) и поли-D-молочная кислота (П-D-МК) - гомополимеры L- и D-молочных кислот, соответственно, являются полукристаллическими материалами. Высокомолекулярная полимолочная кислота на основе обеих стереомеров имеет температуру плавления 170 °С. В смеси же высокомолекулярных поли-L-молочной и поли-D-молочной кислот обнаруживается фаза с более высокой температурой плавления – 230 °С, что объясняется формированием стереокомплекса, впервые описанным Ikada с сотрудниками [127].

В последние годы был описан ряд систем, преимущественно используемых для контролируемого выделения лекарственных препаратов, основанных на формировании данного стереокомплекса. Так, формирование стереокомплекса было обнаружено в смеси триблоксополимера П-L-МК-ПЭГ- П-L-МК и П-D-МК-ПЭГ- П-D-МК. Выделение бычьего сывороточного альбумина из микросфер на основе вышеупомянутого триблоксополимера изучалось в работе [128]. Полученные данные сравнивались с данными выявленными для микросфер,

полученных из энантиомерной формы триблоксополимера, и микросфер на основе П-L-МК.

Микросферы на основе стереокомплексного триблоксополимера продемонстрировали по сравнению с микросферами на основе полимолочной кислоты несколько больший берст-релиз, что очевидно, связано с более высоким водопоглощением содержащих ПЭГ частиц, однако выделение БСА из микросфер на основе оптически чистого гомополимера не отличалось от выделения из стереокомплексных микросфер.

Другим примером систем на основе стереокомплесов может служить материал, полученный при образовании стереокомплекса между энантиомерными олигомолочнокислотными боковыми цепями, привитыми на полигидроксиэтилметакрилат (поли(ГЭМ-графт-олиголактат)). Такие системы были получены посредством отлива пленок из растворенных в хлороформе поли(ГЭМ-графт-олиго-L-лактата) и поли(ГЭМ-графт-олиго-D-лактата). Одной из особенностей таких систем является различие скоростей биodeградации стереокомплексов и пленок полученных на основе энантиомеров. Наиболее медленная биodeградация наблюдалась для систем, полученных из смесей с соотношением D и L-форм 1:1 [126].

В работе [129] молочную кислоту различной хиральности присоединяли к концевым группам декстрана. Затем каждое из производных растворяли по отдельности и смешивали растворы. Образование гидрогеля происходило при комнатной температуре, что подтверждалось реологическими исследованиями. Модуль упругости образующихся гидрогелей снижался при повышении температуры до 80 °C, но восстанавливался при снижении температуры до 20 °C, что объясняется термообратимостью и физической природой стереокомплексных межмолекулярных сшивок [130]. Примечательно, что образование геля происходило преимущественно, когда один мономер молочной кислоты связывался с гидроксильной группой мономера противоположной хиральности, а тот, в свою очередь, с его карбоксильной группой. Этот факт связан, очевидно, с параллельной упаковкой олигомеров в стереокомплексе [131]. Полученные

гидрогели характеризовались достаточно быстрой биодegradацией, варьирующейся от 1 до 7 дней, и были использованы в качестве систем с контролируемым выделением белка [132].

### 2.2.2.3. Физические гидрогели на основе амфифильных блок- и графт-сополимеров

Амфифильные блок- и привитые сополимеры способны к самосборке в воде с образованием организованных структур, таких как полимерные мицеллы и гидрогели, за счет агрегации гидрофобных сегментов. Амфифильные диблок-сополимеры обычно образуют мицеллы, пластинчатые комплексы и т.д. [133]. Физически сшитые гидрогели, как правило, получают из мультиблок-сополимеров или привитых сополимеров. Последние могут состоять из основной цепи водорастворимого полимера, например, полисахарида, к которой присоединены боковые гидрофобные блоки, или гидрофобные цепи, содержащие водосовместимые прививки.

Способность к биодegradации полимолочной кислоты (и ее сополимеров с гликолевой кислотой) побудили ряд исследователей к синтезу блок-сополимеров, содержащих фрагменты этих полимеров, и получению на их основе гидрогелей для создания систем с контролируемым выделением. Для таких систем выделение введенного вещества возможно как посредством пассивной диффузии, так и при дegradации материала.

Было исследовано несколько архитектур таких блок-сополимеров.

Триблоксополимеры с гидрофобным сегментом полимолочной (полигликолевой) кислоты в центре получали соединением двух ПЭГ-ПМ(Г)К диблоксополимеров [134-136]. При низких концентрациях в растворах таких триблоксополимеров имеет место образование мицелл, при повышении же концентрации имеет место образование термообратимых гидрогелей. Критическая концентрация гелеобразования и температура гель-золь перехода сильно зависели от молекулярной массы и строения блоков. ПЭГ-ПМГК-ПЭГ блоксополимеры также имеют нижнюю критическую концентрацию растворения, что делает их интересными в качестве основы для систем с контролируемым

выделением, растворы таких полимеров находятся в жидком состоянии при комнатной температуре, но переходят в гелеобразное при температуре тела при достаточно высокой концентрации (как правило, выше 17 %) [135].

Триблоксополимеры с ПЭГ в качестве центрального блока получали полимеризацией с раскрытием цикла лактидов в присутствии ПЭГ [137-141]. Предпочтительным методом получения гидрогелей является метод фазового обращения, то есть добавление воды в раствор полимера в тетрагликоле [142]. Смешивающийся с водой растворитель удаляют промывкой водой. Было установлено, что гидрогель может связывать как гидрофильные вещества на поверхности фазы ПЭГ, так и гидрофобные - на ПМК-доменах. Кроме того, было обнаружено, что эти системы достаточно мягки для инъекционного введения. Данный материал был исследован в качестве систем с контролируемым выделением веществ различных классов [143-147]

Мультиблоксополимеры ПЭГ и ПМКГК получали поликонденсацией дикарбоксилированных ПМК и ПЭГ [148-149]. Блок-сополимеры со сравнительно малыми блоками полимолочной кислоты характеризовались водорастворимостью и наличием нижней критической температурой растворения, определявшейся молекулярной массой ПМК. Полимеры, которые были нерастворимы в воде обладали, однако, хорошей набухаемостью. Пленочные материалы на основе сополимеров, содержащие факторы роста фибробластах, в экспериментах на крысах продемонстрировали способность к уменьшению времени заживления ран, что подтверждает, как минимум частичное сохранение активности включенного в пленку белка [149].

Гидрогели на основе графт-сополимеров ПЭГ и ПМК описаны как для сополимера, в котором в качестве основной цепи выступал как ПЭГ, так и ПМК [150]. Гидрогели, в которых в качестве основной цепи выступала ПМК, демонстрировали лишь частичную биодегградацию и выделение включенного белка, в тоже время, гидрогели на основе полимера, в котором ПЭГ выступал в качестве основной цепи, а ПМК – привитых, полностью деградировали в течение 7 дней.

Мультиблоксополимеры ПЭГ и другого гидрофобного полиэфира, полибутилентерефталата (ПБТ) исследованы в работах [151 - 155]. Эти биосовместимые полимеры были получены конденсацией в расплаве ПЭГ, бутандиола и диметилтерефталата. Гидрогели на основе получали в виде микрочастиц, либо набухающих пленок. Равновесное набухание, частота сшивки и скорость выделения модельного белка возрастало по мере роста доли и молекулярной массы блоков ПЭГ [151,152]. При изучении гидролитической деградации было показано, что гидрогель на основе полимера молекулярной массой блока ПЭГ порядка 1000 г/моль и 30 % ПБТ демонстрировал потерю порядка 25% массы спустя 35 дней. По мере роста доли ПБТ скорость деградации снижалась. Вводимый в гидрогель в качестве модельного белка лизоцим полностью выделялся из гидрогеля в течение 1 недели, при этом ферментативная активность белка не снижалась в процессе включения гидрогеля, нахождения в его объеме и выделения. Коэффициент диффузии сильно зависел от строения сополимера. Контроль скорости выделения включенного в гидрогель белка был возможен посредством варьирования условий получения гидрогелевого материала [153]

Примерами описанных в литературе используемых для получения физических гидрогелей полисахаридов являются гидрофобизованные хитозан, декстран, пуллулан и карбоксиметилкурдлан. В работах [156 - 162] описаны гидрогелевые частицы на основе модифицированного холестерином пуллулана. В частицы включали различные белки, такие как  $\alpha$ -хемотрипсин, инсулин [159], БСА. В качестве примера простым смешением с суспензией пуллулана в гидрогелевые частицы включали и гидрофобное соединение – антиопухолевый препарат адримидин [158]. Во всех случаях была достигнута приемлемая скорость выделения включенного препарата с заметным повышением его стабильности. Самоорганизующиеся гидрогелевые частицы были также получены на основе карбоксиметилкурдлана – полисахарида, обладающего противоопухолевой активностью, посредством его взаимодействия с гидрофобной сульфонилмочевинной [163]. Выделение противоракового препарата

политрансретиноевой кислоты из таких частиц подчинялось кинетическому уравнению первого порядка, увеличение количества введенного вещества и степени гидрофобизации полимера заметно замедляло скорость выделения.

Еще одним примером гидрофобизованных полисахаридов является водорастворимый гликольхитозан, модифицированный цепями пальмитоила. Этот полимер способен образовывать самоорганизующиеся везикулы в присутствии холестерина [164]. Такие гидрогелевые частицы демонстрировали высокую биосовместимость и гемосовместимость, а также доступность для включаемых лекарственных препаратов [165]. При лиофильной же сушке раствора, содержащего частицы имело место образование высокопористого твердого материала, способного к поглощению значительных количеств жидкости [166].

В работах [167,168] на поверхность хитозана прививали цепи полимолочной и полигликолевой кислот, в этом случае гидрофобные боковые цепи обеспечивали в воде гидрофобные взаимодействия, за счет которых происходило образование гидрогелей. При изучении полученных гидрогелей была обнаружена их чувствительность к величине рН раствора. Максимальное водопоглощение для таких систем наблюдалась при рН менее 2,2, что соответствовало наибольшей степени протонирования аминогрупп хитозана, в интервале же от 2,2 до 7,4 происходило снижение водопоглощения.

Величина максимального водопоглощения в протонированной форме зависела от содержания привитой молочной (гликолевой) кислот. Другие основанные на хитозане чувствительные к изменению внешних условий гидрогели были получены посредством прививки полиакриловой кислоты [169] и поли-(N-изопропилакриламида) (ПИПАМ) [170]. Помимо хитозана ПИПАМ прививали и карбоксиметилцеллюлозе [171]. В этом случае удалось получить гидрогель, изменяющий свою набухаемость при температуре порядка 38 °С.

Примерами физически сшитых гидрогелей на основе блок-сополимеров являются также системы на основе мульти(блок) сополимеров ПЭГ-полиизобутилена [172], ПЭГ-поли(γ-бензил-L-глутамата) [173], поли (2-этил-

2оксазалин)- поли ( $\epsilon$ -капролактама) [174], а также термочувствительные гидрогели на основе ПЭГ-ПИПАМ [175]. Последние были образованы триблок и звездчатыми полимерными производными линейного и разветвленного ПЭГ, играющего роль центрального водорастворимого блока, и ПИПАМ, выполняющего роль концевой термочувствительного блока. Растворы таких полимеров при комнатной температуре представляют собой низковязкие жидкости пригодные для инъектирования, однако, при температурах близких к температуре тела желируются в течение менее чем одной минуты.

Гидрогели-суперсорбенты, образующиеся за счёт гидрофобных взаимодействий, были получены на основе поли(N-винилпирролидон-графт-стирола) [176]. Такой материал был способен поглощать воду в количестве превышающем сухой вес материала в 33 раза. Необратимая физическая сшивка частиц эмульсии полиметилметакрилата, о которой сообщается в работе, также, очевидно, происходит вследствие гидрофобных взаимодействий [177]. Было сделано предположение, что самосборка микрочастиц в сетчатые структуры имело из-за недостаточного заполнения поверхности поверхностно-активных веществ, используемых в процессе полимеризации микроэмульсии.

#### 2.2.2.4 Структурирование посредством водородных связей

Полиакриловая кислота и полиметакриловая кислоты образуют комплексы с этиленгликолем. Эти комплексы образованы водородными связями между кислородом ПЭГ и карбоксилем поликислоты, некоторую роль играют роль и гидрофобные взаимодействия поликислот [178]. Водородная связь возникает не только между полиметакриловой кислотой и ПЭГ, но и в графт-полимере поли(акриловая кислота-графт-этиленгликоль) [179,180]. Водородные связи образуются лишь в случае протонирования карбоксильных групп кислоты. Это приводит к тому, что набухание таких гелей сильно зависит от значения pH. Более того, комплекс полиметакриловой кислоты и полиэтиленгликоля, полученный при низком pH, растворяется в этаноле. При введении диффузия этанола из жидкости приводит к превращению системы в гель. Гель постепенно растворяется вследствие диссоциации комплекса [181].

Двойные спирали ДНК связаны между собой также водородными связями, кроме того за счет них реализуется «укладка» молекул ДНК. В работе [182] с использованием этого принципа разработана гидрогелевая система, в которой сшивка была основана на гибридизации. В рамках этого подхода олигодеоксирибонуклеатиды попарно связывались с водорастворимым поли(N,N-диметилакриламид-со-N-акрилоилсукцинимидом). Образование гидрогеля происходило при добавлении комплементарного олигодеоксирибонуклеотида (ОДН) связанного с этим же водорастворимым полимером, либо находящимся в свободной форме, к водному раствору ОДН-производному водорастворимого полимера. Гели формировались при комнатной температуре, но растворялись при ее повышении

#### 2.2.2.5 Сшивка за счет белок-белковых взаимодействий

Белковая инженерия является новым направлением в химии материалов, областью открытой Тиррелом и Капелло [183,184]. Основным достижением является то, что последовательность пептидов и в конечном итоге их свойства могут регулироваться с достаточной точностью посредством соответствующего изменения генетического кода в последовательности синтетической ДНК. Что делает возможным использование даже аминокислот, не встречающихся в природе [185].

С помощью генной инженерии были получены блоксополимеры, состоящие из шелкоподобных и эластиноподобных блоков, в которых водонерастворимые шелкоподобные сегменты связаны в виде вытянутых, связанных водородными связями бета-тяжей и пластов [184, 186]. Эти биосовместимые, так называемые, проластины представляют собой жидкие водные растворы, которые могут быть смешаны с лекарственными веществами и претерпевать необратимый золь-гель переход при физиологических условиях вследствие кристаллизации шелкоподобных доменов. Скорость гелеобразования и последующего выделения включенного препарата зависят от различных факторов, таких как концентрация, состав полимера температура. Скорость выделения связана с содержанием воды в

геле и молекулярной массой включаемых соединений и подчиняется кинетическому уравнению первого порядка.

Некоторые природные белки образуют так называемые суперспирали, то есть левые суперспирали, состоящие из двух и более альфа-спиралей с правым ходом. Такие альфа-спирали характеризуются наличием гидрофильной и гидрофобных сторон, связанным с повторением последовательностей аминокислот с различной полярностью. Эти белки характеризуются способностью к конформационному переходу в ответ на изменение, например, температуры и величины рН. Полипептид, демонстрирующий такое поведение, содержал повторяющийся фрагмент «лейциновая застежка» и был присоединен к водорастворимому полипептидному блоку в качестве части трехблочной структуры скомпонованной с применением методов генетической инженерии в работе [187]. Гидрогель, образованный посредством суперспиральных взаимодействий, переходил в раствор при повышении температуры и увеличении рН более 8.

В работах [188,189] исследовались натуральные и инженерированные белки, демонстрировавшие суперспиральные взаимодействия, которые были использованы авторами в качестве сшивателя для поли(N-(2-гидроксипропил)метакриламида) (ПГПМА). Белки прикреплялись одним концом к полимерной цепи при помощи комплексов между концевым гистидином и хелатирующим лигандом полимера. Такие содержащие природный белок гидрогели демонстрировали температурный коллапс при температуре близкой к температуре плавления суперспирального полимера (35 °С).

Развертывание бета-складчатой структуры I28 Ig-подобного модуля белка сердечной мышцы человека при температуре выше температуры плавления было использовано в работе [190] для обратимой сшивки ПГПМА, результатом стало более чем трехкратное увеличения равновесной набухаемости полученного гидрогеля при повышении температуры.

В работе [191] описаны гидрогели, полученные на основе полиакриламида, на поверхность которого были пришит антиген (IgG кролика), и соответствующих

антител, выступающих в качестве сшивающего агента. Такая система достаточно сильно изменяла свою равновесную набухаемость в присутствии в растворе соответствующих свободных антигенов за счет уменьшения плотности сшивки, имевшей место вследствие высвобождения антигена, связанного с полимерным каркасом. Изменение набухаемости имело достаточно большую величину, однако было необратимым, вследствие потери части антигенов на поверхности полимера.

Сходный подход был применен и в работе [192], однако в этом случае гидрогели получали в виде взаимопроникающих полимерных сеток, иммобилизуя на полимерном каркасе, как антитела, так и антигены. В этом случае удавалось достигнуть обратимости набухания/сжатия при чередующемся воздействии на гидрогель растворов, содержащих антигены и свободных от них. Полученные на основе таких гидрогелевых материалы мембраны демонстрировали поведение подобное своеобразному «включателю/выключателю» при проникновении через них гемоглобина, что делает возможным в перспективе создание систем, выделяющих включенный лекарственный препарат лишь в ответ на присутствие специфического антигена.

### 2.3 Процессы гелеобразования в криоусловиях

Практически все протекающие в среде растворителя типы гелеобразования, описанные выше могут быть реализованы в криоусловиях. Криотронным гелеобразованием принято называть специфический процесс, происходящий при криогенной обработке систем, способных образовывать гели [193]. Неотъемлемым условием процессов, ведущих в конечном итоге к формированию в криоусловиях гелей (криогелей), является кристаллизация (замерзание) большей части присутствующей в исходной системе массы низкомолекулярной жидкости. Образование фазы полимерного геля может происходить как непосредственно во на стадии замерзания исходной системы (например, коллоидные дисперсии клейстеризованного крахмала [194]), так и при инкубации замерзшей системы замороженном состоянии (в основном, формирование химически сшитых криогелей [195-197]), а также во время оттаивания (например при нековалентном гелеобразовании в водных растворах ПВС [198,199]).

Замерзание и оттаивание (плавление) замороженных растворов являются довольно сложными зависящими от большого числа факторов явлениями. Традиционные представления о том, что замороженные растворы представляют собой поликристаллические тела при температурах ниже эвтектических не позволяют объяснить целый ряд явлений, например, протекание разнообразных по своему механизму химических реакций. Также с этих позиций не могут быть адекватно интерпретированы спектроскопические данные (ЭГТР, ЯМР), свидетельствующие о сохранении у части молекул растворенного вещества и растворителя высокой подвижности вплоть до температур на десятки градусов лежащих ниже точки кристаллизации исходной системы.

Результаты, полученные при изучении процессов, протекающих при криотропном гелеобразовании, позволяют говорить о наличии в замороженной системе, так называемой, незамерзшей жидкой микрофазы (НЖМФ). Показано, что молекулы, находящиеся в незамерзшей жидкой микрофазе характеризуются высокой подвижностью, что проявляется на ЯМР-спектрах высокого разрешения в виде узких сигналов. В том случае, если компоненты хорошо растворимы, они концентрируются в НЖМФ (в предельном случае - полностью). С позиций термодинамики, причиной образования в многокомпонентных замороженных растворах жидкой микрофазы является тот факт, что «включение растворенных веществ в кристаллическую решетку твердого растворителя требует большего количества энергии, чем затрачивается на повышение химических потенциалов при увеличении концентрации компонентов в жидкой микрофазе» [200].

Отличие физико-химических характеристик НЖМФ (плотности, вязкости, теплоемкости, диэлектрической проницаемости, и тому подобных) от аналогичных характеристик исходного незамороженного раствора из-за изменившегося микроокружения сказывается на реакционной способности растворенных веществ или же их способности к ассоциации. Что, в свою очередь, приводит к наличию у криохимических реакций в многокомпонентных растворах ряда кинетических особенностей. В НЖМФ концентрируются, разумеется, при соблюдении условия достаточной растворимости, исходные компоненты раствора

и продукты протекающих реакций. В силу этого, несмотря на то, что замороженный образец «ad oculus» выглядит как твердое тело эти реакции, на самом деле, являются жидкофазными.

Объем незамерзшей жидкой микрофазы определяется многими факторами, в частности, природой растворителя, температурой системы, исходной концентрацией и молекулярной массой растворенных веществ, наличием примесей (растворимых и нерастворимых), режимом заморозки и рядом других. Общая схема гелеобразования в криоусловиях представлена ниже (Рисунок 1)

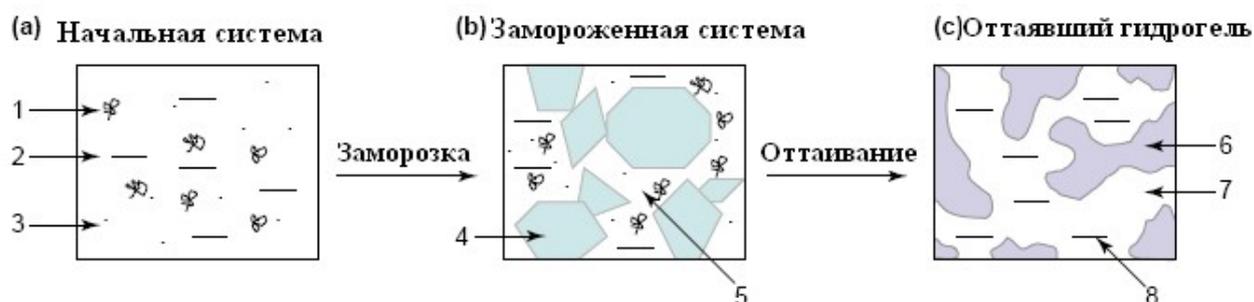


Рисунок 1 - Общая схема гелеобразования в криоусловиях.

1 - полимерный предшественник; 2 - растворитель; 3 - низкомолекулярные вещества или мономеры; 4 - поликристаллы заморозшего растворителя; 5 - незамерзшая жидкая микрофаза; 6 - полимерная сетка гидрогеля; 7 - макропоры; 8 - растворитель.

При изучении ряда способных к гелеобразованию систем было выявлено [201, 202], что объем НЖМФ (Рисунок 1b), по сравнению с объемом растворителя присутствующем в исходном растворе (Рисунок 1a), составляет от долей до нескольких процентов. После оттаивании же замороженной системы образуется макропористый гидрогель (Рисунок 1c), содержащий крупные поры разного размера и геометрии.

Порогоном в этом случае являются кристаллы замороженного растворителя, или же изредка кристаллосольваты, либо частицы криопреципитатов, если они возникают при охлаждении исходной системы [203]. Плавление или растворение данных порогенов после оттаивания системы оставляет в массе образовавшегося

гидрогеля полости, заполняющиеся оттаявшим растворителем, при этом силы поверхностного натяжения полимерной фазы гидрогеля искривляют поверхность стенок макропор, которые в результате принимают округлую форму. При этом сам материал стенок характеризуется наличием своей собственной (гелевой) пористости, поскольку представляет собой сшитую трехмерную сетку.

Таким образом, характерной особенностью полимерных гидрогелей, получаемых в криоусловиях, является их гетерофазная и гетеропористая морфология. Помимо этого, в таких системах макропоры, как правило, связаны между собой, в силу того, что при замерзании кристаллы растворителя растут, как правило, от периферии сосуда к центру (если не реализуется направленное замораживание) до момента соприкосновения с гранью другого кристалла.

Повышение (по сравнению с исходным раствором) концентрации реагентов в НЖМФ, или, иными словами, криоконцентрирование, служит одной из главных причин ряда специфических эффектов, присущих процессу формирования криогелей. В частности, при криотропном гелеобразовании наблюдается кажущееся снижение критической концентрации гелеобразования [203], причиной коего, без сомнения, является криоконцентрирование реагентов в незамерзшей жидкой микрофазе.

### 3 Обсуждение результатов

#### 3.1 Получение ненасыщенных производных поливинилового спирта и гидроксиэтилкрахмала

Одним из достаточно распространенных способов модификации синтетических и природных полимеров с целью введения в их боковые цепи ненасыщенных групп, является их взаимодействие с эпоксидсодержащими акрилатами и метакрилатами. Как правило, для этой цели используется глицидилметакрилат, либо глицидилакрилат, при этом наиболее часто в качестве растворителя выступает вода. Очевидно, что в силу целого ряда причин, в частности, малой растворимости глицидил(мет)акрилата в воде, малой стабильности его эпоксидной группы в водной среде, особенно, при значениях рН отличных от нейтрального, вода не могла выступать в качестве оптимального растворителя для проведения модификации используемых в настоящей работе полимеров. В силу этого нами изучалась возможность проведения модификации в среде органических растворителей. Надо отметить, что число таких растворителей достаточно ограничено и, в первую очередь, определяется растворимостью поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала. Другим немаловажным фактором, в силу того, что нами ставилась цель разработки технологии пригодной для промышленного производства гидрогелевых материалов и изделий на их основе, является доступность и стоимость используемого растворителя на рынке. Важным, хотя и не определяющим выбор, фактором являлась токсичность используемого растворителя. На основании этих критериев нами изучалась возможность использования в качестве растворителей для проведения модификации исходных полимеров диметилформамида и диметилсульфоксида.

Изучение процесса модификации в среде диметилформамида выявило относительно низкую скорость протекания реакции и сравнительно низкую растворимость поливинилового спирта при температурах менее 100 °С, что вело к необходимости проведения процесса при температурах более 120 °С, что не

совсем удобно с позиций масштабирования производства, из-за необходимости проведения процесса модификации в среде инертного газа, разбавления реакционной системы после завершения реакции перед выделением продукта модификации, что ведет к заметному увеличению расхода растворителей, и так далее. Помимо этого, диметилформамид по сравнению с диметилсульфоксидом является более токсичным веществом, что ужесточает требования к качеству очистки модифицированного полимера и изделий на его основе. Проведение же процесса в среде диметилсульфоксида позволяет снизить температуру процесса более чем на 40 °С, что ведет к снижению расхода растворителей и упрощает аппаратное оформление участка модификации полимера.

В рамках настоящей диссертационной работы мы воздержимся от детального описания закономерностей процессов протекающих при модификации исходных полимеров, продемонстрировав в качестве примера лишь наиболее типичные и общие зависимости, в силу того, что накопленный нами массив данных имеет значительный объем и представляет, скорее, техническую ценность.

В настоящей работе модификацию поливинилового спирта глицидилметакрилатом проводили в растворе диметилсульфоксида в присутствии каталитических количеств серной кислоты (0,1 %). Процесс проводили в интервале температур от 80 до 100 °С, концентраций поливинилового спирта в реакционной смеси от 4 до 12 масс %, мольных соотношениях реагентов [ГМА]/[ПВС] от 1/10 до 1/50 моль/осново-моль, соответственно [204].

Нижний предел интервала температур процесса модификации полимера, определялся снижением растворимости ПВС в диметилсульфоксиде при температуре ниже 80°С, верхний - возможной сшивкой образующегося модифицированного полимера, либо существенным осмолением реакционной системы при температурах выше 110 °С

Строение метакрилатных производных поливинилового спирта подтверждалось методами ИК- и ЯМР <sup>1</sup>Н-спектроскопии.

Как известно, при кислотнo-катализируемом взаимодействии эпоксиdов и спиртов образуются вицинальные алкоксиспирты. Поэтому при модификации ПВС глицидилметакрилатом следует ожидать образования сополимера, содержащие: метакрилатные группы, непрореагировавшие гидроксильные группы и ацетатные группы, содержащиеся в исходном поливиниловом спирте в количестве до 2% (Рисунок 2).

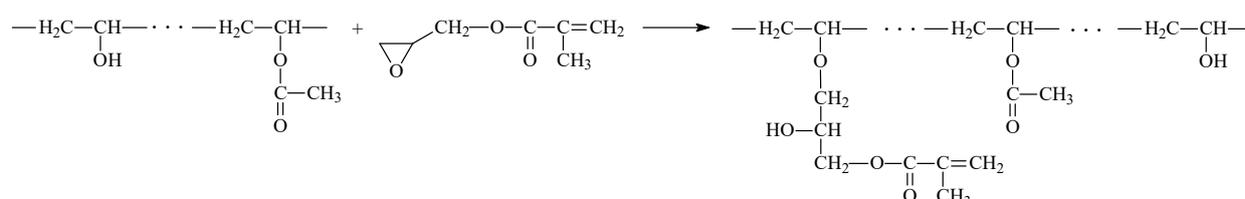


Рисунок 2 – Общая схема процесса получения модифицированного поливинилового спирта.

В ИК-спектре продукта модификации ПВС глицидилметакрилатом (Рисунок 3) появляются две новые полосы поглощения с волновыми числами 1706 и 1621  $\text{см}^{-1}$ , отвечающие валентным колебаниям двойных связей C=O и C=C соответственно в сопряженных еноновых системах и отсутствующие в ИК-спектре исходного ПВС.

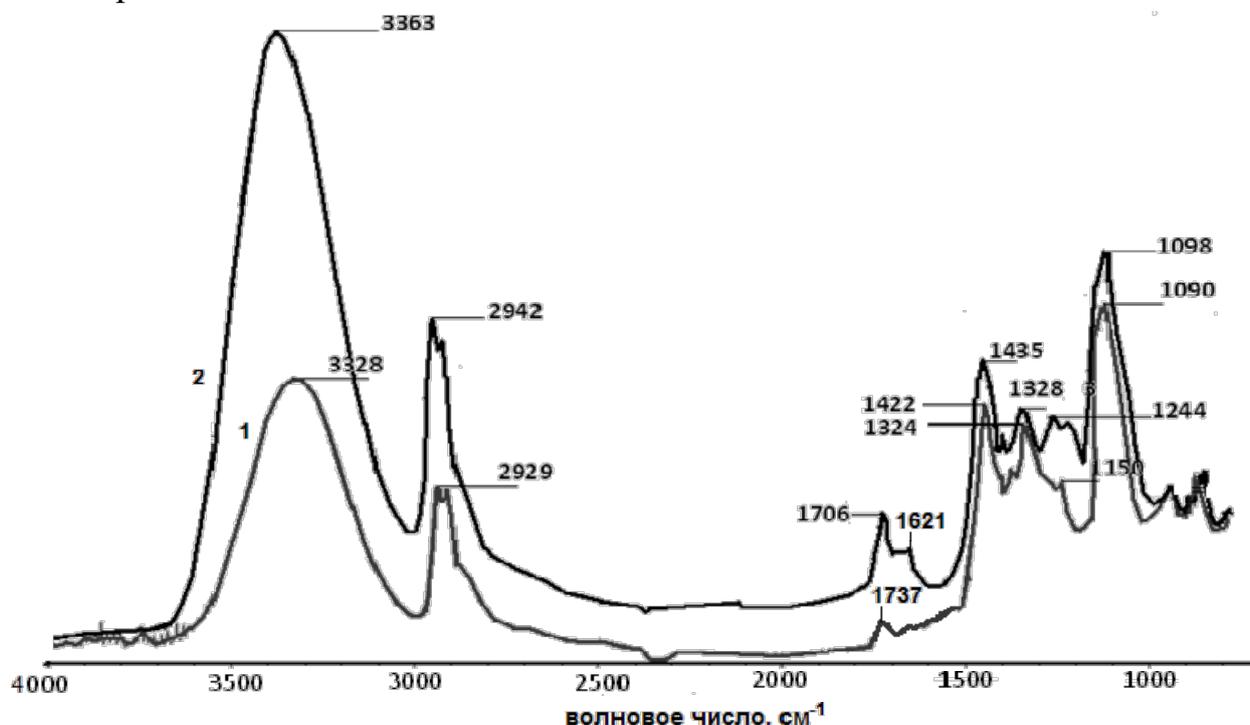


Рисунок 3 - ИК НПВО спектры исходного (1) и модифицированного (2) поливинилового спирта

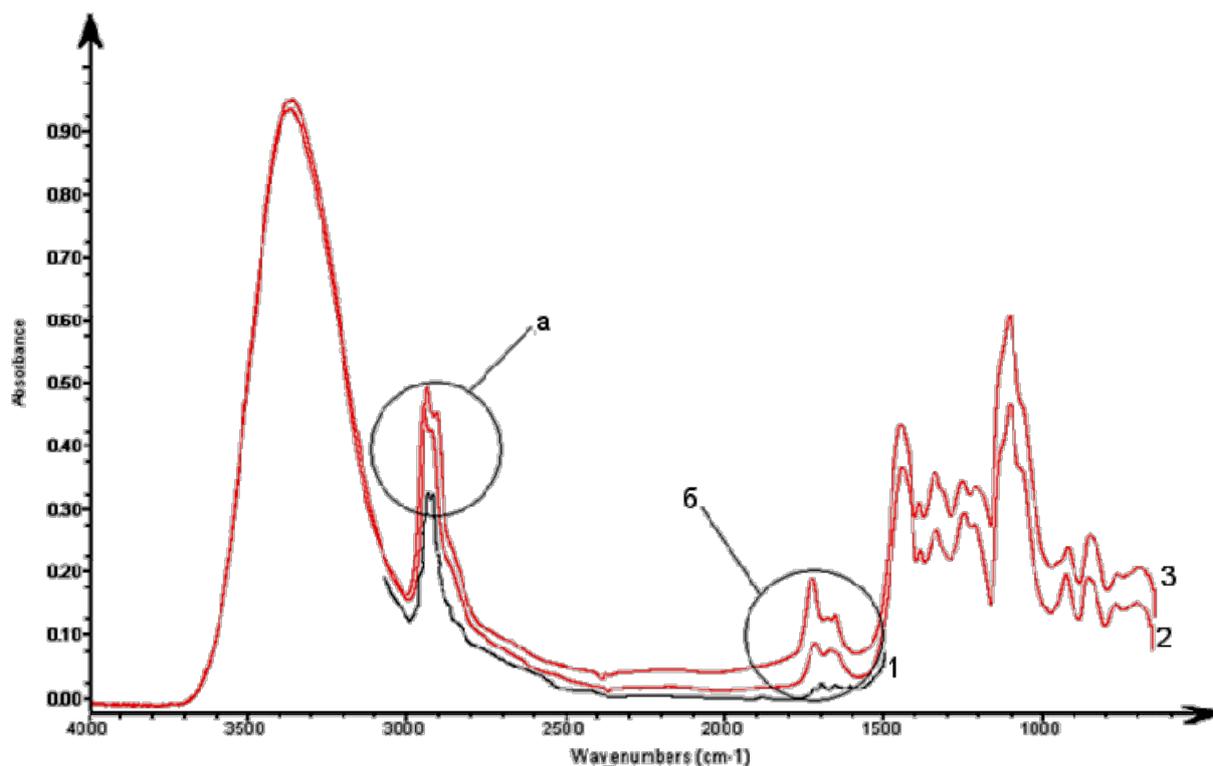


Рисунок 4 - ИК НПВО спектры модифицированного поливинилового спирта различной молекулярной массы: 1 - 14 000; 2 –50 000; 3 –110 000.

(а) - валентные колебания С-Н связей, (б) - валентные колебания С=О связей.

В случае использования ПВС с различной молекулярной массой (Рисунок 4) можно было наблюдать возрастание пиков с волновым числом  $1706$  и  $1621\text{ см}^{-1}$  в соответствии с возрастанием молекулярной массы.

ЯМР  $^1\text{H}$  спектр ПВС модифицированного ГМА, полученный в растворе  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  (Рисунок 5) также свидетельствует о вхождении метакрилатных групп в боковые цепи поливинилового спирта. Серия сигналов с химическими сдвигами в области  $1,5$  м.д. соответствует протонам  $-\text{CH}_2$  групп основной цепи поливинилового спирта. Вызванные отклики обусловлены как образованием различных типов соединений звеньев в цепи ПВС, так и наличием метакрилатных групп, обладающих диамагнитной анизотропией.

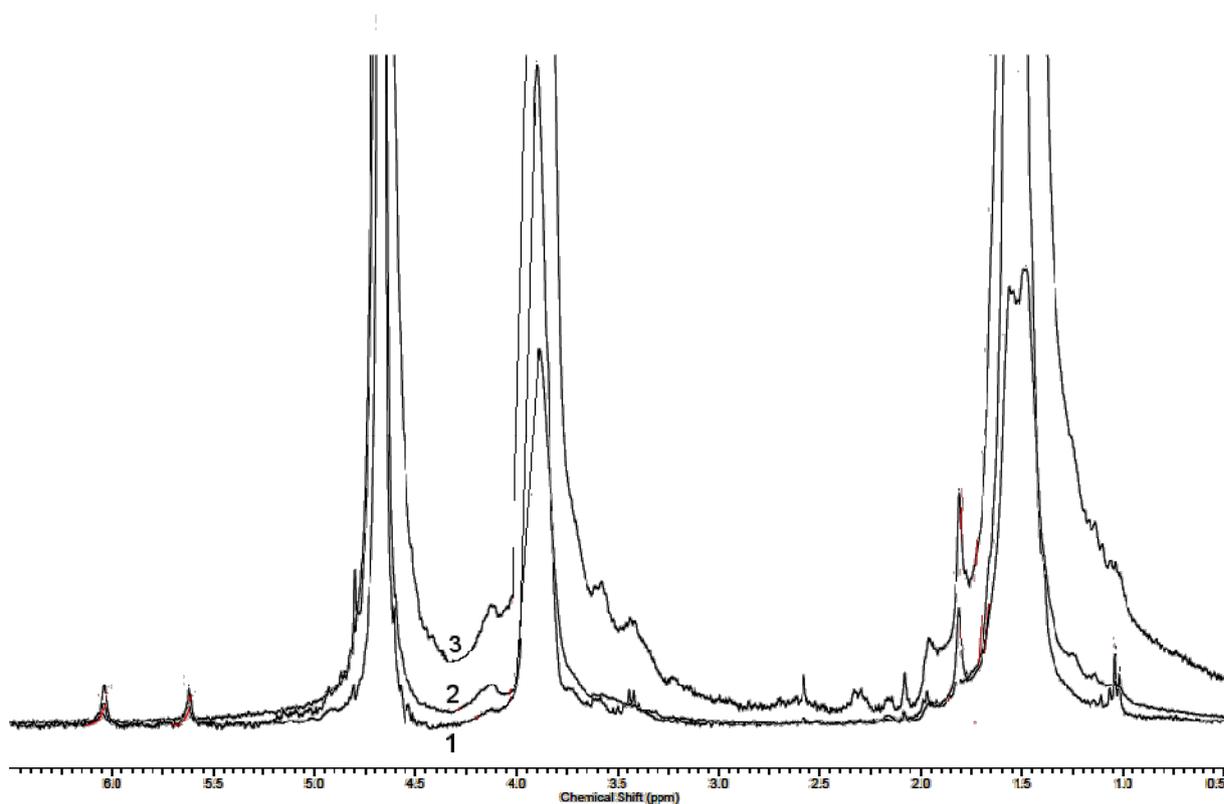


Рисунок 5 - ЯМР  $^1\text{H}$  спектр ПВС продукта модификации поливинилового спирта  
 Температура реакции  $90\text{ }^\circ\text{C}$ , соотношении  $[\text{ПВС}]/[\text{ГМА}] = 10/1$  моль/осново-моль, концентрация ПВС  $6\text{ г}/100\text{ мл}$ . Время реакции: 1- 1, 2 -2, 3- 4 ч.

Кроме того, в спектре продукта модификации ПВС глицидилметакрилатом появляется узкий интенсивный синглет с химическим сдвигом  $1,75\text{ м.д.}$ , соответствующий протонам  $\text{CH}_3$  группы и сигналы с химическими сдвигами  $5,63\text{ м.д.}$  и  $6,1\text{ м.д.}$ , отвечающие магнитнонеэквивалентным гминальным протонам  $\text{СНН=}$  фрагментов метакрилатных групп. Сигналы  $1,9\text{ м.д.}$ ,  $3,3\text{ м.д.}$  и  $3,6\text{ м.д.}$ , очевидно, относятся к протонам фрагмента  $-\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-$ , образующегося при раскрытии эпоксидного цикла глицидиловых эфиров.

На рисунках представленных ниже (Рисунок 6 - Рисунок 9) приведены примеры типичных зависимостей степени замещения поливинилового спирта от условий проведения процесса. Как можно видеть, скорость реакции ожидаемо

увеличивалась с ростом температуры (Рисунок 6). Причем, во всем интервале изменения температуры реакции предельная степень замещения достигалась в течение 2÷3 часов. Наблюдаемое увеличение предельной степени замещения с ростом температуры, вероятно, связано с уменьшением вязкости реакционной среды.

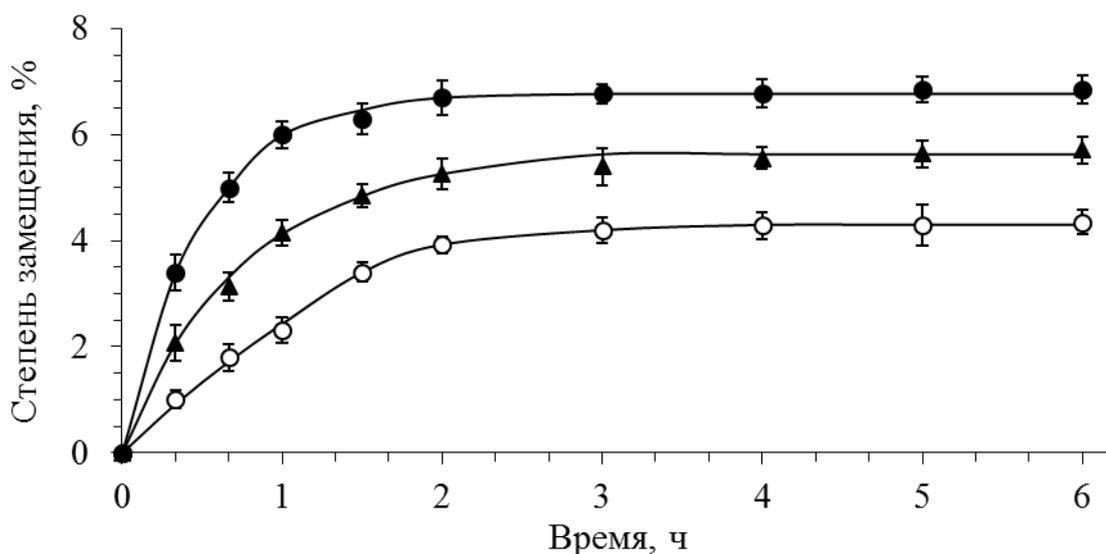


Рисунок 6 - Зависимость степени замещения поливинилового спирта от времени при различных температурах.

Молекулярная масса полимера 110 000. Концентрация реакционной системы 6 г/100 мл,  $[ПВС]/[ГМА] = 10/1$  осново-моль/моль, температура: (●) – 100, (▲) -90, (○) - 80 °C

О ключевой роли вязкости реакционной среды в лимитировании процесса модификации полимера диффузией свидетельствует влияние на скорость протекания процесса молекулярной массы ПВС. Как можно видеть, с увеличением молекулярной массы ПВС, а, соответственно, и вязкости реакционной системы, при постоянстве остальных условий, скорость реакции и предельная степень замещения несколько уменьшаются (Рисунок 7), что, вероятно, объясняется уменьшением коэффициентов диффузии реагентов.

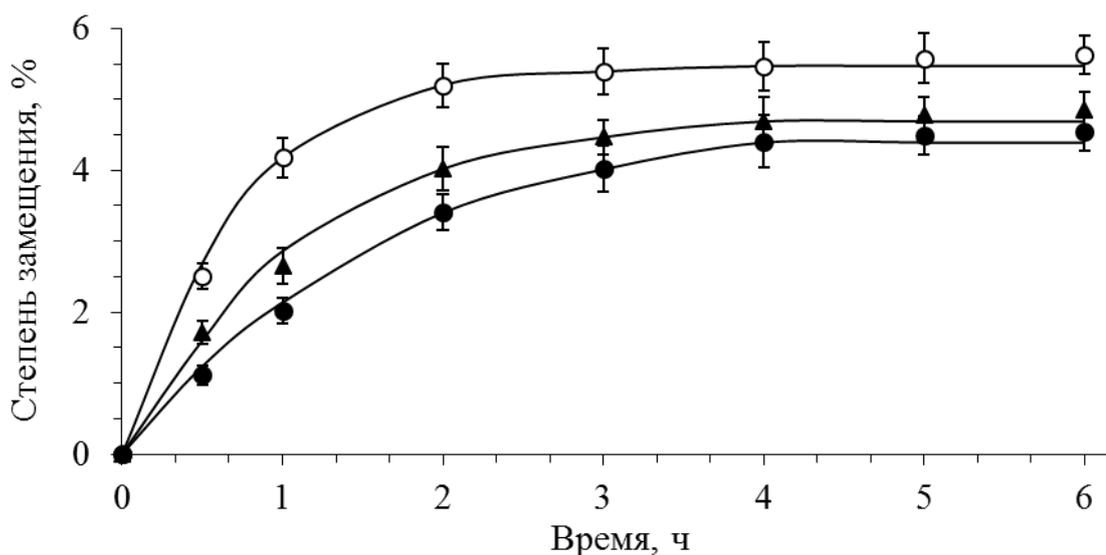


Рисунок 7 – Зависимость степени замещения поливинилового спирта от времени при различных молекулярных массах полимера.

Молекулярная масса ПВС: (○) - 14000, (▲) - 50000, (●) – 110000. Концентрация реакционной системы 6 г/100 мл, [ПВС]/[ГМА] = 10/1 осново-моль/моль, температура 90 °С

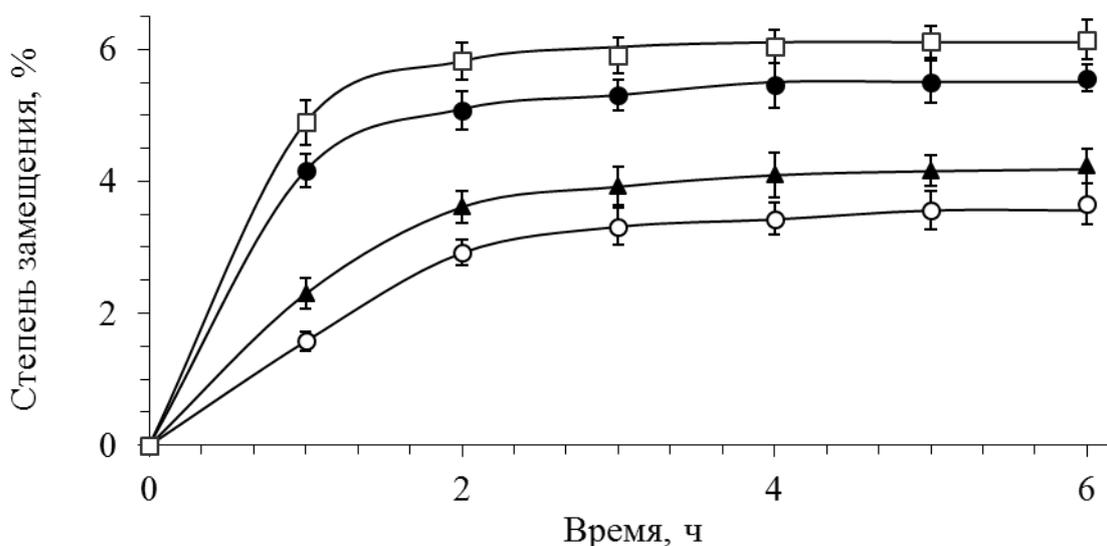


Рисунок 8 – Зависимость степени замещения поливинилового спирта от времени при различных концентрациях реакционной системы.

Концентрация реакционной системы: (□) – 7, (●) -6, (▲) – 5, (○) – 4 г/100 мл. [ПВС]/[ГМА] = 10/1 осново-моль/моль, температура 90 °С

На диффузионно-лимитируемый характер взаимодействия указывает и уменьшение скорости реакции и предельной степени замещения при увеличении

суммарной концентрации реагентов (Рисунок 8) в реакционной смеси (в кинетической области следовало бы ожидать обратного результата).

Наблюдаемый эффект связан с ростом вязкости реакционной среды при увеличении концентрации ПВС в реакционной системе. Вместе с тем, если концентрация ПВС сохранялась постоянной, то увеличение концентрации ГМА ожидаемо приводило к увеличению степени замещения гидроксильных групп (Рисунок 9).

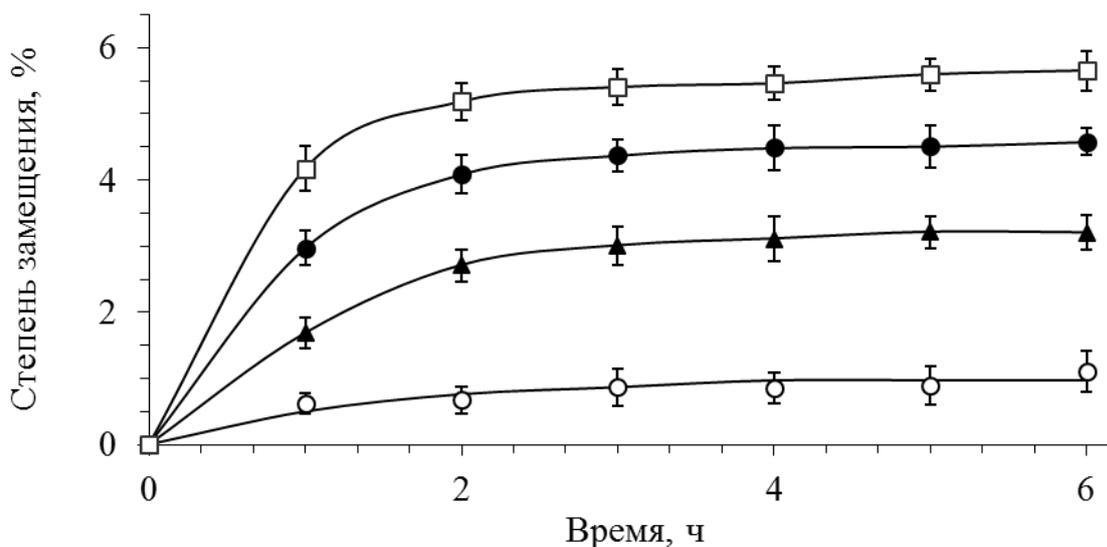


Рисунок 9 – Зависимость степени замещения поливинилового спирта от времени при различных соотношениях реагентов.

Концентрация реакционной системы 6 г/100 мл, температура 90 °С. [ПВС]/[ГМА]: = (□) – 10/1, (●) – 13/1, (▲) – 20/1, (○) – 50/1 осново-моль/моль

Модификацию 2-гидроксиэтилкрахмала глицидилметакрилатом проводили также в растворе диметилсульфоксида, но в присутствии каталитических количеств N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (0,1 %). Процесс проводили в интервале температур от 80 до 100°С, концентрации ГЭК в реакционной смеси от 4 до 12 масс %, мольных соотношениях реагентов [ГМА]/[ГЭК] равных от 1/10 до 1/50 моль/осново-моль, соответственно.

Химическая модификация ГЭК глицидилметакрилатом заключается в замещении атома водорода гидроксильных групп гидроксиэтилкрахмала остатком глицидилметакрилата. Так как на каждое звено цепи гидроксиэтилкрахмала

приходится по две -ОН группы при атомах углерода (С3) и (С6), а также третий гидроксил гидроксиэтильного фрагмента при атоме углерода (С2), имеет место проблема региоселективности для реакции между ГЭК и ГМА.

Для установления преимущественного направления реакции были изучены ИК- и  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектры модифицированного ГЭК [205].

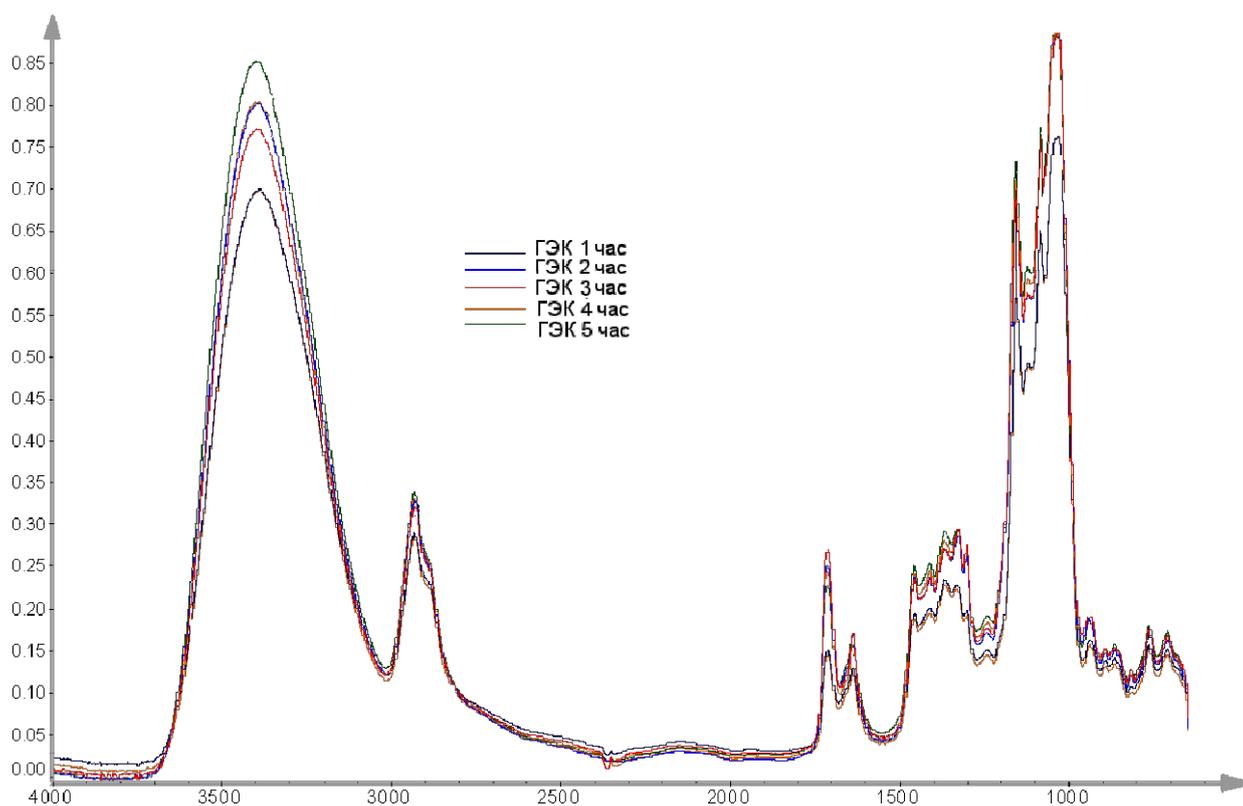


Рисунок 10 - ИК - спектр модифицированного ГЭК (1, 2, 3, 4 и 5 часов от начала реакции)

В ИК-спектре продукта модификации ГЭК глицидилметакрилатом наблюдается сигнал  $1711\text{cm}^{-1}$ , соответствующий валентным колебаниям двойных связей  $\text{C}=\text{O}$ , находящихся в сопряжении со связями  $\text{C}=\text{C}$ , отсутствующий в исходном полимере, что указывает на введение метакрилатных фрагментов (Рисунок 10).

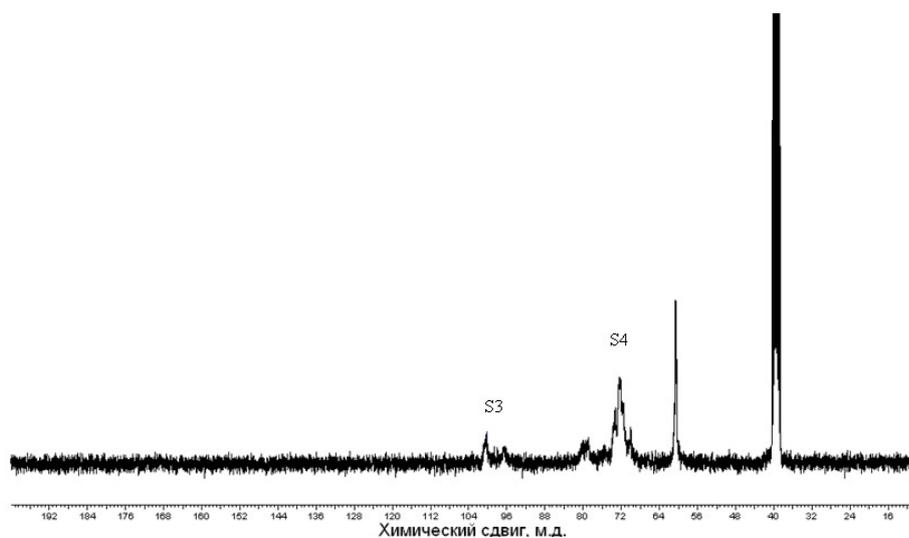


Рисунок 11 - ЯМР  $^{13}\text{C}$ -спектр исходного 2-гидроксиэтилкрахмала

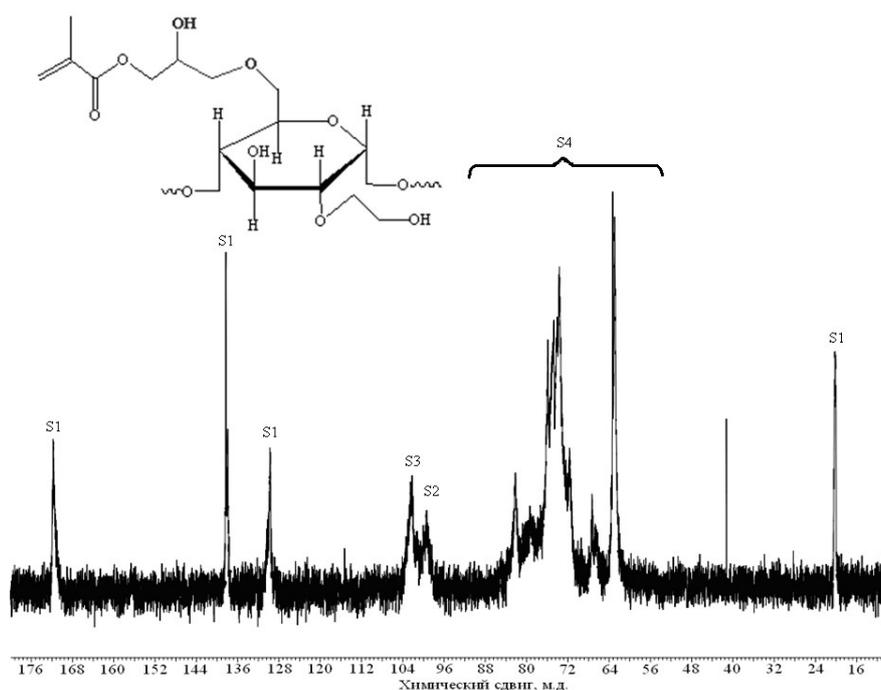


Рисунок 12 - Типичный ЯМР  $^{13}\text{C}$ -спектр модифицированного 2-гидроксиэтилкрахмала

К сожалению, говорить о том, с какой конкретно ОН - группой произошло взаимодействие молекулы ГМА, основываясь на данных ИК достаточно сложно. Так как на каждое звено цепи гидроксиэтилкрахмала приходится по две гидроксильные группы при атомах углерода глюкопиранозного кольца (С3) и

(С6), а также третий гидроксил гидроксиэтильного фрагмента при атоме углерода (С2), то возникает проблема региоселективности для реакции между ГЭК и ГМА. Можно предполагать, что из-за стерической затруднённости 6-го и тем более 3-го положения в звене гидроксиэтилкрахмала наиболее вероятным положением является гидроксил -СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>ОН группы при втором атоме углерода.

Для определения подтверждения данного предположения были изучены спектры <sup>13</sup>С ЯМР исходного (Рисунок 11) и модифицированного ГЭК (Рисунок 12).

Таблица 1 - Отнесение сигналов в типичном спектре ЯМР <sup>13</sup>С продукта модификации ГЭК

№	Отнесение сигнала или группы сигналов	Обозначение	Химический сдвиг, м.д.
1	сигналы ядер углерода глицидилметакрилатного остатка	S1	172, 138, 130 , 20
2	сигналы аномерных ядер (С1) углерода ГЭК в случае замещения	S2	100
3	сигналы аномерных ядер (С1) углерода ГЭК без замещения	S3	102
4	группу сигналов, соответствующих С2 – С6 ядрам углерода ГЭК	S4	62-84

На основании неизменности интегральных интенсивностей сигналов аномерных ядер углерода ГЭК, по сравнению с исходным спектром ГЭК, можно утверждать, что замещение протекает не по положению С2 и С3. Появление же уширенного сигнала при 68 м.д., а также уширение сигнала при 80 м.д. свидетельствует о присоединении глицидилметакрилатного остатка по гидроксильной группе глюкопиранозного кольца, в положение С6.

В силу этого, химическую модификацию ГЭК глицидилметакрилатом можно представить следующим образом (Рисунок 13):

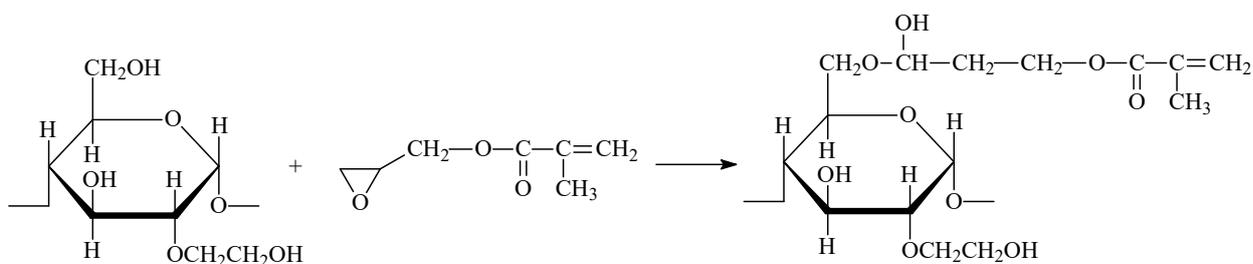


Рисунок 13 – Упрощенная схема химической модификации 2-гидроксиэтилкрахмала глицидилметакрилатом

На рисунках, представленных ниже приведены примеры некоторых типичных зависимостей степени замещения гидроксиэтилкрахмала от условий проведения процесса.

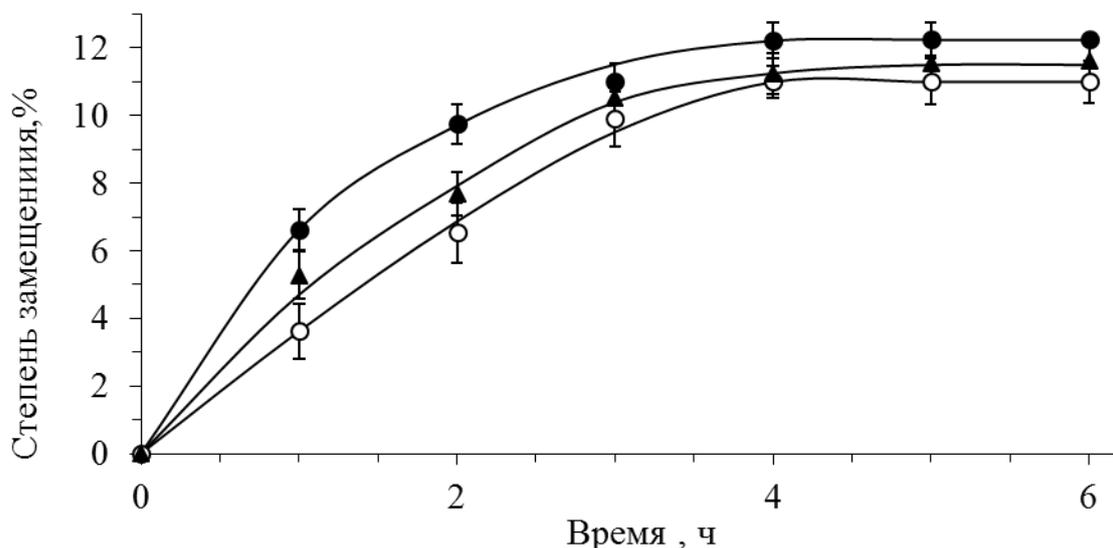


Рисунок 14 - Зависимость степени замещения 2-гидроксиэтилкрахмала от времени при различных температурах.

Концентрация реакционной системы 10 г/100 мл, [ГЭК]/[ГМА]=1/0,5 осново-моль/моль, температура: (●) – 100, (▲) -90, (○) - 80 °С

Как можно видеть на приведенных зависимостях, во всех рассматриваемых случаях максимальная степень замещения полимера достигалась уже за 3-4 часа, при этом, как и следовало ожидать, и скорость реакции и степень замещения полимера возрастали с ростом температуры (Рисунок 14), увеличением относительной доли эпоксидсодержащего соединения (Рисунок 15) и суммарной концентрации реакционной системы (Рисунок 16)

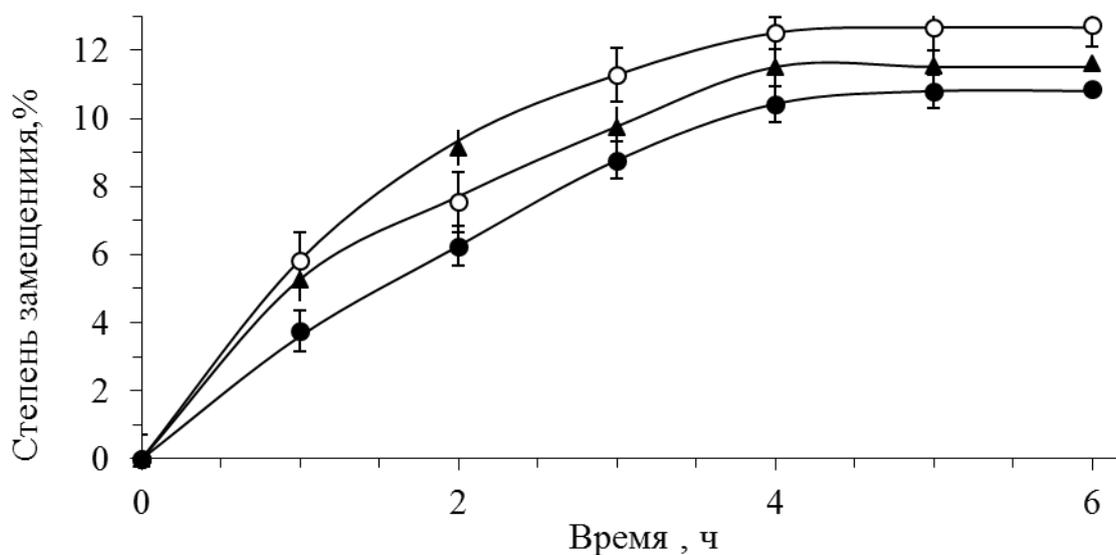


Рисунок 15 - Зависимость степени замещения 2-гидроксиэтилкрахмала от времени при различном соотношении реагентов.

Концентрация реакционной системы 10 г/100 мл, температура 90 °С, [ГЭК]/[ГМА]: (●) – 1/0,6; (▲) -1/0,5; (○) – 1/0,3 осново-моль/моль

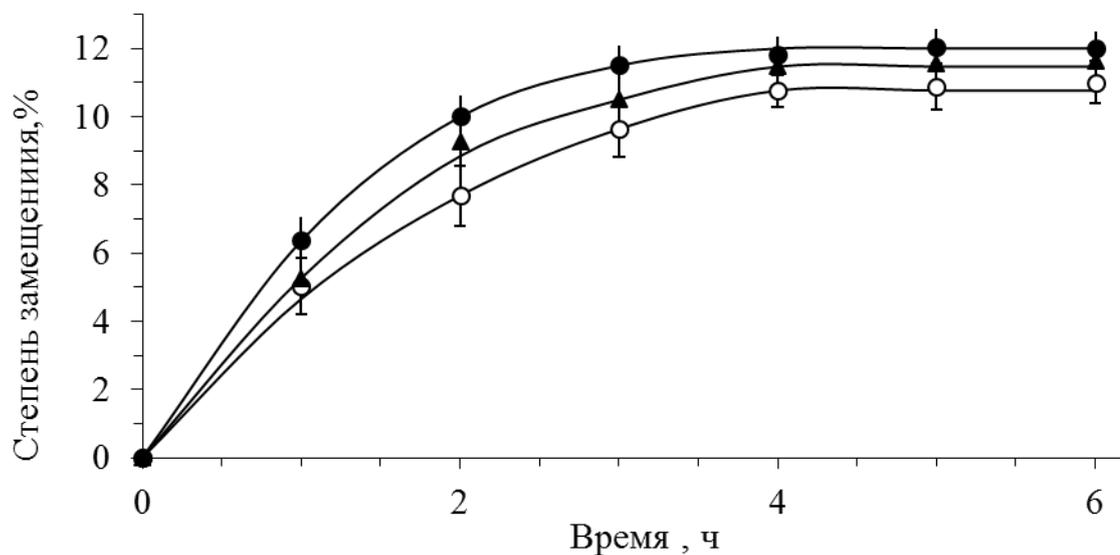


Рисунок 16 - Зависимость степени замещения 2-гидроксиэтилкрахмала от времени при различной концентрации реакционной системы.

Концентрация реакционной системы: (●) – 14; (▲) -10; (○) – 6 г/100 мл. Температура 90 °С, [ГЭК]/[ГМА]=1/0,5 осново-моль/моль

## 3.2 Получение сшитых полимерных гидрогелей

### 3.2.1 Изучение процесса синтеза сшитых полимерных гидрогелей на основе модифицированного поливинилового спирта при положительных температурах

#### 3.2.1.1 Радиационно-химических синтез полимерных гидрогелей

Применение радиационного облучения, как это указывалось ранее в обзоре литературы, считается весьма удобным и эффективным инструментом для формирования гидрогелей. К существенным достоинствам данного метода следует отнести достаточно легкое управление технологическим процессом, наличие возможности совмещения стадий формирования и стерилизации изделия, отсутствие необходимости использования каких бы то ни было сшивающих агентов или иницирующих систем, удаление остатков которых в случае сшитых полимерных гидрогелей является достаточно сложной технической задачей [206]. Негативным же аспектом применения такого подхода к формированию полимерных гидрогелей является возможная деструкция основной цепи полимеров с образованием токсичных веществ, в частности формальдегида, при высоких дозах облучения. Наличие же кратных связей в боковых цепях синтезированного в рамках данной работы поливинилового спирта позволяло сделать предположения о снижении необходимой для формирования трехмерной сшитой структуры дозы жесткого излучения, и, как следствие, заметного снижения риска образования токсичных соединений в готовых изделиях на основе разрабатываемых полимерных гидрогелей.

Изучение радиационно-химического синтеза полимерных гидрогелей проводили на базе Обнинского ФГУП НИФХИ им. Л.Я. Карпова под руководством профессора, д.х.н. Дуфлота В.Р.

С целью выявления закономерностей влияния различных факторов на процесс формирования сшитых полимерных гидрогелей на основе синтезированного акрирированного поливинилового спирта был осуществлен ряд синтезов при различных условиях [207]. Полимеризацию проводили при температурах 0 и 20 °С, соответственно; интенсивность облучения

составляла 0,1 Гр/с. Изучение кинетических зависимостей процесса показало, что в этих условиях реакции сшивки протекают вполне эффективно (Рисунок 17). Уже на ранних стадиях процесса имело место образование полимеризата, который иммобилизовывал всю содержащуюся в системе воду. Как можно видеть на приведенных рисунках, кинетическая зависимость процесса сшивки имеет типичный вид, присущий полимеризации би- и полифункциональных (мет)акриловых мономеров. Проведение процесса при более высокой температуре закономерно ведет к увеличению скорости процесса гелеобразования, однако при снижении температуры может быть достигнуто более высокое содержание геле-фракции. Существенно, что при облучении раствора исходного немодифицированного поливинилового спирта при же условиях (температура, концентрация) не наблюдалось образования сшитых гидрогелевых структур, а облученная система представляла собой раствор, характеризующийся заметно меньшей вязкости, что может свидетельствовать о значительной степени деструкции цепей полимера.

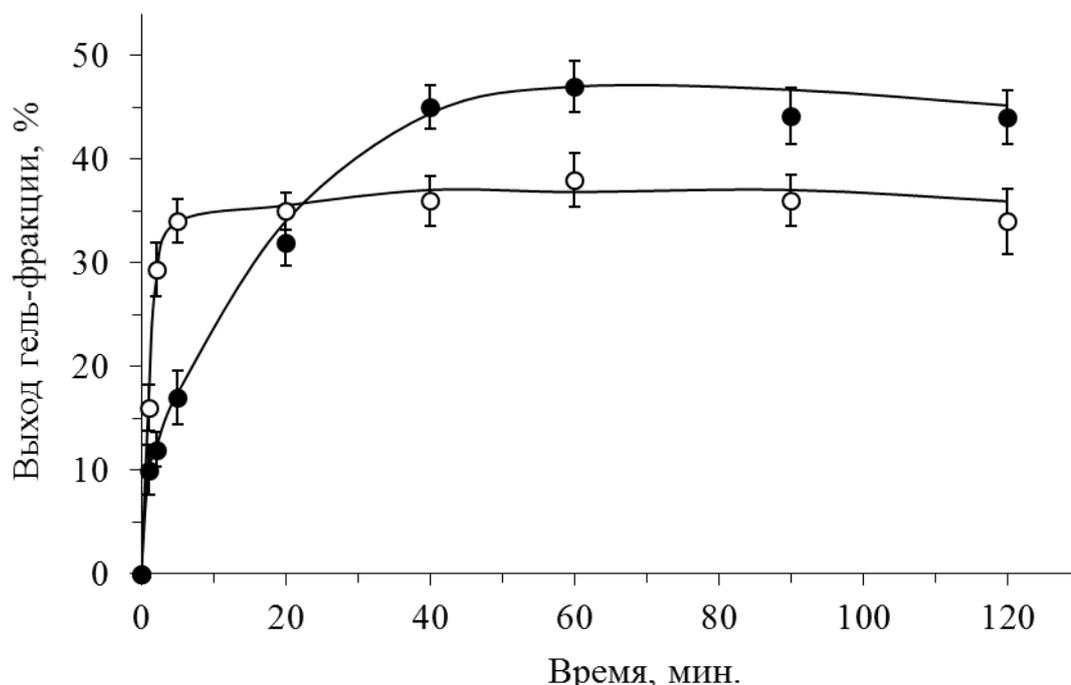


Рисунок 17 - Зависимость выхода сшитого полимера от времени.

Интенсивность излучения – 0,1 Гр/с

Концентрация реакционной системы 6 г/100 мл, температура: (●)- 0°C, (○)- 20°C

Помимо этого, можно видеть, что при практически приемлемых временах облучения во всех экспериментах не удалось достичь значений выхода гель-фракции превышающего 50%. Можно утверждать с большой степенью вероятности, что причиной данного факта является устанавливающееся в системе динамическое равновесие между процессами сшивки за счет кратных связей боковых цепей и деструкции основных цепей ПВС поливинилового спирта.

Аналогичные явления были описаны ранее для трехмерной радикальной полимеризации диметакрилатов в присутствии разветвленных полиметакрилатов [208]. В упоминаемой работе с использованием методов золь-гель анализа в сочетании с результатами ГПХ-анализа золь-фракций изучаемых полимеризационных составов было показано, что часть одна макромолекул разветвленного полиметакрилата является химически активной, тогда как другая – остается инертной на протяжении всего процесса трехмерной радикальной полимеризации. Как указывают авторы работы [208] «причиной этого могут являться стерические ограничения для взаимодействия растущих полимерных радикалов с «подвешенными» двойными С–С связями разветвленного полиметакрилата и их пространственная разобщенность. Эти пространственные ограничения реализуются даже при наличии в полимеризационной системе достаточно большой концентрации двойных связей диметакрилата, выступающего в качестве растворителя и сомономера, одновременно».

Изучаемый же в данной диссертационной работе, процесс полимеризации может быть реализован только по введенным в боковые цепи полимера двойным связям, низкомолекулярный же сомономер полностью отсутствует, в следствие этого ситуация с пространственными ограничениями еще более усугубляется, в связи с чем процесс радиационной полимеризации модифицированного ПВС может полностью останавливаться, не достигая высоких степеней конверсии имеющихся кратных С–С связей. Подобная ситуация, безусловно, должна оказывать влияние на выход гель-фракции, однако вклад данного фактора, по сравнению с обнаруженной радиационной деструкцией, менее существенен,

поскольку, как это можно видеть на приведенной ниже (Рисунок 18), зависимости, увеличение степени замещения поливинилового спирта достаточно слабо сказывается на выходе гель-фракции. Зависимость выхода сшитого гидрогеля от концентрации модифицированного полимера в реакционной смеси имеет критический характер (Рисунок 18). При концентрациях ПВС менее  $\sim 2,5$  г/100 мл образование трехмерной сетки (макрогеля) не наблюдалось. В узком диапазоне концентраций модифицированного полимера (от 2 до 3 г/100 мл), который был неизменен для всех использованных степеней замещения, имело место резкое возрастание выхода гель-фракции, который при дальнейшем увеличении концентрации реакционной системы оставался практически неизменным. Характерно, что при этом для всех использованных концентраций вода, которая присутствовала в исходном растворе, оказывалась полностью иммобилизованной образывавшейся трехмерной сеткой.

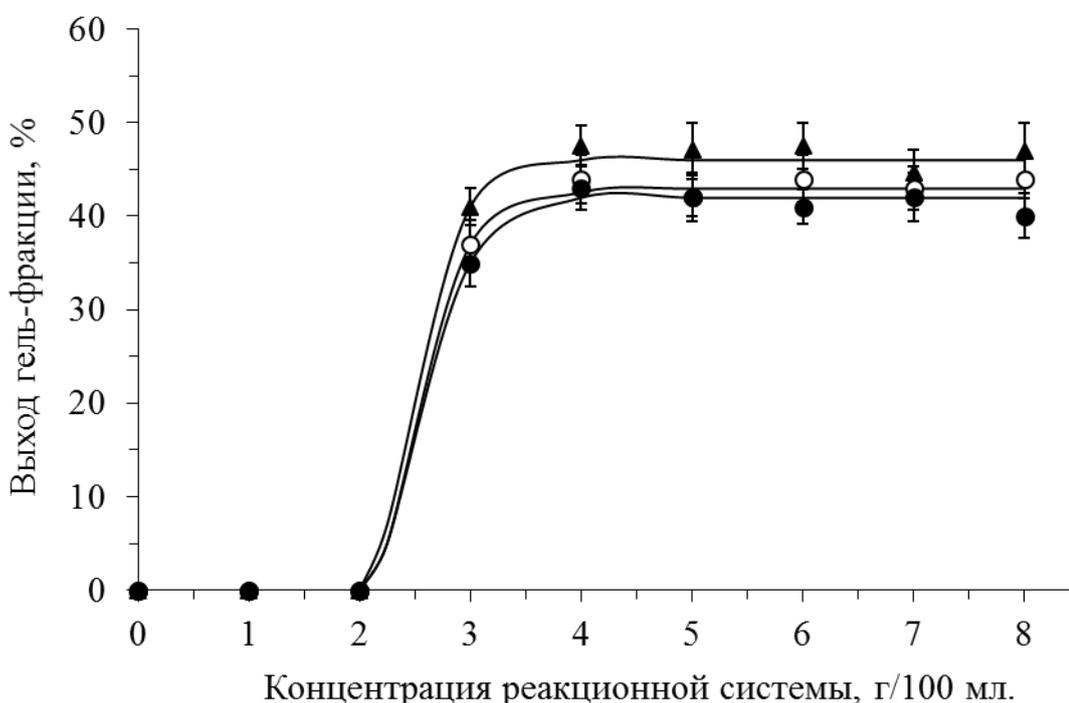


Рисунок 18 - Зависимость выхода сшитого полимера от концентрации реакционной системы

Интенсивность облучения – 0,1 Гр/с. Время облучения 180 минут. Температура 0 °С. Степень замещения полимера: (●)- 1,75 мольн. %, (○)- 2,5 мольн. %, (▲) – 4,2 мольн. %.

Известно [209-210], что ситуация, при которой  $c[\eta] \approx 1$ , соответствует концентрации, при которой клубки макромолекул полимера, находящегося в растворе, начинают перекрываться. Если  $c^*$  составляет около 2,5-3 %, то это может свидетельствовать об формировании сплошной трехмерной сетки при этой концентрации. Учитывая тот факт, что константы в уравнении Марка-Хаувинка для поливинилового спирта в воде при 25°C  $K = 5,95 \cdot 10^{-4}$  дл/г,  $\alpha = 0,63$  [211], а молекулярная масса полимера использованного для исследований составляет  $M_w = 25\ 000$ , характеристическая вязкость ПВС будет равна 0,35 дл/г (это значение близко к характеристической вязкости определенной экспериментально). Таким образом, расчетная величина концентрации раствора  $c^*$ , при которой происходит перекрывание полимерных клубков, составляет 2,85%. Как можно видеть полученное значение и выявленное в эксперименте значение концентрации, при которой имело место образование заметного количества гель-фракции, достаточно хорошо коррелируют между собой.

На основании этих данных может быть предложена следующая модель процесса полимеризации (сшивки) модифицированного поливинилового спирта. В растворах с концентрацией полимера ниже  $c^*$  результатом полимеризационного процесса является образование микрогеля, который не может быть зафиксирован обычными методами экстракции. По достижении концентрации полимера значения близкого к критической концентрации  $c^*$  процесс полимеризации начинает протекать по, своего рода, каналам, которые состоят из системы пронизывающих весь объем образца взаимоперекрывающихся и взаимосвязанных полимерных клубков. Дальнейший рост концентрации поливинилового спирта в растворе приводит лишь к увеличению числа этих каналов и, как следствие, росту плотности сшивки полимерной стеки гидрогеля.

### 3.2.1.2 Изучение процесса синтеза гидрогелей при вещественном иницировании

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 позволило бы использовать данный метод для сколь-либо эффективного производства изделий на их основе. В силу этого в дальнейшем для получения полимерных гидрогелей на основе модифицированных поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала использовалась сшивка по свободно-радикальному механизму в присутствии веществ-инициаторов радикальной полимеризации [212].

Для изучения процессов гелеобразования при вещественном иницировании использовались следующие иницирующие системы: система «персульфат калия - N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин» (ПСК–ТМЭД) – «классическая» иницирующая система, обеспечивающая высокую эффективность и воспроизводимость результатов в широком интервале температур, при этом, однако, характеризующаяся сравнительно высокой токсичностью, а также система «перекись водорода - аскорбиновая кислота» (ПВ-АК) – сравнительно редко используемая при синтезе гидрогелевых материалов иницирующая система, преимуществом которой является ее меньшая токсичность, что дает потенциальную возможность формирования полимерных гидрогелей *in vivo*.

При использовании данных окислительно-восстановительных систем сшивка проводилась при комнатной температуре.

Помимо этого, изучалась сшивка при повышенных температурах в присутствии персульфата калия (ПСК).

Изучение динамики процесса формирования сшитых полимерных гидрогелей на основе акриловых производных поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилметакрилата показало, что в условиях при которых проводились эксперименты реакции сшивки протекают весьма эффективно (пример типичных зависимостей можно видеть ниже) и время сшивки составляет, в зависимости от

условий в которых протекает процесс от нескольких секунд до десятков минут (Рисунок 19, Рисунок 20).

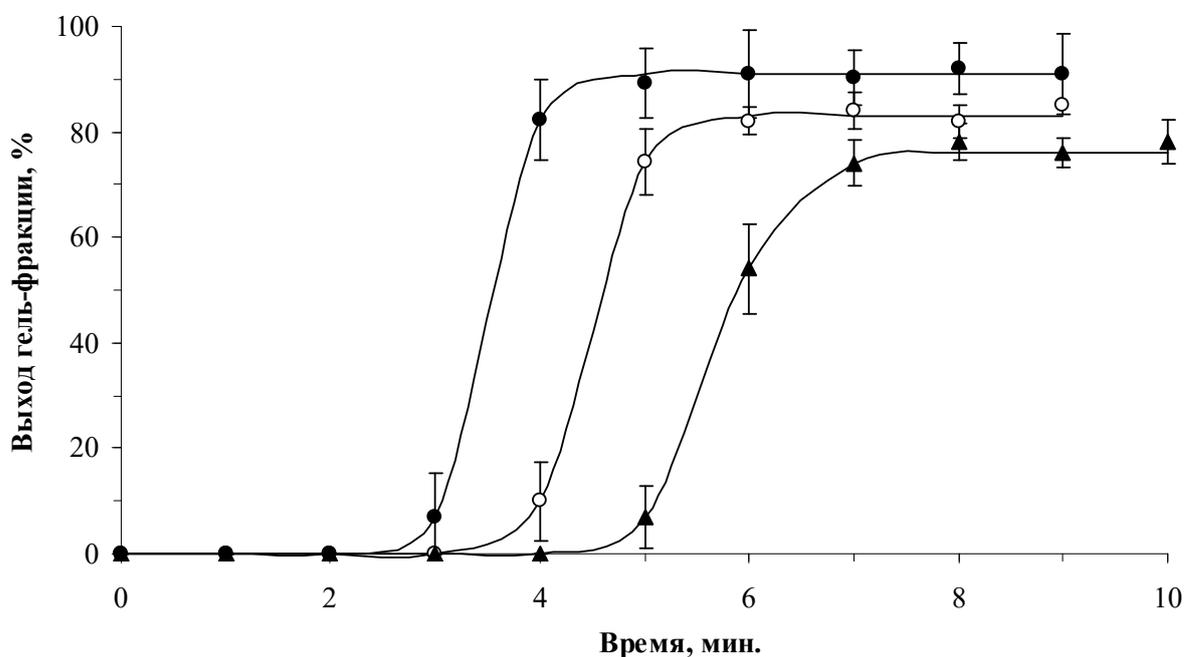


Рисунок 19 - Зависимость выхода сшитого полимера от времени

(●)- иницирующая система ПВ-АК, температура 20 °С, (○)- иницирующая система ПСК-ТМЭД, температура 20 °С, (▲) – инициатор - ПСК, температура 80 °С

Следует при этом отметить, что если в случае радиационно-химической сшивки, как это было продемонстрировано выше, уже на ранних стадиях полимеризационного процесса образовывался полимеризат, который содержал всю воду системы, то в случае полимеризации в присутствии инициаторов до определенного момента не наблюдалось образования макрогеля, а имело место постепенное нарастание вязкости системы, после чего происходила потеря текучести и быстрое увеличение выхода гель-фракции. Характерно, что довольно часто образующимся полимеризатом поглощалась, лишь часть имеющейся в реакционной системе воды, то есть имел место, своего рода, синерезис. Для систем с низкой концентрацией модифицированного полимера наблюдалось также формирование нескольких «очагов» гелеобразования, в которых раствор терял текучесть, объединяющихся в дальнейшем в монолитный гидрогель.

Наблюдаемая картина, очевидно, может объясняться неравномерным распределением инициатора при перемешивании вязкой реакционной системы.

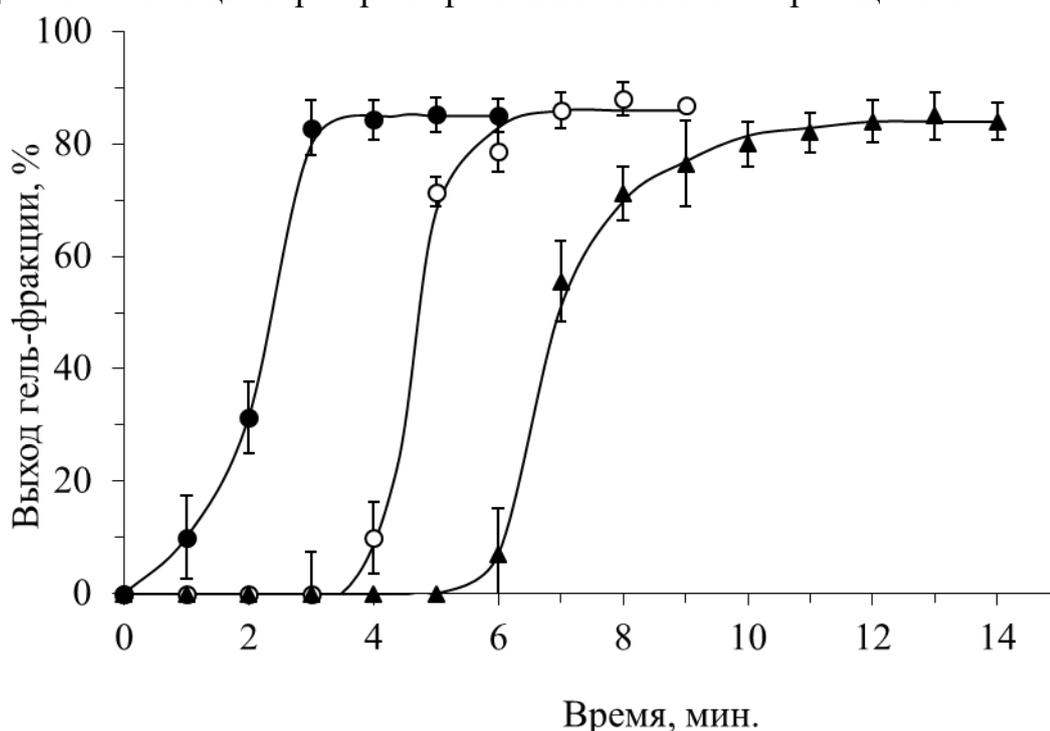


Рисунок 20 - Зависимость выхода сшитых полимерных гидрогелей ПВС/ГЭК от времени.

Соотношение ПВС/ГЭК=70/30, температура 20 °С, концентрация иницирующей системы ПСК-ТМЭД в реакционной системе: (▲)- 1,5 г/л (○)-, 2,5 г/л, (●) – 4 г/л,

Говоря о влиянии количества вводимого в реакционную систему инициатора, стоит отметить также наличие некоего критического содержания инициатора, ниже которого не происходило образование макрогеля (Рисунок 21, Рисунок 22). Данный факт, очевидно, может быть объяснен отсутствием при недостаточном количестве инициатора необходимого для образования трехмерной сшитой гидрогелевой сетки числа узлов сшивки. По достижении же концентрацией инициатора некоего порогового значения наблюдался весьма быстрый рост выхода гель-фракции, что вполне ожидаемо и может быть объяснено законом действующих масс. В тоже время, если в случае использования для инициирования полимеризационного процесса персульфата калия графическая зависимость выхода гель-фракции от количества инициатора в

реакционной смеси выходила на «плато», то при использовании иницирующей системы на основе перекиси водорода аналогичные графические зависимости имели экстремальный характер. Можно предположить, что подобный вид зависимости может быть объяснен увеличением количества растворенного в реакционной системе кислорода, который образуется при распаде перекиси водорода (побочная реакция). Последний, как известно, является весьма эффективным обрывателем радикальной полимеризации.

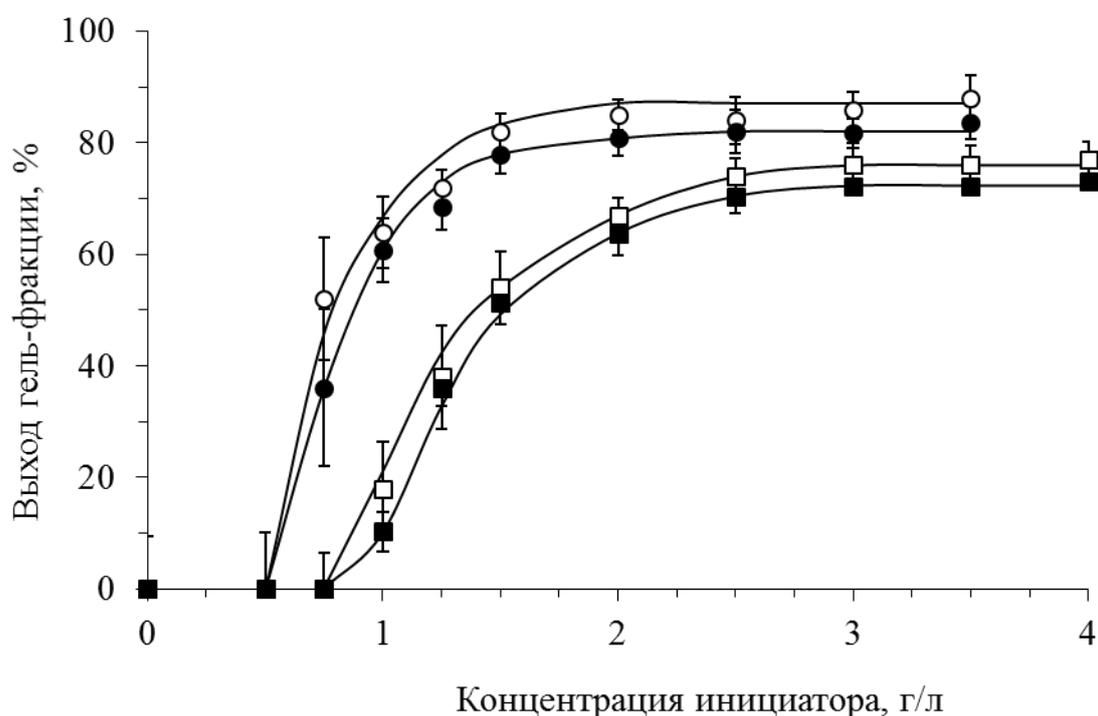


Рисунок 21- Зависимость выхода сшитых полимерных гидрогелей от времени при различной концентрации в реакционной системе.

(○)- иницирующая система «ПСК-ТМЭД», ПВС/ГЭК=100/0, (●) – иницирующая система «ПСК-ТМЭД», ПВС/ГЭК=70/30, (□) – инициатор ПСК, 80°C, ПВС/ГЭК=100/0, (■) - инициатор ПСК, 80°C, ПВС/ГЭК=70/30. Суммарная концентрация макромеров 7 г/100 мл, продолжительность реакции 20 минут. Степень замещения ПВС- 2,5 мольн. %, ГЭК – 7,67 мольн.%.

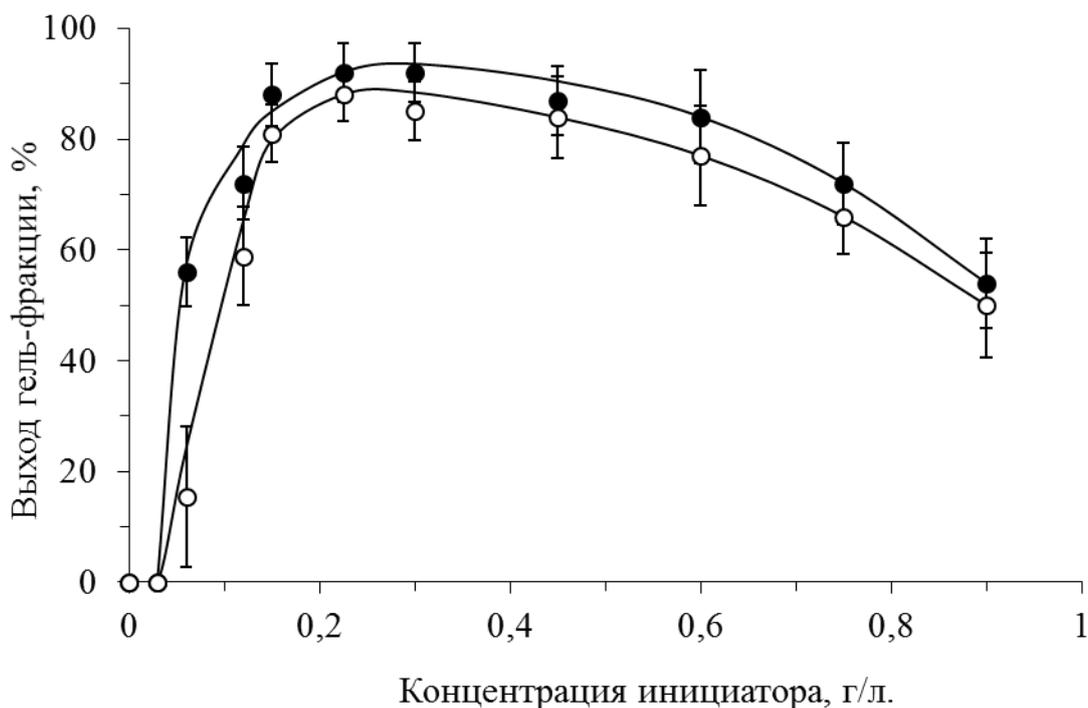


Рисунок 22 - Зависимость выхода сшитых полимерных гидрогелей от времени при различной концентрации инициатора в реакционной системе.

Инициатор - иницирующая система «ПВ-АК», суммарная концентрация макромеров 7 г/100 мл, продолжительность реакции 20 минут. Степень замещения ПВС- 2,5 мольн.%, ГЭК – 7,67 мольн.%.

Соотношение сомономеров: (●)-ПВС/ГЭК=100/0, (○) –ПВС/ГЭК=70/30

Наличие образующегося в побочной реакции кислорода объясняет, очевидно, и худшую воспроизводимость результатов при использовании в качестве инициатора перекиси водорода. В силу этого, для большей части исследований, связанных с изучением структуры полимерных гидрогелей (результаты приводятся в последующих главах) использовались образцы, полученные с использованием иницирующей системы «персульфат калия – тетраметилэтилендиамин».

Типичные зависимости, описывающие характер влияния концентрации реакционной системы на выход сшитых полимерных гидрогелей представлены ниже (Рисунок 23 - Рисунок 28). Как можно видеть, для гидрогелей на основе

ПВС, как и в случае описанной выше радиационно-химической сшивки (Рисунок 18), эти зависимости имеют критический характер. Однако, в случае вещественного инициирования, критическая концентрация, ниже которой макрогель не образуется, заметно выше и зависит от степени замещения макромера. Кроме того, диапазон, в котором происходит возрастание выхода гель-фракции заметно шире.

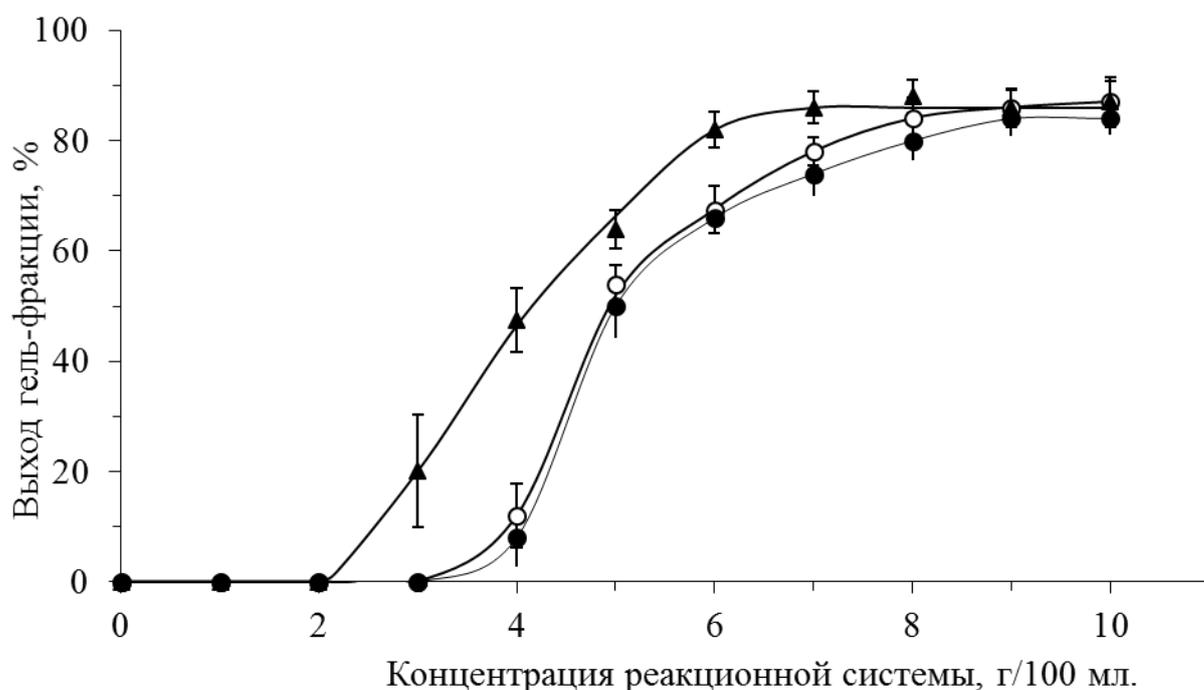


Рисунок 23 - Зависимость выхода сшитых полимерных гидрогелей ПВС от суммарной концентрации реакционной системы  
Иницирующая система ПСК-ТМЭД, концентрация инициатора 3 г/л.  
Время реакции 20 минут. Температура 20 °С. Степень замещения полимера: (●)- 1,75 мольн.%, (○)- 2,5 мольн.%, (▲) – 4,2 мольн.%

Подобная картина подтверждает значительное влияние на образование сшитого гидрогеля процессов деструкции полимерных цепей при радиационно-химической сшивке, которые, очевидно, и обеспечивают межмолекулярную сшивку при достижении концентрации перекрытия клубков даже при недостаточном для эффективной сшивки количестве кратных связей в реакционной системе.

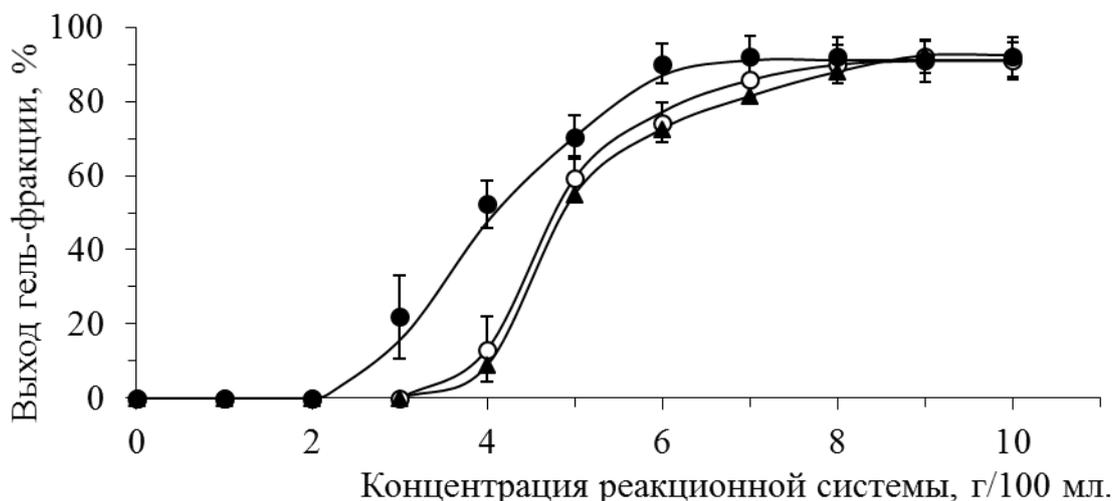


Рисунок 24 - Зависимость выхода сшитых полимерных гидрогелей ПВС от суммарной концентрации реакционной системы

Иницирующая система ПВ-АК, концентрация инициатора 0,3 г/л. Время реакции 20 минут. Температура 20 °С. Степень замещения полимера: (●)-4,2 мольн.%, (○)- 2,5 мольн.%, (▲) – 1,75 мольн.%

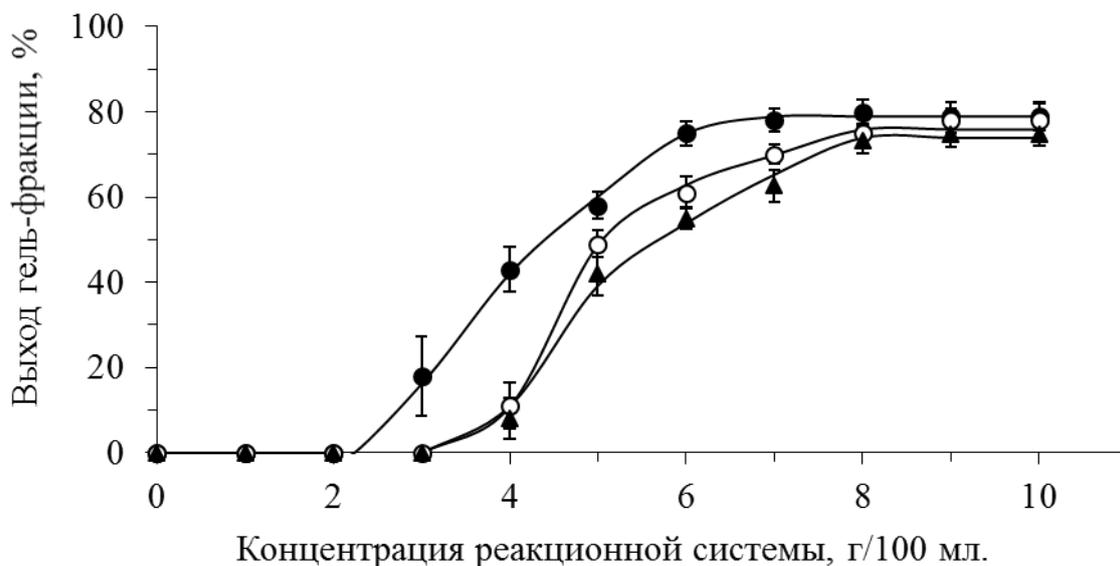
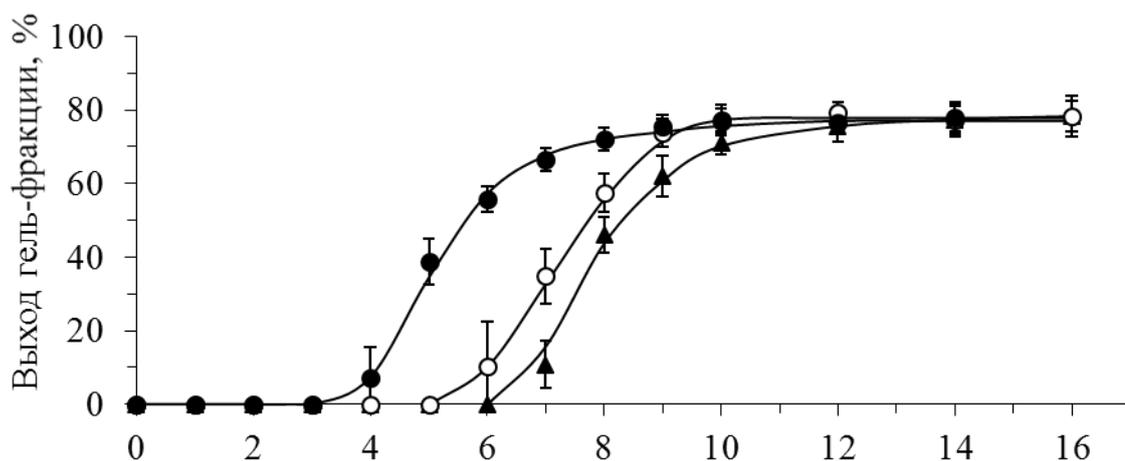


Рисунок 25 - Зависимость выхода сшитых гидрогелей ПВС от суммарной концентрации реакционной системы

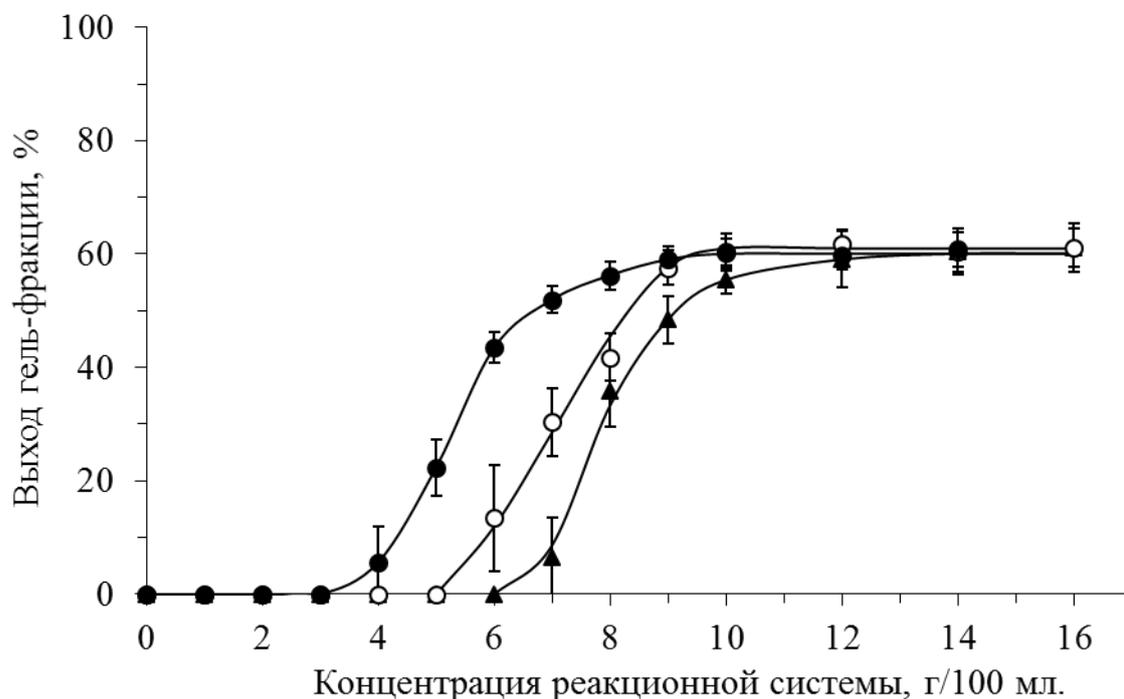
Инициатор - ПСК, концентрация инициатора 3 г/л. Время реакции 20 минут. Температура 80 °С. Степень замещения полимера: (●)-4,2 мольн.%, (○)- 2,5 мольн.%, (▲) – 1,75 мольн.%



Концентрация реакционной системы, г/100 мл.

Рисунок 26 - Зависимость выхода сшитых гидрогелей ГЭК от суммарной концентрации реакционной системы

Иницирующая система ПВ-АК, концентрация инициатора 0,3 г/л. Время реакции 20 минут. Температура 20 °С. Степень замещения полимера: (●)- 5,2 мольн.%, (○)- 7,67 мольн.%, (▲) – 10,2 мольн.%



Концентрация реакционной системы, г/100 мл.

Рисунок 27- Зависимость выхода сшитых гидрогелей ГЭК от суммарной концентрации реакционной системы

Иницирующая система ПСК-ТМЭД, концентрация инициатора 3 г/л. Время реакции 20 минут. Температура 20 °С. Степень замещения полимера: (●)- 5,2 мольн.%, (○)- 7,67 мольн.%, (▲) – 10,2 мольн.%.

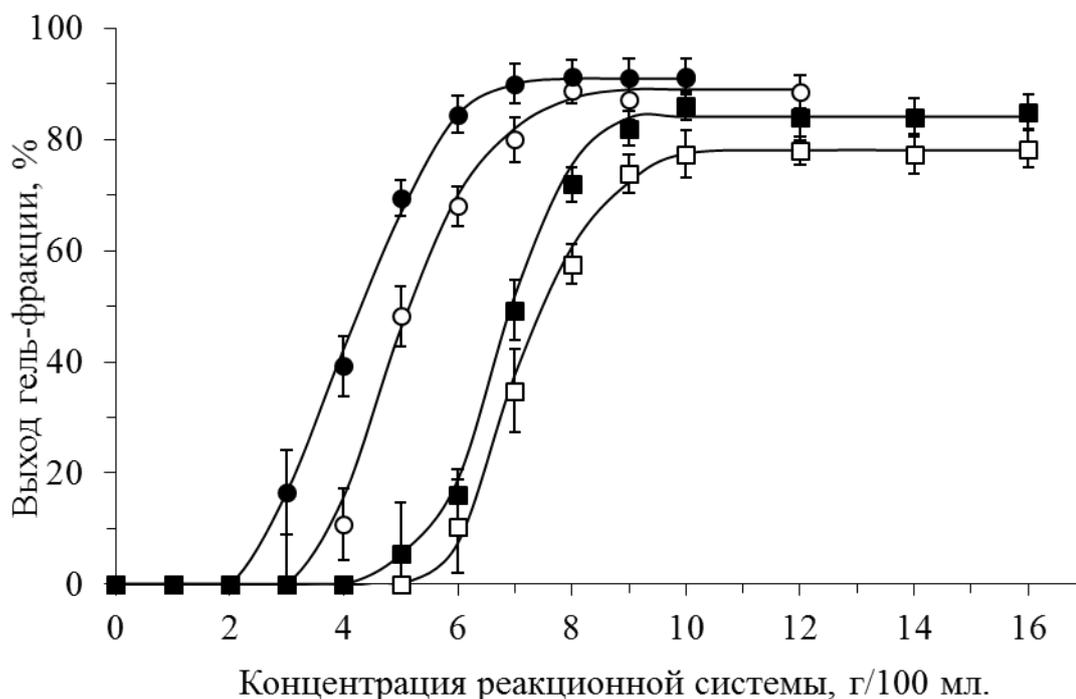


Рисунок 28 - Зависимость выхода сшитых гидрогелей ПВС-ГЭК от суммарной концентрации реакционной системы

Иницирующая система ПА-АК, концентрация инициатора 0,3 г/л. Время реакции 20 минут. Температура 20 °С. Степень замещения полимеров: ПВС – 4,76 мольн.%, ГЭК – 7,67 мольн.%. Соотношение макромеров: (●)- ПВС/ГЭК=90/10, (○)-ПВС/ГЭК=50/50, (■) - ПВС/ГЭК=10/90, (□) – ПВС/ГЭК=0/100

Однако стоит указать на тот факт, что критическая концентрация, после достижения которой имеет место образование сшитых структур, в случае ГЭК заметно выше (Рисунок 26, Рисунок 27), несмотря на большую молекулярную массу этого макромера, и как следствие меньшую концентрацию обеспечивающую перекрытие макромолекулярных клубков. Данный факт, очевидно, может объяснять меньшей доступностью кратных связей.

Добавление в реакционную систему модифицированного поливинилового спирта, как и следовало бы ожидать, ведет заметному снижению критической концентрации, по достижении которой имело место гелеобразование (Рисунок

28). Причем снижение этого параметра по мере увлечения доли ПВС имеет нелинейный характер.

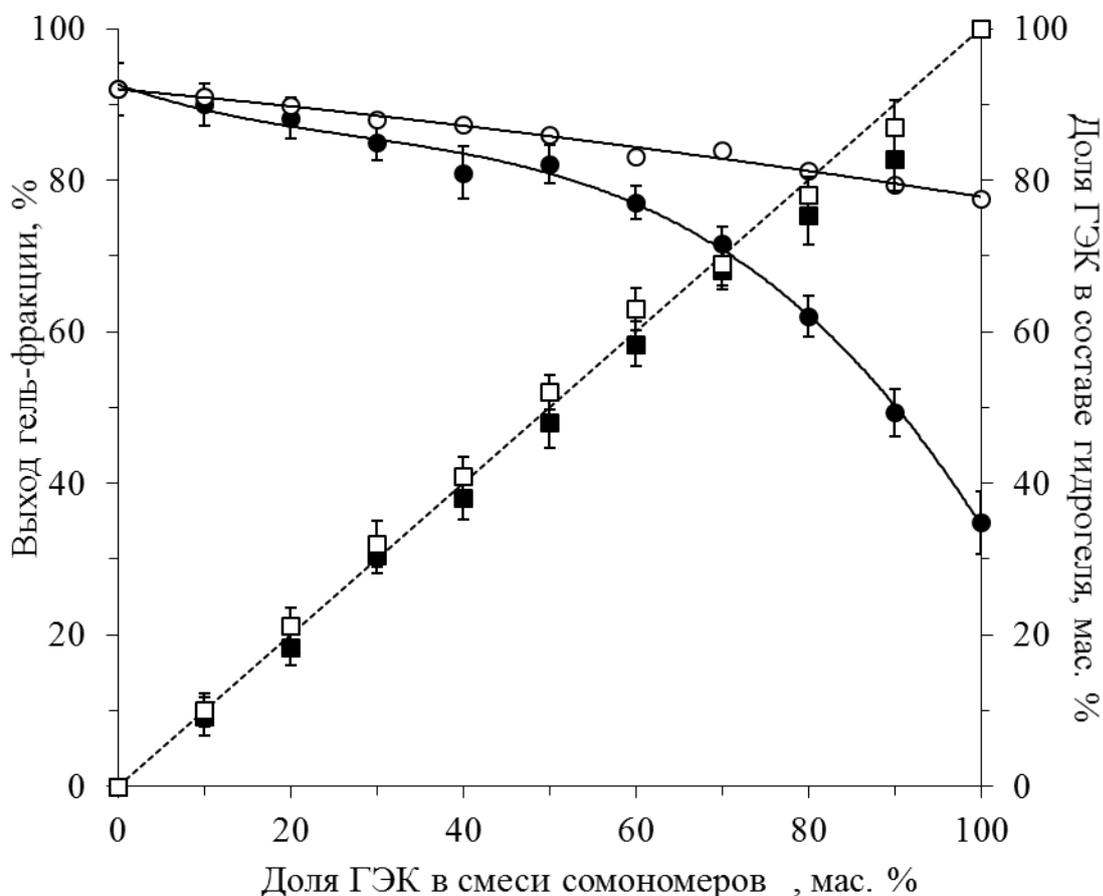


Рисунок 29 – Выход ((○),(●)) и состав образующихся полимерных гидрогелей ((□), (■)) при различном соотношении сомономеров.

Иницирующая система ПА-АК, концентрация инициатора 0,3 г/л, продолжительность реакции 20 минут, температура 20 °С. Степень замещения полимеров: ПВС – 4,76 мольн.%, ГЭК – 5,1 мольн.%.

Суммарная концентрация сомономеров в реакционной системе: (●), (■) – 7 г/100 мл., (○), (□) – 10 г/100 мл.

Говоря о влиянии на процесс гелеобразования соотношения макромеров в реакционной системе, стоит отметить, тот факт, что в целом протекание процессов гелеобразования в растворах модифицированного поливинилового спирта протекает более эффективно, чем в растворах модифицированного гидроксиэтилкрахмала (Рисунок 23 - Рисунок 27). В силу этого, увеличение

выхода сшитых полимерных гидрогелей с ростом относительной доли модифицированного поливинилового спирта является достаточно предсказуемым. Действительно как можно видеть выше (Рисунок 29), выход растет с ростом доли ПВС в смеси сомономеров, особенно ярко данный эффект наблюдается в области сравнительно низких концентраций реакционной системы, при которых эффективность сшивки в растворах ГЭК достаточно мала.

Изучение составов образующихся полимерных гидрогелей (Рисунок 28) 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.) близко к соотношению в исходной смеси сомономеров.

### 3.2.1.3 Оценка параметров структуры сетки полимерных гидрогелей

#### 3.2.1.3.1 Определение степени сшивания сетки по модулю упругости геля в состоянии его приготовления

Характер взаимодействия полимерного гидрогелевого материала с организмом, в частности, его проницаемость для различных веществ и клеток срок, биодegradации, и т.п., его физико-химические и механические свойства во многом определяются параметрами трехмерной полимерной сетки, которая образуется при формировании гидрогеля. В силу этого, изучение этих параметров представляет не только теоретический, но и практический интерес.

В связи с этим, проводилась оценка характера полимерной сетки гидрогелей, синтезированных на основе модифицированного поливинилового спирта [213]. (Исследования проводились совместно с Отделом полимеров и композиционных материалов ИХФ им. Н.Н. Семенова под руководством профессора, д.ф.-м.н., Дубровского С.А.)

Определение параметров структуры трехмерной сетки гидрогеля (степени полимеризации её межузловых цепей  $N$  и концентрации в ней межузловых цепей

$n_c$ ) нами проводилось с использованием подхода, основанного на предсказаниях теории упругости полимерных сеток [214], [215]. Исходными данными для расчета параметров стали результаты, полученные при измерении равновесного модуля упругости (модуля сдвига) синтезированных полимерных гидрогелей на основе ПВС в состоянии их приготовления. Последнее представляет собой состояние с некой весьма низкой концентрацией полимера в растворителе, то есть, иными словами с объемной долей полимера  $\phi_0 \gg 1$ . Согласно воззрениям современной теории [214], равновесный модуль сдвига в состоянии приготовления  $G_{\text{грп}}$  прямо пропорционален концентрации междуузловых, являющихся эластически активными, цепей сетки гидрогеля:

$$G_{\text{грп}} = ARTn_c\phi_0, \quad (3.2.1)$$

где  $R$  - универсальная газовая постоянная,  $T$  - абсолютная температура,  $n_c$  — концентрация эластически активных цепей в сухой сетке (измеряемая в моль/л).

Значение коэффициента  $A$  в уравнении (3.2.1) имеет значение от  $1 - 2/f_c$  (где  $f_c$  - функциональность узлов сетки) до 1, которое устанавливается фантомной [216] и аффинной [217] моделями строения сетки гидрогеля, то есть соответствует свободным и полностью подавленным флуктуациям узлов. Следует отметить, что столь же простое выражения для определения для  $G_{\text{грп}}$  получается и с позиций классической теории высокоэластичности [218]. В этом случае концентрация междуузловых цепей в сухой сетке  $n_c$  может быть определена на основании измеренных значений модуля упругости гидрогелей в состоянии приготовления  $G_{\text{грп}}$  по формуле:

$$n_c = \frac{G_{\text{грп}}}{RT\phi_{\text{грп}}}, \quad (3.2.2)$$

которая следует из соотношения (3.2.1) в том случае, если значение коэффициента  $A$  равно 1. В силу того, что данное значение коэффициента  $A$  представляет собой максимально теоретически возможное значение, вычисленные на основании формулы (3.2.2) значения величины  $n_c$  будут несколько занижены. К большому сожалению, устранение ошибки в определении значения величины  $n_c$ , проистекающая из-за неопределенности значения

коэффициента  $A$  не представляется возможным. В тоже время, в силу того, что в изученных нами гидрогелевых сетках узлы были образованы посредством радикальной полимеризации содержащихся в исходных полимерных групп с кратными связями, имеются все основания для того, чтобы сделать предположение о том, что данные узлы полимерной сетки обладают весьма высокой функциональностью ( $f_c \geq 10$ ), как это часто наблюдается в полимерных, полученных полимеризацией макромономеров [219]. В силу этого, можно предположить, что минимальное теоретически возможное значение коэффициента  $A$  (равное  $1 - 2/f_c$ ) будет близко к единице, а, стало быть ошибка при вычислении величины  $n_c$  не будет столь уж значительна.

Из величины  $n_c$ , делая предположение о том, что сетка гидрогеля является совершенной, то есть не содержит каких-либо структурных дефектов (циклов, висящих цепей), можно рассчитать среднюю степень полимеризации межузловых цепей  $N$ :

$$N = \frac{1}{n_c V_m}, \quad (3.2.3.)$$

где  $V_m$  - мольный объем звеньев в цепях сетки.

При этом в случае несовершенных сеток, содержащих структурные дефекты - циклы и/или висящие цепи, определяемое согласно этой формуле значение  $N$  дает завышенное значение длины цепей между узлами, и эта погрешность тем выше, чем больше концентрация дефектов [220].

Для получения экспериментальных значений величин  $n_c$  и  $N$  измеряли модули упругости в состоянии приготовления нескольких групп гидрогелей. Полученные по формуле (3.4.3) значения степени полимеризации межузловых цепей  $N$  сравнивались теоретическими, равными величине обратной степени замещения звеньев поливинилового спирта звеньями глицидилметакрилата. Полученные данные представлены ниже (Таблица 2)

Как можно видеть, экспериментальные значения степени полимеризации цепей значительно превышают значения, рассчитанные по степени замещения модифицированного полимера. 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 [221,222,223]. Стоит также отметить, что экспериментальные значения  $N$  явным образом зависят и от количества инициатора, присутствующего в реакционной системе и от концентрации модифицированного полимера в ней. Как можно видеть из приведенных данных, большим значениям количества инициатора соответствуют более низкие значения величины степени сшивания, а при увеличении концентрации макромера степень полимеризации цепей растет.

Таблица 2 - Характеристики степени сшивания исследованных полимерных гидрогелей

Концентрация макромера, г/100 мл	Степень замещения, мольн. %		Концентрация инициатора, г/л	$\rho \times 10^5$ , моль/см <sup>3</sup>	N	
					из $G_{\text{prep}}$	из степени замещения
5	4,2		2	1,48	1535	24
6	4,2		2	2,74	828	24
7	4,2		2	3,64	624	24
8	4,2		2	3,80	597	24
9	4,2		2	4,11	553	24
10	4,2		2	4,42	514	24
11	4,2		2	4,54	500	24
12	4,2		2	4,95	459	24
13	4,2		2	5,43	419	24
14	4,2		2	6,05	376	24
15	4,2		2	6,35	358	24
17	4,2		2	7,09	321	24
20	4,2		2	7,59	300	24
8	4,2		1	4,74	479	24
8	4,2		1,5	4,32	526	24
8	4,2		2	3,80	597	24
8	4,2		2,5	3,05	746	24
8	4,2		3	3,16	720	24
8	4,2		4	2,98	763	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
Концентрация макромера, г/100 мл	$T$ , °C	Степень замещения, мольн. %	Доза облучения, кГр			
8	0	4,2	1,08	65,42	35	24
8	20	4,2	1,08	125,61	18	24

Интересным является сравнение продемонстрированных выше данных с характеристиками гелей, которые были синтезированы при помощи радиационно-химического метода. Поскольку пробоподготовка для этих двух групп образцов заметно отличалась, это сравнение может иметь лишь оценочный характер, однако позволяет сделать ряд важных выводов. Как следует из данных приведенных в таблице (Таблица 2), плотность сшивки гелей, полученных воздействием жесткого излучения, более чем на порядок выше таковой у гелей полученных сшивкой в присутствии инициаторов радикальной полимеризации. Данный факт подтверждает сделанное нами в предыдущих разделах предположение об определяющем влиянии радиационной деструкции основных цепей молекул поливинилового спирта на формирование сетки образующихся гидрогелей.

Для определения влияния различных факторов, влияющих на протекание процесса сшивки, на характер сетки образующихся полимеров гидрогелей проводились синтезы при различных условиях, и изучались модули упругости гидрогелей в состоянии приготовления этих условий. Полученные зависимости представлены ниже.

Хотя, как это было показано в предыдущих разделах, образование сшитых гидрогелей имело место при концентрации реакционной системы в реакционной системе порядка 3-4 г/100 мл, образующиеся в этих условиях, характеризовались крайне низкой механической прочностью, в связи с чем определение их модуля упругости не представлялось возможным. Поэтому измерения проводились для образцов, которые были получены в интервале концентраций от 5 до 20 г/100 мл.

Как можно видеть, для исследованных образцов модуль упругости линейно возрастает с повышением концентрации системы (Рисунок 30). Аналогичная зависимость была получена и в работе [224] для полиакриламидных гидрогелей. Подобный вид зависимости связан с тем, что при низких концентрациях реакционной системы в образующейся сетке гидрогеля присутствует большое количество дефектов, таких как образующиеся при замыкании цепей друг на друге циклы и «висящие» двойные связи, которые обладают низкой способностью

к радикальной полимеризации из-за имеющихся пространственных затруднений. При увеличении концентрации системы количество дефектов уменьшается, что закономерно приводит к росту модуля упругости и степени сшивания (Таблица 30).

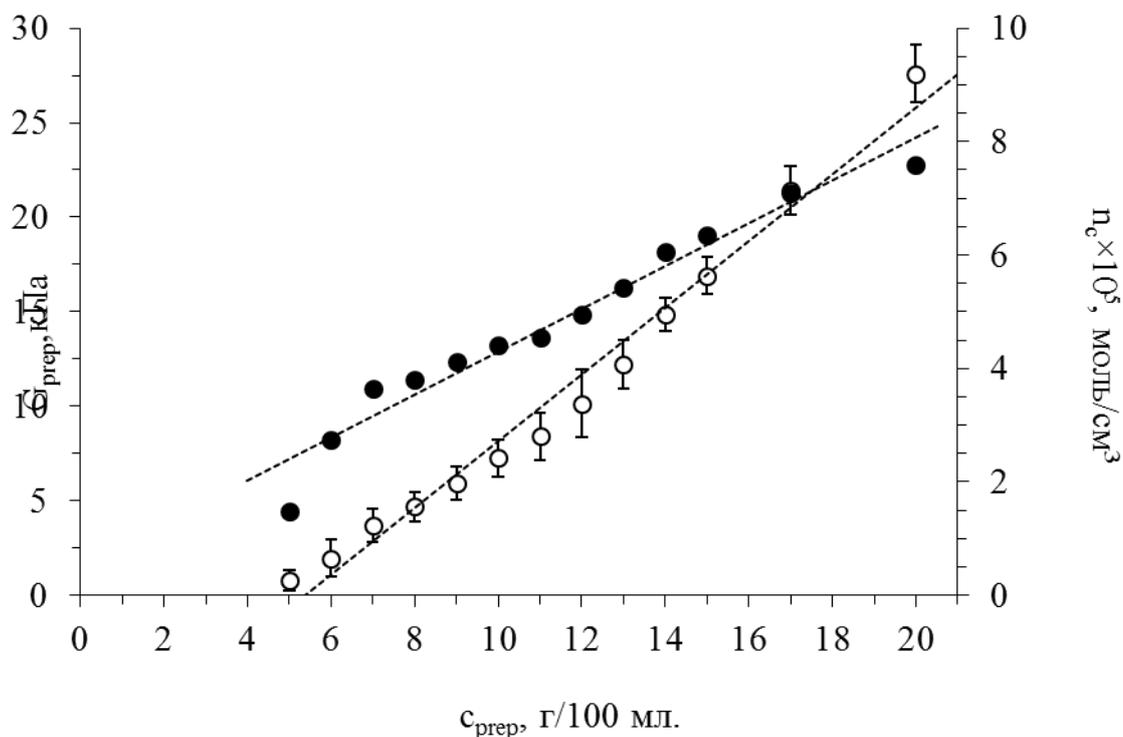


Рисунок 30 - Зависимость модуля упругости гидрогелей в состоянии приготовления (○) и концентрации межузловых цепей (●) от исходной концентрации макромера.

Степень замещения макромера 4,2 мольн.%, концентрация инициатора 2 г/л, продолжительность процесса 1 ч, температура 20 °С

Интерес представляет характер влияния на свойства формирующихся трехмерных полимерных сеток количества инициатора в реакционной смеси. Количество инициатора в системе влияет на функциональность узлов  $f_c$  сетки, что, в свою очередь, оказывает влияние на упругие свойства.

Влияние концентрации инициатора на функциональность узлов трехмерной полимерной сетки гидрогеля обусловлено тем фактом, что ее узлами являются полимерные цепи, которые растут при радикальной полимеризации звеньев

поливинилового спирта, содержащих двойные С-С связи. Как следствие число участков исходных полимерных цепей поливинилового спирта, которые соединяют один узел сетки с другим, или иными словами, функциональность узлов сетки  $f_c$  определяется степенью полимеризации этих новых (узловых) цепей  $N_j$ , последняя же во многом зависит от концентрации инициатора и замещенных групп.

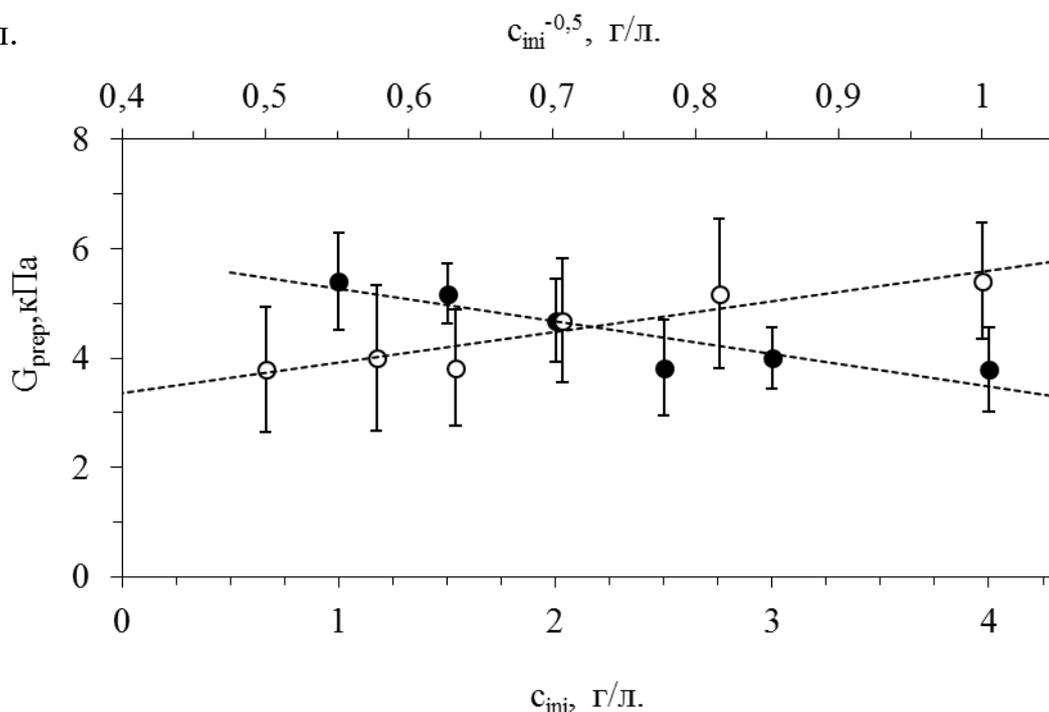


Рисунок 31 - Зависимость модуля упругости гидрогелей в состоянии приготовления от концентрации инициатора (●) и концентрации инициатора в степени минус 0,5 (○).

Согласно общепринятой теории радикальной полимеризации [225], значение степени полимеризации растущих цепей связана с концентрацией инициатора  $c_{\text{ini}}$  соотношением:

$$N_j \sim c_{\text{ini}}^{-0,5} \quad (3.2.4)$$

Функциональность узлов полимерной сетки  $f_c$  приблизительно пропорциональна степени полимеризации узловых цепей  $N_j$ , поэтому, следует ожидать, ее роста при увеличении параметра  $c_{\text{ini}}^{-0,5}$ . Одновременно должны сокращаться и флуктуации положения узлов сетки, а значит, должно расти значение модуля упругости геля, поскольку согласно фантомной модели

высокоэластичности [215,<sup>226</sup>] модуль упругости гидрогеля должен увеличиваться как

$$G \sim (1 - 2/fc) \quad (3.2.5)$$

На приведенных выше зависимостях (Рисунок 31) видно, что модуль упругости в состоянии приготовления несколько понижается по мере роста концентрации инициатора в реакционной системе. Данный факт может быть объяснен увеличением длины узловых цепей, то есть, их функциональности. Увеличение же значения концентрации инициатора в степени минус 0,5 монотонно возрастает, подтверждая тем самым сделанное на основании теории предположение о характере влияния количества инициатора на свойства образующейся полимерной сетки.

При рассмотрении степени замещения полимера, или иными словами количества реакционноспособных групп в составе полимера на параметры образующейся при сшивке сетки вполне очевидным является предположение о том, что ее, степени замещения, рост однозначно должен приводит к значимому увеличению модуля упругости гидрогелей, вследствие возрастания плотности сшивки полимерной сетки.

Таблица 3 - Влияние степени замещения на параметры гидрогелей.

Степень замещения мольн. %	$G_{\text{преп}}$ , кПа	N	
		из $G_{\text{преп}}$	из СЗ
2,5	4,5	621	40
4,2	4,7	616	24
8,6	5,2	576	12

Однако, как можно судить по данным, приведенным выше (Таблица 3), в интервале значений степеней замещения полимера работе (от 2,5 до 8,6 мольн.%) использованных в работе модуль упругости гидрогеля в стадии приготовления и его степень сшивания крайне незначительно зависят от степени замещения

модифицированного полимера. Значения  $N$ , рассчитанные на основании значения модуля упругости, заметно превышают теоретические, и практически не изменяются при переходе к более замещенным макромерам. Для идеальной же полимерной сетки переход от минимальной из использованных степеней замещения к максимальной должен вести к изменению значений плотности сшивки более чем в 3 раза. Отсутствие столь значимого изменения еще раз доказывает тот факт, что мы исследуемые полимерные системы представляют собой сильно дефектные сетки, и предположение о наличии прямой зависимости модуля упругости гидрогеля от степени замещения используемого при синтезе макромера в их отношении не может являться верным.

### 3.2.1.3.2 Характеристика термодинамического состояния системы «полимерный гидрогель – вода»

Одним из важнейших показателей, характеризующих систему «сшитый полимер – растворитель» является соотношение модуля упругости и степени набухания полимерного геля при его равновесном набухании. Данное соотношение позволяет судить о качестве растворителя в случае нейтрального геля и о наличии в окружающем растворителе подвижных ионов в случае гелей полиэлектролитных.

Теоретически для полимерных гидрогелей такого рода соотношения могут быть получены из условия равновесия их свободного набухания, которое может быть записано в следующем виде:

$$\pi_{\text{osm}} = -\pi_{\text{el}} \quad (3.2.6)$$

Предполагая, что упругое давление  $\pi_{\text{el}}$  прямо пропорционально модулю сдвига гидрогеля  $G$ , данное соотношение можно представить в степенной функции [220,219]

$$G = BQ^{-n} \quad (3.2.7)$$

Такая степенная зависимость имеет место для нейтральных гелей для использования скейлинговой теории полуразбавленных растворов полимеров

[227]. В случае же полиэлектролитных гелей в пределах низкой и высокой концентрации соли, данная зависимость справедлива, лишь в случае, если полимерной составляющей осмотического давления пренебрегают и учитывают только идеальную составляющую ионного давления. Присутствующий в выражении (3.2.7) показатель  $n$  в случае нейтрального геля зависит от качества растворителя и имеет значения  $9/4$ ,  $3$  и  $\infty$  для хорошего, и  $9$  - для плохого растворителя, соответственно. Для полиэлектролитных гелей этот показатель равен  $1$  при низкой концентрации ионов в растворе и  $2$  - при высокой, коэффициент  $B$  зависит от концентрации ионов (при высокой концентрации) и доли заряженных звеньев в полимерной сетке гидрогеля.

Соотношения вида (3.2.7) в явном виде не содержат концентрацию при приготовлении сетки и длину ее цепей, что позволяет исключить из рассмотрения эффекты связанные с несовершенством сетки, и очень удобны при сравнении с экспериментом.

Прежде чем перейти к обсуждению полученных экспериментальных данных, следует отметить, что при равновесном набухании геля модуль сдвига является характеристикой его осмотического давления. Как видно из условия равновесного набухания (3.2.6), величины  $\pi_{osm}$  и  $G$  совпадают лишь при условии, что упругое давление  $\pi_{el}$ , по абсолютной величине равно модулю сдвига  $G$ . Таким образом, при равновесном набухании корреляция между  $G$  и  $Q$ , фактически, является зависимостью осмотического давления геля от его равновесной степени набухания.

Экспериментальные корреляции между модулем упругости  $G$  и объемной долей полимера в гидрогеле  $\phi$  ( $\phi = 1/Q$ ) для двух серий образцов, которые были получены из одного и того же макромера в присутствии одинаковой иницирующей системы, но имели разный исходный размер можно видеть ниже (Рисунок 32). Данные представлены в логарифмических координатах и аппроксимированы степенными функциями (сплошные прямые линии). Показатели данных функций  $n$ , представляющие собой углы наклона прямых, имеют значения  $1,4 \pm 0,3$  для «больших» (исходный диаметр образца 37 мм) и  $1,2$

$\pm 0,2$  для «малых» (исходный диаметр образца 17 мм) образцов, соответственно. Вопреки довольно большой погрешности определения значений  $n$ , не вызывает никакого сомнения, что вычисленные значения данного показателя заметно ниже ожидаемого для  $\theta$ -условий ( $n=3$ ). Более того, они ниже даже показателя, который предсказывается теорией для нейтрального полимера, находящегося хорошем растворителе ( $n=2,25$ ). Определённые экспериментально значения свидетельствуют о том, что полимерная сетка исследованных образцов гидрогелей несет заряд, то есть, де-факто, представляют собой полиэлектролиты. Тот факт, что эти значения превышают значение показателя  $n$ , которое соответствует состоянию, при котором в растворе отсутствуют подвижные ионы ( $n=1$ ), может объясняться наличием в осмотическом давлении геля наряду с ионным вкладом  $\pi_{\text{ion}}$  также и полимерного вклада  $\pi_{\text{pol}}$ .

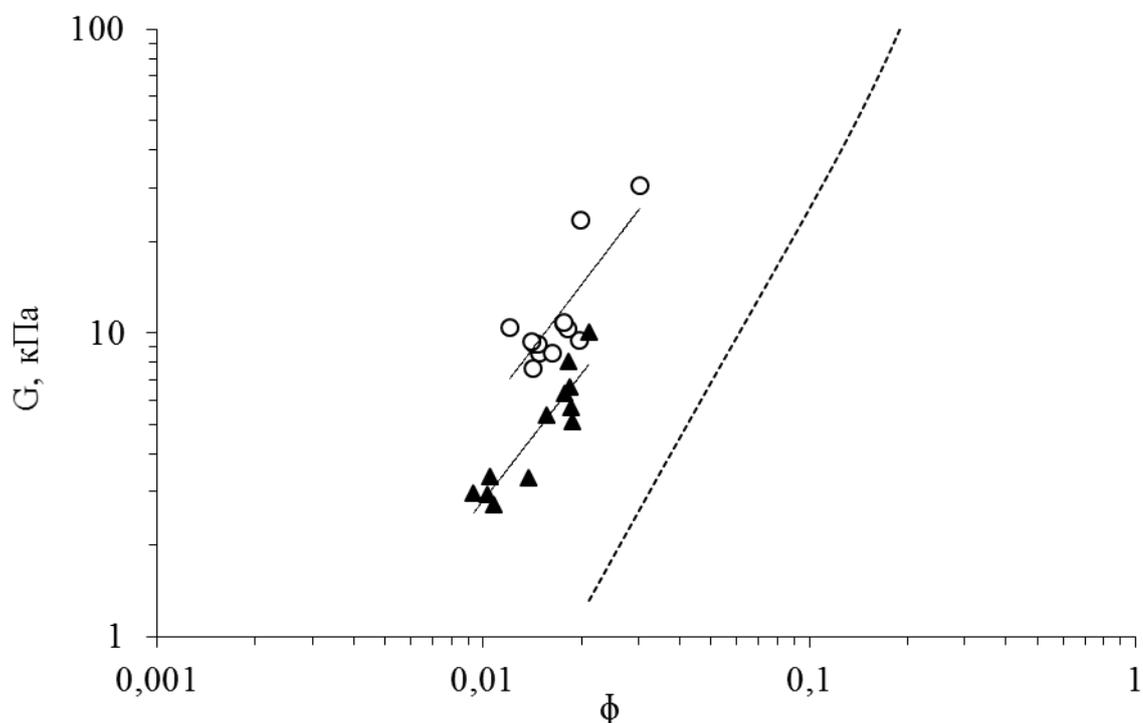


Рисунок 32 - Зависимость модуля упругости от равновесной степени набухания. (●)-«большие» образцы, (▲)- «малые» образцы, (-) – данные работы [228]

Полученные экспериментальные данные на рисунке сопоставлены с концентрационной зависимостью осмотического давления для гидрогелей ПВС, сшитых глутаровым альдегидом, которая построена на основании данных, приведенных в работе [228]. Как можно видеть, осмотическое давление в

синтезированных нами гидрогелях (характеризуемое модулем сдвига  $G$ ) значительно выше, чем в гидрогелях, изученных в вышеупомянутой работе [228]. Данный факт хорошо согласуется со сделанным ранее выводом о наличии зарядов в сетке изучаемых гидрогелей и может быть объяснен присутствием дополнительного - ионного вклада в осмотическое давление полимерного гидрогеля.

Из приведенных зависимостей (Рисунок 32) следует также, что осмотическое давление, а стало быть, и количество ионизированных групп, присутствующих в сетке, в образцах большего размера примерно в два раза больше, чем в аналогичных образцах меньшего размера. Данный факт, по-видимому, может быть объяснен тем, что «большие» образцы находились в среде растворителя до достижения состояния равновесного набухания на протяжении примерно 4-5 недель, тогда как в случае «малых» образцов процесс их набухания занимал 7-8 днями. На основании этого наблюдения можно сделать предположение о том, что на степень ионизации сетки оказывает влияние гидролиз сложноэфирных групп, имеющих в составе гидрогелей, который в случае «больших» образцов имеет возможность протекать на протяжении более продолжительного периода времени.

Стоит также отметить, что осмотические давления в работе [228] были определены в том же самом приближении ( $-\pi_{el} = G$ ), что результаты полученные нами. С целью подтверждения предположения о полиэлектролитной природе полученных в рамках данной работы гидрогелей на основе поливинилового спирта нами были их изучено набухания в растворах электролитов, а именно, в растворах хлорида натрия в пределах концентраций от  $10^{-4}$  до 1 моль/л. Для исследования использовали образцы одного и того же исходного размера («малые» образцы), для которых после их набухания в 0,1 М NaCl определяли модуль упругости.

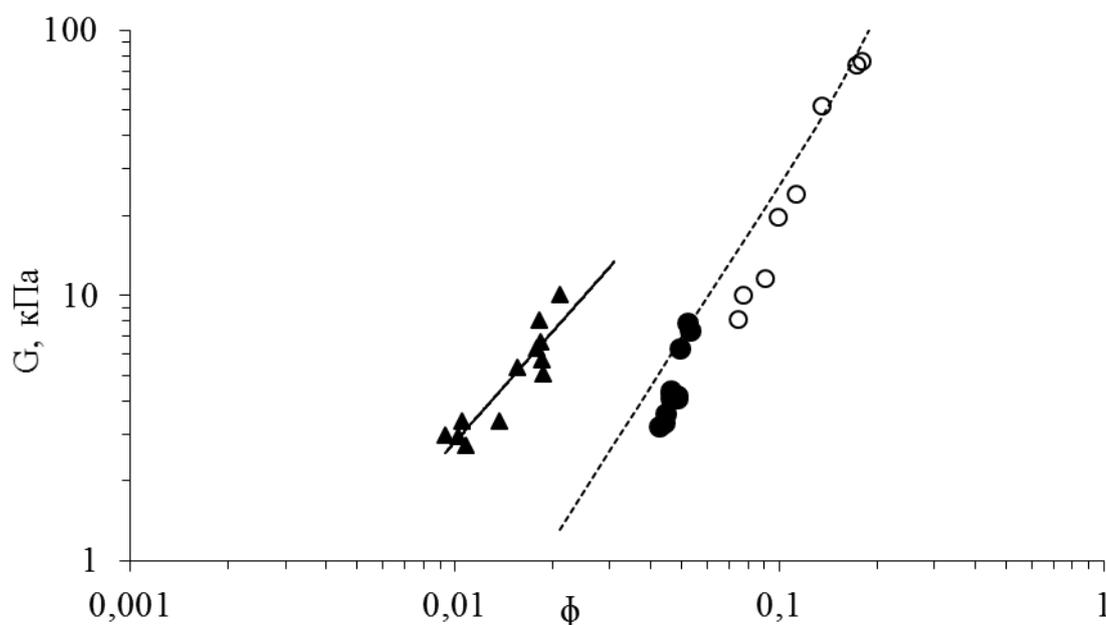


Рисунок 33 - Зависимость модуля упругости от равновесной степени набухания.

(▲) – образцы гидрогелей, набухавшие в воде, (●) – образцы гидрогелей, набухавшие в 0,1 М водном растворе NaCl (-) – данные работы [228] для гелей ПВС, полученных сшивкой глутаровым альдегидом, при набухании в воде, (○) – данные работы [229] для гелей ПВС, полученных сшивкой макромера, при набухании в фосфатно-буферном солевом растворе PBS.

Как можно видеть (Рисунок 33), при появлении в растворе ионов соли осмотическое давление уменьшается. Соответственно, понижается вместе с ним и степень набухания геля, стало быть, происходит рост объемной доля полимера  $\phi$ . В рамках теории полиэлектролитных гелей наблюдаемые явления могут быть объяснены снижением величины ионной составляющей осмотического давления. Существенно, что зафиксированное изменение  $\pi_{\text{osm}}$  не обусловлено высаливанием нейтрального полимера, поскольку данный эффект наблюдается в системе «ПВС - раствор NaCl» при более высоких концентрациях хлорида натрия (выше 1 моль/л) [222]. Также на рисунке (Рисунок 33) приведены данные работы [228] полученные для гидрогелей ПВС, полученных, посредством сшивки глутаровым

альдегидом, которые, ведущих себя при набухании в воде, как уже отмечалось ранее, как типичные нейтральные гелям. Как можно видеть, осмотическое давление в исследуемых гелях на основе модифицированного поливинилового спирта, набухавших в 0,1 М растворе NaCl, достаточно близко к осмотическому давлению гелей на основе ПВС, полученных посредством сшивки глутаровым альдегидом, набухших в чистой воде. На основании этого, можно сделать вывод о том, что ионное давление  $\pi_{\text{ion}}$  в исследуемых гелях при указанной концентрации соли стремится к нулю.

Выявленные нами данные также были сопоставлены с данными работы [229], в которой исследовались гели, также полученные радикальной полимеризацией макромеров на основе поливинилового спирта (Рисунок 33). В данной работе полимерные гидрогели достигали равновесного набухания в фосфатно-солевом буферном растворе PBS, ионная сила которого составляла порядка 0,15 М. Можно видеть, что полученные нами в эксперименте данные для гелей в 0,1 М NaCl неплохо согласуются с данными приведенными в работе [229]. Это может свидетельствовать о достаточной надежности обеих групп данных. Обе группы данных аппроксимируются степенной функцией (3.4.7) с показателем  $n$ , близким к 3, что соответствует нейтральному полимеру в  $\theta$ -растворителе.

Немаловажным является тот факт, что в другой своей работе авторы [230] провели исследование упругости гелей, полученных на основе ненасыщенных производных ПВС, после их равновесного набухания в воде. Анализ этих данных (таблица 1 в работе [230]) приводит к показателю зависимости модуля упругости от равновесной степени набухания, соответствующему, как и в случае гидрогелей, полученных в настоящей работе, не нейтральной, а имеющей заряды ( $n = 1,5 \pm 0,2$ ). Данный факт позволяет сделать предположение о том, что наличие ионогенных групп в сетке исследуемых гидрогелей на основе ПВС связано со спецификой процессов, протекающих при полимеризации макромеров на основе ненасыщенных производных этого полимера.

Помимо изучения зависимости модуля упругости от степени равновесного набухания полимерных гидрогелей нам представлялось целесообразным также

провести анализ зависимости степени набухания гидрогеля от степени сшивания его сетки, что позволило бы получить дополнительные свидетельства поли электролитного характера синтезированных полимерных гидрогелей.

В рамках того же приближении, что использовано нами при выводе соотношения (3.2.7), может быть получено весьма простое теоретическое выражение, связывающее зависимость равновесной степени набухания полимерного геля  $Q$  и степени полимеризации межузловых цепей его сетки  $N$

$$Q = (AN/B)^{1/(n-m)} \quad 3.2.8$$

В этом выражении  $A$  и  $B$  являются константами, а  $n$  и  $m$  - показателями степени, входящими в выражения для осмотической и упругой составляющих осмотического давления геля, заданные в виде  $\pi_{osm} = A\varphi^n$  и  $\pi_{el} = (B/N)\varphi^m$ . Соответственно, показатель  $n$  принимает те же значения, что и в выражении (3.4.7), а показатель  $m$  имеет значение равное  $1/3$ . Возможные значения показателя  $1/(n - m)$  в соотношении (3.2.8) для различных систем «гель – растворитель» представлены ниже (Таблица 4).

Таблица 4 - Показатели степени в уравнении (3.2.8)

Система	$n$	$1/(n - m)$
Полиэлектролит в бессолевоом растворителе	1	1,43
Полиэлектролит при большой концентрации соли	2	0,58
Нейтральный полимер – хороший растворитель	2,25	0,51
Нейтральный полимер – $\theta$ -растворитель	3	0,37
Нейтральный полимер – плохой растворитель	$\infty$	0

Поскольку поливиниловый спирт в воде ведет себя как нейтральный полимер в хорошем, либо  $\theta$ -растворителе, можно было ожидать, что показатель в степенной зависимости  $Q(N)$  должен был находиться в интервале от 0,37 до 0,51. Однако полученные экспериментальные данные, представленные в логарифмических координатах (Рисунок 34), показывают, что данное предположение не является истинным. Наклон прямой линии, проведенной с

использованием метода наименьших квадратов через точки, которые соответствуют набуханию гелей в воде, составляет  $0,9 \pm 0,1$ , что косвенно свидетельствует о наличии зарядов на полимерной сетке. Для проверки этого предположения была построена аналогичная зависимость в растворе NaCl (0,1M). В этом случае определяемый показатель находился в области  $\theta$ -растворителя для нейтральных полимеров. Иными словами, исследованные гидрогели на основе ПВС демонстрируют поведение характерное для полиэлектролитов в бессолевом растворе. Тот факт, что наблюдаемый показатель степени в уравнении (3.4.8) ниже, предсказываемого для системы «полиэлектролит в бессолевом растворителе» ( $1/(n-m)=1,43$ , Таблица 4), может объясняться тем, что помимо вклада ионного давления  $\pi_{\text{ion}}$  в осмотическое давление свой вклад вносит и полимерная составляющая  $\pi_{\text{pol}}$ .

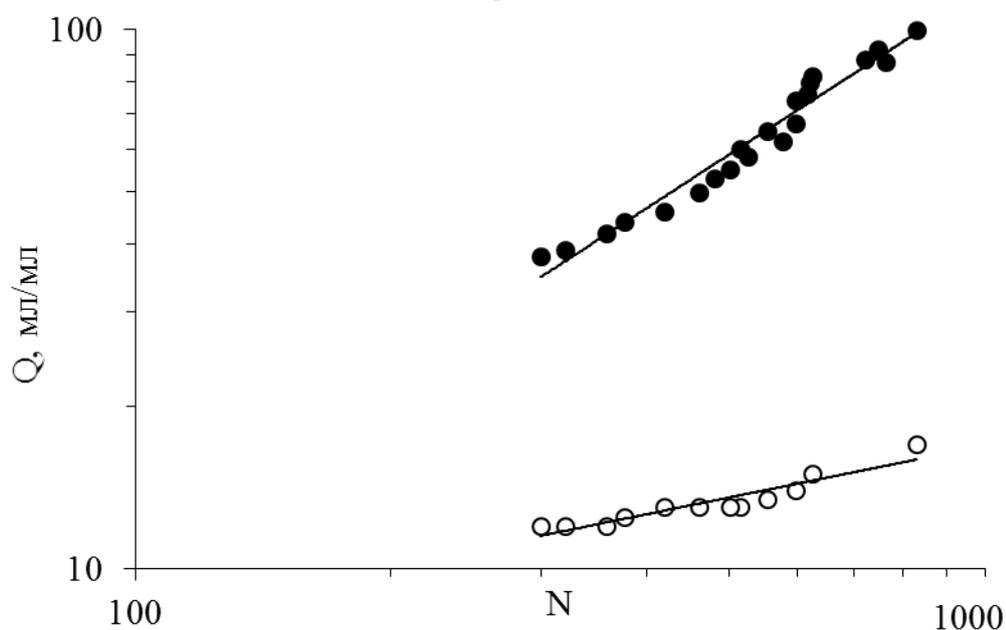


Рисунок 34 - Зависимость степени набухания полимерных гидрогелей в воде (●) и растворе 0,1 М водном растворе NaCl (○) от степени сшивания гидрогелей.

С целью более детального изучения необычного поведения осмотического давления и степени набухания синтезированных гидрогелей ПВС также было исследовано их набухание в растворах различных электролитов.

Характер влияния добавок низкомолекулярных электролитов на степень набухания полимерных гидрогелей на основе поливинилового спирта был изучен

ранее рядом исследователей [222,231]. Однако в этих работах основное внимание уделялось эффектам «всаливания» и «высаливания» незаряженного полимера, проявляющихся при высоких концентрациях электролита (~1 моль/л и выше) и являющихся ионспецифичными, то есть зависящих от природы электролита.

Также в работе [231] изучалось набухание гидрогелей ПВС в водных растворах KCl, KOH и HCl с концентрациями до 4,5 моль/л. Из приведенных в работе данных следует, что поливиниловый спирт, сшитый эпихлоргидрином, по-разному набухает в растворах различных электролитов (иными словами, взаимодействие полимера с растворенным электролитом определяется природой электролита.). При этом увеличение концентрации электролита в растворе в случае хлорида калия ведет к снижению степени набухания гидрогеля Q; в случае KOH - немонотонному изменению – росту, а затем понижению Q; в случае кислоты - повышению Q. Изменение степени набухания на 10 % наблюдалось при концентрации электролита порядка 1 моль/л для случая соли и щелочи, и порядка 1,5 моль/л для кислоты.

В работе [222] изучалось влияние добавок NaCl и ряда других солей (LiCl, KF, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>) на равновесное набухание гидрогелей ПВС, полученных радиационной сшивкой водного раствора. Для таких гидрогелей эффект также зависел от природы ионов, введенных в растворитель (вода). Для хлорида натрия влияние электролита становилось заметным при его концентрации около 1 моль/л. При дальнейшем повышении концентрации (до 4 моль/л) степень набухания резко снижалась.

В отличие от вышеупомянутых работ [222,231], проведенные нами исследования были сосредоточены на поиске универсальных эффектов оказываемых низкомолекулярными электролитами, не зависящих от химического строения электролита, а определяемых лишь концентрацией и зарядом ионов. Сообразно теории набухания, именно такие эффекты должны иметь место для полиэлектролитных гелей. При этом мы сознательно ограничились областью достаточно малых концентраций электролита (до 1 моль/л), при которой ионспецифические эффекты электролитов почти не проявляются. В качестве

электролитов использовались такие дислоцирующие на одновалентные ионы соединения как NaCl, HCl и NaOH.

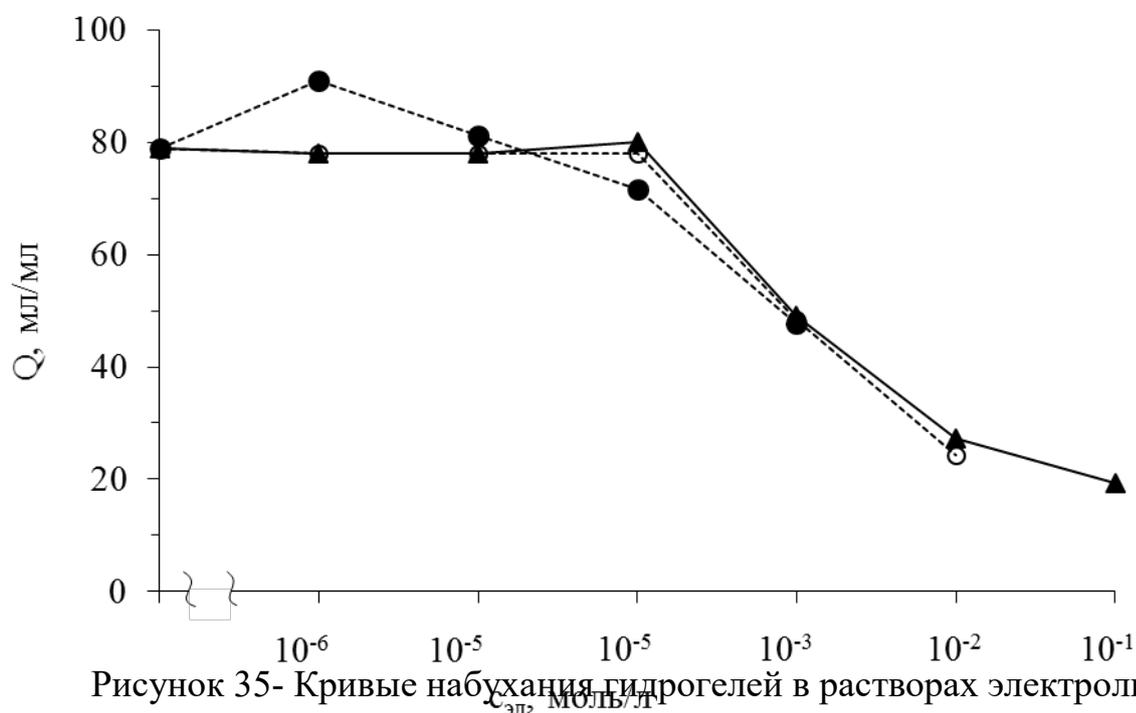


Рисунок 35- Кривые набухания гидрогелей в растворах электролитов.

(●) – NaOH, (○) – HCl, (▲) – NaCl

На представленных выше (Рисунок 35) зависимостях видно, что все использованные электролиты одинаково (универсально) влияли на набухание гидрогеля. Значение степени набухания понижалось с ростом концентрации электролита и выходило на постоянный уровень при его концентрации порядка  $10^{-2}$  моль/л. Наиболее заметное изменение наблюдалось в интервале концентраций от  $10^{-4}$  до  $10^{-2}$  моль/л. Такой характер влияния, присущий для полиэлектролитным гидрогелям, свидетельствует о наличии в сетке исследуемых гидрогелей зарядов. Для подобных систем понижение степени набухания обуславливается снижением доли ионной составляющей  $\pi_{ион}$  осмотического давления, а выход на постоянный уровень - тем, что эта часть осмотического давления становится близкой к нулю и осмотическое давление определяется своей полимерной составляющей  $\pi_{пол}$ , которая весьма слабо зависит от концентрации ионов в широкой области концентраций. Существенно, что влияние HCl на набухание исследованных нами гидрогелей ПВС диаметрально

противоположно описанному в работе [231] для гелей ПВС, сшитых эпихлоргидрином. Это еще раз свидетельствует о том, что об ином (не ионспецифическом) механизме взаимодействия ионов и полимера и подтверждает предположение о том, что изучаемые нами полимерные гидрогели являются полиэлектролитами.

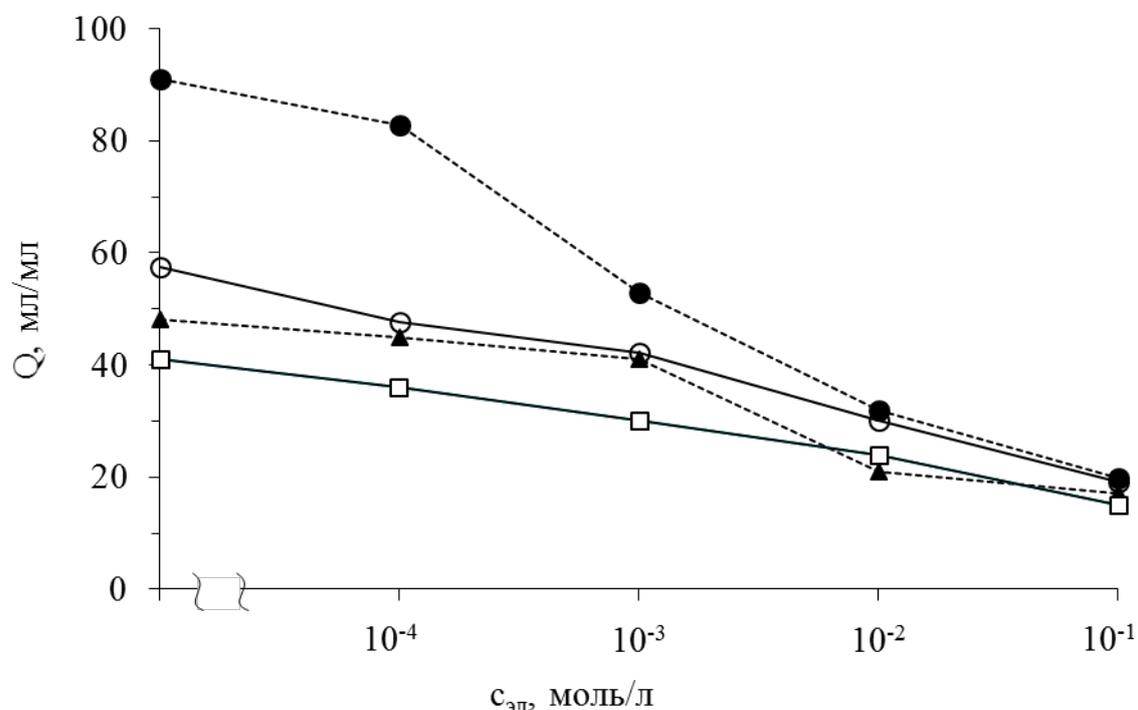


Рисунок 36 - Зависимость степени набухания полимерных гидрогелей, полученных в различных условиях, от концентрации хлорида натрия в растворе. (●) иницирующая система «ПСК-ТМЭД», молекулярная масса модифицированного полимера 14400, (○) иницирующая система «перекись водорода – аскорбиновая кислота», молекулярная масса модифицированного полимера 14400, (▲) - инициатор– ПСК», молекулярная масса модифицированного полимера 14400, (□) иницирующая система «ПСК-ТМЭД», молекулярная масса модифицированного полимера 40000

Данный вывод подтверждается результатами, представленными на рисунке, приведенном выше. Как можно видеть (Рисунок 36), характер влияния концентрации NaCl в растворе на степень набухания гидрогелей не изменяется ни при вариации типа иницирующей системы, используемой при получении

гидрогеля, ни при изменении молекулярной массы исходного поливинилового спирта. Степень набухания заметно снижается при увеличении концентрации NaCl до  $0,01 \div 0,1$  моль/л и слабо изменяется при последующем росте концентрации хлорида натрия.

Тот факт, что основная часть изменения степени набухания гидрогеля имеет место при достаточно низких концентрациях электролита (до  $0,01 \div 0,1$  моль/л) в растворе, говорит о доннановском, а не ионспецифичном механизме снижения осмотического давления геля, а практически полное отсутствие изменения степени набухания гидрогеля при увеличении концентрации NaCl от 0,1 до 1 моль/л может свидетельствовать, что в данной области концентраций электролита ионное давление близко к нулю, а следовательно степень набухания определяется полимерной составляющей осмотического давления, то есть, иными словами, гель ведет себя как незаряженный.

Параметр взаимодействия Флори-Хаггинса  $\chi$  является исключительно важной характеристикой термодинамического состояния системы «(нейтральный) полимер –растворитель». Практический интерес к этому показателю вызван тем, что на основании экспериментальных данных о набухании гидрогелей в состоянии равновесия с его помощью можно оценить степень сшивания сетки.

Для оценки параметра  $\chi$  мы использовали известное теоретическое соотношение, проистекающее из равенства абсолютной величины упругого давления  $\pi_{el}$  и модуля сдвига  $G$ , условия равновесного набухания Флори-Ренера и уравнения Флори-Хаггинса для осмотического давления геля. Данное соотношение имеет вид:

$$\chi = - [G/(RT/V_1) + \ln(1-\phi) + \phi]/\phi^2, \quad (3.2.9)$$

где объемная доля полимера в геле  $\phi$  определяется из равновесной степени набухания гидрогеля  $Q$  по формуле  $\phi = 1/Q$ .

Нами были проведены расчеты параметра Флори-Хаггинса для гидрогелей, которые набухали в воде и в водном растворе NaCl с концентрацией 0,1 моль/л. Полученные результаты представлены в таблице ниже (Таблица 5) . В качестве

сравнения в таблице также приводятся значения  $\chi$ , определенные в том же самом приближении в работе [228].

Таблица 5 - Параметр Флори-Хаггинса  $\chi$  и степень ионизации сетки ПВС, рассчитанные из модуля упругости и степени набухания при равновесии

Образец		$\chi$				Степень ионизации
		вода		0.1 М NaCl		
			Данные [228]		Данные [228]	
1	«большой» образец	0,16	0,48	–	–	0,8
2	«большой» образец	0,20	0,48	–	–	1,1
3	«большой» образец	0,22	0,48	–	–	0,8
4	«малый» образец	0,39	0,48	0,506	0,498	0,4
5	«малый» образец	0,30	0,48	0,501	0,494	0,4
6	«малый» образец	0,37	0,49	0,497	0,500	0,5
7*	«малый» образец	0,33	0,49	0,506	0,505	0,9

\* Для получения образца использовалась другая марка полимера.

Как следует из приведенных данных (Таблица 5) для гелей, помещенных для набухания в воду, параметр  $\chi$  имеет весьма низкие значения, не согласующиеся ни с литературными данными для гелей на основе ПВС [228], ни с данными для растворов этого полимера [232, 233]. В случае же гелей, набухавших в 0,1 М растворе NaCl, рассчитанные значения  $\chi$ , напротив, вполне неплохо согласуются с данными работы [228]. С учетом предположения о наличии заряда в исследуемых нами гелях, это вполне ожидаемо. Строго говоря, применение к полиэлектролитным гелям в бессолевом растворителе (воде) теории набухания нейтральных гелей и не могло привести к достоверным результатам. Однако же, использование этой теории для описания заряженных гелей, находящихся в состоянии равновесного набухания в достаточно концентрированных солевых растворах, в которых такие гели ведут себя подобно нейтральным, вполне обоснованно.

Степень ионизации полимерной сетки гидрогеля может быть определена в рамках теории Доннана, на основании данных о его равновесном набухании в бессолевом растворителе. Выражение для вычисления доли ионизованных звеньев шитой полимерной сетки  $i$  может быть получено из равенства абсолютной величины упругого давления  $\pi_{el}$  и модуля сдвига  $G$ , условия равновесного набухания, а также соотношения для ионной части осмотического давления в бессолевом растворителе ( $\pi_{ion} = (RT/V_m)i\phi$ ). Это выражение имеет вид:

$$i \approx (G - \pi_{pol}) / [(RT/V_m)\phi], \quad (3.2.10)$$

где полимерная часть осмотического давления геля  $\pi_{pol}$  задается уравнением Флори-Хаггинса при  $\chi = 0,504$  (см. раздел 3.2.1.3.3 Определение степени сшивания сетки по равновесному набуханию).

Для полиэлектролитного геля, сильно набухающего в воде, равенство, лежащее в основе выражения (3.2.10), выполняется только приближено, поскольку из-за сильного растяжения цепей сетки и изменения их гибкости изменение концентрации полимера и соли приводит к тому, что отношение  $|\pi_{el}|/G$  становится меньше единицы. Из-за этого уравнение (3.2.10) несколько переоценивает долю ионизированных звеньев сетки.

Полученные в результате проведенных расчетов значения степеней ионизации сетки приведены выше (Таблица 5). Можно видеть, в изучаемых гидрогелях поливинилового спирта ионизованными являются от 0,4 до 1,1 % звеньев сетки, то есть сетка заряжена достаточно слабо. Значение степени ионизации у «больших» образцов полимерных гидрогелей гелей (образцы 1-3, продолжительность набухания 4-5 недель) больше, чем у «малых» образцов (образцы 4-6, продолжительность набухания 7-8 дней). Данный факт может быть объяснен тем, что в количество ионизованных звеньев сетки гидрогеля увеличивается в процессе его набухания; оно тем больше, чем больше время нахождения геля в среде растворителя. Образцы группы № 7, представляют собой исключение – величина их степени ионизации заметно выше, чем у других «малых» образцов, хотя продолжительность набухания аналогична. Это,

вероятно, связано с тем, что для получения данного образца использовалась другая марка исходного ПВС, имеющая меньшую степень омыления.

В завершение обсуждения величины степени ионизации полимерной сетки синтезированных гидрогелей, стоит указать на тот факт, что определенная нами степень ионизации отвечает только лишь осмотически активным противоионам, в силу этого реальное значение степени ионизации может быть больше.

### 3.2.1.3.3 Определение степени сшивания сетки гидрогеля по его равновесному набуханию

В предыдущем разделе было рассмотрено состояние равновесного набухания синтезированных полимерных гидрогелей и сделан вывод о их полиэлектролитной природе. В связи с этим, попытка расчета степени сшивания таких гидрогелей на основании данных об их степени набухания в воде с позиций теории набухания нейтральных гелей, очевидно, должна приводить к заведомо неадекватным результатам. В случае же использования при расчете данных о степени набухания в 0,1 М растворе NaCl теория набухания нейтральных гелей должна приводить к значениям, которые должны согласовываться с величинами, полученными из модуля упругости гидрогелей в состоянии их приготовления.

Выражение, использованное для проведения расчетов, как и ранее, было получено на основании постулата Флори-Ренера подстановкой эту формулу соотношений для осмотического (в рассматриваемом случае исключительно полимерного,  $\pi_{\text{пол}} = -(RT/V_1)[\ln(1 - \varphi) + \varphi + \chi\varphi^2]$ ) и упругого ( $\pi_{\text{el}} = -RTn_c\varphi[(\varphi_0/\varphi)^{2/3} - 2/f_c]$ ) давления:

$$N = -\frac{V_1}{V_m} \frac{\varphi_{\text{гел}}^{2/3} \varphi^{1/3}}{[\ln(1 - \varphi) + \varphi + \chi\varphi^2]}, \quad (3.2.11)$$

где объемная доля полимера в гидрогеле геле  $\varphi$  вычисляется из равновесной степени набухания геля  $Q$  по формуле  $\varphi = 1/Q$ .

При расчетах  $N$  на основании экспериментальных данных о равновесном набухании гидрогелей в воде использовали значение  $\chi$ , приведенное в

литературных источниках ( $\chi=0.49$  [232,233]). Полученные результаты представлены в таблице приведенной ниже (Таблица 6).

Из демонстрируемых данных (Таблица 6) следует, что значения  $N$ , полученные на основании данных об равновесном набухании в воде при  $\chi=0,49$ , заметно превышают значения полученные на основании данных об модуле упругости. Иными словами, результаты расчетов степени сшивания, основанных на данных об равновесной набухаемости гидрогелей в воде, с использованием величины  $\chi$ , соответствующей литературным данным для системы «ПВС – вода», являются ошибочными.

Таблица 6 - Сравнение степеней полимеризации межузловых цепей, рассчитанных из модуля упругости в состоянии приготовления геля и равновесной степени набухания в воде

Концентрация макромера, г/100 мл	Степень замещения, мольн. %	Концентрация инициатора, г/л	N		
			из $G_{\text{преп}}$	из Q	
				$\chi=0,49$	$\chi=0,405$
5	4,2	2	1535	15784	1931
6	4,2	2	828	6275	852
7	4,2	2	624	5403	769
8	4,2	2	597	5019	734
9	4,2	2	553	4313	654
10	4,2	2	514	3985	619
11	4,2	2	500	3614	577
12	4,2	2	459	3180	524
13	4,2	2	419	2842	482
14	4,2	2	376	2746	473
15	4,2	2	358	2625	460
17	4,2	2	321	2438	440
20	4,2	2	300	2611	476
8	4,2	1	479	2427	392
8	4,2	1,5	526	3018	474
8	4,2	2	597	4117	619
8	4,2	2,5	746	7777	1076
8	4,2	3	720	7187	1005
8	4,2	4	763	7044	988
8	2,5	2	621	5842	837
8	4,2	2	616	5403	784
8	8,6	2	576	3683	566

В силу этого, нами был изучен вопрос о том, какое численное значение параметра  $\chi$  обеспечивает согласие между величинами  $N$ , определяемыми

разными методами. Было выявлено, что наилучшее (в среднем) совпадение достигается при значении  $\chi$  равном 0,405. Как можно видеть, данное значение заметно отличается от величины параметра взаимодействия для поливинилового спирта в воде, приведенной в литературных источниках.

Результаты расчетов  $N$  с использованием степени набухания хорошо согласуются с представлением о том, что синтезированные полимерные гидрогели являются полиэлектролитами. Расчеты же степени полимеризации межузловых сшивок проводились в рамках теории набухания нейтральных гелей и, естественно, как это и указывалось в начале данного раздела, не могут быть корректными.

Таблица 7 - Сравнение степеней полимеризации межузловых цепей, рассчитанных из модуля упругости и степени набухания в 0,1 М NaCl

Концентрация макромера, г/100 мл	Степень замещения, мольн. %	Концентрация инициатора, г/л	N		
			из $G_{\text{преп}}$	из Q	
				$\chi=0,49$	$\chi=0,504$
6	4,2	2	828	452	1220
8	4,2	2	597	302	620
10	4,2	2	514	249	461
12	4,2	2	459	270	489
14	4,2	2	376	141	218

В тоже время, как это и отмечалось ранее, полиэлектролитные эффекты в набухании исследуемых нами гелей ПВС практически исчезают в случае набухания в 0,1 М растворе хлорида натрия. В этих условиях гидрогели ведут себя подобно нейтральным, и выражение (3.2.11) должно быть вполне применимо для расчета средней степени полимеризации цепи между сшивками. Результаты расчета с использованием этого выражения для случая набухания гелей в 0,1 моль/л NaCl приведены в таблице представленной выше (Таблица 7). Как можно видеть из приведенных в ней данных, в этом случае значения  $N$ , вычисленные с использованием значения параметра  $\chi$ , соответствующего литературным данным ( $\chi = 0.49$ ), ожидаемо вполне сопоставимы с величинами степеней полимеризации,

найденными из модуля упругости, а подходящий параметр взаимодействия  $\chi = 0,504$  весьма близок к литературному.

### 3.2.2 Изучение процесса синтеза сшитых гидрогелей на основе модифицированного поливинилового спирта в криоусловиях

#### 3.2.2.1 Исследование закономерностей гелеобразования в криоусловиях

Макро- и суперпористыми полимерными гидрогелями принято называть гидрогелевые системы, которые обладают «истинной» (поры имеют размер в десятки и сотни микрометров). Наличие в таких гидрогелях системы сообщающихся между собой пор обеспечивает им высокую проницаемость, значительную удельную поверхность, отсутствие диффузионных затруднений при сорбции и десорбции веществ с широчайшим спектром значений молекулярных масс, доступность присутствующих в их составе функциональных групп для присоединяемых лигандов и целый ряд других уникальных свойств, позволяющих эффективно использовать такие гидрогели в областях, связанных с медициной и медицинской биотехнологией, в частности, в качестве матриц для клеточной и тканевой инженерии, компонентов систем с контролируемым выделением, высокоэффективных сорбентов для разделения и очистки белков основы пломбирочных материалов и для имплантатов, а также целом ряде других областей. На сегодняшний день разработан целый ряд методов создания подобных пористых систем, наиболее распространенными среди них являются:

- сублимационная сушка полимерных гидрогелей после их набухания в воде [234];
- полимеризация в присутствии компонентов, способных выделять в процессе реакции газ ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ) [235,236];
- полимеризация в присутствии компонентов, которые растворимы в мономере, но не растворяются в образующемся полимере [237,238];
- формирование пространственной полимерной матрицы гидрогеля в присутствии гетерофазы замороженного растворителя (вода,

формами) [239]

- полимеризация в присутствии нерастворимого компонента (глюкоза, сахара, NaCl), который может быть вымыт, однако, по завершении процесса [240,241];

Каждый из методов имеет как преимущества, так и ряд недостатков, ограничивающих их применимость. 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 условиях криоструктурирования, или иными словами, в присутствии гетерофазы замороженного растворителя (воды). Несмотря на сравнительную простоту данный метод достаточно гибок и, как это будет продемонстрировано далее, позволяет в широком интервале менять свойства получаемых гидрогелей, позволяя получать материалы с оптимальными для каждой конкретной области применения характеристиками.

Как уже отмечалось в кратком обзоре, представленном в начале настоящей работы изменения, которые претерпевают физико-химические свойства и реакционная способность взаимодействующих соединений при замораживании, как правило, нельзя предсказать или определить путем экстраполяции характеристик системы, определенных при повышенных и комнатных температурах. В силу этого, для изучения закономерностей влияния различных факторов на процессы, протекающие при формировании макропористых полимерных гидрогелей в криоусловиях, проводились синтезы при различных условиях – при различных концентрациях реакционной системы и соотношениях сомономеров, различных количествах инициатора, температурах. Реакции проводились в интервале температур от минус 5 до минус 25 °С, суммарной концентрации реакционной системы от 1 до 14 г/100 мл. 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 поливинилового спирта и N,N-диэтиламиноэтилметакрилата, однако в этом случае ускорителем распада перекиси являлся сам низкомолекулярный сомономер. При сополимеризации модифицированного поливинилового спирта с акриловой кислотой была использована окислительно-восстановительная система «перекись водорода – аскорбиновая кислота», выбор которой определялся низким значением величины рН реакционной смеси, связанным с присутствием в реакционной системе акриловой кислоты, что не позволяло эффективно использовать в качестве компонента иницирующей системы третичный амин.

Как это неоднократно отмечалось ранее, эффективность гелеобразования в водных растворах может быть охарактеризована скоростью потери реакционной системой способности к течению, а также выходом гель-фракции. Однако, в отличие от процессов, протекающих при положительных температурах, при протекании процесса в условиях криоструктурирования определить время достижения системой геле-точки с приемлемой точностью не представляется возможным, в связи с этим основным показателем эффективности процесса сшивки становится выход гель-фракции.

На предварительном этапе исследования проводилось замораживание растворов сомономеров (макромеров на основе ПВС и ГЭК, а также низкомолекулярных акриловой кислоты (АК) N,N-диэтиламиноэтилметакрилата (ДЭАМЭА)) с концентрациями от 1 до 25 г/100 мл и их выдержка при температуре минус 25 °С в течение 24 ч., с последующим оттаиванием при комнатной температуре. После оттаивания образование физических криогелей поливинилового спирта наблюдалось только лишь в растворах, концентрация которых была выше 18-20 г/100 мл. Таким образом, можно констатировать, что в интервале использованных в работе концентраций (2-14 г/100 мл) процесс гелеобразования протекал, преимущественно, за счет образования ковалентных межмолекулярных сшивок и для большей части использованных в работе концентраций реакционной системы раствор, находящийся в

межкристаллическом пространстве, до конца процесса оставался в жидком состоянии.

На рисунках, представленных ниже, выборочно приведены типичные зависимости, характеризующие влияние концентрации реакционной системы на процесс гелеобразования в изученных воднозамороженных системах (Рисунок 37-Рисунок 42). Более детально данные зависимости представлены в соответствующих публикациях [242 - 249].

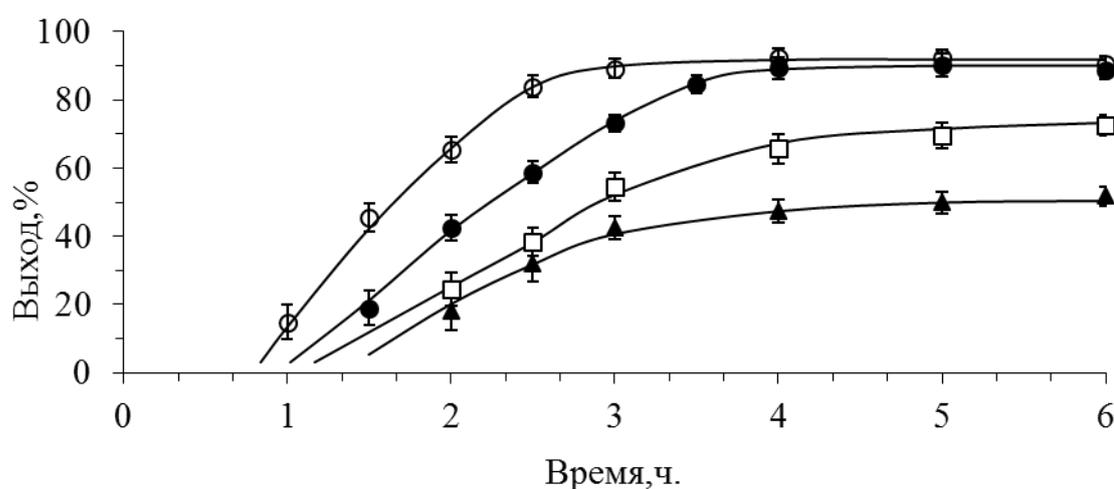


Рисунок 37- Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от времени при различных концентрациях реакционной системы.

Модифицированный поливиниловый спирт

Концентрации макромера: (▲)- 2, (□)- 4, (●) - 6, (○) - 8 г/100 мл.

Температура минус 15 °С, концентрация инициатора 1,2 мг/мл, степень замещения макромера 4,1 мольн. %

Как можно видеть, рост суммарной концентрации сомономеров в реакционной смеси, как этого и следовало ожидать, закономерно ведет к ускорению эффективности гелеобразования. При этом выход гидрогелей, по сравнению с процессами, протекающими при положительных температурах, несколько выше, а минимальные концентрации, при которых имело место формирование сшитых гидрогелей, соответственно, ниже. Данный факт, очевидно, связан с концентрированием реакционной системы в межкристаллическом пространстве.

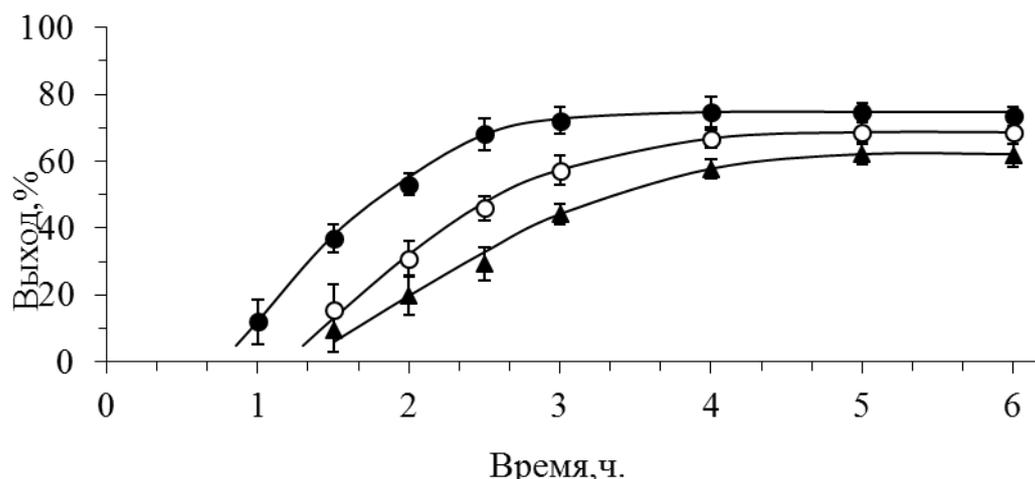


Рисунок 38 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от времени при различных концентрациях реакционной системы. Модифицированный 2- гидроксипропилакрилат.

Концентрации макромера: (▲)- 6, (○)- 8, (●) - 12 г/100 мл. Температура минус 15 °С, концентрация инициатора 1,2 мг/мл, степень замещения макромера 6,1 мольн. %

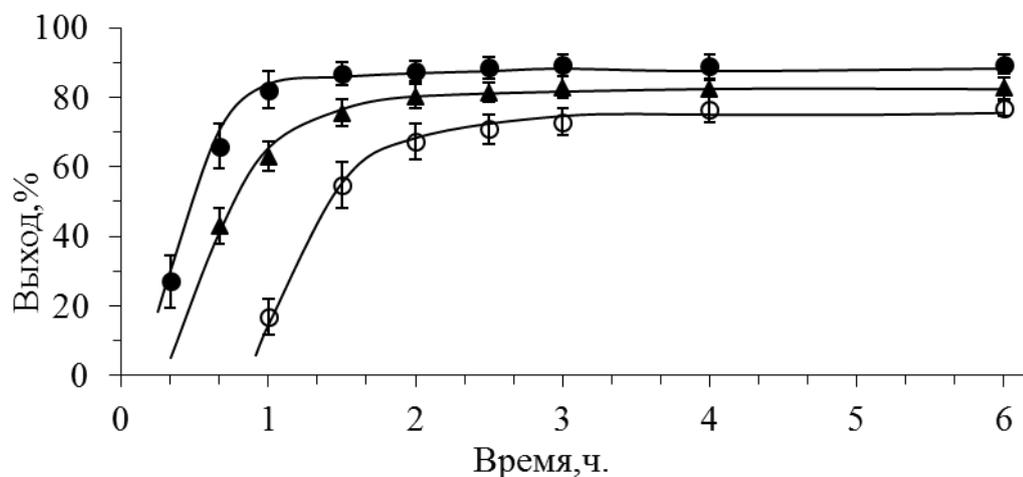


Рисунок 39 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от времени при различных концентрациях реакционной системы. Модифицированный поливинилспирт и акриловая кислота.

Суммарная концентрация сомономеров: (●)- 4, (▲)- 6, (○) - 10 г/100 мл. Температура минус 15 °С, концентрация акриловой кислоты 15 мольн.%, концентрация инициатора 0,06 мг/мл

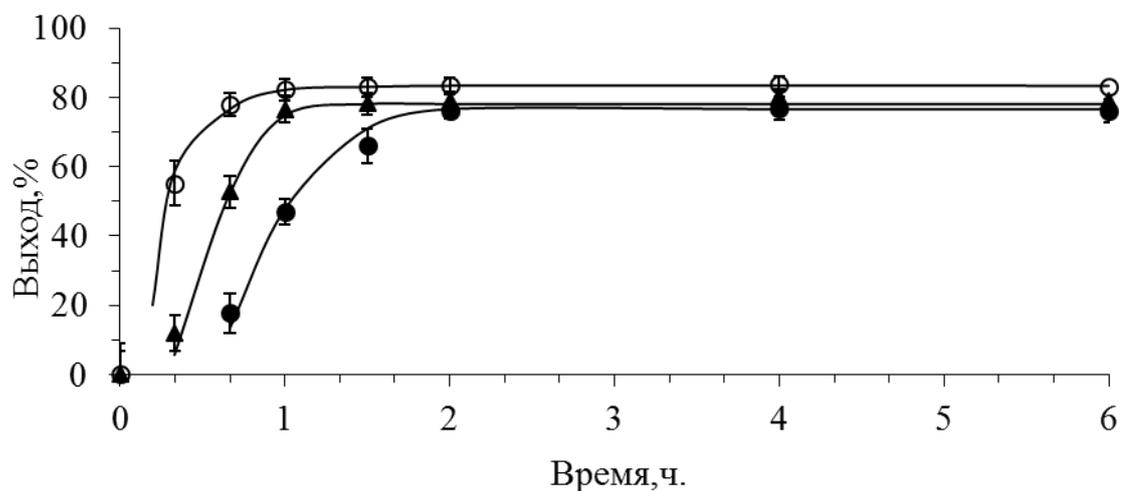


Рисунок 40 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от времени при различных концентрациях реакционной системы. Модифицированный поливиниловый спирт и N,N-диэтиламиноэтилметакрилат.

Суммарная концентрация сомономеров: (●)- 4, (▲)- 6, (○) - 10 г/100 мл. Температура минус 15 °С, концентрация ДЭАЭМА 15 мольн.%, концентрация инициатора 0,06 мг/мл

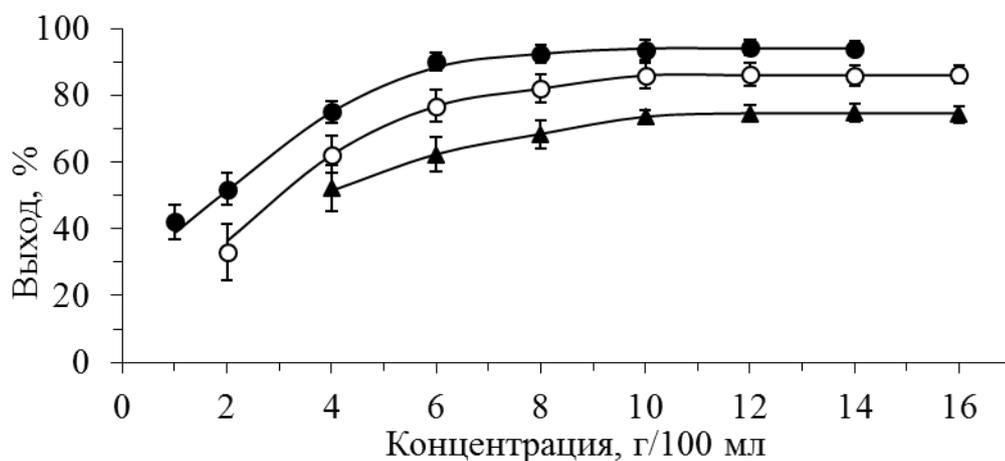


Рисунок 41 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от концентрации реакционной системы.

(●)- ПВС, (▲)- ГЭК, (○) – ПВС/ГЭК=70/30

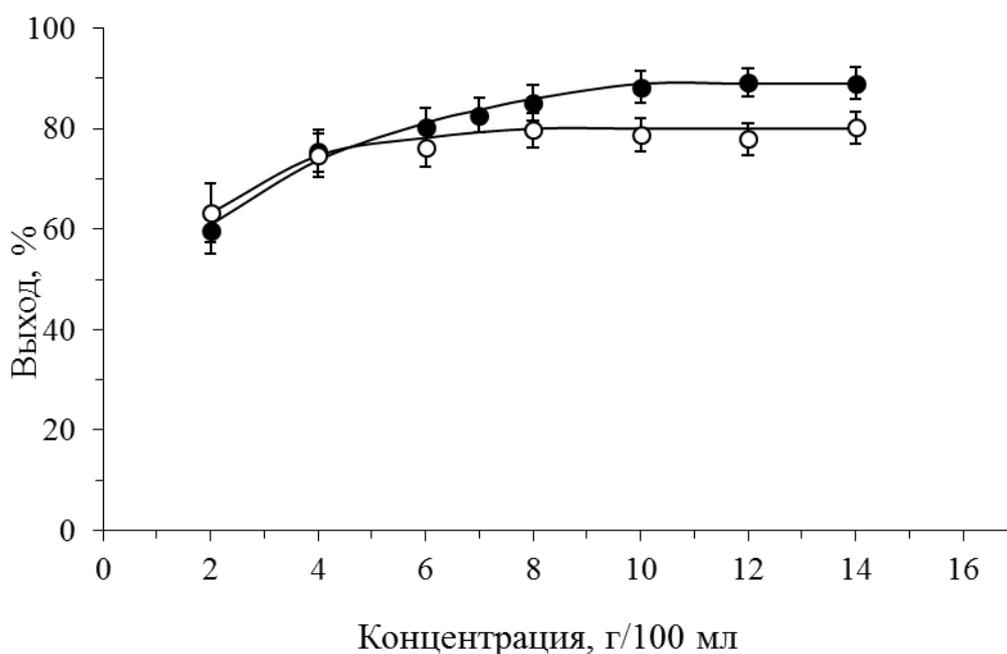


Рисунок 42 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от концентрации реакционной системы.

(●)- ПВС-АК, (○) – ПВС-ДЭАМЭА. Доля низкомолекулярного сомономера 15 мольн.%.

Вполне очевидным выглядел и характер влияния на процесс гелеобразования изменения количества инициатора в реакционной системе. Как можно видеть из приведенных зависимостей (Рисунок 43 - Рисунок 46), проведение реакций при сравнительно низких концентрациях инициатора в реакционной системе ведет к образованию продукта с низким выходом. Очевидно, что такая ситуация обусловлена малым содержанием в системе свободных радикалов. После увеличения количества инициатора в системе возникает значительное количество свободных радикалов, способных инициировать зарождение кинетических цепей сразу же во многих активных центрах, что закономерно ведет к существенному росту как скорости реакции, так и выхода продукта. Примечательно, что «пороговая» концентрация инициатора, после которой наблюдалось эффективное гелеобразование, в случае присутствия в реакционной системе низкомолекулярного мономера была заметно ниже, что, очевидно, объясняется заведомо большим числом реакционноспособных кратных связей в системе.

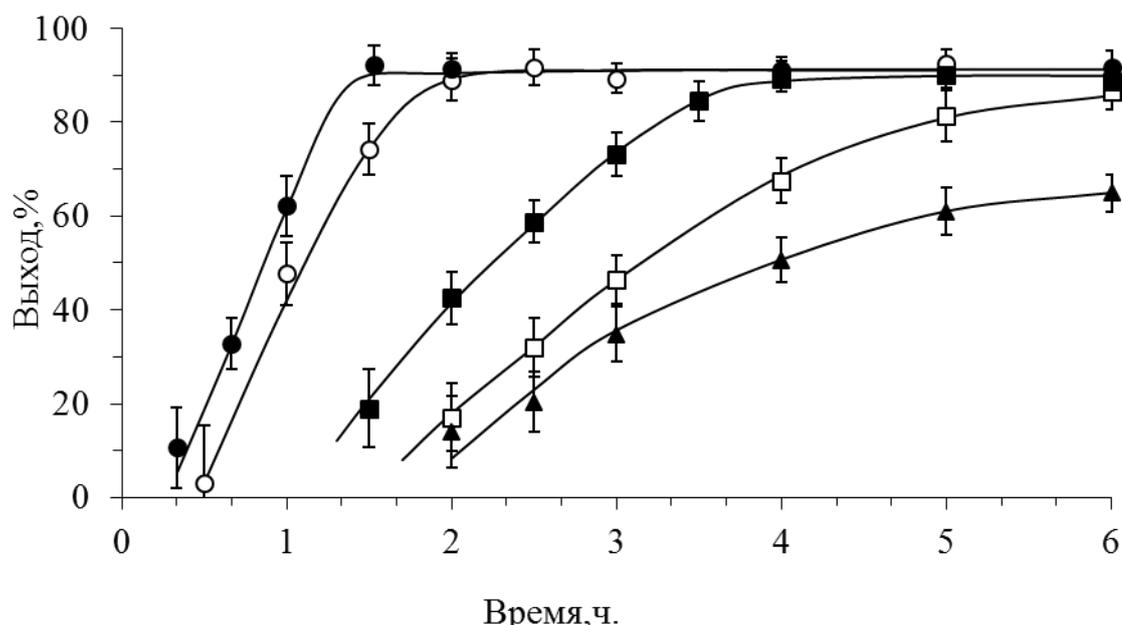


Рисунок 43 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от времени при различных концентрациях инициатора. Модифицированный поливиниловый спирт.

Суммарная концентрация сомономеров: (●)-2 мг/мл., (○)-1,6, (■) -1,2, (□)-0,8, (▲) – 0,4 Температура минус 15 °С, концентрация макромера 6 г/100 мл, степень замещения макромера 4,1 мольн. %

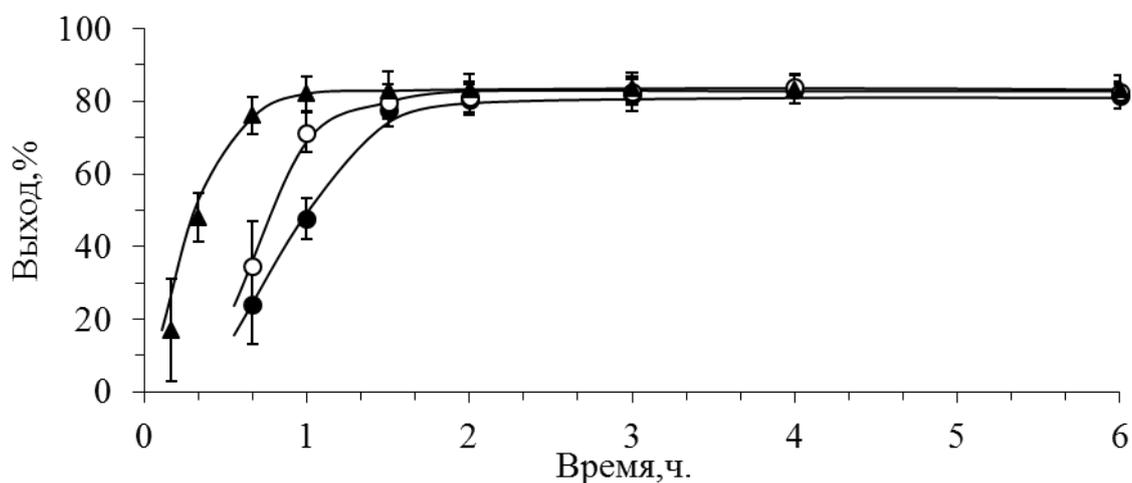


Рисунок 44 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от времени при различных концентрациях инициатора. Модифицированный поливиниловый спирт и акриловая кислота.

Суммарная концентрация сомономеров: (●)-0,04, (○)- 0,08, (▲) – 0,12 мг/мл. Температура минус 15 °С, концентрация макромера 6 г/100 мл, степень замещения макромера 4,1 мольн. %, доля АК – 15 мольн.%

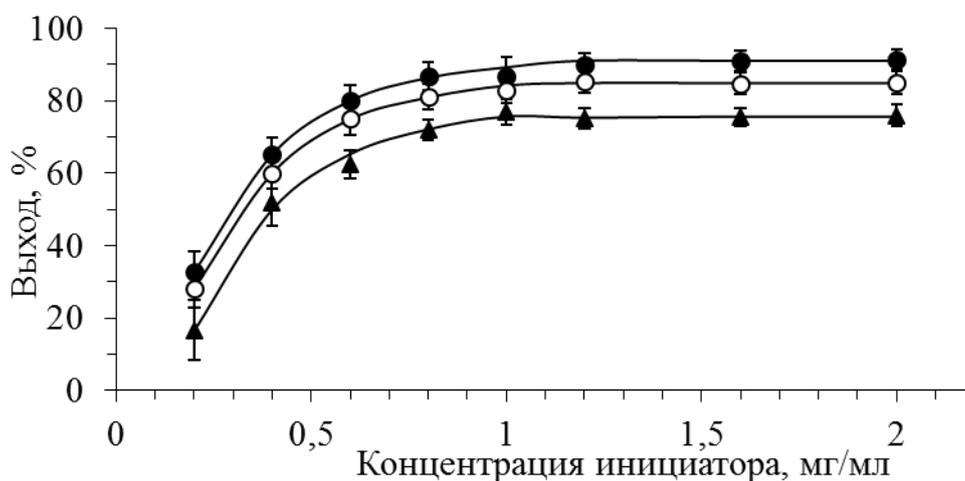


Рисунок 45 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от количества инициатора в реакционной системе.

(●)- ПВС, (▲)- ГЭК, (○) – ПВС/ГЭК=70/30

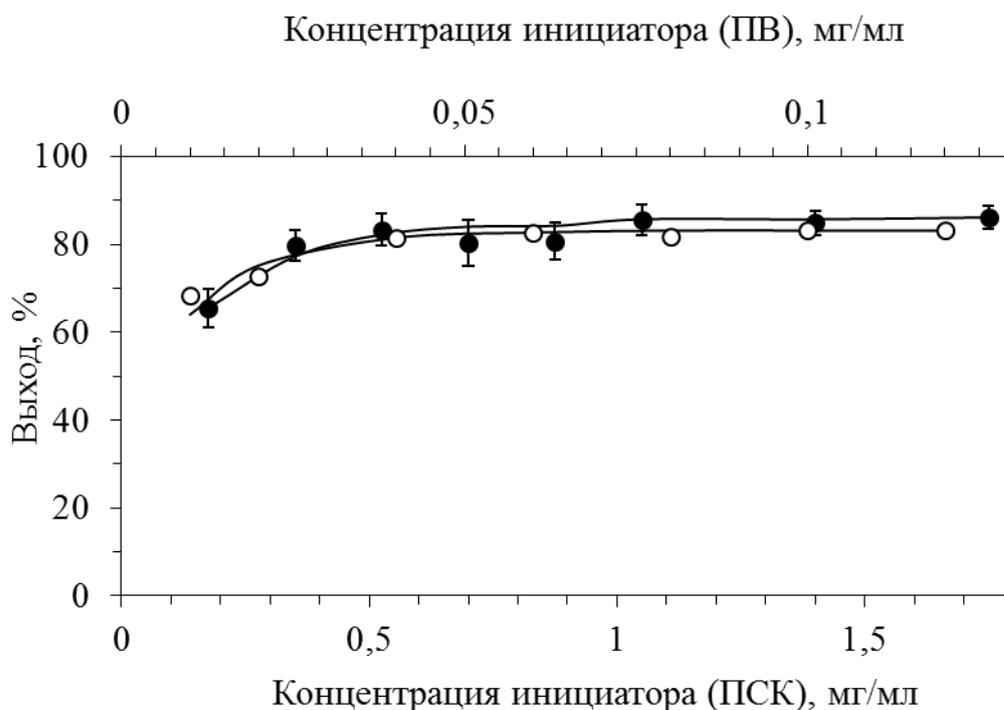


Рисунок 46 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от количества инициатора в реакционной системе

(●)- ПВС-АК, (○) – ПВС-ДЭАМЭА. Доля низкомолекулярного сомономера 15 мольн.%.

В тоже время, несмотря на монотонный рост выхода, после того как количество инициатора превышало определенное значение – 1,6 мг/мл для растворов, модифицированных ГЭК и ПВС, и 1,4 и 0,1 мг/мл для систем,

содержащих ДЭАЭМА и АК, соответственно, механические и осмотические свойства образующихся гидрогелей существенно ухудшались за счет частичного образования изотропного геля. Данный факт, вероятно, связано с тем, что вследствие наличия в системе большого числа реакционных центров часть гелевой фракции могла образовываться еще до того, как окончательно сформировывались поликристаллы. Аналогично, поликристаллы льда могли образовываться еще до того, как окончательно сформировывались поликристаллы льда.

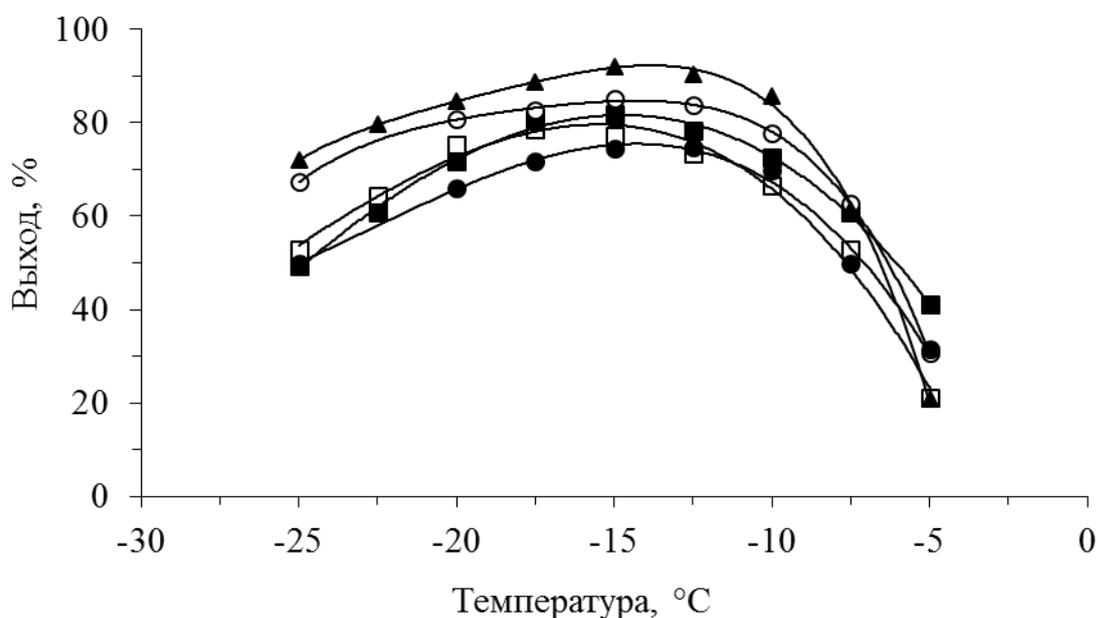


Рисунок 47- Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от температуры

(▲) - ПВС, концентрация макромера 10 г/100 мл, концентрация инициатора 2 мг/мл, (○) - ПВС/ГЭК=30/70; (●) - ГЭК, суммарная концентрация сомономеров 6 г/100 мл, концентрация инициатора 1,2 мг/мл; (□)- ПВС/АК=85/15, суммарная концентрация сомономеров 7 г/100 мл, концентрация инициатора 0,05 мг/мл; (■) ВС/ДЭАЭМА=85/15, суммарная концентрация сомономеров 7 г/100 мл, концентрация инициатора 1,2 мг/мл

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 (Рисунок 47, выше).

Такой вид температурной зависимости характерен для процессов, протекающих в криоусловиях [21-23, 239,250- 251] и объясняется, по всей вероятности, сложным характером вкладов разнообразных физико-химических процессов, определяющих протекание реакции, в первую очередь, как это упоминалось ранее, наличием конкурирующих явлений ускорения реакции за счет концентрирования раствора в незамерзшей жидкой микрофазе и ее замедления при снижении температуры сообразно закону Аррениуса.

Изучение процессов, протекающих в реакционных системах с различным соотношением сомономеров (поливинилового спирта и гидроксипропилакрилата, поливинилового спирта и низкомолекулярного мономера) показало, что увеличение доли низкомолекулярного сомономера ведет к некоторому увеличению как выхода сшитых гидрогелей, так скорости гелеобразования (Рисунок 48 - Рисунок 50), особенно заметному на ранних стадиях процесса.

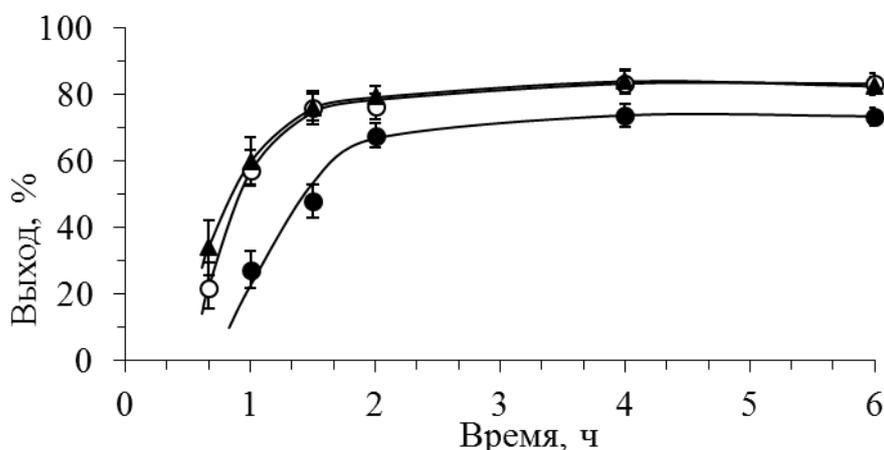


Рисунок 48 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от времени при различном соотношении сомономеров. Модифицированный поливиниловый спирт и акриловая кислота.

Доля акриловой кислоты: (●)-2,5, (○)-5 (▲)-15 мольн.%. Температура синтеза минус 15 °С, концентрация инициатора 0,06 мг/мл концентрация реакционной смеси 7 г/100

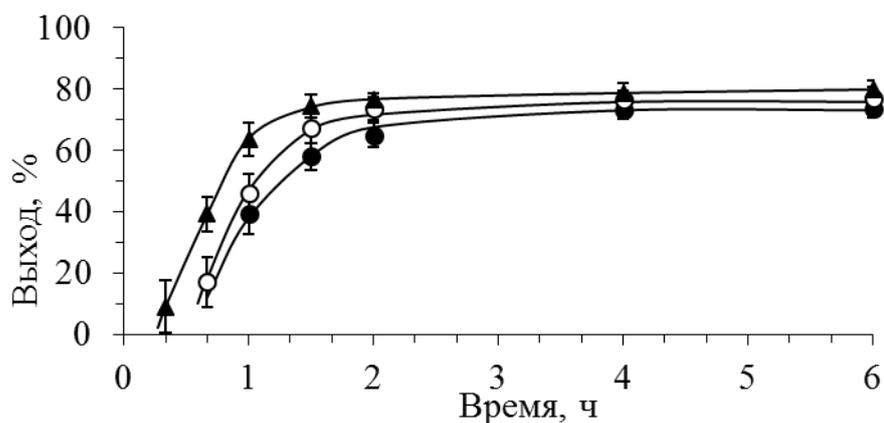


Рисунок 49 - Зависимость выхода макропористых полимерных гидрогелей от времени при различном соотношении сомономеров. Модифицированный поливиниловый спирт и ДЭАЭМА.

Доля ДЭАЭМА: (●)-5 (○)-7,5, (▲)-10 мольн.%. Температура синтеза минус 15 °С, концентрация инициатора 0,35 мг/мл, концентрация реакционной смеси 7 г/100 мл.

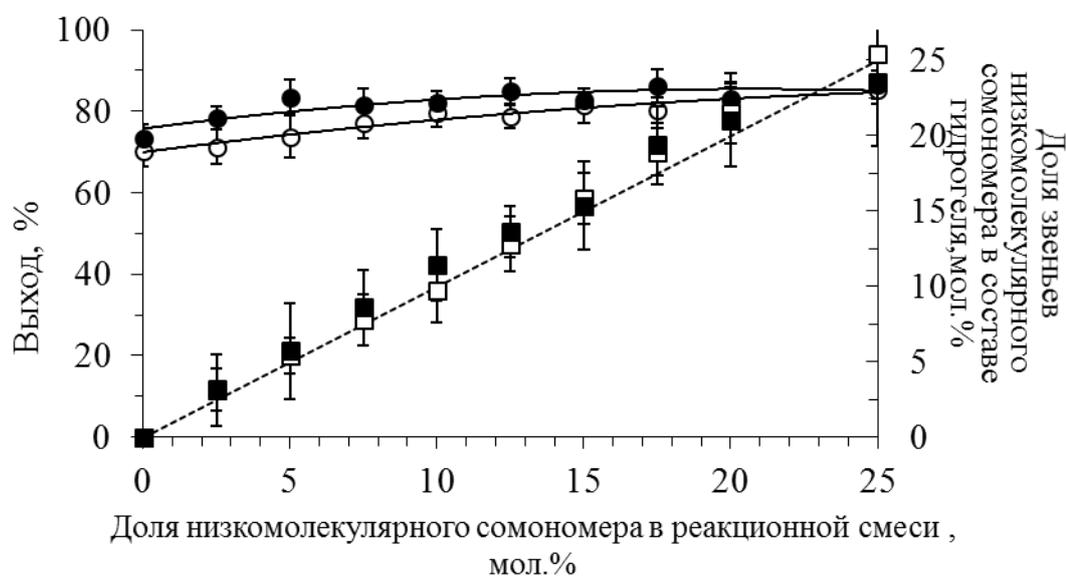


Рисунок 50 - Зависимость выхода (●,○) и состава (■,□) образующихся гидрогелей от соотношения макромеров в реакционной смеси.

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

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

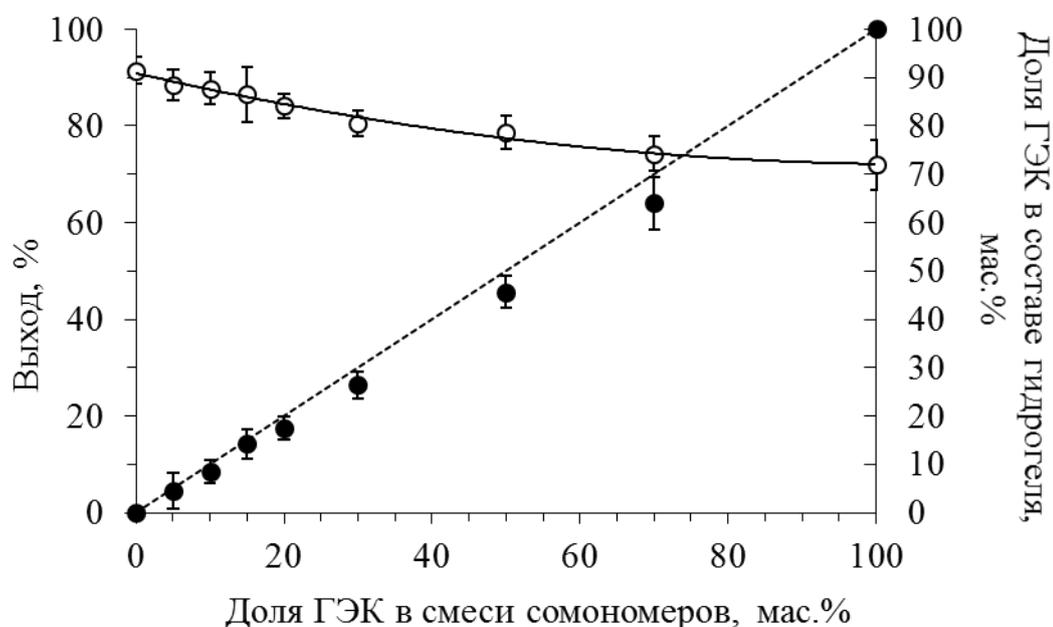


Рисунок 51 - Зависимость выхода (○) и состава (●) образующихся гидрогелей от соотношения макромеров в реакционной смеси.

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

Введение же в реакционную систему модифицированного ГЭК, как и в случае гелеобразования при положительных температурах, напротив, приводит к снижению эффективности гелеобразования (Рисунок 41, Рисунок 45, Рисунок 51). Такая картина, очевидно, может быть связана при введении в реакционную систему низкомолекулярных АК или ДЭАЭМА, в первую очередь, с заметным увеличением числа реакционных центров, а также, отчасти, с существенно большей, по сравнению с находящимися в боковых цепях поливинилового спирта группами, содержащими кратные связи, подвижностью, присущей молекулам низкомолекулярного сомономера. В случае же ГЭК, очевидно, сказывается увеличение относительной доли менее доступных, по сравнению с группами, находящимися в боковых цепях ПВС, кратных связей, находящихся в боковых цепях гидроксиэтилкрахмала.

Анализ составов полученных полимерных гидрогелей показал, что для всех случаев состав образующихся гидрогелей достаточно близок к составу

реакционной смеси (Рисунок 50, Рисунок 51), хотя 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.

### 3.2.2.2 Исследование морфологии образующихся полимерных макропористых гидрогелей.

Не менее важной, нежели химическое строение, характеристикой материалов, контактирующих с внутренними средами живых организмов, является морфология их поверхности, и в частности их пористость [252]. На сегодняшний день, наличие в материале системы связанных между собой пор считается необходимым условием для обеспечения эффективного роста, миграции и питания клеток. Помимо наличия сообщения между порами материала важное значение имеет и их размер, так, например, недостаточно крупный размер пор снижает миграцию клеток, в конечном итоге приводя к формированию клеточной капсулы вокруг имплантированного материала или изделия на его основе, в конечном итоге снижая диффузию к клеткам, находящимся в объеме имплантата, питательных веществ и удаление продуктов их жизнедеятельности. С другой стороны, избыточный объем пор ведет к малой площади внутренней поверхности, ограничивая тем самым возможность клеточной адгезии. Кроме того, размер пор может оказывать эффект на прикрепление клеток, инфильтрацию и васкуляризацию в объеме матрикса. Так, например, в настоящее время описано оптимальными для использования в тканевой инженерии считаются матриксы с размером пор от 20 до 1500 мкм, однако, минимальным размером пор необходимым для роста костной ткани считается размер от 75 до 100 мкм, оптимальным – от 100 до 135 мкм. Для материалов, используемых для регенерации кожи и лечения ран в качестве оптимального, обеспечивающего оптимальную клеточную активность и жизнеспособность называется размер пор, лежащий в интервале от 20 до 120 мкм [253]. Иными словами, нахождение оптимального баланса между химическим

строением и степенью развитости пористой структуры, размером и характером распределения пор по размерам потенциально позволяет создавать материалы, обеспечивающий оптимальный рост требуемого типа тканей.

Для изучения морфологии поверхности полученных гидрогелей в данной работе использовалась сканирующая электронная микроскопия. При этом количественная обработка микрофотографий образцов синтезированных полимерных гидрогелей проводилась путем выбора эквивалентного радиуса поры с площадью равной площади обрабатываемой поры. Поиск этого оптимума происходил визуально с использованием специальных шаблонов. Такой выбор метода обработки экспериментальных данных связан со сложной морфологией поверхности изучаемых макропористых гидрогелей.

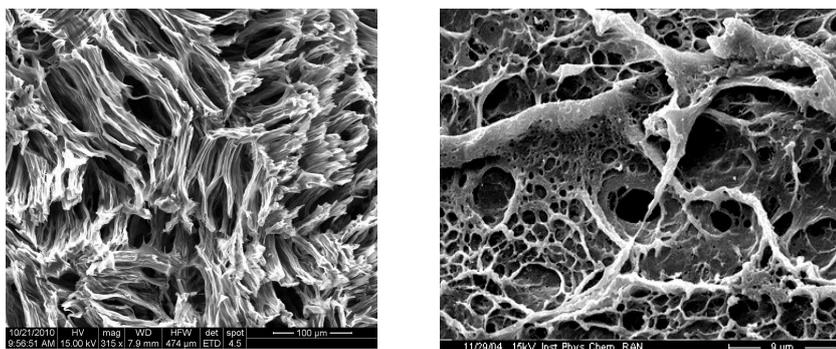


Рисунок 52 – Пример типичных микрофотографий синтезированных макропористых гидрогелей.

Примеры типичных микрофотографий синтезированных полимерных гидрогелей поливинилового спирта представлены выше (Рисунок 52). Как можно видеть, синтезированные гидрогели содержат систему сообщающихся между собой крупных поры размером в десятки, иногда сотни, микрометров, занимающих основной объем образцов гидрогелей. Помимо крупных макропор, определяющих основные физико-химические характеристики, макропористых гидрогелей, в их структуре присутствует большое количество более мелких мезо- и микроразмерных пор, которые представляют собой дефекты стенок макропор и значительно увеличивают удельную поверхность последних и обеспечивают дополнительное сообщение между ними.

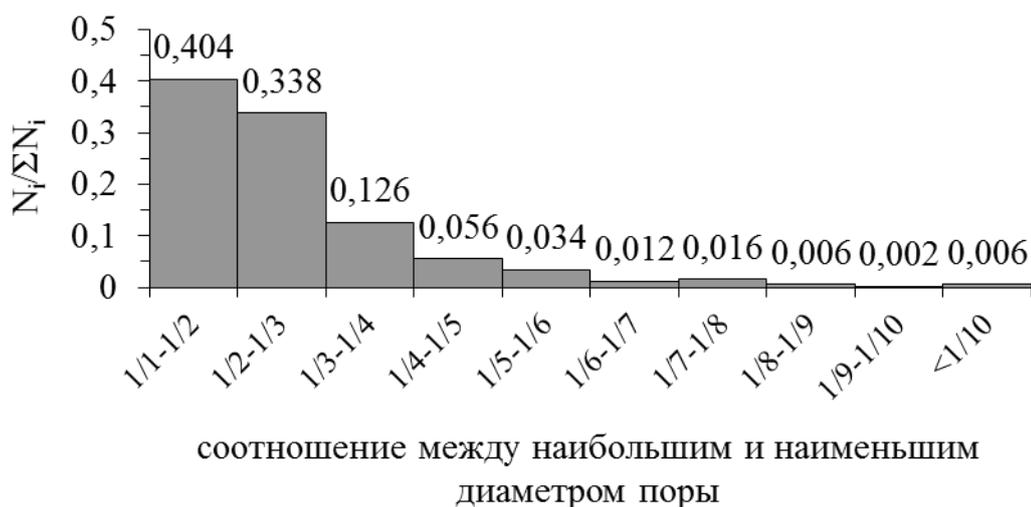


Рисунок 53 – Распределение соотношения между наибольшим и наименьшим диаметром поры для образца гидрогеля ПВС-ДЭАЭМА.

Температура синтеза минус 25 °С, концентрация макромера 7 г/ 100 мл, концентрация звеньев ДЭАЭМА 10 мольн.%, концентрация инициатора 0,35 мг/мл.

Большая часть пор в изученных образцах гидрогелей представляет собой умеренно вытянутые поры с соотношением между наибольшим и наименьшим диаметром менее 1-го к 4-м (Рисунок 53). Подобный характер распределения в целом не зависит от условий синтеза и состава гидрогеля, среднее же значение соотношения между наибольшим и наименьшим диаметром поры находится, обыкновенно, в интервале от 1 к 2,1 до 1 к 3,2.

Процесс формирования пористой структуры полимерного гидрогеля в условиях криоструктурирования характеризуется двумя конкурирующими процессами – с одной стороны образованием поликристаллов льда, обеспечивающих после оттаивания наличие в системе крупных пор, а с другой - формированием матрицы сшитого полимера, препятствующей образованию и росту поликристаллов.

Если скорость образования пространственной сетки сшитого полимерного гидрогеля невысока и вследствие этого кристаллизация растворителя протекает беспрепятственно, имеет место образование системы, которая характеризуется развитой пористостью и наличием большого числа крупных сообщающихся

между собой пор. В противном случае, если скорость образования нерастворимой сшитой полимерной фазы гидрогеля превышает скорость кристаллизации растворителя, образуется материал, характеризующийся слаборазвитой пористостью, обогащенный не имеющими между собой сообщения мелкими порами, зачастую представляющими собой дефекты структуры полимерной фазы, возникшие вследствие кристаллизации воды в объеме сформированного изотропного (непористого) гидрогеля.

На практике же, как правило, имеет место некий промежуточный вариант протекания процесса, который определяется соотношением скоростей кристаллизации и гелеобразования. В силу этого влияние условий протекания процесса на свойства, образующихся гидрогелей различно. В частности, как можно видеть на приведенных зависимостях (Рисунок 54 - Рисунок 56), в широком диапазоне значений концентрация инициатора практически не оказывает влияние на пористости формирующихся гидрогелей и характер распределения его пор по размерам.

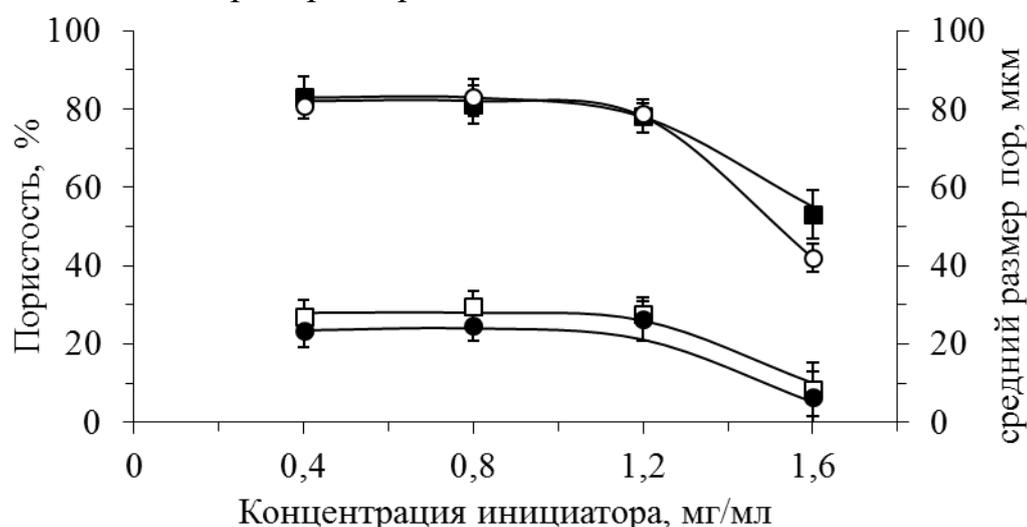


Рисунок 54 – Зависимость пористости (○,■) и среднего размера пор (□,●) образцов гидрогелей от концентрации инициатора в реакционной системе.

Температура синтеза минус 15 °С, суммарная концентрация реакционной системы 8 г/100 мл. Соотношение макромеров в реакционной смеси: (○,□) - ПВС/ГЭК=100/0, (●,■) - ПВС/ГЭК=70/30

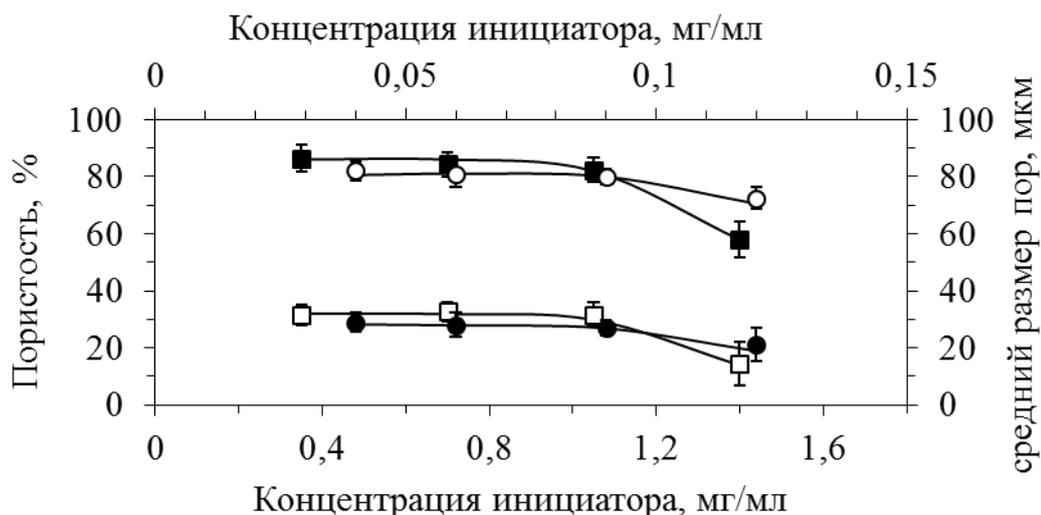


Рисунок 55 – Зависимость пористости (○, ■) и среднего размера пор (□, ●) образцов гидрогелей от концентрации инициатора в реакционной системе.

Температура синтеза минус 15 °С, суммарная концентрация реакционной системы 8 г/100 мл. Доля низкомолекулярного сомономера 15 мольн.%. Реакционная система: (○, □) – ПВС-АК, (●, ■) – ПВС-ДЭАЭМА

Подобная ситуация может объясняться тем, что до достижения концентрацией инициатора определенного порогового значения скорость формирования сшитой структуры полимерного гидрогеля остается такова, что формирование поликристаллов льда завершается момента формирования гелевой фракции в количестве, достаточном для того, чтобы в заметной степени повлиять на протекание процессов кристаллизации растворителя.

По достижении же концентрацией инициатора порогового значения, очевидно, имеет место формирование значительного количества изотропного (непористого) полимерного гидрогеля до завершения формирования поликристаллов воды, что, ожидаемо, приводит к резкому снижению пористости образующейся полимерной системы. В этом случае в образовавшемся гидрогеле поры, как правило, не имеют сообщения между собой и являются дефектами, созданными поликристаллами растворителя в монолитном изотропном гидрогеле (Рисунок 56).

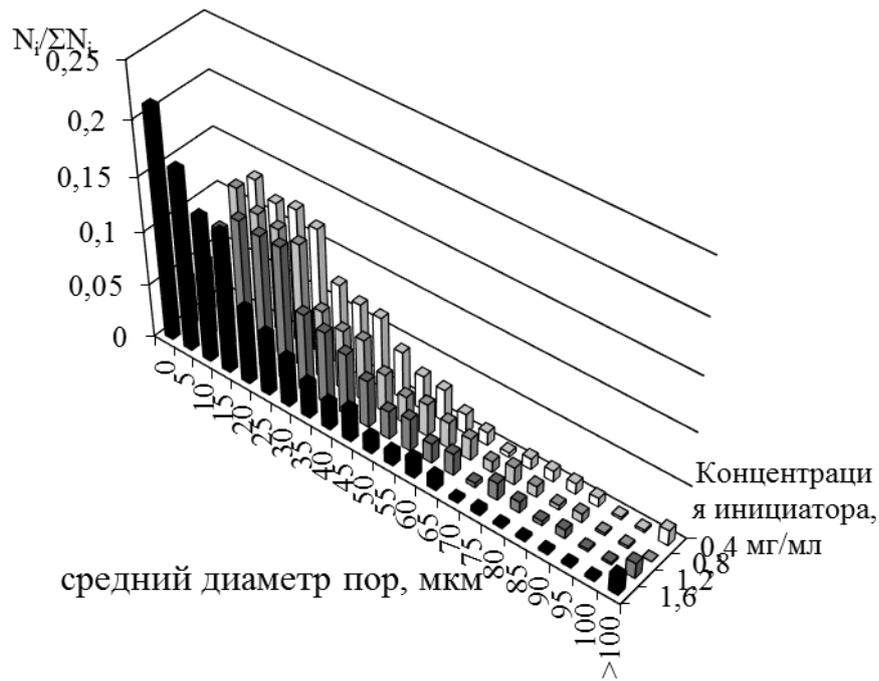


Рисунок 56 – Диаграмма распределения пор по размерам для образцов, полученных при различных концентрациях инициатора. Модифицированный ПВС.

Концентрация макромера 6 г/100 мл температура синтеза минус 15 °С

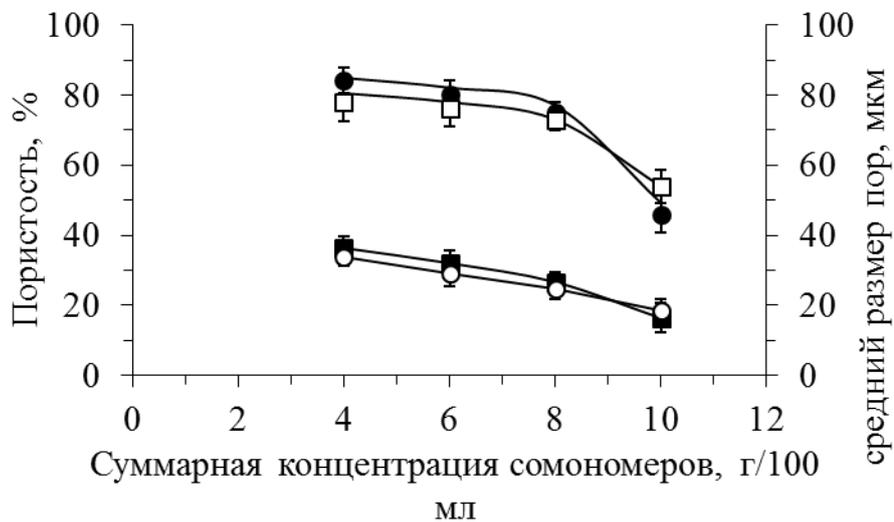


Рисунок 57 – Зависимость пористости (●,□)и среднего размера пор (■,○) образцов гидрогелей от суммарной концентрации макромеров в реакционной системе.

Температура синтеза минус 15 °С, Соотношение макромеров в реакционной смеси: (○,□) - ПВС/ГЭК=100/0, (●,■) - ПВС/ГЭК=70/30

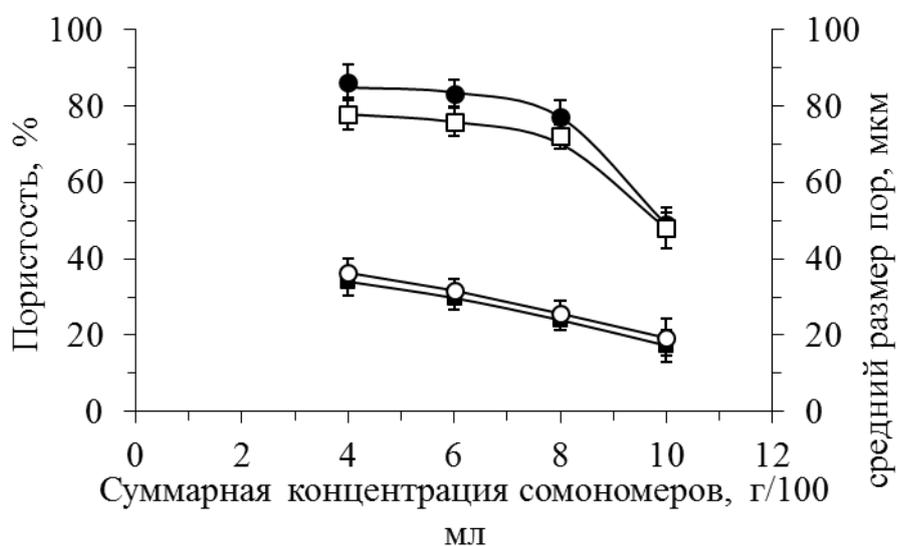


Рисунок 58 – Зависимость пористости (●,□)и среднего размера пор (■,○) образцов гидрогелей от суммарной концентрации макромеров в реакционной системе.

Температура синтеза минус 15 °С, Соотношение макромеров в реакционной смеси: (●,■) - ПВС/ГЭК=100/0, (○,□) - ПВС/ГЭК=70/30

Изменение температуры и суммарной концентрации сомономеров в реакционной системе вело к более очевидному изменению характеристик пористой структуры формирующихся пористых полимерных систем.

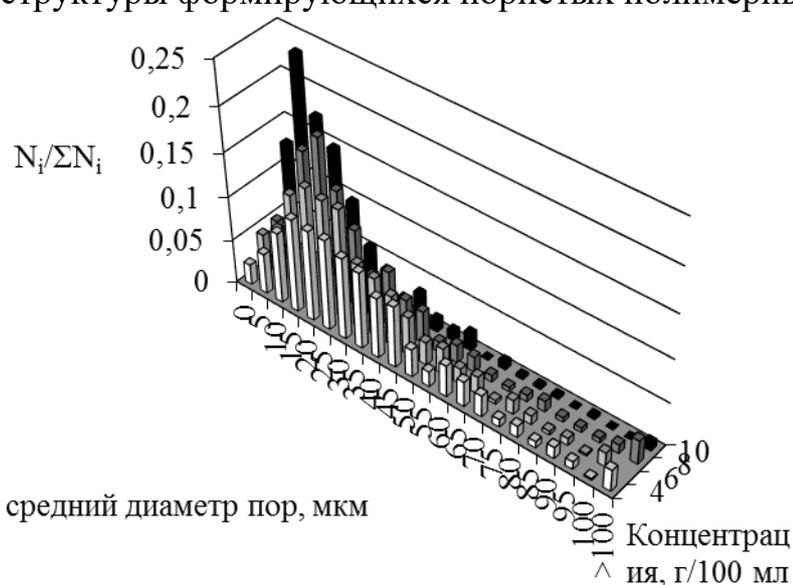


Рисунок 59 – Диаграмма распределения пор по размерам для образцов, полученных при различных концентрациях инициатора. Модифицированный ПВС - акриловая кислота.

Температура синтеза минус 15 °С, доля АК - 10 мольн. %.

Как можно видеть из приведенных зависимостей (Рисунок 57 - Рисунок 59) рост концентрации реакционной системы вел к монотонному снижению общей пористости полимерных гидрогелей, что, в первую очередь, может быть объяснено увеличением относительной доли собственно полимерной части системы в единице объема образца.

Все вышеперечисленные факторы, помимо снижения общей пористости, должны, очевидно, вызывать также и образование более мелких пор. И действительно, как можно видеть на типичной гистограмме распределения пор по размерам (Рисунок 59), с ростом концентрации реакционной системы возрастает относительная доля фракции мелких пор, а распределение пор по размерам становится более узким.

Зависимости изменения общей пористости гидрогелей и среднего эквивалентного диаметра пор от температуры синтеза приведены ниже.

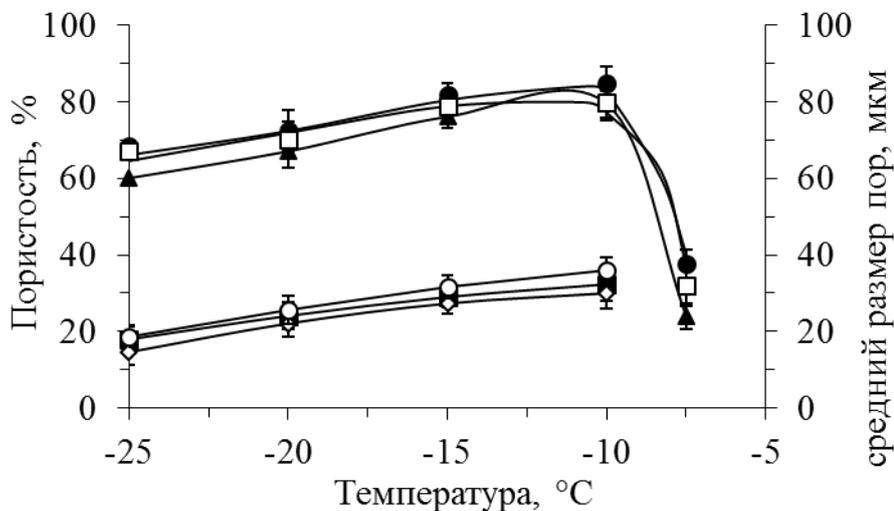


Рисунок 60 – Зависимость пористости (●, □, ▲) и среднего размера пор (■, ○, ◇) образцов гидрогелей от температуры.

Соотношение макромеров в реакционной смеси: (●, ■) - ПВС/АК=90/10, (○, □) - ПВС/ДЭАЭМА=90/10, (▲, ◇) ПВС/ГЭК=70/30

Как видно из приведенных зависимостей, в интервале температур от минус 15 до минус 25 °C наблюдается снижение общей пористости системы по мере уменьшения температуры (Рисунок 60, Рисунок 61), данный факт может

быть объяснен как образованием более мелких пор, так и наличием условий для структурного переохлаждения, а также более сильным вымораживанием растворителя и, как следствие, увеличением относительно доли фракции физического криогеля поливинилового спирта. Резкое же уменьшение общей пористости образцов гидрогелей при проведении процесса при температурах выше минус 10 °С, объясняется наличием в их составе заметной доли изотропного геля, в силу наличия при протекании процесса продолжительного периода нахождения реакционной системы в жидком состоянии вследствие низкой скорости кристаллизации растворителя при таких температурах.

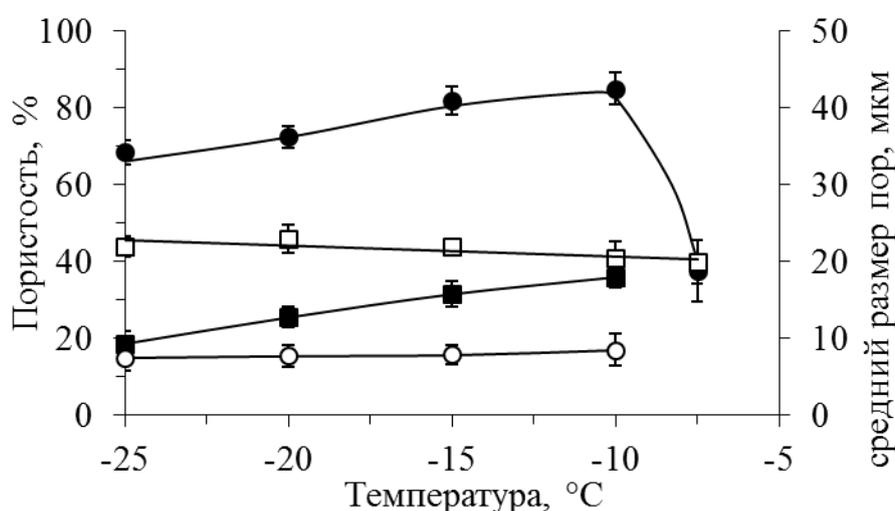


Рисунок 61 – Зависимость пористости (●, □) и среднего размера пор (■, ○) образцов гидрогелей от температуры. Модифицированный поливиниловый спирт

Метод охлаждения реакционной системы: (●, ■) – «обычный», (□, ○) – «температурная закалка»

Говоря о влиянии температуры, при которой проводился процесс, на средний размер пор образующихся гидрогелей, следует отметить, что в диапазоне значений температур, при которых протекал процесс, от минус 10 °С до минус 25 °С имеет место монотонное снижение среднего размера пор, а также сужение диапазона изменения размера пор сопровождающееся обогащением системы более мелкими порами (Рисунок 60 - Рисунок 62). Наблюдаемая эволюция

формирующихся полимерных гидрогелевых систем может объясняться увеличением количества центров кристаллизации и ростом скорости поликристаллов растворителя по мере снижении температуры, что и ведет к образованию большого количества более мелких пор.

Данное предположение может быть подтверждено картиной, наблюдаемой при проведении криогенного гелеобразования посредством метода «температурной закалки», то есть при очень быстром охлаждении системы до температуры жидкого азота (Рисунок 61, Рисунок 63). При таком проведении процесса образующиеся полимерные гидрогелевые системы содержали преимущественно очень мелкие поры, причем и размер пор, и характер распределения последних по размерам был практически независим от температуры, при которой проводился процесс после резкого охлаждения реакционной системы.

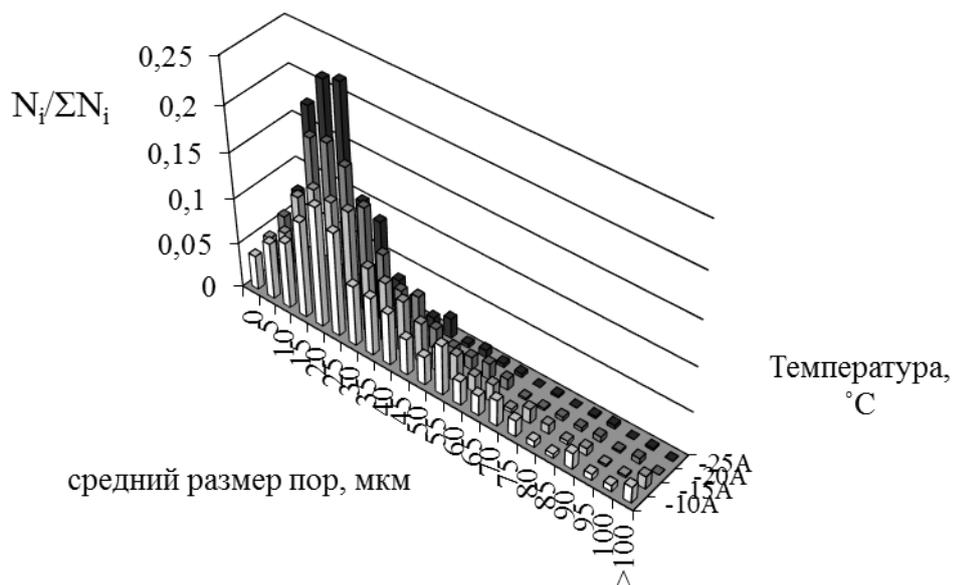


Рисунок 62 – Диаграмма распределения пор по размерам для образцов, полученных при различных температурах. Модифицированный ПВС. «Обычное» охлаждение

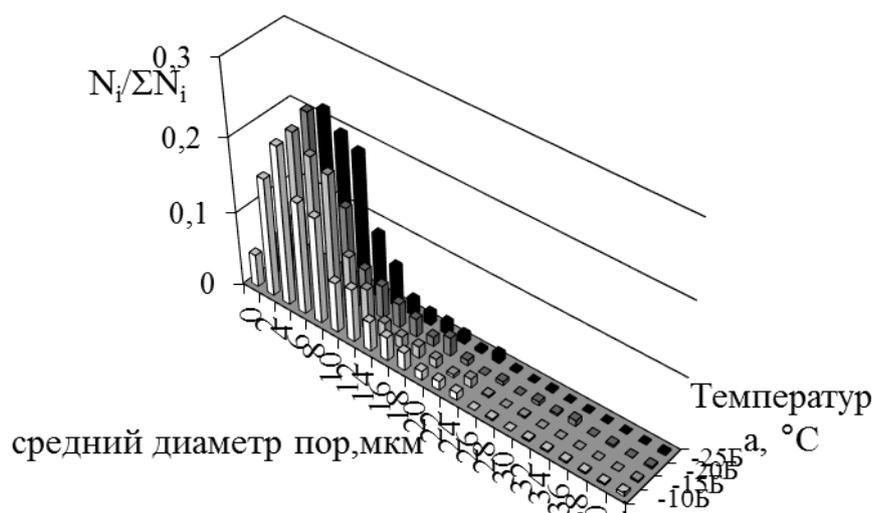


Рисунок 63 – Диаграмма распределения пор по размерам для образцов, полученных при различных температурах. Модифицированный ПВС. «Температурная закалка»

Заметный интерес представляло изучение характера влияния на структуру образующихся полимерных систем соотношения сомономеров в реакционной смеси. Как можно видеть на приведённых зависимостях, как для систем, которые содержали ДЭАЭМА, так и для систем с АК, увеличение относительной доли низкомолекулярных сомономеров вело к некоторому росту как общей пористости образующихся гидрогелей так и увеличению среднего размера их пор (Рисунок 64).

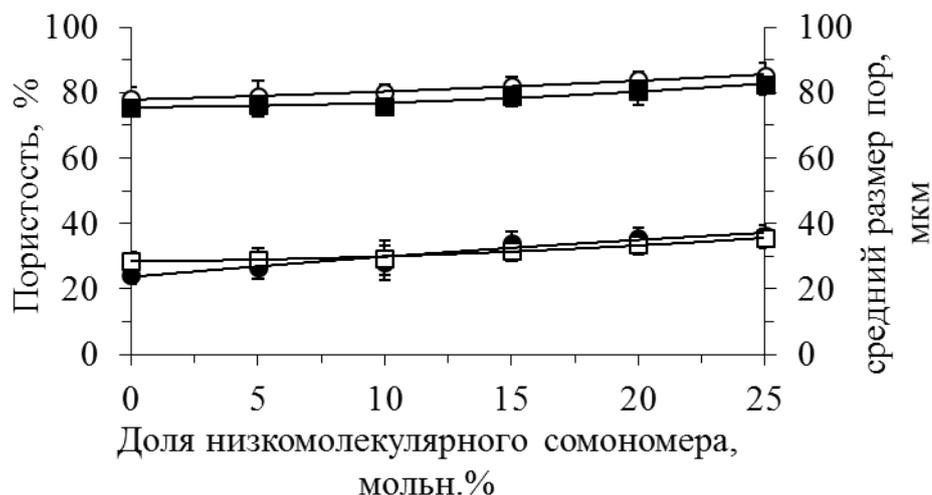


Рисунок 64 – Зависимость пористости (○,■)и среднего размера пор (●,□) гидрогелей от соотношения сомономеров.

Реакционная система: (○, □)- ПВС-АК, (■, ●) – ПВС-ДЭАЭМА. Концентрация реакционной смеси 7 г/100 мл, температура синтеза минус 15 °С.

Данный факт может быть объяснен, вероятно, своего рода «разбавлением» реакционной системы и уменьшением относительной доли высокомолекулярного сомономера, ведущего к снижению вязкости системы, и делающего возможным формирование более крупных поликристаллов льда, а также, очевидно, способного снизить количество невымороженного растворителя.

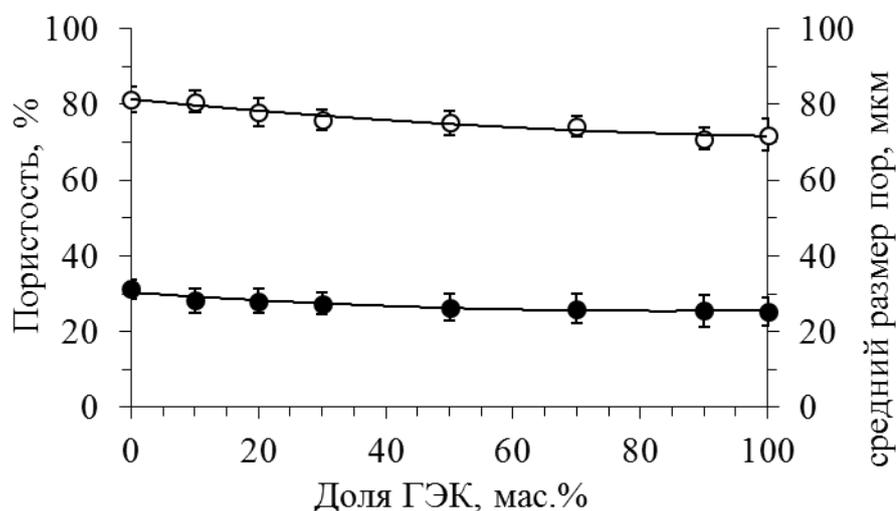


Рисунок 65 – Зависимость пористости (○) и среднего размера пор (●) гидрогелей от соотношения сомономеров.

Реакционная система ПВС-ГЭК. Концентрация реакционной смеси 8 г/100 мл, температура синтеза минус 15 °С.

Увеличение же относительной доли гидроксиэтилкрахмала ведет к незначительному уменьшению, как пористости, так и среднего размера пор (Рисунок 65), что, очевидно, связано, напротив, с ростом вязкости реакционной системы по мере увеличения относительной доли полимера с большей молекулярной массой.

Впрочем, стоит отметить, что наблюдаемые изменения характеристик пористой системы гидрогелей, полученных при различных соотношениях сомономеров не столь уж и велики по сравнению с гелями, получаемыми при различных концентрациях реакционной системы и температурах.

### 3.2.2.3 Исследование равновесной набухаемости гидрогелей, полученных в криоусловиях

Как было показано ранее, образцы сшитых полимерных гидрогелей, полученные в результате реакций, проведенных в криоусловиях, содержат

большое число связанных между собой пор занимающих основную часть объема образца. Объем же, собственно, полимерной гидрогелевой части в таких системах сравнительно мал. Открытая пористая структура таких макропористых гидрогелей делает возможным чрезвычайно быструю сорбцию жидкости в направлении центра высушенной матрицы за счет действия капиллярных сил, что и определяет их быстрое набухание вне зависимости от размера образца. В силу этого скорости набухания макропористых гидрогелей, синтезированных в условиях криоструктурирования, в десятки и сотни раз превышают скорости набухания образцов непористых (изотропных) гидрогелей, сформированных при положительных температурах [247, 248, 250]. Как можно видеть на приведенных в качестве примера типичных зависимостях, равновесная набухаемость образцов макропористых полимерных гидрогелей достигается уже за 20-30 минут (Рисунок 66), тогда как для достижения равновесной набухаемости изотропных гидрогелей, как это было показано ранее, требовалось от нескольких часов до нескольких недель в зависимости от размера образцов.

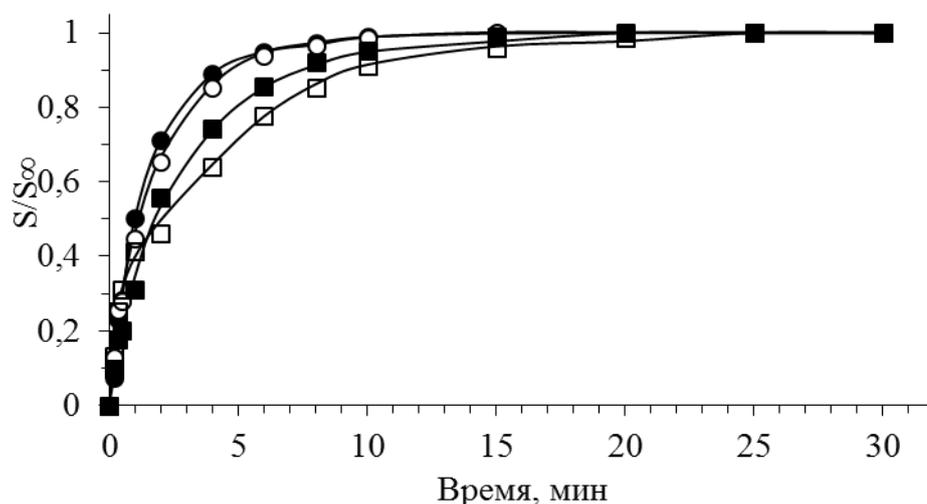


Рисунок 66 – Зависимость равновесной набухаемости макропористых полимерных гидрогелей на основе поливинилового спирта.

Температура синтеза минус 15 °С, концентрация инициатора 0,8 г/мл, концентрация реакционной системы: (●)-2, (○)-4, (■)-6, (□)-10 г/100мл.

Еще одной особенностью макропористых гидрогелей, получаемых в криоусловиях, проистекающей из их специфического строения является то, что

основная часть жидкости, поглощаемой таким макропористым гидрогелем при набухании, заполняет свободное пространство пор, занимающих, как это неоднократно отмечалось ранее, основной объем образца. Количество же жидкости, поглощаемой при набухании образца, собственно, его сшитой гидрогелевой частью сравнительно мало.

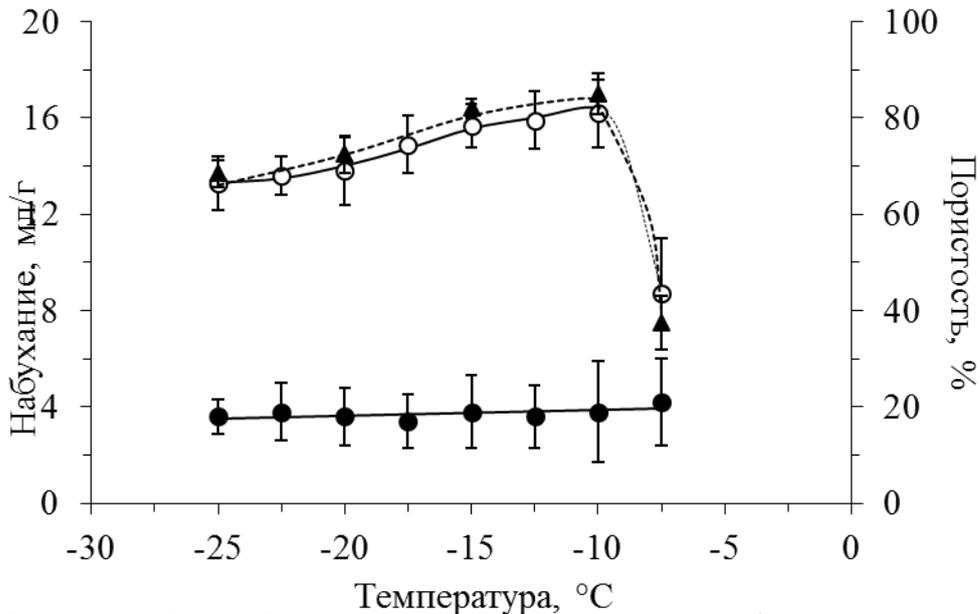


Рисунок 67 – Зависимость равновесной набухаемости макропористых гидрогелей (○), равновесной набухаемости полимерной части (●) и общей пористости (▲) от температуры. Гидрогели на основе ПВС.

Концентрация реакционной системы 6 г/100 мл, концентрация инициатора 0,8 мг/мл.

Примечательно, что равновесная набухаемость полимерной части синтезированных макропористых гидрогелей, как правило, незначительно меняется при изменении условий их получения, и имеет значение порядка 4-5 мл/г. В силу этого равновесная набухаемость полученных в криоусловиях макропористых гидрогелей в основном определяется степенью развитости их пористой структуры. Более того, для всех изученных образцов макропористых гидрогелей профиль графической зависимости величины равновесного набухания от изменяемых условий проведения процесса криотропного структурирования, в основном, повторяет профиль зависимости общей пористости гидрогеля (см., например, Рисунок 67) от этого изменяемого фактора (для упрощения восприятия

материала зависимость пористой в качестве примера структуры приводится лишь на этом рисунке).

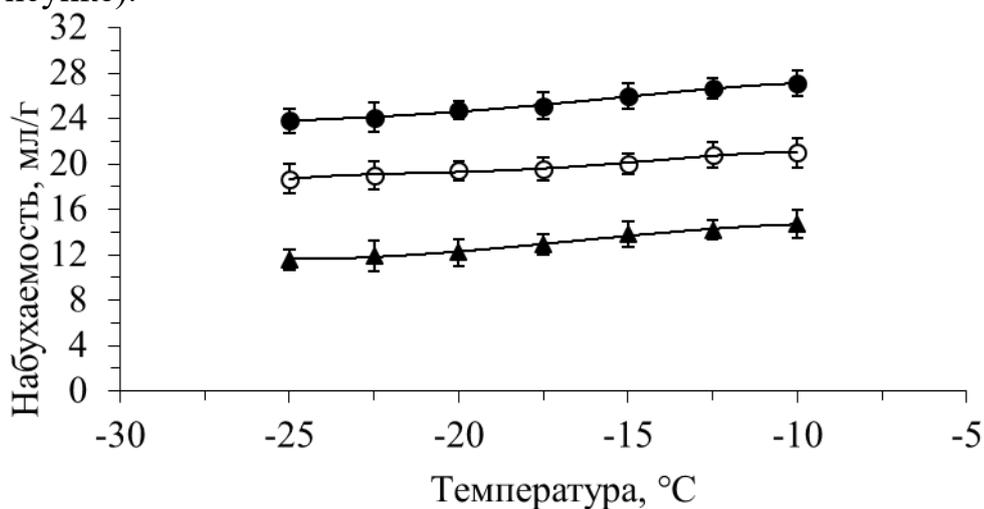


Рисунок 68 – Зависимость равновесной набухаемости макропористых гидрогелей от температуры. Гидрогели: (●)- ПВС-АК, (○) - ПВС-ДЭАЭМА, (▲)- ПВС-ГЭК

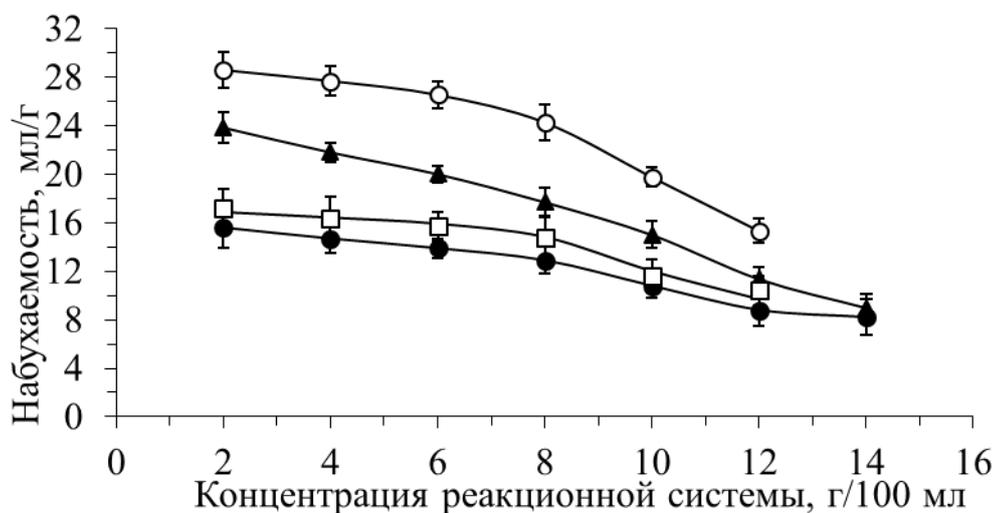


Рисунок 69 – Зависимость равновесной набухаемости макропористых гидрогелей от концентрации реакционной системы. Гидрогели: (○)- ПВС-АК, (▲) - ПВС-ДЭАЭМА, (□) - ПВС, (●)- ПВС-ГЭК

Поэтому изменение температуры протекания процесса (Рисунок 67, Рисунок 68), состава мономерной смеси для систем, содержащих низкомолекулярный сомономер (Рисунок 70), концентрации реакционной системы (Рисунок 69), способно привести к заметному изменению способности полученных макропористых гидрогелей к сорбции воды, тогда как изменение

соотношения макромеров в мономерной смеси (Рисунок 70), а также изменение количества инициатора (Рисунок 71) практически во всем интервале использованных значений практически не влияет на изменение величины равновесного набухания образующихся образцов.

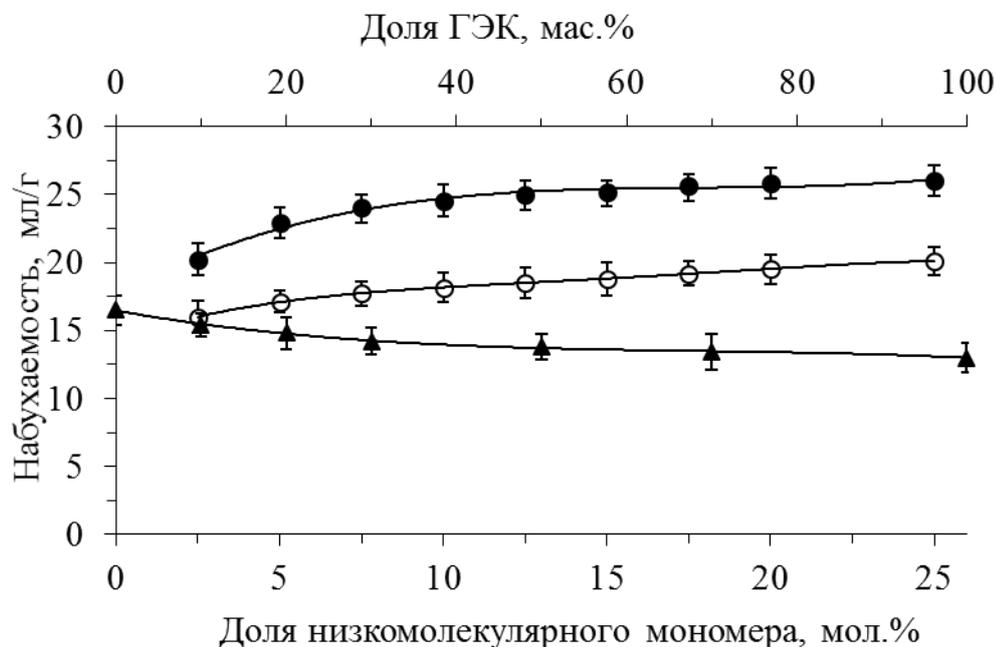


Рисунок 70 – Зависимость равновесной набухаемости макропористых гидрогелей от соотношения сомономеров. Гидрогели: (●)- ПВС-АК, (○) - ПВС-ДЭАЭМА, (▲)- ПВС-ГЭК

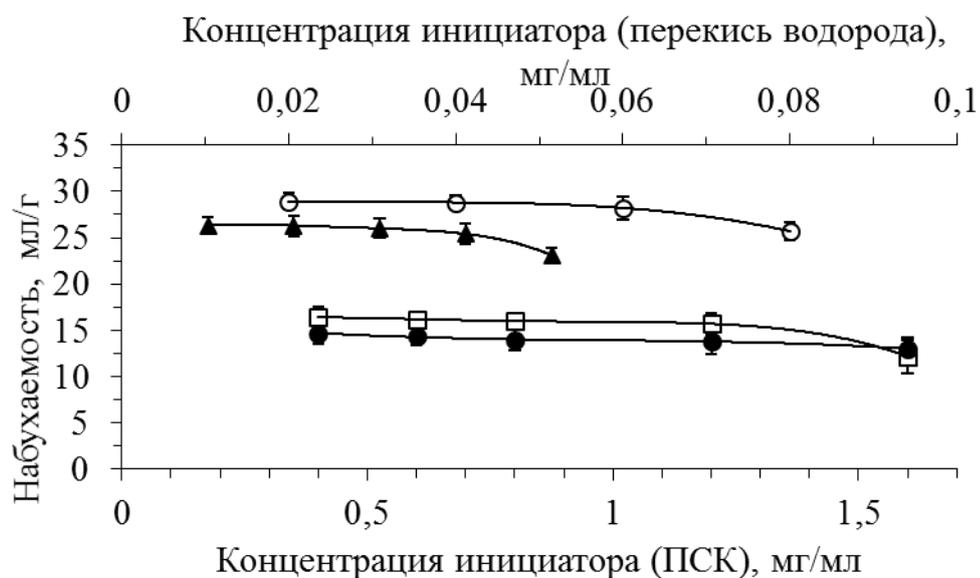


Рисунок 71 – Зависимость равновесной набухаемости макропористых гидрогелей от концентрации инициатора. Гидрогели: (○)- ПВС-АК, (▲) - ПВС-ДЭАЭМА, (□) - ПВС, (●)- ПВС-ГЭК

Поскольку при практическом применении разработанных макропористых материалов и изделий на их основе вероятен их контакт с растворами различной ионной силы и рН, практический интерес имело исследование осмотической стабильности полученных гелей, то есть способности их сохранять свое равновесное набухание (и как следствие линейные размеры) в растворе при изменении внешних условий.

Поскольку макропористые полимерные гидрогели, формирующиеся в криоусловиях, представляют собой систему, состоящую из плотно сшитого полимерного гидрогелевого каркаса, степень набухания которого невелика и мало изменяется при изменении внешних условий, и системы сообщающихся макропор, в которых находится основная часть поглощаемой макропористым гидрогелем жидкости, они, в отличие от «обычных» непористых изотропных гелей, незначительно изменяют свое равновесное набухание при изменении внешних условий, таких как, например, ионной сила или величина рН раствора [21-23, 251, 254].

Аналогичная картина имела место и в случае разработанных макропористых гидрогелей, на основе модифицированных ПВС и ГЭК, не имеющих на своей поверхности заряженных групп. Как видно из приведённых выше зависимостей, при изменении молярной концентрации NaCl в растворе от 0 до 5 М наблюдалось весьма незначительное уменьшение равновесной набухаемости таких гидрогелей (Рисунок 72), причем для образцов, при синтезе которых концентрация макромера в системе была мала, относительное изменение равновесного набухания было более заметно.

Изменение величины рН раствора в которых инкубировались образцы гидрогелей также вызывало существенного изменения их равновесного набухания (Рисунок 73).

При наличии в составе синтезированных полимерных гидрогелей ионогенных их осмотическая стабильность была несколько ниже.

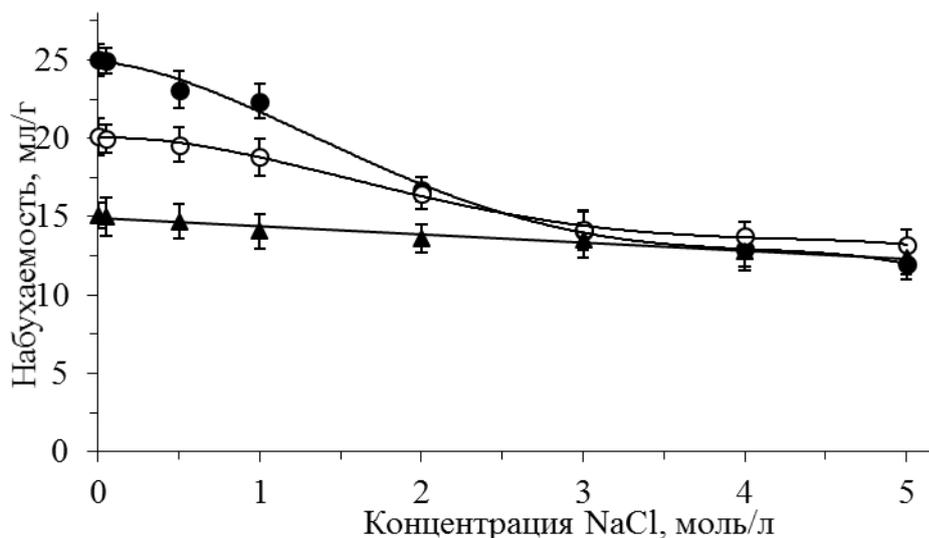


Рисунок 72 – Равновесная набухаемость макропористых гидрогелей в растворах с различной ионной силой. Гидрогели: (●)- ПВС-АК, (○) - ПВС-ДЭАЭМА, (▲)- ПВС-ГЭК

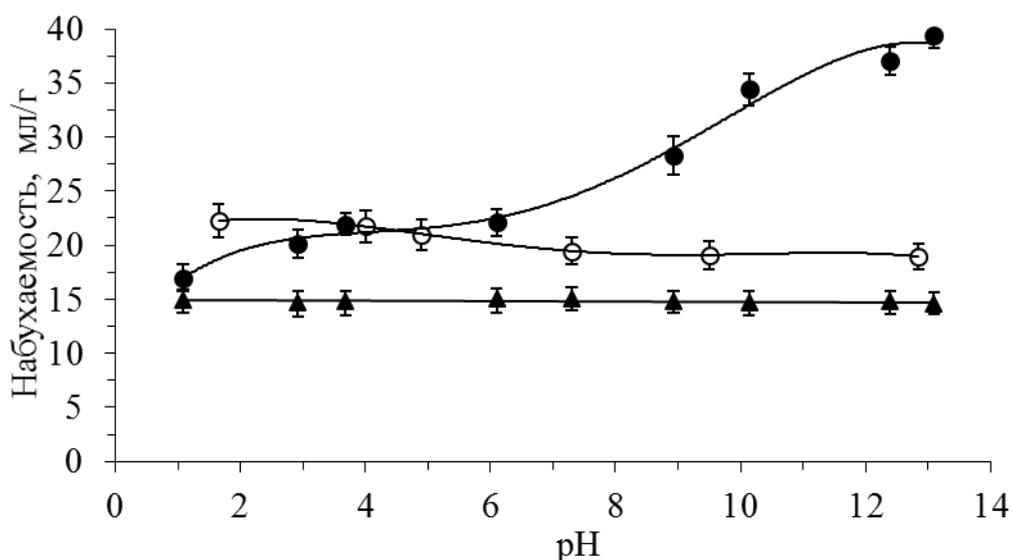


Рисунок 73 – Равновесная набухаемость макропористых гидрогелей в растворах с различной величиной рН. Гидрогели: (●)- ПВС-АК, (○) - ПВС-ДЭАЭМА, (▲)- ПВС-ГЭК

Как можно видеть на приведенных зависимостях (Рисунок 72), и в случае систем, содержащих аминокислотные группы, и в случае систем, содержащих карбоксильные группы, равновесная набухаемость гидрогелей ожидаемо снижалась при увеличении ионной силы раствора. При изменении же величины рН, гидрогели, содержащие группы несущие различные заряды, вели себя по-разному. Набухаемость гидрогелей, содержащих отрицательно заряженные

карбоксильные группы, постепенно увеличивалась в диапазоне рН от 1,8 до 4, затем в интервале от 4 до 6 рН оставалась практически неизменной (Рисунок 73), что связано с диссоциацией карбоксильных звеньев акриловой кислоты и, как следствие, ростом осмотического давления внутри геля. После чего рост набухаемости продолжался. В том же случае, если в составе гидрогелей присутствовали положительно заряженные группы влияние величины рН на набухаемость было менее очевидным. При изменении величины водородного показателя раствора имело место лишь некоторое увеличение равновесной набухаемости в области «кислых» значений рН (Рисунок 73). Стоит, впрочем, отметить, что, несмотря на то, что равновесная набухаемость «заряженных» макропористых полимерных гидрогелей заметно изменялась на фоне «нейтральных» гидрогелей на основе ПВС и ГЭК в растворах с различной ионной силой и рН, эти изменения были заметно меньше наблюдаемых у «обычных», непористых, гидрогелей. То есть, иными словами, даже в случае наличия сравнительного большого числа заряженных групп, синтезированные макропористые гидрогели демонстрировали достаточно высокую осмотическую стабильность.

#### 3.2.2.4 Оценка параметров сетки полимерных гидрогелей, полученных в криоусловиях

Как было продемонстрировано в предыдущем разделе основная часть, поглощаемой макропористым гидрогелем при набухании макропористым жидкости находится в свободном пространстве его пор. В силу этого, определение равновесного набухания, собственно, трехмерной сетки гидрогеля представляет значительную сложность и не может быть реализовано с приемлемой точностью. В связи с этим, в настоящей работе мы не смогли использовать для оценки параметров сетки гидрогеля методы, основанные на изучении их равновесной набухаемости, и оценка производилась лишь на основе анализа деформационных свойств образцов синтезированных гидрогелей [<sup>255</sup>, <sup>256</sup>].

Для определения деформационных свойств гидрогелей в набухшем состоянии была использована методика определения кривых «напряжение-деформация» при сжатии. Измерения проводили на образцах цилиндрической формы диаметром 14 мм. Толщина образцов, задавалась в процессе синтеза и в набухшем равновесном состоянии изменялась от 2 до 4 мм (измерения толщины, проводились для каждого образца).

После деформационного воздействия на каждом этапе с помощью правой чаши аналитических весов осуществлялось нагружение образца, таким образом, чтобы весы оказывались в состоянии равновесия. Полученный таким образом вес нагрузки относился к площади нагружения, а затем использовался для расчета напряжения деформации  $[\sigma]$  и построения кривой «напряжение-деформация» « $\sigma$ - $\epsilon$ ».

Существенно, что все измерения проводили для набухших образцов, находящихся в водной фазе. Поскольку при деформации такой структуры, состоящей, как это было показано ранее, из связанных между собой сквозных пор, процесс деформирования состоял, по меньшей мере, из двух стадий, одна из которых была связана с вытеснением водной фазы, а вторая с деформацией каркаса, нами были проведены дополнительные измерения. Суть их заключалась в том, что обводненные образцы извлекались из жидкой фазы и деформационные измерения проводились на воздухе. В этом случае, удавалось зафиксировать момент выхода водной фазы из пористой структуры геля. В дальнейшем, эта деформация учитывалась при расчете модуля упругости полимерного каркаса гидрогеля. Характерно, что при снятии нагрузки, процесс деформации гидрогеля и поглощения водной фазы проходил обратимо.

Как можно видеть, типичная деформационная кривая (Рисунок 74) состоит из двух участков: участка I -где происходило капиллярное вытеснение водной фазы из пористой структуры полимера и участка II, где происходила деформация собственно пористого каркаса. По второму участку кинетической кривой рассчитывался модуль упругости, численные значения которого представлены ниже (Таблица 8). Для сравнения там же представлены определенные в

предыдущей главе модули упругости в стадии приготовления гидрогелей, полученных при положительных температурах.

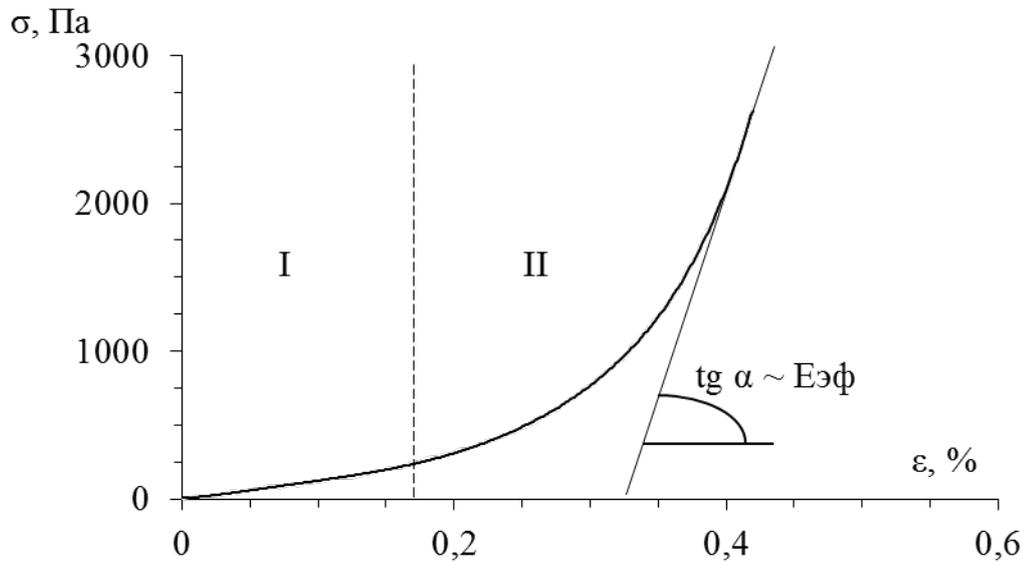


Рисунок 74 – Типичная кривая «напряжение – деформация» набухшего макропористого гидрогеля. I – область синерезиса под внешним давлением, II – деформация пористого полимерного каркаса

Таблица 8 - Модули упругости и характеристики степени сшивания исследованных гидрогелей

Концентрация макромера, г/100 мл	Температура, °С	Концентрация инициатора, г/л	Модуль упругости, кПа	$n_c \times 10^5$ , моль/см <sup>3</sup>	N
4	-15	1,2	17,6	13,01	175
6	-15	1,2	22	14,19	160
8	-15	1,2	33,8	15,27	149
10	-15	1,2	35,2	16,77	136
6	-25	1,2	28,3	15,46	147
6	-20	1,2	24,8	14,06	162
6	-15	1,2	22	14,19	160
6	-10	1,2	19,8	13,17	173
6	-15	0,4	20,8	13,80	165
6	-15	0,8	21,3	14,00	162
6	-15	1,2	22	14,19	160
6	-15	1,6	35	17,54	130
Изотропные гели ПВС (раздел 3.1.2)					
5	20	2	0,8	1,48	1535
6	20	2	1,96	2,74	828
8	20	2	4,69	3,80	597
10	20	2	7,25	4,42	514
20	20	2	27,6	7,59	300

Можно видеть, что модули упругости, для гидрогелей, полученных в криоусловиях заметно, для ряда образцов - на порядок, превосходят модули упругости сшитых систем, полученных при положительных температурах, и достаточно слабо изменяются при изменении условий синтеза. Причем, модули упругости мало зависят от условий синтеза.

По результатам измерения пористой упругости нами были рассчитаны эффективные значения параметров узлов сеток. Для расчета мы использовали уравнения (3.2.2) и (3.2.3), примененные ранее для расчета параметров сетки изотропных систем. Полученные данные приведены в таблице выше.

Несмотря на то, что полученные значения, безусловно, носят лишь оценочный характер, можно выделить ряд тенденций. Как можно видеть, плотность сшивки для гидрогелей, полученных в криоусловиях значительно выше, чем у образцов, полученных при аналогичных концентрациях реагентов, но при положительных температурах (Таблица 8). Причем значения данной характеристики изменяются достаточно слабо и сравнимы со значениями плотности сшивки трехмерной сетки образцов, синтезированных при положительных температурах сшивкой концентрированных растворов модифицированного поливинилового спирта. Данный факт, очевидно, может быть объяснен концентрированием раствора полимера в межкристаллическом пространстве при вымораживании растворителя, причем эта концентрация сравнительно мало изменяется при переходе от более разбавленных замораживаемых растворов к более концентрированным. Уменьшение температуры ведет к более полному вымораживанию растворителя, и, как следствие, росту концентрации раствора в невымороженных областях, что, очевидно и объясняет некоторый рост частоты сшивки пространственной сетки образцов макропористых гидрогелей, наблюдаемый при уменьшении температуры синтеза. Увеличение же, концентрации инициатора в интервале значений в котором время, проходящее до начала сшивки достаточно для завершения кристаллизации растворителя, как можно видеть, практически не влияет на свойства сетки образующихся гидрогелей.

### 3.2.2.5 Исследование сорбции альбумина 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, как уже об этом говорилось выше, и был применен нами в настоящей работе. С целью оценки сорбционной способности синтезированных макропористых гидрогелей, содержащие заряженные группы, нами была исследована иммобилизация на них модельного белка [257].

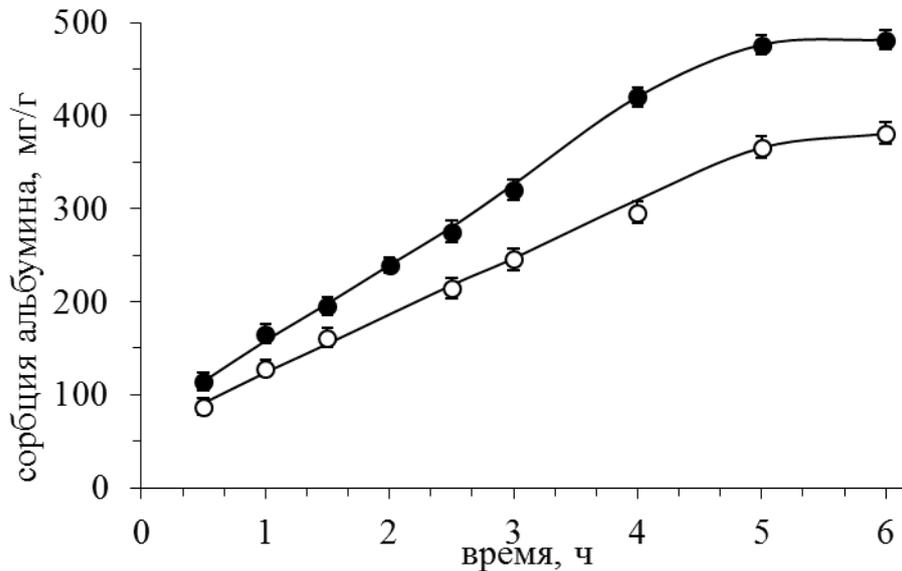


Рисунок 75 - Изменение емкости по альбумину (мг альбумина/ г носителя) во времени.

Гидрогели: (●) ПВС-ДЭАЭМА, (○)- ПВС-АК. Содержание заряженных групп в составе гидрогелей ~15 мольн.%

В качестве модельного белка был использован бычий сывороточный альбумин (БСА), который представляет собой удобную и широко распространенную модель, применяемую при изучении свойств глобулярных белков.

Зависимость изменения количества сорбированного на поверхности содержащих ионогенные группы макропористых гидрогелей поливинилового спирта БСА от времени приведена выше (Рисунок 75). Можно видеть, что основная часть белка 90-95% сорбируется на поверхности гидрогелей в первые 5-6 часов, при этом сорбция на гидрогеле, содержащем аминогруппы, протекает несколько быстрее. Важно, что емкость синтезированных полимерных носителей достигает заметных величин порядка 450-500 мг белка на 1 грамм носителя. Данный факт весьма предсказуем и объясняется высокой удельной поверхностью макропористых гелей, сравнимые значения сорбционной способностью наблюдались и для ряда иных макропористых систем, в частности для макропористых гидрогелей на основе акриламида [23] и 2-гидроксиэтилметакрилата [254, 258] дополнительно имеющих в своем составе требуемые для связывания функциональные группы.

Количество альбумина, связываемого на поверхности гидрогелей, не содержащих моногенных групп, составляет порядка  $25 \pm 5$  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 различной ионной силы и величиной рН нам не удавалось выявить десорбции белка с поверхности гидрогелевого носителя.

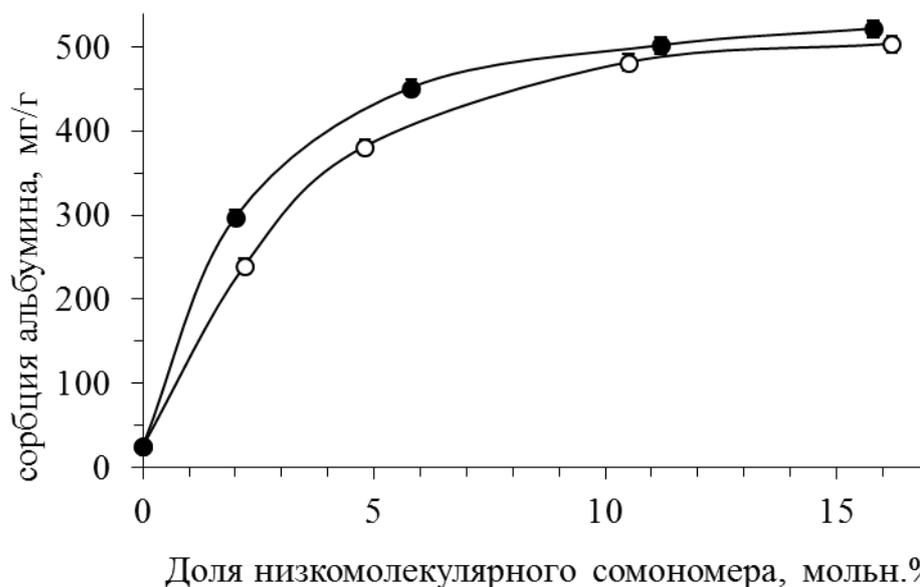


Рисунок 76 - Зависимость количества сорбированного белка (мг альбумина/ г носителя) от концентрации заряженных звеньев в составе полимерных гидрогелей.

Гидрогели: (●) ПВС-ДЭАЭМА, (○)- ПВС-АК.

В силу ионного характера образующихся между сорбируемым белком и поверхностью полимерного гидрогеля, можно было сделать предположение, что количество альбумина связываемого на поверхности носителя будет определяться количества ионогенных групп в составе последнего. И, действительно, как можно наблюдать на приведенном выше рисунке (Рисунок 76) сорбция альбумина на гидрогелевом матриксе увеличивается по мере роста числа заряженных групп в нем, достигая максимума при количестве ионогенных групп порядка 10 мольн.%, при этом емкость гидрогелей, содержащих аминогруппы, увеличивается несколько быстрее, что может быть связано со строением молекулы альбумина, являющегося, как известно «кислым белком». 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.

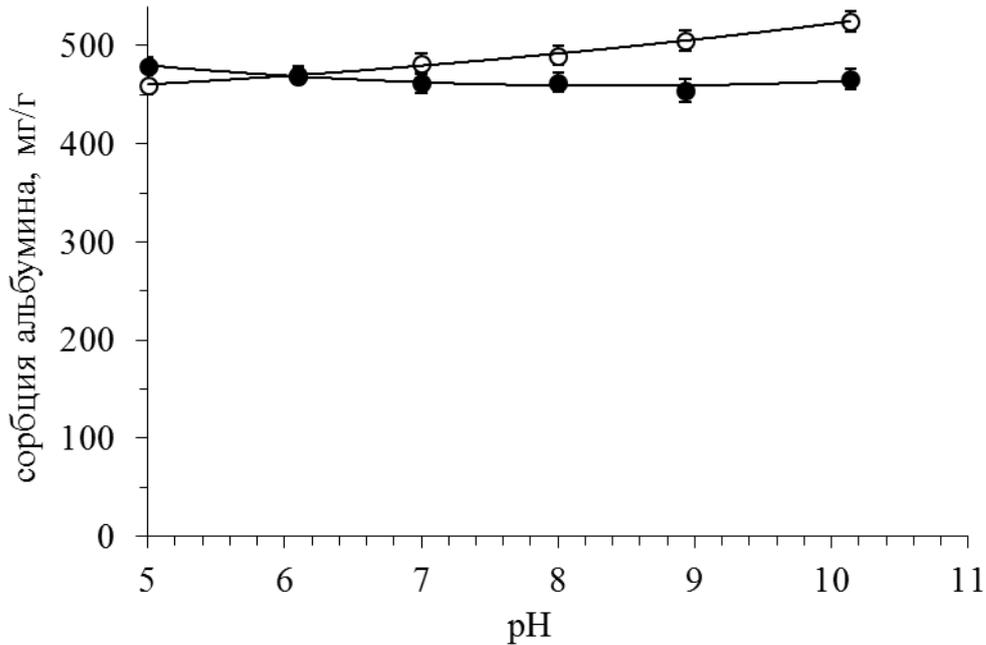


Рисунок 77 - Зависимость количества сорбированного полимерным гидрогелем по альбумину (мг альбумина/ г носителя) от pH раствора.

Гидрогели: (●) ПВС-ДЭАЭМА, (○)- ПВС-АК. Содержание ионогенных групп в составе гидрогелей ~10 мольн. %

Концентрации водородных ионов вблизи поверхности полимерного носителя и в свободном растворе могут заметно отличаться, то есть, иными словами, имеет место определенное их распределение между носителем и средой. Изменения баланса электростатических и водородных связей, происходящие при изменении ионизированного состояния заряженных групп молекул белков, вызываемые взаимодействием с полимерным носителем, обуславливаются типом носителя и природой белка и могут влиять на процесс иммобилизации. Обычно, сорбция белков максимально при значениях величины pH близких к их изоэлектрической точке [259]. Альбумин является «кислым» белком – значение его изоэлектрической точки составляет 4,9, в силу этого можно было ожидать с ростом значения pH раствора некоторого снижения количества белка, сорбируемого на полимерных гидрогелях. В действительности, подобная картина имела место лишь в случае полимерных гидрогелей, содержащих аминогруппы (Рисунок 77). В случае гидрогелей на основе сополимера с акриловой кислотой количество иммобилизованного белка увеличивается с ростом pH. Наблюдаемый

аномальный характер изменения сорбции, очевидно, связан с тем, что имеющееся в действительности снижение сорбции альбумина нивелируется увеличением удельной поверхности носителя, в силу заметного увеличения линейного размера образцов гидрогелей, связанного с заметным ростом их равновесной набухаемости при увеличении величины водородного показателя раствора (Рисунок 73).

### 3.2.2.6 Исследование динамики выделения включённых биологически активных веществ из объема полимерных гидрогелей.

Используемое при получении полимерных гидрогелей, описываемых в настоящей работе, техническое решение делает возможным введение методом «включения в гель» в состав синтезируемых полимерных систем различных биологически активных лигандов, с последующим их выделением из объема полимерного геля [260,261]. В сочетании с практически полным отсутствием в реакционной системе на стадии формирования гидрогеля токсичных соединений данный факт позволяет рассматривать разработанные полимерные гидрогели как весьма перспективную основу для систем с контролируемым выделением лекарственного препарата.

В силу этого нами был проведен ряд экспериментов по включению и изучению динамики выделения из объема гидрогелей модельных лекарственных препаратов. В качестве модельных препаратов, включаемых в гель, использовалось антисептическое лекарственное вещество - известный и широко применяемый в медицине антибиотик рифампицин и ранозаживляющее лекарственное вещество - метилурацил.

Лекарственные препараты вводились как в макропористые полимерные гидрогели, так и композитные системы, в которых макропористый гидрогель играл роль каркаса, обеспечивающего механическую прочность системы, а изотропный гель в пространстве пор обеспечивает пролонгированное выделение препарата.

Кроме того, с целью увеличения сроков выделения лекарственных препаратов их в состав геля вводили в составе наноагрегатов на основе

амфифильных производных поли-N-винилпирролидона любезно предоставленных Кусковым А.Н.

Включение лекарственных препаратов, проводили на стадии синтеза. С целью получения образцов с различной структурой, в частности, различной пористостью условия проведения реакции варьировали.

Для определения скорости выделения включенного лекарственного препарата приготовленные образцы гидрогелей помещали в физиологический раствор (модуль ванны 100) и инкубировали при температуре 37 °С, определяя через заданные промежутки времени концентрации препарата в растворе. Концентрацию определяли спектрофотометрически измеряя интенсивность поглощения при длине волне характерной для используемого лекарственного вещества.

Поскольку скорость выделения лекарственного препарата и макропористых гидрогелей определяется характером их пористой структуры, проводилось изучение влияния общей пористости и среднего размера пор на скорость выделения включаемого лекарственного препарата.

Полученные экспериментальные зависимости приведены ниже.

Как можно видеть, вне зависимости от строения, полученные полимерные системы характеризовались сравнительно высокими скоростями выделения включенного лекарственного препарата. Причем, выделение проходило в два этапа. В первые несколько минут происходило очень быстрое выделение некоторой части включенного препарата (от 10 до 20%), («burst release») после чего выделение существенно замедлялось, причем зависимость количества выделенного вещества от времени, практически на всем протяжении имела линейный характер.

Такой вид зависимости, объясняется, очевидно, тем, что на первом этапе происходит быстрое выделение в раствор несвязанной части лекарственного препарата, находящегося в свободном объеме и на поверхности пор, причем, по мере снижения пористости, как и следовало ожидать, количество вещества в

«burst release» снижается. В дальнейшем же начинается выделение лекарственного препарата, включенного в стенки полимерной матрицы.

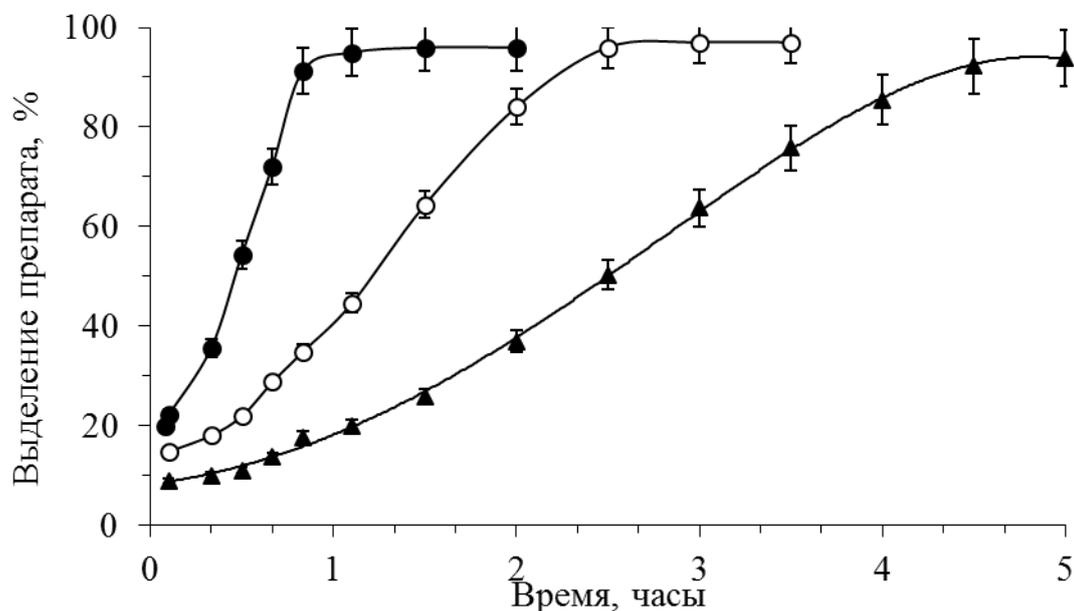


Рисунок 78 – Выделение метилурацила из гидрогелей с различной пористостью. Концентрация лекарственного препарата 5 % мас.

Пористость гидрогелей: (●)- 86,2 %, (○) -72,5 %, (▲)- 51 %

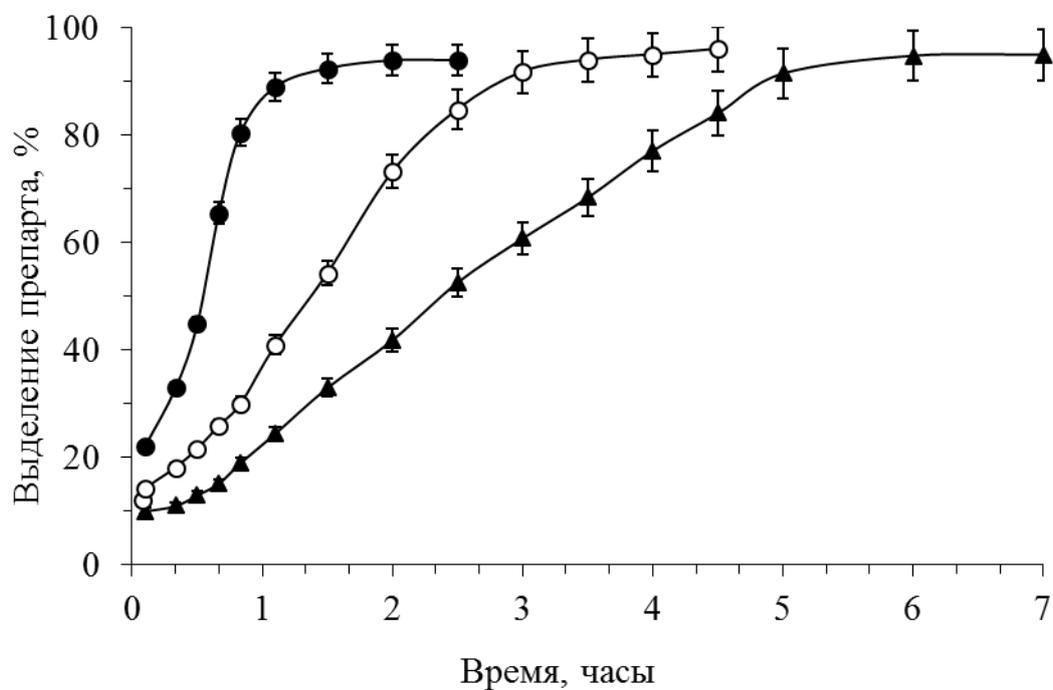


Рисунок 79 – Выделение рифампицина из гидрогелей с различной пористостью. Концентрация лекарственного препарата 5 мас. %.

Пористость гидрогелей: (●)- 84,4 %, (○) -73,5 %, (▲)- 52,6%

Как можно видеть скорость выделения включенного вещества заметно снижается по мере снижения общей пористости системы (Рисунок 78 и Рисунок 79), что, очевидно, обусловлено снижением удельной поверхности гидрогелевого материала, а также, возможно, возникновением больших диффузионных затруднений, связанных с увеличением толщины «перегородок» полимерной части гидрогеля.

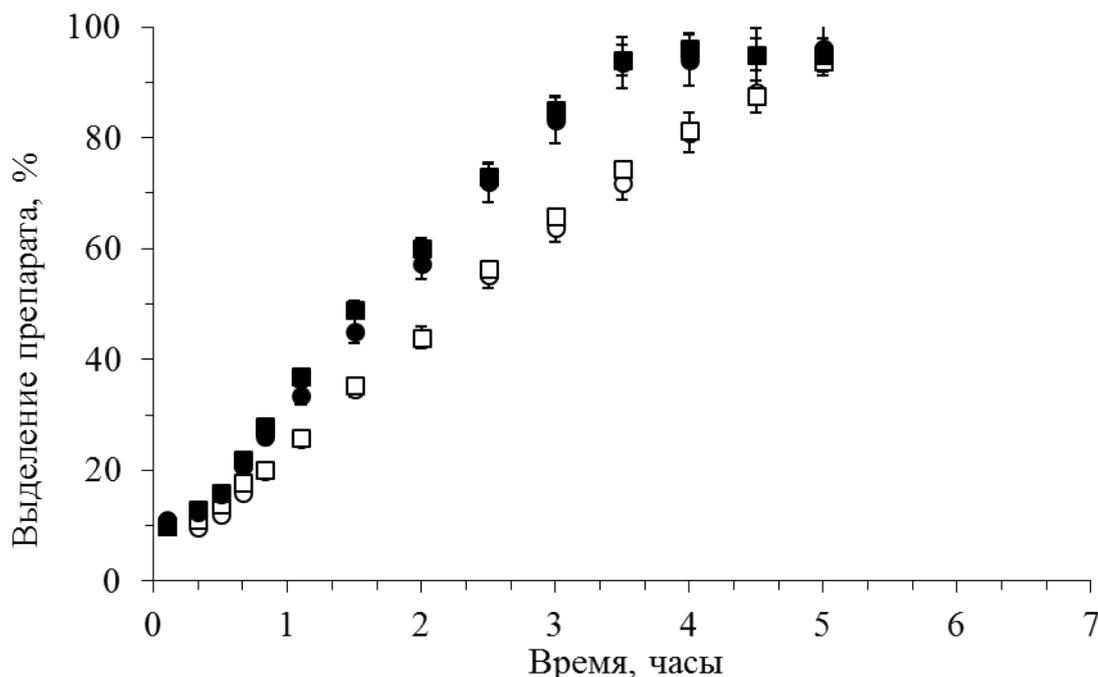


Рисунок 80 - Выделение метилурацила (■,●) и рифампицина (□,○) из гидрогелей с различным средним размером пор и близкой общей пористостью. Концентрация лекарственного препарата 5 мас.-%

Размер пор и общая пористость гидрогелей: ■ - 25,67 мкм, 79,6 %; ● - 31,67 мкм, 81,6 %; □ – 26,45 мкм, 74,3 %; ○- 33,21 мкм, 75,8 %

Кроме того, возможно некоторое влияние изменения частоты сшивок между цепями полимера, образующих полимерную сетку. Однако, как было показано выше (Таблица 8 (страница 126)), условия проведения полимеризации в криоусловиях незначительно влияют на параметры сетки образующихся гидрогелей, в силу чего с большой долей уверенности можно утверждать, что влияние частоты сшивки, по сравнению с влиянием общей пористости системы,

весьма мало и, вряд ли, существенно может сказаться на динамике выделения веществ, включенных в синтезированные гидрогелевые системы.

Изучение динамики выделения включенного лекарственного препарата из образцов с близкой пористостью, но различным средним размером пор (Рисунок 80) показало, что для исследованных макропористых гидрогелевых систем размер пор не оказывал существенного влияния на характер выделения как метилурацила, так и рифампицина. Это, очевидно, связано с тем, что молекулы использованных в качестве модельных веществ обладают малыми по сравнению с порами гидрогелей размерами. В силу этого, по мере уменьшения размера пор при сохранении общей пористости (и как следствие удельной поверхности) на примерно одинаковом уровне не возникает значительных диффузионных затруднений, ведущих к замедлению выделения включенного в гидрогелевую матрицу лекарственного препарата.

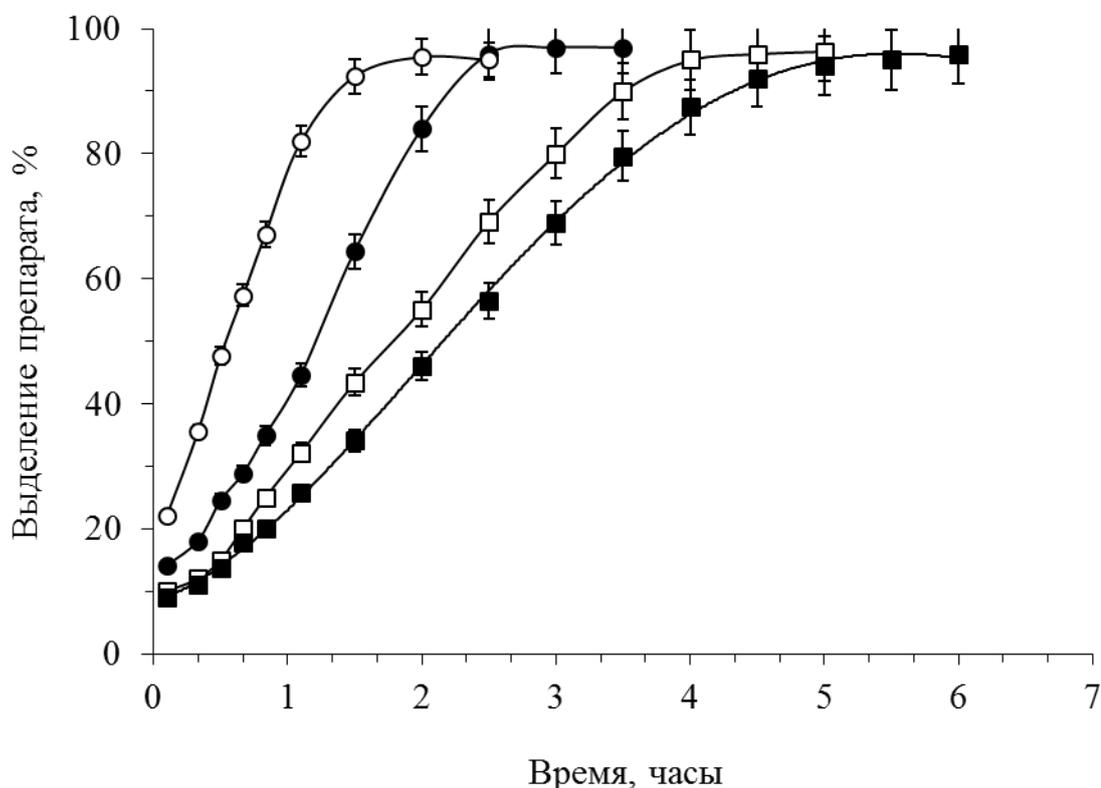


Рисунок 81 - Выделение метилурацила при различном количестве включенного вещества.

Концентрация метилурацила: ○-2,5; ●-5; □-7,5; ■-10 мас.%

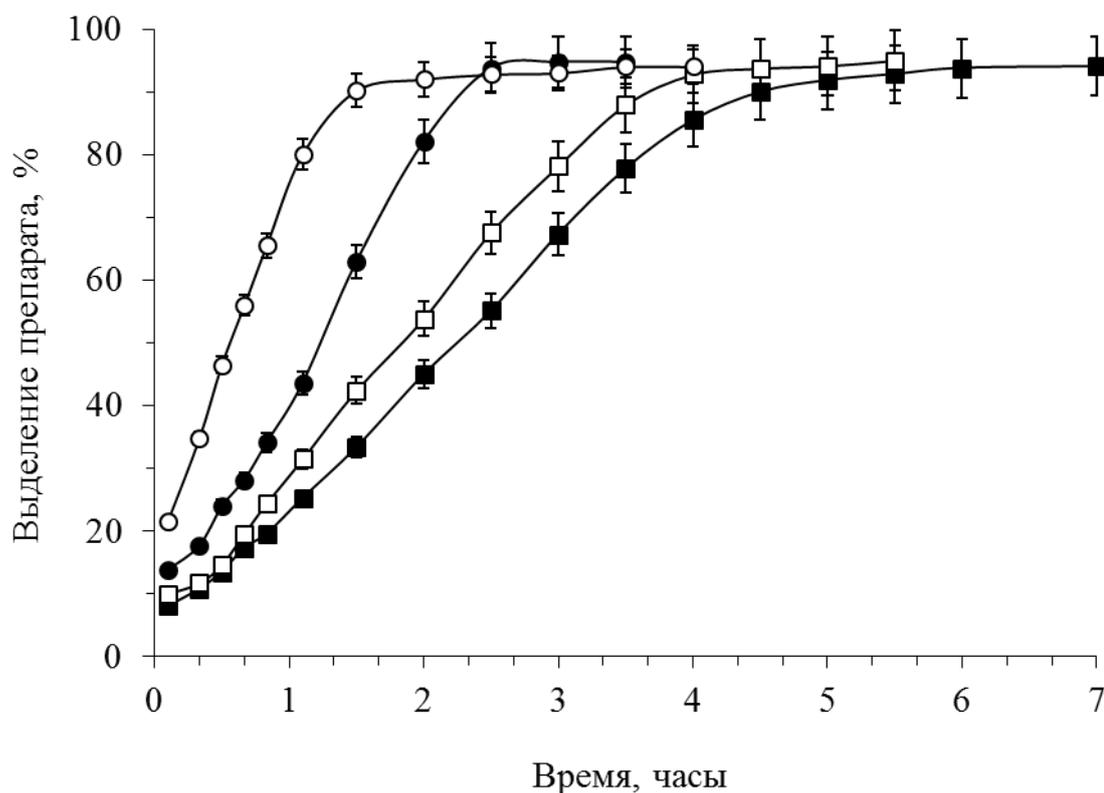


Рисунок 82 - Выделение рифампицина при различном количестве включенного вещества.

Концентрация рифампицина: ○-2,5; ●-5; □-7,5; ■-10 мас.%

На рисунках приведенных выше (Рисунок 81, Рисунок 82) приведены кривые выделения лекарственного препарата при его различном содержании в синтезированных полимерных системах.

Как и следовало ожидать, время полного выделения лекарственного препарата возрастает по мере роста его количества в объеме гидрогеля, однако, в целом, остается сравнительно малым, не превышая 6-7 часов.

Таким образом, можно утверждать, что несмотря на неплохие механические и эксплуатационные свойства макропористых гидрогелевых систем в силу их чрезвычайно развитой удельной поверхности и наличия макропор, не создающих значимых диффузионных затруднений для выделяющегося лекарственного препарата, они характеризуются сравнительно высокой скоростью выделения включаемых препаратов. Что в ряде случаев практического применения является неприемлемым.

В силу этого были рассмотрены системы на основе изотропных (непористых) гидрогелей, образующихся при положительных температурах. Очевидно, что в этом случае сравнительно плотная сшитая сетка полимера, не содержащая системы пор, должна создавать значительные диффузионные затруднения для молекул выделяемого вещества. И действительно, как можно видеть на рисунках, приведенных ниже (Рисунок 83, Рисунок 84) в случае изотропных гидрогелей время выделения включенного лекарственного препарата значительно возрастает. В ряде случаев для полного выделения препарата не было достаточно и 3 суток. (Продолжительность времени измерения ограничена этим сроком в связи со значительным увеличением погрешности измерения концентрации при длительных сроках инкубации, связанных, очевидно, с разрушением модельных лекарственных препаратов).

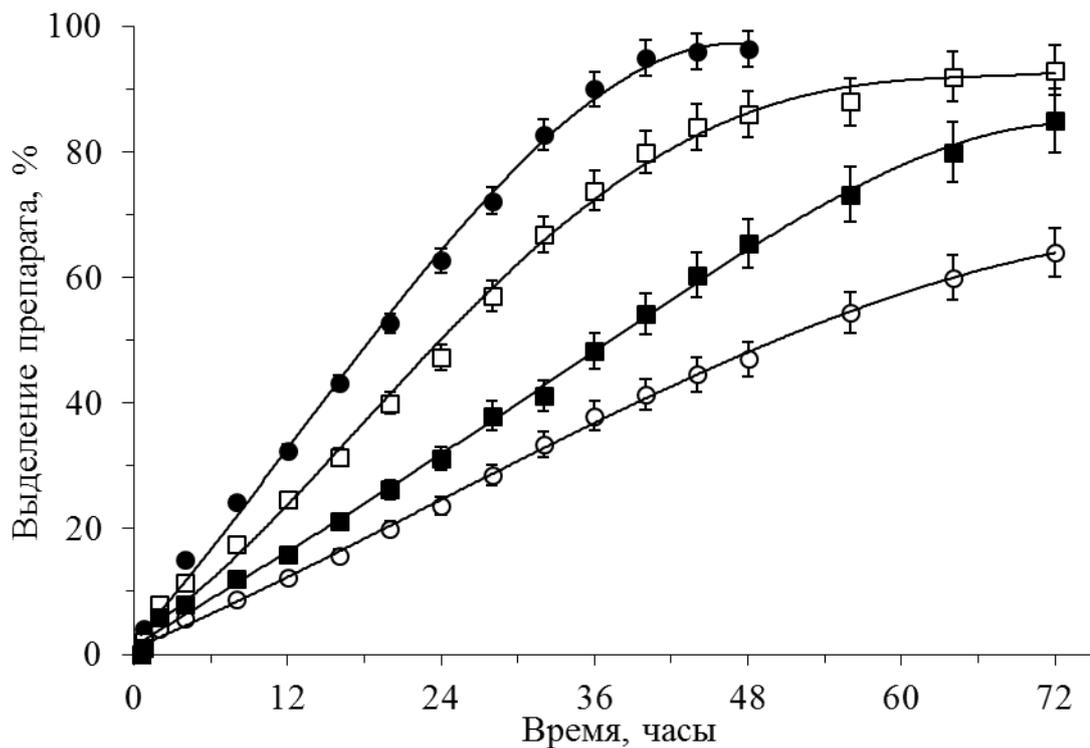


Рисунок 83 – Выделение метилурацила из изотропных гидрогелей, полученных при различных значениях концентрации макромера в реакционной системе.

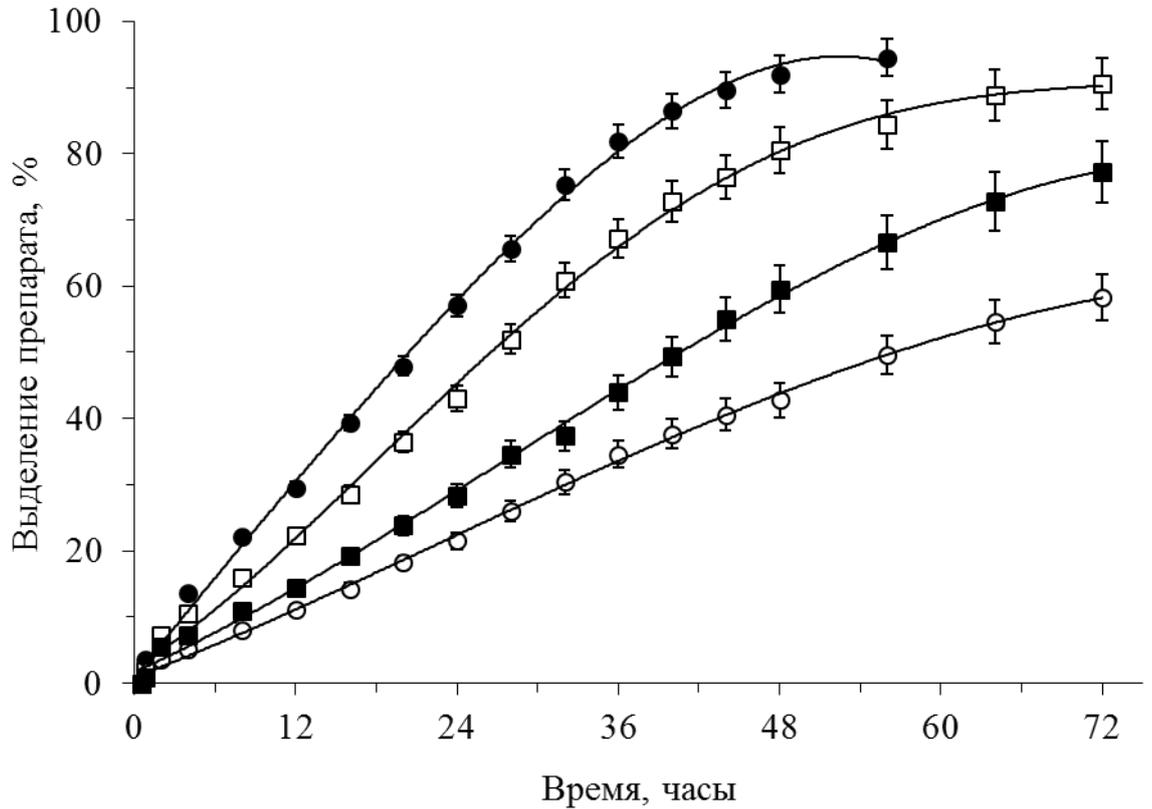


Рисунок 84 - Выделение рифампицина из изотропных гидрогелей, полученных при различных значениях концентрации макромера в реакционной системе

Как можно также видеть, в отличие от макропористых гидрогелей в случае изотропных систем при выделении включенного вещества практически отсутствовал «burst release» на начальной стадии десорбции, что связано с тем, что практически весь включаемый препарат находится в плотно сшитой сетке полимера.

При этом, как и следовало ожидать, скорость выделения лекарственного препарата монотонно уменьшается с ростом концентрации реакционной системы при отверждении. Данный факт объясняется увеличением плотности сшивки полимерной сетки (Таблица 6, (страница 91)) и, как следствие, ростом диффузионных затруднений при десорбции.

Между тем, несмотря на существенное увеличение сроков десорбции включенного вещества при переходе от макропористых к изотропным системам,

механическая прочность и как следствие эксплуатационные свойства образующихся систем существенно ухудшается.

С этих позиций весьма привлекательным представлялось создание «гибридных» систем, в которых макропористый гидрогель обеспечивал бы механическую прочность, а изотропный – значительные сроки выделения лекарственного препарата.

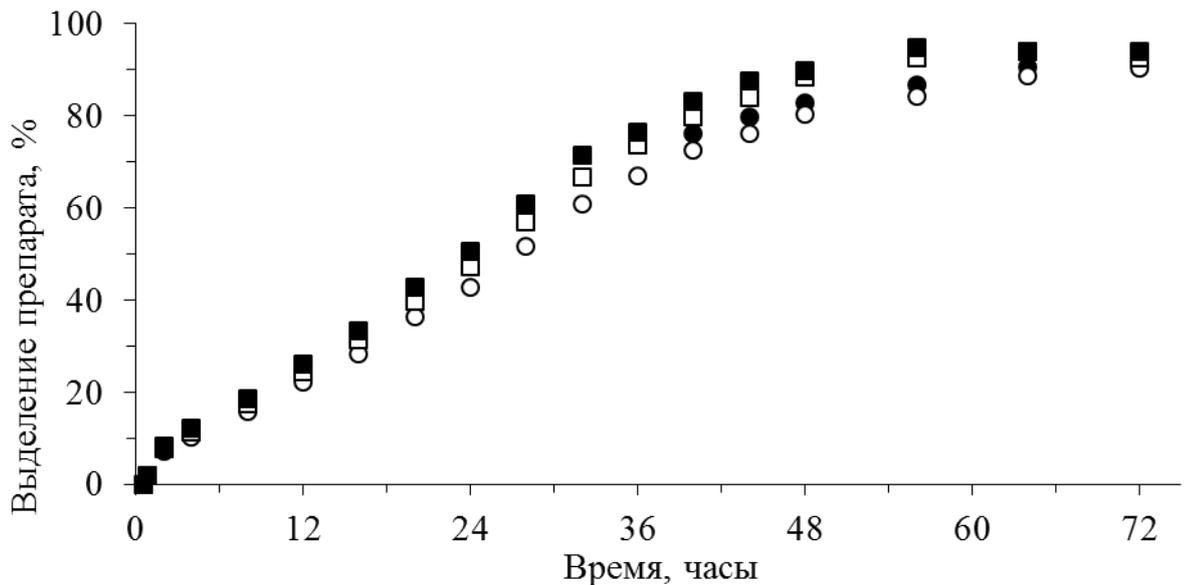


Рисунок 85 – Выделение рифампицина (●,○) и метилурацила (■, □) из изотропных гидрогелей (○,□) и «гибридных» (●,■) систем.

Поэтому нами была получена серия подобных композиций, в которых предварительно приготовленный макропористый гидрогель играл роль своеобразного каркаса. Для этого предварительно полученный образец лиофильно высушенного макропористого гидрогеля помещали в раствор макромера, содержащий лекарственный препарат и иницирующую систему (для всех образцов в качестве каркаса использовался макропористый гидрогель, полученный при следующих условиях: концентрация реакционной системы 4 г/100 мл, температура - минус 15 °С).

Как можно видеть из типичных зависимостей, приведенных на рисунке выше (Рисунок 85), подобная модификация достаточно слабо влияла на динамику выделения включенного в объем гидрогеля вещества, что связано с относительно

малым объемом полимерной части пористого гидрогеля-«каркаса» (~6 %) и ее развитой пористой структурой, характеризующейся высокой проницаемостью.

Еще одним из известных способов, позволяющих снизить скорость выделения лекарственного препарата, является его включение в наноагрегаты, имеющие большие размеры по сравнению с его индивидуальными молекулами и, как следствие, испытывающими большие диффузионные затруднения при десорбции из сшитой полимерной сетки.

С этой целью были синтезированы пористые системы, содержащий наноагрегаты на основе амфифильного поли-N-винилпирролидона с включенным лекарственным препаратом (Рисунок 86). Наночастицы были получены в сотрудничестве с Кусковым А.Н. по известным методикам [262]. Соотношение включенного модельного вещества и амфифильного полимера составляло 1:1 для всех синтезированных систем.

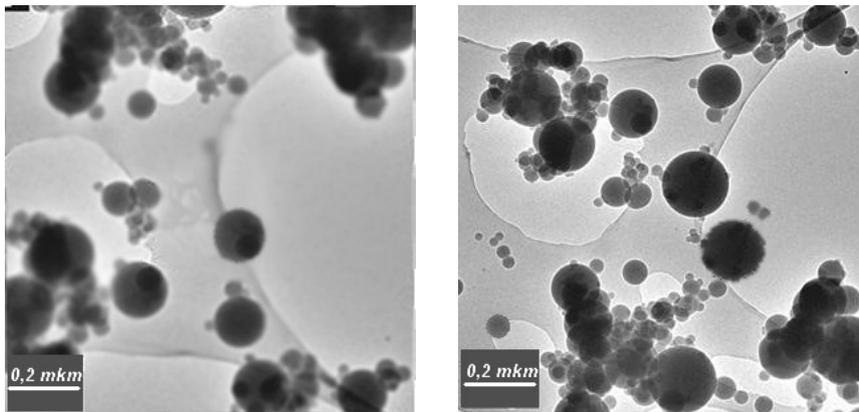


Рисунок 86 – Примеры ТЭМ-микрофотографий образцов гидрогелей с включенными наноагрегатами, содержащими лекарственные препараты

Как можно видеть ниже, иммобилизация модельных лекарственных препаратов в наночастицы ожидаемо позволила значительно увеличить время их выделения из макропористых полимерных систем.

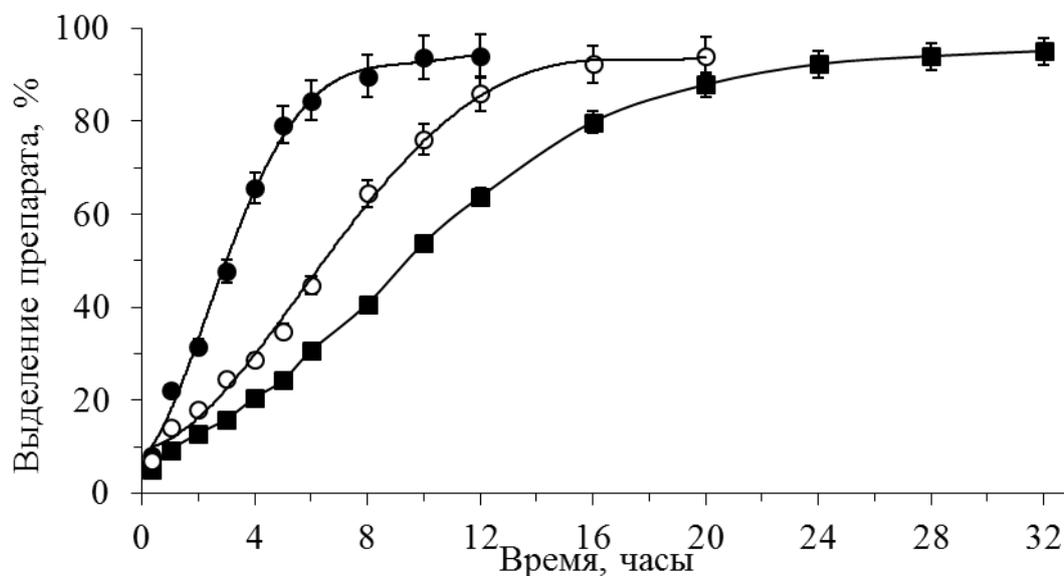


Рисунок 87 – Выделение метилурацила, включенного в наноагрегаты из гидрогелей с различной пористостью (концентрация лекарственного препарата 5 мас. %)

Пористость гидрогелей: (●)- 83,7 %, (○) -72,5 %, (▲)- 51,3%

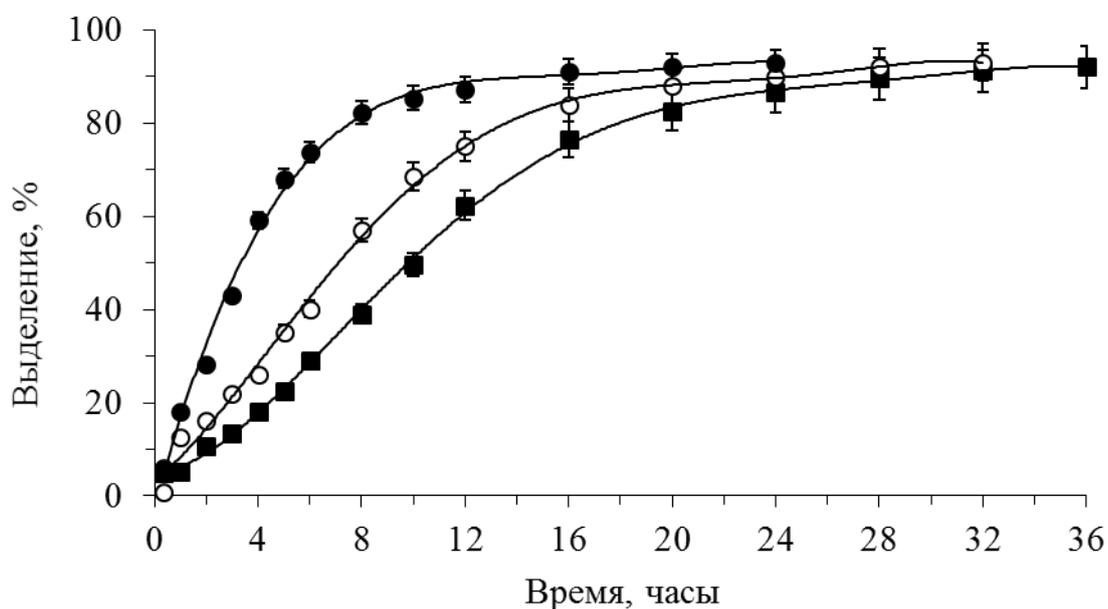


Рисунок 88 – Выделение рифампицина, включенного в наноагрегаты из гидрогелей с различной пористостью (концентрация лекарственного препарата 5 мас. %)

Пористость гидрогелей: (●)- 81,4 %, (○) -73,1 %, (▲)- 52,2%

Причем общий вид зависимостей совпадал с зависимостями, полученными при изучении выделения «нативных» лекарственных препаратов. Так же, как и в случае зависимостей, описанных выше, на кривых выделения включенного вещества на начальных стадиях имело место быстрое выделение части включенного препарата (хотя данный эффект был несколько меньше), в дальнейшем же зависимость выхода от времени имела характерный S-образный вид.

Также как и в случае включения «неагрегированных» форм препаратов, скорость их выделения в водные среды в значительной степени определялась общей пористостью гидрогеля (Рисунок 87, Рисунок 88), хотя различия между скоростями выделения из гидрогелей с различной пористостью в случае наноагрегатов были менее явными.

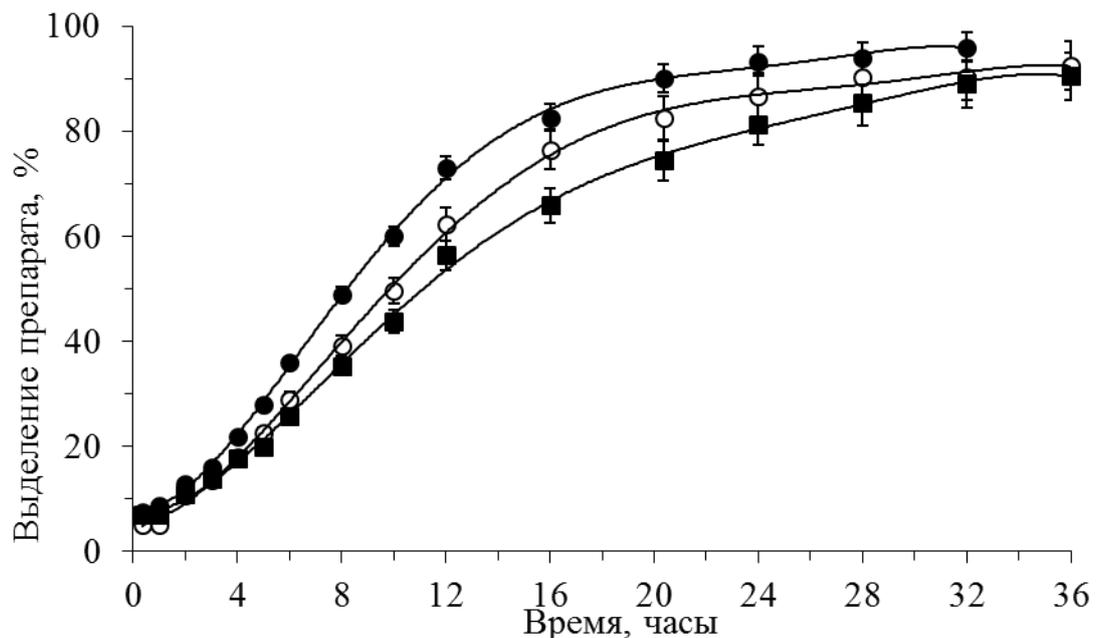


Рисунок 89 - Выделение метилурацила, включенного в наноагрегаты, из гидрогелей с различным размером, но близкой общей пористостью. Концентрация лекарственного препарата 5 % мас.

Размер пор и общая пористость гидрогелей: (■) - 26,21 мкм, 82,6 %; (○) - 31,21 мкм, 81,8 % (●) - 35,34 мкм, 81,0 %

В случае же гидрогелей с близкой пористостью, но различным размером пор имело место явное снижение скорости выделения для систем с более мелкими порами (Рисунок 88, Рисунок 89). Очевидно, это объясняется существенно большим размером включаемых частиц (десятки нанометров (Рисунок 86)), и, как следствие, увеличением диффузионных затруднений с увеличением доли фракции более мелких пор в гидрогеле.

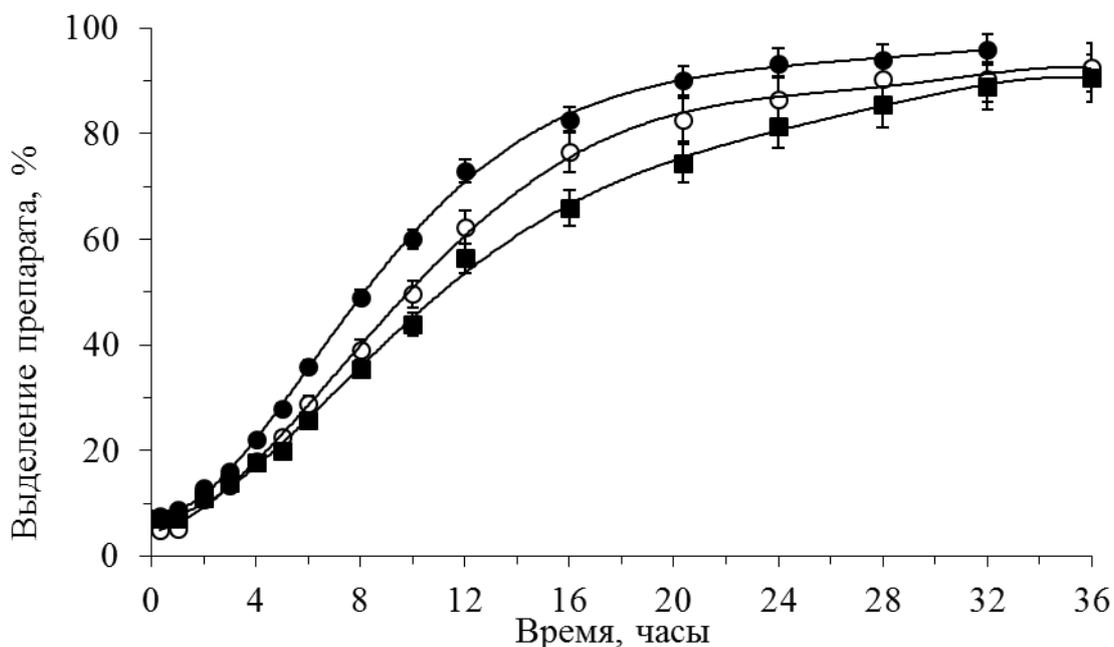


Рисунок 90 - Выделение рифампицина, включенного в наноагрегаты, из гидрогелей с различным размером, но близкой общей пористостью. Концентрация лекарственного препарата 5 % мас.

Размер пор и общая пористость гидрогелей: (■) - 27,34 мкм, 81,2 %; (○) - 32,56 мкм, 79,8 % (●) - 36,05 мкм, 81,9 %

Таким образом, можно утверждать, что на основе разработанных полимерных гидрогелей могут быть получены системы с контролируемым выделением лекарственного препарата. Причем время выделения включаемого препарата посредством изменения структуры формируемого гидрогеля и использования наночастиц лекарственных препаратов может регулироваться в широком интервале значений - от нескольких часов до нескольких суток.

### 3.3 Изучение биосовместимости полимерных гидрогелей

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, полученным в данной работе. Поэтому значительное внимание в ней уделено различным аспектам, связанным с биосовместимостью синтезированных макромолекулярных систем

#### 3.3.1 Изучение токсичности полимерных гидрогелей поливинилового спирта

При применении медицинских изделий в клинической практике существует вероятность миграция из различных их узлов и материалов разнообразных соединений в дозах, превышающих безопасные уровни. Для полимерных композиций медицинского назначения потенциально опасными соединениями являются примеси в используемом сырье, технологические и функциональные добавки, вносимые в процессе переработки (растворители, катализаторы, модификаторы, красители и др.), соединения, образовавшиеся в результате деструкции полимера, стерилизующие и дезинфицирующие агенты, а также продукты их превращений, в определенных концентрациях представляющие опасность для организма [263 - 265].

Это в полной мере относится и к разработанным в настоящем исследовании гидрогелевым материалам. Свой вклад в потенциальную токсичность разработанных гидрогелевых материалов могут вносить не только сама полимерная основа материалов, но и продукты их превращений, остаточные количества низкомолекулярных химических соединений, примеси в используемом сырье, продукты распада материала в условиях стерилизующего воздействия (нагрев,  $\gamma$ -облучение). Среди них: формальдегид, ацетальдегид, растворители, металлы, которые могут присутствовать в используемом сырье, а также попадающие в материалы в процессе их получения [265, 266].

Комбинированное действие веществ, которые в случае миграции могут накапливаться в организме, повышает опасность применения полимерных

материалов. В силу этого важной составляющей любых токсикологических исследований является идентификация, определение концентрации выявленных потенциально опасных соединений и сопоставление этих концентраций с допустимыми значениями. Помимо этого, к основным эффектам, изучаемым при изучении токсичности, относят:

- цитотоксичность – повреждающее действие на культивируемые клетки каких-либо факторов (физических, химических, биологических);
- гемолитическое действие – повреждающее действие на клеточную стенку эритроцитов крови каких-либо факторов (физических, химических, биологических), вызывающих ее разрушение – лизис;
- аллергенное действие, сенсibilизация и гиперчувствительность замедленного типа – аллергическая реакция с вовлечением иммунной системы, активизирующейся результате предварительной кожной сенсibilизации;
- раздражающее действие – локализованная воспалительная реакция вызываемая однократным, повторным или продолжительным воздействием исследуемого вещества без вовлечения иммунного механизма;
- общетоксическое действие – токсическое действие на весь организм;
- острая токсичность - неблагоприятный эффект, который возникает после введения однократной или многократных доз исследуемой пробы в течение 24 часов;
- подострая токсичность - неблагоприятный эффект, возникающий после ежедневного введения однократной или многократных доз исследуемой пробы в течение 14-28 дней;
- хроническая токсичность - неблагоприятный эффект, возникающий после ежедневного введения однократной или многократных доз исследуемой пробы в течение части общей продолжительности жизни (обычно 90 дней).

3.3.1.2 Изучение концентрации потенциально опасных соединений в составе образцов полимерных гидрогелей на основе поливинилового спирта

При моделировании условий исследования изучаемых полимерных материалов должны учитываться особенности применения их в клинической

практике. В силу того, что в процессе исследования не могут быть воссозданы абсолютно все эти особенности (продолжительность применения, влияние биосред, и т.п.), согласно общепринятой практике условия исследования были аггравированы [267].

В качестве модельной среды нами была выбрана дистиллированная вода, которая, является простейшей моделью биосред и обладает высокой экстракционной способностью, в силу чего включена в качестве обязательной модельной среды в стандарты по оценке безопасности материалов и изделий медицинского назначения [267,268]. На фоне дистиллированной воды можно обнаружить ряд закономерностей, выявление которых на фоне более сложных по составу модельных сред затруднено.

Соотношение между массой анализируемых образцов (M) и объемом контактирующей модельной среды (V), соответствующим объему крови в организме человека, равному 5000 мл, рассчитывалось из уравнения:

$$\frac{M}{V} = \frac{m}{v} k, \quad (3.4.1)$$

где m – максимальная масса материала при его практическом применении, k – коэффициент аггравации, равный 10.

Исследования образцов проводились при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , близкой к температуре тела человека [267,268].

Готовые к испытаниям образцы заливали дистиллированной водой в указанном соотношении и термостатировали в течение 14 суток в «динамическом» режиме, для обеспечения которого на 3-и и 7-е сутки вытяжки сливали и анализировали, а к образцам добавляли новые порции модельной среды того же объема. Использование «динамического» режима отчасти учитывает особенности применения биоматериалов, омываемых постоянно сменяющейся порцией контактирующей среды (кровью).

В качестве контрольного раствора в исследованиях использовали дистиллированную воду, которую термостатировали в тех же условиях.

О свойствах гидрогелей судили по содержанию в полученных вытяжках химических соединений, мигрирующих из их объема. Для оценки суммарного содержания этих химических соединений использовался общепринятый набор интегральных показателей: содержание восстановительных примесей, определяемое по расходу 0,01 М раствора тиосульфата натрия, затраченного на их определение ( $\Delta V$ , мл); изменение значения рН вытяжки по сравнению с контролем ( $\Delta$  рН, ед. рН); максимальное значение оптической плотности в области длин волн от 220 до 360 нм ( $D$ , ед. ОП) [268,<sup>269</sup>].

Вытяжки из изучаемых образцов контролировались также на содержание в них ГМА, формальдегида, ацетальдегида, ацетона, водорастворимых форм металлов [266]. Для количественного определения концентраций этих соединений использовали хроматографические методы

Для определения концентраций растворенных форм металлов (свинца, кадмия, железа, бария, меди, олова, хрома, алюминия, мышьяка) в вытяжках использовался метод атомно-абсорбционной спектрометрии [<sup>270</sup>, <sup>271</sup>].

Как можно видеть из полученных данных (Таблица 9), как и следовало ожидать, наибольшие значения интегральных показателей наблюдались для образцов, представляющих собой растворы, отвержденные непосредственно перед проведением испытаний и не подвергавшиеся отмывке. Однако даже в этом случае величина показателей была значительно меньше нормативных.

В 3-суточных вытяжках из образцов всех трех типов обнаружены альдегиды: формальдегид и ацетальдегид. На представленной в качестве примера типичной хроматограмме (Рисунок 91), полученной после перевода альдегидов в соответствующие 2,4-динитрофенилгидразоны, можно видеть пики со временем удерживания формальдегида (3,98 мин.) и ацетальдегида (4,96 мин.).

Однако стоит при этом отметить тот факт, что в течение всего периода исследования (14 суток) концентрации формальдегида в вытяжках из образцов всех трех типов не превысили безопасный уровень (Таблица 9).



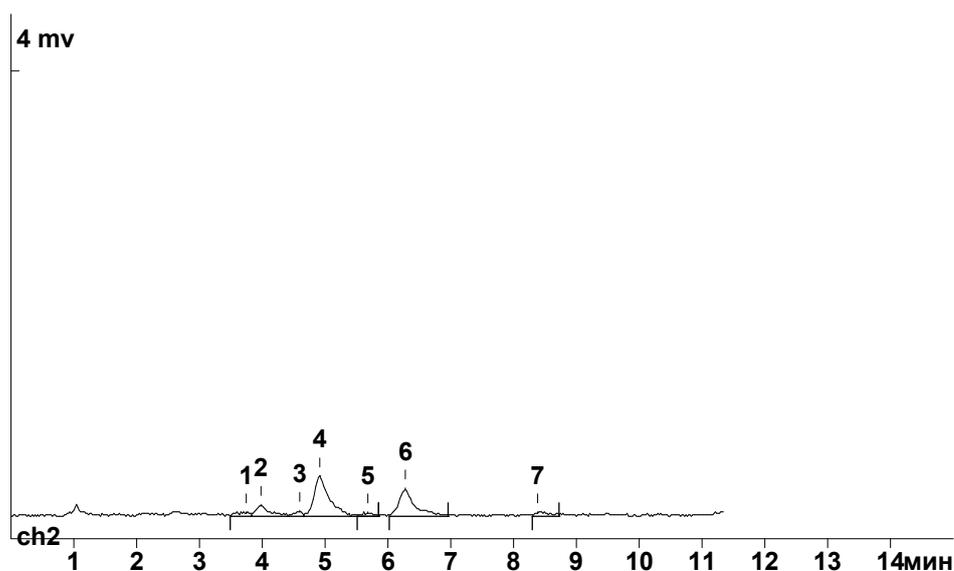


Рисунок 91 - Хроматограмма 3-х суточной вытяжки из образцов макропористого гидрогеля поливинилового спирта. Пик 2-формальдегид, концентрация  $0,017 \pm 0,001$  мг/л. Пик 4-ацетальдегид, концентрация  $0,091 \pm 0,006$  мг/л

Наименьшее количество формальдегида и ацетальдегида обнаружено в вытяжках образцов, представляющих собой гидрогели, полученные из растворов для сшивания, приготовленные для получения гидрогелей и стерилизованные фильтрованием, что позволяет сделать предположение о том, что обнаруженные альдегиды образуются в системе как продукты деструкции поливинилового спирта в условиях радиационной и термической стерилизации, использованной для макропористых и изотропных гидрогелевых материалов, соответственно.

В вытяжках из образцов всех трех типов глицидилметакрилат в пределах чувствительности определения ( $0,005$  мг/л) в течение всего периода исследования обнаружен не был.

Ацетон был обнаружен в 3-, 7- и 14-суточных вытяжках из образцов, однако концентрации его (от  $0,154 \pm 0,005$  до  $0,185 \pm 0,007$  мг/л) не превысили фоновый уровень ( $0,280 \pm 0,009$  мг/л).

В процессе исследований также проводилась идентификация и определение содержания потенциально опасных водорастворимых форм

металлов, присутствие которых характерно для полимерных материалов (барий, железо, кадмий, медь, олово, свинец, хром, цинк, мышьяк) и керамики (кадмий, алюминий, цинк, титан, барий) [266].

В результате ни один из перечисленных металлов в вытяжках из изучаемых образцов в течение всего периода исследования в пределах чувствительности определения, которая составляет (мг/л): для алюминия – 0,005; титана – 0,001; мышьяка – 0,001; цинка – 0,001; кадмия – 0,0001; бария – 0,01; свинца – 0,001; меди – 0,001; олова – 0,02; хрома – 0,001; железа – 0,001 обнаружен не был. Следует отметить, что чувствительности определения указанных металлов значительно ниже (на один – четыре порядка) соответствующих допустимых значений (мг/л): для алюминия – 0,500; титана – 0,100; мышьяка – 0,050; цинка – 1,000; кадмия – 0,001; бария – 0,100; свинца – 0,030; меди – 1,000; олова – 1,00; хрома – 0,100; железа – 0,300 [266].

Таким образом, можно утверждать, что исследованные гидрогелевые материалы удовлетворяют санитарно-химическим требованиям, предъявляемым к материалам, предназначенным для создания изделий медицинского назначения.

### 3.3.1.2 Исследование токсичности полимерных гидрогелей поливинилового спирта

Для оценки токсичности разработанных гидрогелей на основе поливинилового спирта, использовался комплекс стандартных методов, таких как: изучение гемолитической активности (гемолитический тест), цитотоксического действия с определением индекса токсичности при воздействии на биологический клеточный тест-объект, а также исследование этих материалов в условиях острого, подострого и хронического токсикологического экспериментов «in vivo». Также проводились исследования по изучению раздражающего и сенсибилизирующего действия образцов полимерных гидрогелей.

Оценку гемолитического действия водных вытяжек проводили в опытах «in vitro» с изолированными эритроцитами кроликов: Метод основан на сравнении оптической плотности суспензии вытяжек с кровью и оптической плотности раствора при 100% гемолизе [272, 273].

$$\% \text{гемолиза} = \frac{E_{\text{опт}} - E_{\text{к}}}{E_{100}} \times 100, \quad (3.4.2)$$

где  $E_{\text{опт}}$  - оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{к}}$  - оптическая плотность контрольной пробы;

$E_{100}$  - оптическая плотность пробы со 100 %-ным гемолизом.

Исследуемые вытяжки из образцов можно считать свободными от гемолитически действующих веществ, если процент гемолиза, определяемый по формуле (3.4.2), имеет значение менее двух. Процент же гемолиза экстрактов всех образцов не превышал значений от 0 до 0,15 % (Таблица 10).

Таблица 10 - Результаты исследования гемолитической активности и цитотоксичности вытяжек из образцов гидрогелей

Изучаемые материалы	Гемолитическая активность (допустимое значение - не более 2,0%)	Цитотоксичность (допустимое значение - индекс токсичности 70-120%)
Макропористые гидрогели	0%	95,0%
Изотопные гидрогели	0,08%	99,0%
Гель, образованный сшивкой растворенного полимера «in situ»	0,15%	75,0%

Для оценки цитотоксического действия водных вытяжек из образцов использовали суспензионную кратковременную культуру подвижных половых клеток, приготовленную из замороженной спермы крупного рогатого скота, с последующим определением индекса токсичности по формуле [276].

$$I_t = \frac{t_{cp}^0}{t_{cp}^k} \times 100\%, \quad (3.4.3)$$

где  $t_{cp}^0$  и  $t_{cp}^k$  - средние арифметические значения времени подвижности соответственно для опытной и контрольной выборок образцов

Было обнаружено, что вытяжки из исследуемых образцов не оказывали отрицательного воздействия на жизнеспособность биологического клеточного тест-объекта (индекс токсичности составил 75,0-99,0% (допустимый уровень - 70-120%)), однако, стоит отметить, что образцы полученные, отверждением раствора, как и следовало ожидать, показали самый близкий к нижней границе нормы индекс токсичности.

Острое общетоксическое действие вытяжек образцов гидрогелей изучали на белых беспородных мышах массой 20-22 г, разделенных на подопытные и контрольную группы по 20 голов в каждой. Содержание животных полностью соответствовало санитарным нормам [274,275].

Подопытным животным однократно внутрибрюшинно вводили по 1 мл вытяжек (из расчета 50 мл/1кг массы тела). Контрольные животные в том же режиме получали дистиллированную воду. Температура вводимых растворов составляла  $37 \pm 1,5^\circ\text{C}$ .

В течение эксперимента оценивали общее состояние животных, изменение внешнего вида, поведения, двигательной активности, контролировали прирост массы тела. По окончании эксперимента животных забивали методом декапитации, макроскопически оценивали состояние брюшины и внутренних органов, определяют органо-соматические показатели (ОСП), рассчитываемые как соотношение массы органа в миллиграммах к массе тела в граммах.

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента «t» [276].

При проведении эксперимента в течение всего периода наблюдения не было отмечено случаев гибели животных, внешних проявлений интоксикации, как в опыте, так и в контроле.

Макроскопически состояние внутренних органов и брюшины в месте введения вытяжек соответствовало контролю и физиологической норме. Как можно видеть из приведенных данных (Таблица 11), статистически достоверных изменений массы тела и ОСП (органо-соматических показателей) у подопытных животных по сравнению с контрольной группой не наблюдалось.

Таблица 11 - Органо-соматические показатели (ОСП) животных, подвергавшихся воздействию вытяжек из образцов гидрогелей

Исследуемые материалы	Масса тела, г	ОСП (печень)	ОСП (почки)	ОСП (селезенка)
Контроль	18,60±0,44	45,97±3,47	14,47±0,69	3,62±0,49
Макропористые гидрогели	18,56±0,38	48,36±4,01	14,91±0,97	3,99±0,61
Изотопные гидрогели	18,84±1,04	49,04±3,59	15,08±0,77	4,08±0,82
Гели, образованные сшивкой растворенного полимера «in situ»	19,20±0,98	47,35±2,95	14,95±0,57	3,98±0,56

Сенсибилизирующее действие изучали по стандартной методике, оценивая степень кожной реакции [274] и с использованием диагностического метода специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ), рассчитываемого по формуле:

$$\text{Показатель РСЛЛ} = \frac{L_{\text{контроль}} - L_{\text{опыт}}}{L_{\text{контроль}}} \times 100\%, \quad (3.4.4)$$

где  $L_{\text{контроль}}$  – количество лейкоцитов в пробе без аллергена

$L_{\text{опыт}}$  – количество лейкоцитов в пробе с вытяжкой

Реакцию расценивают как положительную при показателе РСЛЛ выше 10%. Показатель РСЛЛ превышающий 20 % свидетельствует о высоком уровне сенсибилизации животных.

Как можно видеть из приведенных данных (Таблица 12), вытяжки из образцов не обладали сенсибилизирующим действием, о чем свидетельствует отсутствие кожной реакции на аппликационных участках, а также в месте

проведения предварительной сенсибилизации и провокационной внутрикожной пробы, значения показателей РСЛЛ и соотношение ОСП (органо-соматические показатели) иммунокомпетентных органов (Таблица 12).  
Таблица 12 - Результаты изучения сенсибилизирующего действия экспериментальных образцов

Изучаемые Материалы	Реакция кожи в баллах (не более 0-1 балла)	РСЛЛ	Соотношение ОСП иммунокомпетентных органов
Контроль	0-0,4	Менее 10,0%	0,567 ± 0,099
Макропористые гидрогели	0-0,4	Менее 10,0%	0,501±0,040
Изотопные гидрогели	0-0,4	Менее 10,0%	0,426±0,069
Гель, образованный сшивкой растворенного полимера «in situ»	0-0,4	Менее 10,0%	0,455±0,079

Изучение подострой и хронической токсичности гидрогелевых материалов проводили на беспородных белых крысах-самцах, являющихся наиболее подходящим видом животных для проведения токсикологических исследований.

Испытания проводили для макропористых полимерных гидрогелей и изотропных гидрогелей, которые формировали «in vivo» посредством сшивки раствора ненасыщенного производного поливинилового спирта («раствор для отверждения»). Исследование приготовленных заранее и очищенных изотропных гидрогелей было признано нами избыточным.

Стерильные растворы для отверждения «in vivo» после добавления к содержимому иницирующей системы вводили с помощью шприца подкожно в область спины подопытным животным. Пористые лиофильно высушенные образцы в виде специально изготовленных образцов помещали для набухания в изотонический раствор, после чего под медикаментозным наркозом (препарат зоолетил в дозе 15 мг/кг) имплантировали подопытным животным

подкожно в область спины. Контрольным животным в тех же условиях вживляли образцы медицинского стекла марки ВС-3 ГОСТ 19808.

Расчет массы имплантата (вводимого раствора) проводили по формуле:

$$m = \frac{M}{P} \cdot p \cdot K \quad (3.4.5)$$

где М - максимальное количество для одного пациента;

Р - средняя масса тела человека (70 кг);

р- средняя масса тела подопытных животных (0,250 кг);

К - коэффициент аггравации, равный 10.

Длительность эксперимента с момента имплантации (3 месяца) была выбрана в соответствии с расчетами, учитывающими продолжительность жизни млекопитающих, из которых следует, что 3 месяца жизни крысы соответствуют 10-11 годам жизни человека, а также согласно международному стандарту серии ГОСТ Р ИСО 10993 [277], в соответствии с которым длительность подострого и хронического эксперимента, а также имплантационного теста может составлять от 7 до 90 суток. В связи с этим продолжительность эксперимента равную трем месяцам можно считать вполне достаточной для изучения подострой и хронической токсичности имплантируемых материалов.

Часть подопытных и контрольных животных (по 5 особей из группы) выводили из эксперимента методом декапитации через месяц после введения образцов и отбирали материал для проведения патоморфологических исследований.

В конце эксперимента (через 3 месяца после имплантации) оставшихся животных обследовали с использованием физиологических, гематологических, биохимических методов.

В течение всего эксперимента проводили наблюдения за внешним видом поведением, двигательной активностью подопытных и контрольных животных. Определяли прирост массы тела.

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.

При биохимических исследованиях сыворотки крови подопытных животных определяли ряд показателей - активность аланиновой аминотрансферазы (АЛТ), характеризующей функциональное состояние печени – органа, ответственного за детоксикацию веществ в организме; активность аспарагиновой аминотрансферазы (АСТ), свидетельствующей о наличии патологических изменений в сердечно-сосудистой системе; содержание мочевины, позволяющее оценить выделительную функцию почек. Кроме того, проводили изучение изменения количества эритроцитов и лейкоцитов в крови экспериментальных животных.

По окончании исследований животных выводили из эксперимента методом декапитации, определяли органо-соматические показатели, отбирали материал для патоморфологических исследований.

Полученные результаты экспериментальных исследований подвергались статистической обработке методом вариационной статистики с использованием критерия «t» Стьюдента [276]

Внутренние органы подопытных и контрольных животных (печень, почки, селезенка), а также соединительнотканная капсула, окружающая образцы, взятые у подопытных и контрольных животных через 1 и 3 месяца после имплантации, подвергались патоморфологическим исследованиям. С этой целью они фиксировались в 10% нейтральном формалине в течение 12 суток, затем заливались в парафин. Готовые гистологические срезы окрашивались гематоксилин-эозином и по методу Ван Гизона.

Как видно из приведенных данных (Таблица 13), 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, а именно ее морфологического состава (содержание гемоглобина, количества лейкоцитов и эритроцитов), активности биохимических ферментов (аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз), содержанию мочевины и общего белка тоже были близки к показателям контроля. Все показатели подопытных и контрольных животных соответствовали физиологической норме.

Таблица 13 - Показатели функционального состояния организма подопытных животных, после введения полимерных гидрогелей

Изучаемые показатели	Группы животных		
	Контроль	С иммобилизованным макропористым гидрогелем	С гелем, полученным отверждением раствора «in vivo»
Суммационно-пороговый показатель, мА	5,60 ± 0,21	5,45±0,35	5,38±0,21
Работоспособность, с	11,50 ± 0,53	12,90±0,44	12,00±0,56
Количество эритроцитов в крови, 10 <sup>12</sup> /л	8,17±0,45	7,86±0,39	7,06±0,56
Содержание гемоглобина в крови г/л	146,40±6,2	141,20±5,5	126,0±8,3
Количество лейкоцитов в крови 10 <sup>9</sup> /л	17,58±2,95	17,68±2,08	14,52±1,73
Активность АЛТ в сыворотке крови ед.экст.	45,68±3,39	44,80±2,74	37,68±3,26
Активность АСТ в сыворотке крови ед. экст	151,9±13,9	155,2±3,6	149,2±14,6
Содержание мочевины в сыворотке крови ед.экст.	4,22±0,16	5,00±0,16	4,66±0,19
Общий белок сыворотки крови, %	20,26±1,45	18,98±1,18	20,58±0,88

Органо-соматические показатели подопытных животных также не имели статистически достоверных отличий от контроля (Таблица 14).

Таблица 14 - Органо-соматические показатели животных после имплантации образцов в хроническом эксперименте.

Исследуемые материалы	Масса тела, г	ОСП (печень)	ОСП (почки)	ОСП (селезенка)
Контроль	18,04 ±0,34	34,6±0,76	5,9±0,17	2,80±0,22
Пористый гидрогель	17,8±0,4	32,5±0,72	5,9±0,14	2,4±0,20
Гели, образованные шивкой растворенного полимера «in situ»	17,05±0,36	30,9±1,15	6,0±0,16	3,50±0,53

В качестве объектов морфологических исследований были использованы гистологические препараты области имплантации, а также внутренних органов (печень, селезенка и почки) экспериментальных животных

Препараты изучали под универсальным микроскопом OLYMPUS BX 51 и фотографировали с помощью камеры SDU-252 и программы Launch CAM\_VIEW. В каждой группе через 1 и 3 месяца изучалось по 3 животных.

При изучении препаратов полученных в группах животных, которым вводились и отверждались *in vivo* образцы в форме растворов для отверждения, наблюдалась следующая картина.

Срок имплантации – 1 месяц.

Контрольная группа: подкожно имплантированные стеклянные образцы.

В области имплантации материала вокруг стеклянной пластинки через 1 месяц формируется соединительнотканная капсула, состоящая из коллагеновых волокон, имеющих продольную ориентацию, и фибробластов, расположенных между коллагеновыми волокнами. Во внутреннем слое капсулы повышено содержание макрофагов и встречаются единичные гигантские многоядерные клетки инородных тел. Капсула имеет зрелый

характер (Рисунок 92). В перикапсулярной жировой клетчатке - слабое полнокровие сосудов и единичные лимфу-макрофагальные инфильтраты.

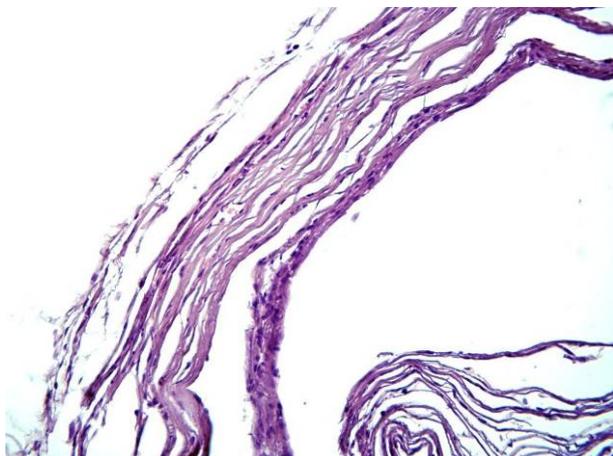


Рисунок 92 - Контрольная группа. 1 месяц. Зрелая соединительнотканная капсула вокруг стеклянной пластинки. Макрофагальная инфильтрация во внутреннем слое капсулы. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$

Внутренние органы (печень и почки) имеют умеренное полнокровие сосудов, дистрофические изменения эпителиальных клеток (соответственно, гепатоцитов и эпителия извитых канальцев) отсутствуют. В селезёнке лимфоидные фолликулы обычной величины и структуры, имеется умеренное полнокровие красной пульпы.

1 группа – отвержденный «in vivo» гидрогелевый материал

В области введения материала имплантат под кожей имеет двухслойную структуру. В центре находится сшитый материал, который окрашивается гематоксилином и эозином слабо базофильно, имеет гомогенную структуру и разделён на фрагменты (Рисунок 93А). Часть материала удаляется при вырезании имплантата из ткани, последующей проводке и резке. Макроскопически этот материал имеет неоднородную «кашеобразную» полужидкую структуру. Гистологически в этом материале обнаруживаются немногочисленные макрофаги, эритроциты и сгустки фибрина.

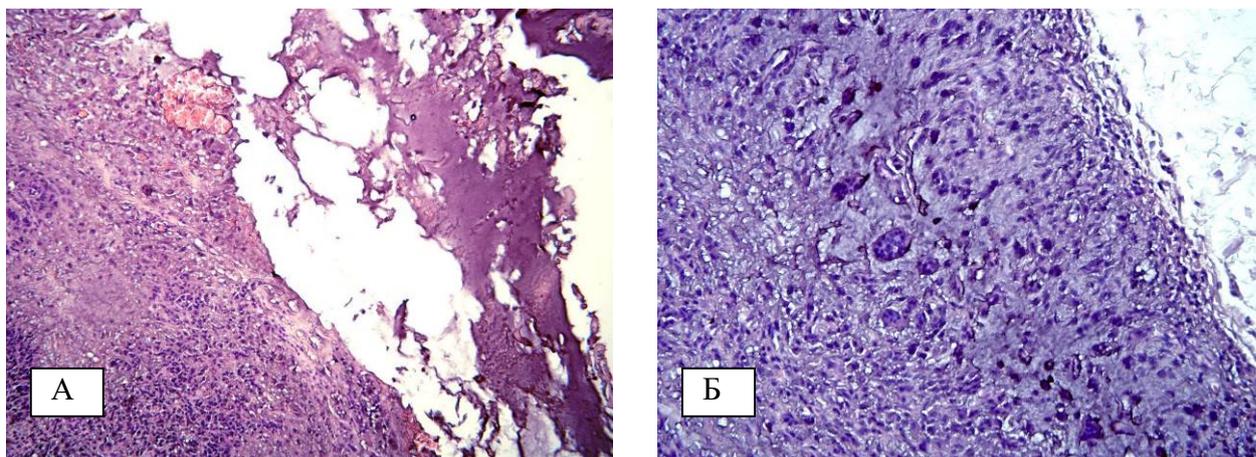


Рисунок 93 - Отвержденный «in vivo» гидрогелевый материал. 1 месяц.  
 (А)- справа вверху - фрагменты гидрогеля, слева внизу – грануляционная ткань, заместившая гидрогель. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$ ; (Б) - остатки гидрогеля в грануляционной ткани, которые фагоцитируются макрофагами и гигантскими клетками. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$

Наружная часть подкожного образования представлена грануляционной тканью, состоящей из многочисленных макрофагов, гигантских клеток инородных тел, фибробластов и коллагеновых волокон, а также капилляров. Эта ткань замещает наружную часть имплантированного образца, приблизительно на 25% площади имплантата. Местами в грануляционной ткани остаются очаги относительно гомогенного материала, в котором располагаются многочисленные гигантские клетки и макрофаги, фагоцитирующие имплантат (Рисунок 93Б).

*Внутренние органы.* В печени полнокровие центральных вен и капилляров. Дистрофические изменения гепатоцитов отсутствуют. Отмечается только некоторое увеличение количества купферовских клеток. В почках и селезёнке никаких изменений по сравнению с контрольной группой не обнаружено.

2 группа – макропористый полимерный гидрогель:

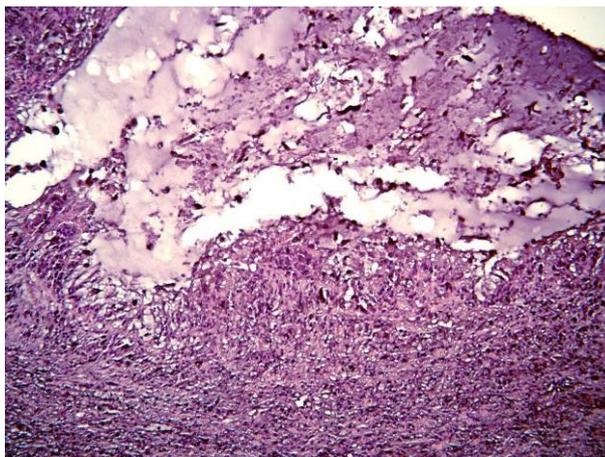


Рисунок 94 - Макропористый полимерный гидрогель 1 месяц.

Вверху - остатки имплантата, внизу – грануляционно-фиброзная ткань с многочисленными макрофагами и гигантскими клетками.

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$

В области имплантации макроскопически обнаружено образование с толстой стенкой и студнеобразной серединой, которая отделяется при разрезе. Гистологически внутреннее содержимое образования практически лишено пористой структуры. Оно представляет собой скопления гидрогеля разной плотности, слабо базофильной окраски. Местами оно гомогенное, а в других участках остаются сильнее окрашенные обрывки перегородок губки (Рисунок 94). Это содержимое окружено толстым слоем грануляционно-фиброзной ткани, состоящей из коллагеновых волокон, фибробластов, многочисленных макрофагов и гигантских многоядерных клеток. Этот слой сформировался при прорастании соединительной тканью наружных слоев имплантата. Грануляционная ткань окружена тонкой соединительнотканной капсулой. В самом наружном слое грануляционной ткани обнаруживаются скопления материал гомогенной структуры, которые резорбируются макрофагами и гигантскими клетками. Окружающая клетчатка слабо инфильтрирована макрофагами, но нейтрофильных лейкоцитов там не обнаруживается.

Внутренние органы. В печени полнокровие сосудов, увеличено содержание купферовских клеток, но не больше, чем в серии с отверждаемым

«in vivo» материалом. Дистрофические изменения гепатоцитов отсутствуют. В селезёнке у 1-го животного слабая гиперплазия лимфоузлов, у остальных животных нормальная структура ткани селезёнки. Почки имеют обычную структуру и не отличаются от контроля.

Срок имплантации 3 месяца

Контрольная группа: подкожно имплантированные стеклянные образцы

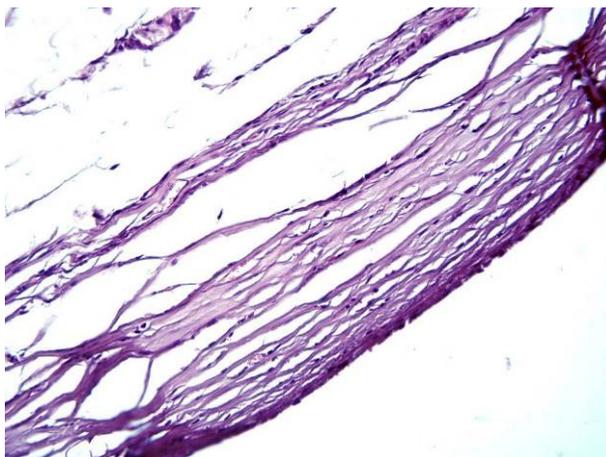


Рисунок 95 - Контрольная группа. 3 месяца.

Соединительнотканная капсула вокруг стеклянной пластинки.

Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$

В области имплантации материала вокруг стеклянной пластинки через 3 месяца сохраняются соединительнотканная капсула приблизительно такой же толщины и структуры, как через 1 месяц (Рисунок 95). Однако содержание макрофагов во внутреннем слое капсулы уменьшается. В окружающей ткани лимфо-макрофагальная инфильтрация уменьшается по сравнению с месячным сроком.

Внутренние органы (почки, печень, селезёнка) умеренно полнокровны, их структура и клеточный состав не отличаются от нормы и от внутренних органов этой серии через 1 месяц.

1 группа – отвержденный «in vivo» гидрогелевый материал

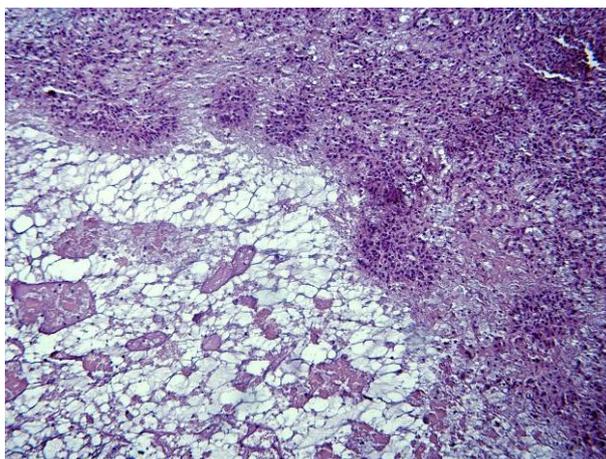


Рисунок 96 - Отвержденный «in vivo» гидрогелевый материал. 3 месяца

Слева внизу мелкочаеистая структура имплантата. Вверху грануляционная ткань, заместившая материал. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$

В области введения материала имплантат под кожей у одного животного в центре приобретает местами мелкочаеистую структуру (Рисунок 96). В этих участках видны очаги отложения фибрина и немногочисленные макрофаги. У двух других животных в центре остаётся гомогенный материал, но этого материала значительно меньше, чем в 1 месяц. В отличие от срока 1 месяц материал в центре образования не вываливается при обработке, что, по-видимому, объясняется его уплотнением.

Периферическая часть образования больше чем на 50% всего имплантата, замещена грануляционной тканью, очень богатой макрофагами, гигантскими клетками и лимфоцитами. Однако в этой ткани выявляются фибробласты и тонкие коллагеновые волокна. Чем ближе к тонкой капсуле, тем более зрелая соединительная ткань: больше фибробластов и коллагеновых волокон. Однако и в грануляционной ткани сохраняются очаги материала. Они резорбируются гигантскими клетками и макрофагами.

Внутренние органы. Печень имеет обычную структуру, умеренно полнокровные межбалочные капилляры. Дистрофические изменения гепатоцитов отсутствуют. Число купферовских клеток несколько увеличено и

соответствует печени этой группы животных через 1 месяц после введения материала. В селезёнке и почках нет отличий от контроля.

2 группа – макропористый полимерный гидрогель:

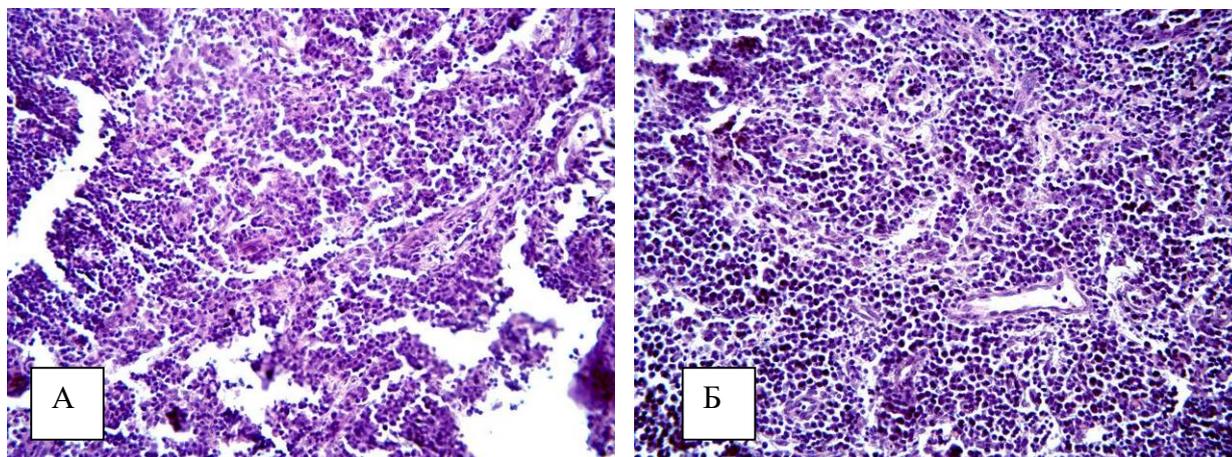


Рисунок 97 – Макропористый полимерный гидрогель 1 месяц.

(А)- на месте имплантат видна прорастающая соединительная ткань, многочисленны мелкие фрагменты. Видны многочисленные гигантские клетки и макрофаги, резорбирующие имплантат. Окраска гемтоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$ ; (Б) - лимфоузел с гиперплазированными фолликулами, выраженной плазматизацией и скоплением макрофагов. Окраска гемтоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$

В месте имплантации наблюдается соединительная ткань, многочисленные мелкие фрагменты оксифильной субстанции. Видны многочисленные гигантские клетки и макрофаги, резорбирующие имплантат (Рисунок 97А). В этой ткани остаются небольшие участки ячеистой структуры. У одного животного в области имплантации обнаружен лимфоузел. В лимфоузле отмечается заметная гиперплазия лимфоидных фолликулов, выраженная плазматизация (увеличение числа плазматических клеток) и повышенное содержание макрофагов с зернистостью в цитоплазме, что свидетельствует о фагоцитозе имплантированного материала (Рисунок 97Б).

Внутренние органы. Отсутствуют отличия от контроля в структуре и клеточном составе печени, почек и селезёнки кроме повышенного количества купферовских клеток в печени.

На основании полученных данных, можно утверждать, что разработанные полимерные гидрогелевые материалы нетоксичны. Воспалительная тканевая реакция на их имплантацию была минимальной: отсутствовала нейтрофильная инфильтрация и макрофагальная реакция в окружающей ткани, формировалась тонкая соединительнотканная капсула, что свидетельствует о сравнительной биоинертности данных материалов. Деградация имплантированных материалов происходит за счёт прорастания в них соединительной ткани и макрофагальной резорбции. Изучение внутренних органов после имплантации не обнаружило видимых отличий от контрольной группы за исключением незначительного увеличения числа купферовских клеток в печени. Очевидно, купферовские клетки, как и макрофаги, реагируют на мельчайшие частицы имплантированного материала, образующиеся при фрагментировании имплантата, попадающие в печень.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии заметной токсичности исследуемых материалов и позволяют утверждать об их пригодности для использования в качестве основы для изделий медицинского назначения различных типов, в том числе контактирующих с кровью и внутренними средами организма.

### 3.3.2 Изучение токсичности полимерных гидрогелей на основе ПВС и ГЭК

#### 3.4.2.1 Изучение концентрации потенциально опасных соединений в составе образцов полимерных гидрогелей на основе ПВС и ГЭК

Также, как и в случае гидрогелей на основе «чистого» поливинилового спирта на начальном этапе изучения токсичности разработанных гидрогелевых материалов на основе ГЭК и ПВС изучалось содержание потенциально опасных соединений в их составе.

Как это было описано ранее, при проведении исследований в качестве модельной среды нами была использована дистиллированная вода,

являющаяся обязательной модельной средой согласно действующей нормативной документации

Соотношение между массой образцов ( $M$ ) и объемом контактирующей модельной среды ( $V$ ), соответствующим объему крови в организме человека, равному 5000 мл, рассчитывалось из уравнения 3.2.8.1.

Исследования проводили согласно процедуре, описанной ранее в разделе посвященном изучению токсичности гидрогелей на основе поливинилового спирта. Для оценки суммарного содержания химических соединений в водных вытяжках также использовался набор интегральных показателей: изменение значения  $pH$  вытяжки, содержание восстановительных примесей, максимальное значение оптической плотности в области длин волн от 220 до 360 нм. Вытяжки из изучаемых изделий контролировались также на содержание в них глицидилового эфира метакриловой кислоты (ГМА), формальдегида, ацетальдегида, ацетона, водорастворимых форм металлов [266]. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась в соответствии с требованиями ГОСТ Р 50855-96.

Результаты исследований содержания в экспериментальных образцах на основе модифицированных поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала, низкомолекулярных веществ обобщены в таблицах приведенных ниже (Таблица 15 - Таблица 17). Как и в случае материалов на основе «чистого» поливинилового спирта определяемые интегральные показатели были заметно ниже допустимого значения.

Причем, как и следовало ожидать, интегральные показатели, особенно изменение величины  $pH$ , фиксируемые у вытяжек из образцов, представлявших собой сшитые непосредственно перед проведением испытаний растворы макромеров, было заметно выше аналогичных показателей, определяемых у макропористых и изотропных гидрогелевых материалов. Данный факт, очевидно, связан с выделением непрореагировавших макромеров и компонентов иницирующей системы.







В тоже время, количество альдегидов, обнаруживаемых в образцах растворов для отверждения, несколько меньше. Данный факт, очевидно, связан с тем, что отверждаемые растворы перед отверждением стерилизовались фильтрованием, тогда как макропористые и изотропные гидрогели – посредством способных вызывать частичную деструкции полимеров радиационной и термической стерилизации, соответственно. Впрочем, количество обнаруживаемых альдегидов для всех образцов были ниже допустимых.

В процессе исследований также проводилась идентификация и определение содержания потенциально опасных водорастворимых форм металлов, присутствие которых характерно для полимерных материалов (барий, железо, кадмий, медь, олово, свинец, хром, цинк, мышьяк) и керамики (кадмий, алюминий, цинк, титан, барий) [266].

В результате ни один из перечисленных металлов в вытяжках из изучаемых образцов в течение всего периода исследования в пределах чувствительности определения, которая составляет (мг/л): для алюминия – 0,005; титана – 0,001; мышьяка – 0,001; цинка – 0,001; кадмия – 0,0001; бария – 0,01; свинца – 0,001; меди – 0,001; олова – 0,02; хрома – 0,001; железа – 0,001 обнаружен не был. Следует отметить, что чувствительности определения указанных металлов значительно ниже (на один – четыре порядка) соответствующих допустимых значений (мг/л): для алюминия – 0,500; титана – 0,100; мышьяка – 0,050; цинка – 1,000; кадмия – 0,001; бария – 0,100; свинца – 0,030; меди – 1,000; олова – 1,00; хрома – 0,100; железа – 0,300 [266].

Таким образом, можно утверждать, что используемая для получения материалов технология и применяемые методы стерилизации вполне адекватны и позволяют получить материалы, отвечающие санитарно-химическими требованиям, предъявляемым к материалам, используемым для создания изделий медицинского назначения.

### 3.3.2.2 Оценка токсичности гидрогелей на основе поливинилового спирта и 2-гидроксиэтилкрахмала с использованием экспресс-методов

Полноценное комплексное изучение пригодности того или иного материала для использования в качестве основы для изделий медицинского назначения предписываемое требованиями стандартов серии ISO 10993 достаточно затратно, включает в себя исследования с использованием экспериментальных животных и, как следствие, занимает продолжительное время. Вследствие этого на первоначальном этапе для изучения токсичности полученных гидрогелевых материалов нами были использованы экспресс-методы, основанные на изучении взаимодействия образцов материала с кровью.

В рамках этого подхода оценка токсичности проводилась посредством:

- анализа крови (в виде эритроцитарной массы и лейкоцитарного слоя) до и после взаимодействия крови с исследуемым материалом;
- анализа надосадочной жидкости на содержание свободного гемоглобина, полученной после центрифугирования эритроцитарной массы, приведенной в контакт с исследуемым материалом;
- микроскопических исследований эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов до и после контакта с исследуемыми материалами;
- исследования адсорбции белков (на примере альбумина) на поверхности исследуемых материалов.

Были исследованы три группы образцов различного состава: предварительно очищенные макропористые полимерные гидрогели, предварительно очищенные изотропные полимерные гидрогели и изотропные гидрогели, формируемые непосредственно перед проведением испытаний, посредством сшивки макромеров, находящихся в растворе («растворы для отверждения»). Исследования проводились согласно методикам, указанным в разделах 4.3.8-4.3.10 настоящей диссертации.

Ниже представлены результаты гемоанализа эритроцитарной массы (ЭР-массы) и лейко-тромбоцитарного слоя (ЛТС) после контакта с образцами гидрогелевых материалов (Таблица 18 и Таблица 19 Таблица 19)

Как можно видеть из приведенных данных, контакт с экспериментальными образцами, представляющими собой предварительно очищенные макропористые и изотропные гидрогели, практически не оказывает на состав эритроцитарной массы. Хотя, впрочем, для некоторых образцов и имела место некоторая убыль эритроцитов (RBC), она не превышала 1 %.

Кажущееся увеличение числа тромбоцитов (Plt) в этом случае связано с «теньями» эритроцитов. Поскольку форменные элементы крови гемоанализатор определяет по размеру, то «тени» эритроцитов он может воспринимать как тромбоциты в виду их небольшого размера по сравнению с другими форменными элементами крови.

Поскольку разрушения эритроцитов не происходило (или оно было незначительно), то остальные определяемые показатели (Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC) практически не отличались от аналогичных показателей контроля. В случае же образцов, представляющих собой «растворы для отверждения», после их контакта ЭР-массой наблюдается более заметная (до 10 %) убыль эритроцитов, и как следствие уменьшение среднего объема эритроцитов и появление «теней» эритроцитов, определяемых как тромбоциты, в пробе.

Содержание свободного гемоглобина в пробах после контакта со всеми образцами сохраняется на одном уровне, поскольку гемоанализатор определяет содержание общего гемоглобина, то есть гемоглобина, который находится в эритроцитах и свободного гемоглобина, появившегося в результате разрушения эритроцитов. Показатель MCHC для всех проб примерно одинаков, что говорит об отсутствии ошибки в определении и подготовке проб.

Таблица 18 - Результаты гемоанализа эритроцитарной массы до и после контакта с экспериментальными образцами

Параметр	Контроль	Доля ГЭК в составе гидрогеля, %									
		макропористые гидрогели				изотропные гидрогели			гидрогели, образованные сшивкой растворов макромеров «in situ»		
		0	30	50	90	0	50	100	0	50	100
RBC, $10^{12}/л$	4,27	4,25	4,23	4,24	4,23	4,27	4,27	4,27	3,93	3,9	3,96
Hgb, г/л	122	123	123	124	122	122	122	122	120	119	120
Hct, %	39,4	39,4	39,5	40,3	41,2	39,8	39,6	39,4	38,4	38,5	38,4
MCV, фл	92,3	92,3	92,2	92,3	92,1	92,3	92,6	92,8	90,4	90,7	90,4
MCH, пг	28,7	28,7	28,9	28,8	28,9	28,8	28,9	28,9	29,1	29,2	29,1
MCHC, г/л	333	335	339	337	340	335	335	338	334	334	334
Plt, $10^9/л$	0	0	10	9	10	0	0	0	254	270	262

Таблица 19 - Результаты гемоанализа лейко-тромбоцитарного слоя до и после контакта с экспериментальными образцами

Параметр	Контроль	Доля ГЭК в составе гидрогеля, %									
		макропористые гидрогели				изотропные гидрогели			гидрогели, образованные сшивкой растворов макромеров «in situ»		
		0	30	50	90	0	50	100	0	50	100
WBC, 10 <sup>9</sup> /л	4,2	4,2	4,18	4,15	4,1	4,2	4,17	4,14	3,96	3,9	3,7
Ly, %	61,2	61,2	61,3	61,3	61,2	61,3	61,3	61,3	60,7	60,0	61,2
Mo, %	15,9	15,9	16,2	16,0	16,0	16,0	16,0	16,2	16,2	16,3	16,2
Gr, %	22,9	22,9	22,5	22,7	22,8	22,7	22,7	22,5	22,8	23,7	22,6
Ly#, 10 <sup>9</sup> /л	2,57	2,57	2,56	2,54	2,51	2,57	2,56	2,54	2,4	2,34	2,26
Mo#, 10 <sup>9</sup> /л	0,67	0,67	0,68	0,66	0,66	0,67	0,67	0,67	0,64	0,64	0,6
Gr#, 10 <sup>9</sup> /л	0,96	0,96	0,94	0,94	0,93	0,95	0,95	0,93	0,9	0,92	0,84
Plt, 10 <sup>9</sup> /л	232	232	229	228	229	232	229	228	221	220	209
MPV, фл	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,6	7,6	7,6
Pct, %	0,199	0,199	0,198	0,198	0,198	0,199	0,198	0,198	0,192	0,193	0,194
PDW	15,9	15,9	15,8	15,9	15,8	15,8	15,9	15,8	16,2	16,0	16,4

После контакта лейко-тромбоцитарного слоя с образцами, полученными непосредственно перед проведением эксперимента («растворы для отверждения») разрушение лейкоцитов было более очевидно, наблюдалось уменьшение общего содержания лейкоцитов до 12 %. Убыль тромбоцитов после контакта с этими образцами достигала 10 %, что, впрочем, не является критичным и вполне укладывается в нормальные величины. Кроме того, происходило незначительное увеличение гетерогенности тромбоцитов и уменьшение среднего объема тромбоцитов в пределах нормальных значений.

Таблица 20 - Результаты спектрофотометрического определения свободного гемоглобина в надосадочной жидкости

Образец	Содержание ГЭК, %	Относительная плотность при длинах волн, абс. ед.			С <sub>нб</sub> , г/л в исследуемом образце
		380 нм	415 нм	450 нм	
Контроль		0,0283	0,1515	0,0154	0,1517
Макропористые гидрогели	0	0,0288	0,1517	0,0158	0,1520
	30	0,0287	0,1538	0,0156	0,1540
	50	0,0288	0,1542	0,0157	0,1544
	90	0,0283	0,1515	0,0154	0,1517
Изотропные гидрогели	0	0,0288	0,1539	0,0156	0,1541
	50	0,0288	0,1542	0,0157	0,1544
	100	0,0288	0,1539	0,0156	0,1541
Гидрогели, образованные сшивкой растворов макромеров «in situ»	0	0,0313	0,1677	0,0170	0,1679
	50	0,0323	0,1729	0,0176	0,1731
	100	0,0318	0,1701	0,0173	0,1704

Сходный характер взаимодействия эритроцитарной массы с образцами гидрогелевых материалов наблюдался и при изучении количества свободного гемоглобина в надосадочной жидкости. Как можно видеть из приведенных выше данных (Таблица 20), в надосадочной жидкости после контакта с образцами,

представляющими собой пористые и изотропные гидрогелевые материалы, содержание свободного гемоглобина незначительно (1,5-2 %) превышает эту величину в надосадочной жидкости контроля. Образцы же, представляющие собой отвержденные растворы, демонстрируют по результатам и этого теста более низкую биосовместимость, в их случае содержание свободного гемоглобина превышает контроль на 10-14 %.

Микроскопические исследования образцов эритроцитарной массы и обогащенной тромбоцитами плазмы проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse 80i (Япония). Для обнаружения «теней» эритроцитов использовался витальный краситель, поскольку без подкрашивания «тени» эритроцитов не видны в микроскоп. Для морфофункционального исследования тромбоцитов использовали оригинальный метод, основанный на окрашивании клеток витальными (прижизненными) флуорохромными красителями с последующим анализом во флуоресцентном микроскопе.

Таблица 21 - Результаты микроскопических исследований эритроцитов до и после контакта с образцами

Образец	Содержание ГЭК, %	Содержание различных форм эритроцитов в пробе, %			
		Дискоциты	Эритроциты с неровным краем	Эхиноциты	«Тени» эритроцитов
Контроль		95±2	3±1	1±1	1±1
Макропористые гидрогели	30	95±2	4±1	1±1	1±1
	50	93±2	3±1	1±1	1±1
	90	94±2	4±1	1±1	1±1
Изотропные гидрогели	0	94±2	4±1	1±1	1±1
	50	95±2	3±1	1±1	1±1
	100	94±2	4±1	1±1	1±1
Гидрогели, образованные сшивкой растворов макромеров «in situ»	0	80±2	5±1	8±1	7±1
	50	79±2	5±1	10±1	6±1
	100	82±2	5±1	12±1	6±1

Для оценки биологической полноценности тромбоцитов использовали количество функционально пригодных тромбоцитов, то есть тромбоцитов,

содержащих гранулы. Результаты микроскопических исследований эритроцитов и тромбоцитов приведены выше.

Микроскопическое исследование морфологических свойств эритроцитов после контакта отмытой эритроцитраной массы с образцами гидрогелевых материалов показало (Таблица 21), что распределение различных форм эритроцитов заметно меняется лишь в случае образцов, представлявших собой растворы для сшивки, однако и в этом случае разрушение эритроцитов не столь критично и не превышает 7 %, при этом несколько увеличивается доля эхиноцитов и эритроцитов с неровным краем, доля дискоцитов уменьшается по сравнению с контролем. Для остальных образцов распределение практически не изменяется.

Аналогичная тенденция сохраняется и при микроскопическом исследовании функциональной пригодности тромбоцитов после контакта обогащенной тромбоцитами плазмы с образцами (Таблица 22). В случае образцов – отвержденных растворов для сшивки имеет место некоторое снижение функциональной пригодности форменных элементов. Для остальных же образцов полученные результаты близки к контролю.

Таблица 22 - Результаты микроскопических исследований тромбоцитов до и после контакта с образцами

Образец	Содержание ГЭК, %	Содержание функционально пригодных тромбоцитов, %
Контроль		92±2
Макропористые гидрогели	0	92±2
	30	91±2
	50	92±2
	90	91±2
Изотропные гидрогели	0	91±2
	50	92±2
	100	91±2
Гидрогели, образованные сшивкой растворов макромеров «in situ»	0	88±2
	50	86±2
	100	89±2

Результаты определения адгезивной активности тромбоцитов до и после контакта с образцами представлены ниже (Таблица 23). Контролем являлась обогащенная тромбоцитами плазма (ОТП), не контактировавшая ни с одним из образцов. Адгезивная активность измерялась в баллах.

Как можно видеть, адгезивная активность тромбоцитов практически не изменяется в ОТП, контактировавшей с образцами, представляющими собой предварительно очищенные макропористые и изотропные гидрогели. После контакта ОТП с образцами-растворами для отверждения имеет место некоторое увеличение адгезированных тромбоцитов, однако оно не столь уж и велико и не выходит за пределы нормы.

Таблица 23 - Результаты определения адгезивной активности тромбоцитов до и после контакта с образцами

Образец	Содержание ГЭК, %	Адгезивная активность тромбоцитов, баллы
Контроль		37±2
Макропористые гидрогели	0	37±2
	30	37±2
	50	38±2
	90	37±2
Изотропные гидрогели	0	38±2
	50	37±2
	100	37±2
Гидрогели, образованные сшивкой растворов макромеров «in situ»	0	40±2
	50	42±2
	100	41±2

Таким образом, на основании проведенных с использованием экспресс-методов исследований было показано, что исследованные образцы разработанных гидрогелевых материалов характеризовались достаточно высокой биосовместимостью. При этом стоит отметить, что, как и следовало ожидать, образцы, представляющие собой растворы для отверждения, предназначенные для формирования гелей *in vivo*, уступали во всех проведенных тестах другим типам образцов, что очевидно связано с выделением из их объема

непрореагировавших макромеров и компонентов иницирующей системы, содержащей перекись водорода. Однако, в тоже время, даже для этих материалов, определяемые в тестах показатели находились в пределах нормальных значений.

3.3.2.3 Изучение взаимодействия с живыми объектами модельных систем, после их контакта с материалом

Для оценки токсичности, как и в случае описанных выше гидрогелевых материалов на основе «чистого» поливинилового спирта 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.

Ниже приведены результаты проведенных исследований.

Таблица 24 - Результаты исследования гемолитической активности и цитотоксичности вытяжек из образцов гидрогелей

Образец	Содержание ГЭК, %	Гемолитическая активность (допустимое значение - не более 2,0%)	Цитотоксичность (допустимое значение - индекс токсичности 70-120%)
Макропористые гидрогели	0	0	98
	30	0,08	92
	50	0,14	90
	90	0,18	91
Изотропные гидрогели	0	0,17	97
	50	0,22	96
	100	0,24	95
Гидрогели, образованные сшивкой растворов макромеров «in situ»	0	0,1	82
	50	0,24	78
	100	0,64	77

Как следует из полученных данных (Таблица 24), вытяжки из всех образцов гидрогелевых материалов можно считать свободными от гемолитически

действующих веществ. Процент гемолиза экстрактов всех образцов не превышал значений от 0 до 0,64%. Как и следовало ожидать, гемолитическая активность, демонстрируемая образцами, отвержденными непосредственно перед проведением эксперимента, была заметно выше аналогичного показателя, обнаруживаемого у предварительно очищенных макропористых и изотропных гидрогелей, однако вполне удовлетворяла нормативным требованиям (допустимые значения - не более 2,0%).

Аналогичная картина наблюдалась и при изучении цитотоксичности – несмотря на большую, по сравнению с образцами других типов, токсичность «растворов для отверждения», все образцы демонстрировали показатели цитотоксичности (от 77 до 98 %), находящиеся в требуемом интервале значений – от 70 до 120 %

Таблица 25 - Органо-соматические показатели животных, подвергавшихся воздействию вытяжек из экспериментальных образцов

Образец	Содержание ГЭК, %	Масса тела, г	ОСП (печень)	ОСП (почки)	ОСП (селезенка)
Контроль		18,60±0,44	45,97±3,47	14,47±0,69	3,62±0,49
Макропористые гидрогели	0	18,94±0,44	46,57±3,49	14,52±0,70	3,65±0,62
	30	19,20±0,44	44,36±3,55	14,53±0,71	3,74±0,71
	50	18,85±0,39	47,19±3,53	14,23±0,62	3,94±0,78
Изотропные гидрогели	90	18,56±0,38	48,36±4,01	14,91±0,97	3,99±0,61
	0	18,84±1,04	49,04±3,59	15,08±0,77	4,08±0,82
	50	20,10±0,65	51,29±4,70	15,28±1,11	6,18±0,58
Гидрогели, образованные сшивкой растворов макромеров «in situ»	100	19,90±0,95	53,07±3,29	15,56±0,60	7,06±0,96
	0	18,15±0,43	48,44±2,98	14,66±0,83	4,12±0,89
	50	19,70±0,96	49,02±3,38	15,12±0,79	4,23±0,77
	100	19,20±0,98	47,35±2,95	14,95±0,57	3,98±0,56

Общее действие вытяжек образцов изучали на белых беспородных мышах массой 20-22 г, подопытным животным внутрибрюшинно однократно вводили по 1 мл вытяжек (из расчета 50 мл/1кг массы тела). Контрольные животные в том же

режиме получали дистиллированную воду. Температура вводимых растворов  $37\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ . В течение всего периода наблюдения как в опыте, так и в контроле не было отмечено ни случаев гибели животных, ни внешних проявлений интоксикации.

Макроскопически состояние внутренних органов и брюшины в месте введения вытяжек соответствовало контролю и физиологической норме. Как показано выше (Таблица 25), статистически достоверных изменений массы тела и ОСП (органо-соматических показателей) у подопытных животных по сравнению с контрольной группой также выявлено не было

Таблица 26 - Результаты изучения сенсibiliзирующего действия экспериментальных образцов

Образец	Содержание ГЭК, %	Реакция кожи в баллах (не более 0-1 балла)	РСЛЛ	Соотношение ОСП иммунокомпетентных органов
Макропористые гидрогели	0	0-0,4	Менее 10,0%	$0,436\pm 0,057$
	30	0-0,4	Менее 10,0%	$0,441\pm 0,039$
	50	0-0,4	Менее 10,0%	$0,459\pm 0,067$
	90	0-0,4	Менее 10,0%	$0,501\pm 0,040$
Изотропные гидрогели	0	0-0,4	Менее 10,0%	$0,516\pm 0,072$
	50	0-0,4	Менее 10,0%	$0,487\pm 0,052$
	100	0-0,4	Менее 10,0%	$0,506\pm 0,084$
Гидрогели, образованные сшивкой растворов макромеров «in situ»	0	0-0,4	Менее 10,0%	$0,494\pm 0,050$
	50	0-0,4	Менее 10,0%	$0,419\pm 0,090$
	100	0-0,4	Менее 10,0%	$0,455\pm 0,079$

Кроме того, вытяжки из образцов материалов не обладали сенсibiliзирующим действием, о чем свидетельствует отсутствие кожной реакции на аппликационных участках, а также в месте проведения предварительной сенсibiliзации и провокационной внутрикожной пробы, значения показателей РСЛЛ (реакция специфического лизиса лейкоцитов) и

соотношение ОСП (органо-соматические показатели) иммунокомпетентных органов (Таблица 26).

Завершающим этапом в оценке токсичности разработанных гидрогелевых материалов образцов стали исследования в условиях подострого и хронического токсикологического экспериментов с использованием патоморфологических методов.

Изучение подострой и хронической токсичности гидрогелевых материалов проводили, также, как и в случае гидрогелей на основе «чистого» поливинилового спирта, на беспородных белых крысах-самцах. Испытания проводили для макропористых полимерных гидрогелей и изотропных гидрогелей, которые формировали «in vivo» посредством сшивки раствора ненасыщенного производного поливинилового спирта («раствор для отверждения»).

Имплантиацию экспериментальных материалов, расчет массы имплантата, оценку состояния центральной нервной системы, показатель двигательной работоспособности, биохимические исследования сыворотки крови подопытных животных проводили аналогично описанному в разделе, посвященном изучению токсичности гидрогелей на основе «чистого» поливинилового спирта.

Результаты обследования животных после имплантации образцов полимерных гидрогелей проведенного по окончании подострого и хронического экспериментов представлены ниже (Таблица 27).

Как видно, у всех подопытных и контрольных животных не обнаружено статистически достоверных изменений массы тела, суммационно-порогового показателя, двигательной работоспособности, а также клинико-биохимических показателей периферической крови, а именно ее морфологического состава (содержание гемоглобина, количества лейкоцитов и эритроцитов), активности биохимических ферментов (аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз), содержанию мочевины и общего белка по сравнению с контролем. Все показатели подопытных и контрольных животных соответствовали физиологической норме.

Таблица 27 - Показатели функционального состояния организма подопытных животных, после введения образцов полимерных гидрогелей

Исследуемые показатели	Группы животных						
	Контроль	Гидрогели, получаемые сшивкой макромеров, находящихся в растворе			Макропористые гидрогели		
		Содержание ГЭК			Содержание ГЭК		
		10	50	100	0	25	50
Суммационно-пороговый показатель, мА	5,60±0,21	5,55±0,30	5,45±0,27	5,38±0,21	5,45±0,35	5,51±0,29	5,68±0,31
Работоспособность, с.	11,5±0,5	11,9±0,4	11,0±0,52	12,0±0,56	12,9±0,4	11,7±0,5	11,9±0,5
Количество эритроцитов в крови, 10 <sup>12</sup> /л	8,17±0,45	6,94±0,76	7,86±0,39	7,06±0,56	7,86±0,39	7,05±0,56	7,59±0,29
Содержание гемоглобина в крови, г/л	146,4±6,2	127,8±11,6	141,2±5,5	126,0±8,2	141,2±5,5	126,2±8,3	129,8±7,3
Количество лейкоцитов в крови, 10 <sup>9</sup> /л	17,58±2,95	18,94±1,82	17,68±2,08	14,52±1,73	17,68±2,08	14,68±1,73	20,05±1,40
Активность Алт в сыворотке крови, ед.экст.	45,68±3,39	40,06±2,82	44,02±2,55	37,68±3,26	44,80±2,74	47,02±4,00	39,68±3,68
Активность Аст в сыворотке крови, ед. экст	151,9±13,9	143,2±6,7	161,1±10,6	149,2±14,6	155,2±3,6	141,6±7,5	146,5±11,4
Содержание мочевины в сыворотке крови, ед.экст.	4,22±0,16	3,94±0,09	4,48±0,19	4,66±0,19	5,00±0,16	4,68±0,24	4,38±0,31
Общий белок сыворотки крови, %	20,26±1,45	20,02±0,75	18,98±1,18	20,58±0,88	18,98±1,18	20,58±0,88	19,88±0,38

Объектом морфологических исследований стали гистологические препараты области имплантации, а также внутренних органов (печень, селезёнка и почки) экспериментальных животных

Препараты изучались под универсальным микроскопом OLYMPUS BX 51, фотографировалась с помощью камеры SDU-252 и программы Launch CAM\_VIEW. В каждой группе через 1 и 3 месяца изучалось по 3 животных.

При изучении препаратов, полученных в группах животных, которым вводились и отверждались *in vivo* образцы в форме растворов для отверждения, наблюдалась следующая картина.

Срок имплантации - 1 месяц

Контрольная группа: подкожно имплантированные стеклянные образцы.

В области имплантации материала вокруг стеклянной пластинки через 1 месяц формируется соединительно-тканная капсула, состоящая из коллагеновых волокон, имеющих продольную ориентацию, и фибробластов, расположенных между коллагеновыми волокнами. Во внутреннем слое капсулы повышено содержание макрофагов и встречаются единичные гигантские многоядерные клетки инородных тел. Капсула имеет зрелый характер (Рисунок 98). В перикапсулярной жировой клетчатке - слабое полнокровие сосудов и единичные лимфо-макрофагальные инфильтраты.

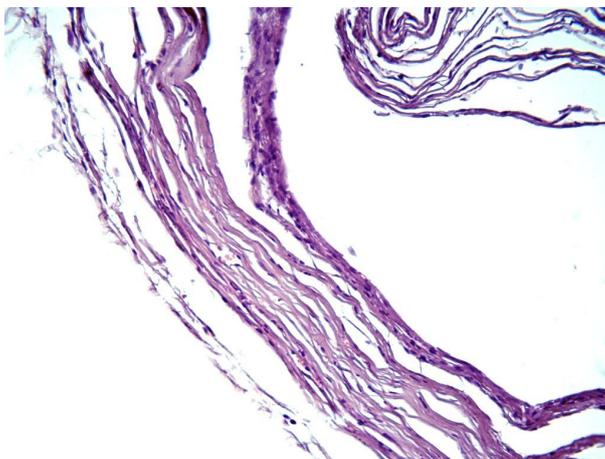


Рисунок 98 - Контрольная группа. 1 месяц. Зрелая соединительно-тканная капсула вокруг стеклянной пластинки. Макрофагальная инфильтрация во внутреннем слое капсулы. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$

Внутренние органы (печень и почки) имеют умеренное полнокровие сосудов, дистрофические изменения эпителиальных клеток (соответственно гепатоцитов и эпителия извитых канальцев) отсутствуют. В селезёнке лимфоидные фолликулы обычной величины и структуры, имеется умеренное полнокровие красной пульпы.

1 группа – Материал, полученный сшивкой *in vivo* ПВС/ГЭК=90/10

В области введения материала имплантат с тканью имеет двухслойную структуру. В центре находится сшитый материал, который окрашивается гематоксилином и эозином слабо базофильно, имеет гомогенную структуру и разделён на фрагменты (Рисунок 99А). Часть материала удаляется при вырезании имплантата из ткани, последующей проводке и резке. Макроскопически этот материал имеет неоднородную «кашеобразную» полужидкую структуру. Гистологически в этом материале обнаруживаются немногочисленные макрофаги, эритроциты и сгустки фибрина.

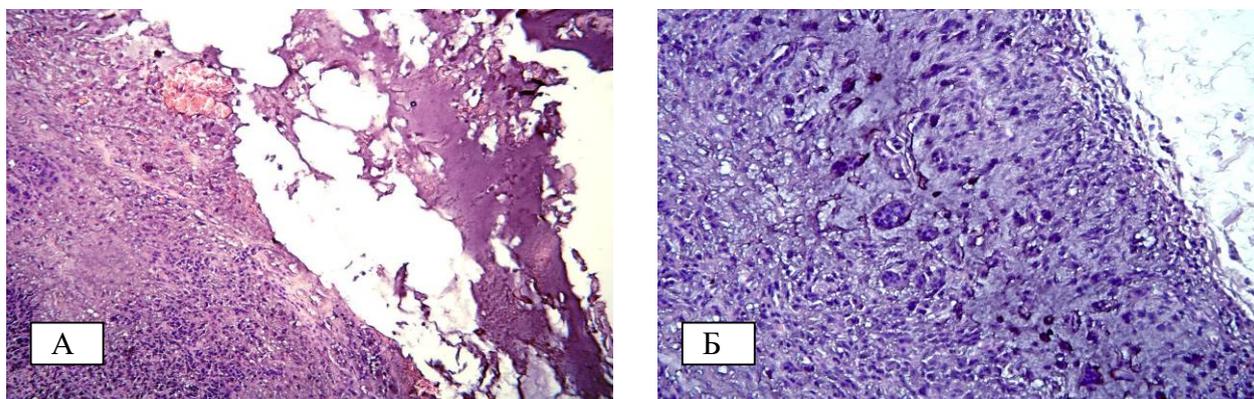


Рисунок 99 - Материал, получаемый сшивкой *in vivo* (соотношение ПВС/ГЭК=90/10). Срок 1 месяц.

(А)- справа сверху - фрагменты ПВС, слева внизу – грануляционная ткань, заместившая ПВС. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$ ; (Б) - остатки ПВС в грануляционной ткани, которые фагоцитируются макрофагами и гигантскими клетками. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$ .

Наружная часть подкожного образования представлена грануляционной тканью, состоящей из многочисленных макрофагов, гигантских клеток

инородных тел, фибробластов и коллагеновых волокон, а также капилляров. Эта ткань замещает наружную часть имплантированного образца, приблизительно на 25% площади имплантата. Местами в грануляционной ткани остаются очаги относительно гомогенного материала, в котором располагаются многочисленные гигантские клетки и макрофаги, фагоцитирующие имплантат (Рисунок 99Б)

Внутренние органы. В печени полнокровие центральных вен и капилляров. Дистрофические изменения гепатоцитов отсутствуют. Отмечается только некоторое увеличение количества купферовских клеток. В почках и селезёнке никаких изменений по сравнению с контрольной группой не обнаружено.

2 группа – Материал, полученный сшивкой *in vivo* ПВС/ГЭК=0/100

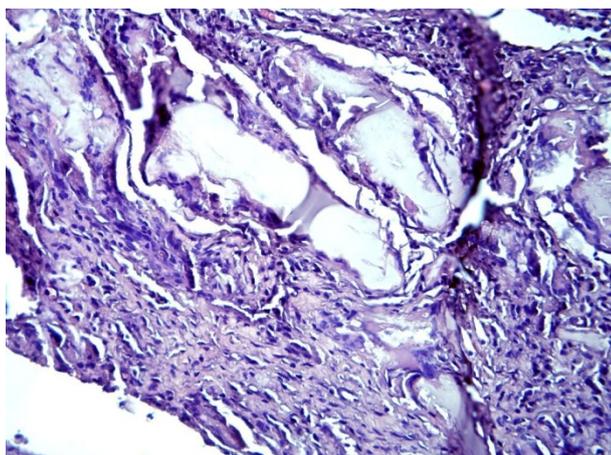


Рисунок 100 - Отвержденный *in vivo* материал, соотношение ПВС/ГЭК=0/100. 1 месяц. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$

В грануляционной ткани видны бесцветные фрагменты материала, которые резорбируются макрофагами и гигантскими клетками.

В области введения материала макроскопические размеры подкожных имплантатов были меньше, чем в 1-ой группе (соотношение ПВС/ГЭК=90/10). Гистологически имплантат так же состоит из внутренней части, заполненной фрагментами материала гомогенной структуры, которые, в отличие от

предыдущего образца, состоящего преимущественно из поливинилового спирта, почти не воспринимают окраску ни гематоксилином, ни эозином.

Наружная часть имплантата замещена приблизительно на 40-50 % площади грануляционной тканью с большим количеством макрофагов. В этой грануляционной ткани в значительно большем количестве, чем в 1-ой группе, обнаруживаются фрагменты материала, окружённые многочисленными макрофагами и гигантскими клетками, которые осуществляют резорбцию материала (Рисунок 100). Грануляционная ткань имеет более зрелый характер и входит в стадию фиброизирования. Вокруг имплантата видна зрелая соединительно-тканная капсула разной толщины.

Внутренние органы. В печени полнокровие центральных вен и капилляров. Дистрофические изменения гепатоцитов отсутствуют, отмечается только некоторое увеличение количества купферовских клеток. В почках и селезёнке никаких изменений по сравнению с контрольной группой не обнаружено.

### 3 группа - Материал, полученный сшивкой *in vivo* ПВС/ГЭК=50/50

В области введения материала имплантат остаётся в центре образования в виде фрагментированного или слабо фрагментированного гомогенного материала, полученный сшивкой *in vivo* материала, окрашивающегося подобно материалу с большим содержанием поливинилового спирта (1-я группа), материал подвергается в большей степени резорбции макрофагами и гигантскими клетками, замещается соединительной тканью (Рисунок 101А). Фиброзирующаяся грануляционная ткань занимает около 50% площади имплантата, но в ней остаются крупные фрагменты, которые резорбируются макрофагами и гигантскими клетками, у двух животных эти фрагменты прокрашиваются подобно материалу, преимущественно состоящему из ПВС, у одного – часть прокрашивается слабо, что характерно для материалов содержащих заметное количество ГЭК (Рисунок 101Б).

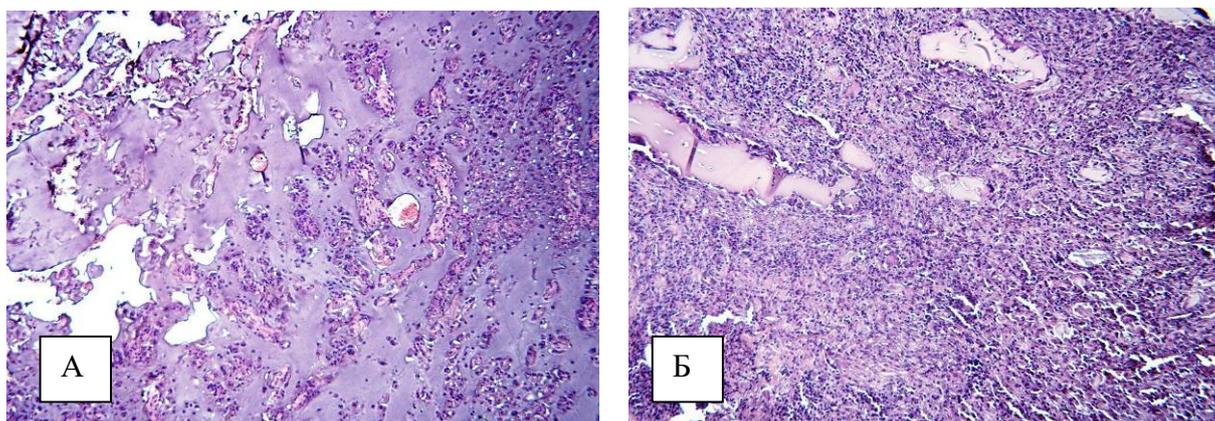


Рисунок 101 - Материал, полученный шивкой *in vivo*, соотношение ПВС/ГЭК=50/50. 1 месяц

(А) - слева фрагментированный материал, справа выраженная резорбция этого материала макрофагами и гигантскими клетками, прорастание тяжами фиброзирующей грануляционной ткани. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$ ; (Б)- Участок в подкожном образовании, в котором остаются светлые фрагменты. Вокруг фиброзная соединительная ткань. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$

Внутренние органы. В печени отмечается умеренное увеличение числа купферовских клеток по сравнению с контролем, но не больше, чем в 3 и 4 группах. Дистрофия гепатоцитов отсутствует, имеется умеренное полнокровие межбалочных капилляров. В селезёнке и почках отличия от контроля не выявляются.

Срок имплантации - 3 месяца

Контрольная группа: подкожно имплантированные стеклянные образцы.

В области имплантации материала вокруг стеклянной пластинки через 3 месяца сохраняются соединительно-тканная капсула приблизительно такой же толщины и структуры, как через 1 месяц. Однако содержание макрофагов во внутреннем слое капсулы уменьшается (Рисунок 102). В окружающей ткани

лимфо-макрофагальная инфильтрация уменьшается по сравнению с месячным сроком.

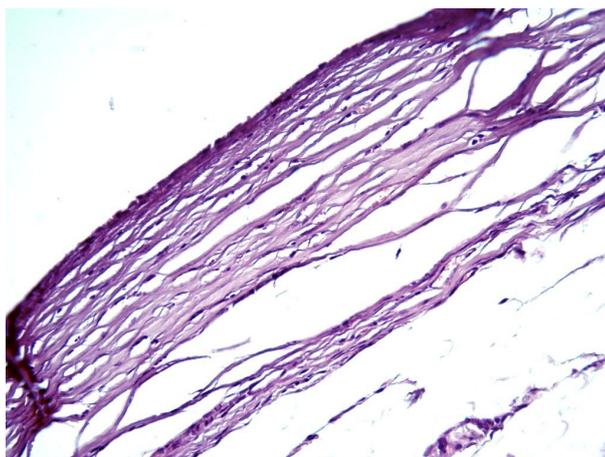


Рисунок 102. Контрольная группа. 3 месяца. Соединительно-тканная капсула вокруг стеклянной пластинки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$

Внутренние органы (почки, печень, селезёнка) умеренно полнокровны, их структура и клеточный состав не отличаются от нормы и от внутренних органов этой серии через 1 месяц.

1 группа – Материал, полученный сшивкой *in vivo* ПВС/ГЭК=90/10

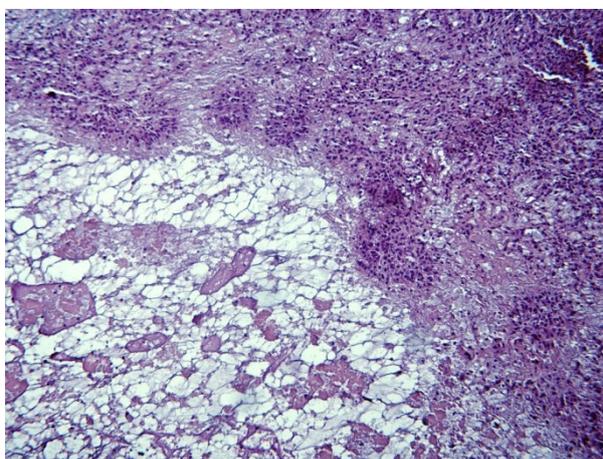


Рисунок 103 - Материал, полученный сшивкой *in vivo*, соотношение ПВС/ГЭК=90/10. 3 месяца. Слева внизу мелкочаеистая структура имплантата. Вверху грануляционная ткань, заместившая материал. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$ .

В области введения материала имплантат под кожей у одного животного в центре приобретает местами мелкочаеистую структуру (Рисунок

103). В этих участках видны очаги отложения фибрина и немногочисленные макрофаги. У двух других животных в центре остаётся гомогенный материал, но этого материала значительно меньше, чем в 1 месяц. В отличие от срока 1 месяц материал в центре образования не вываливается при обработке, что, по-видимому, объясняется его уплотнением.

Периферическая часть образования больше чем на 50% всего имплантата, замещена грануляционной тканью, очень богатой макрофагами, гигантскими клетками и лимфоцитами. Однако в этой ткани выявляются фибробласты и тонкие коллагеновые волокна. Чем ближе к тонкой капсуле, тем более зрелая соединительная ткань: больше фибробластов и коллагеновых волокон. Однако и в грануляционной ткани сохраняются очаги материала, но потерявшие свою ячеистую структуру. Они резорбируются гигантскими клетками и макрофагами.

Внутренние органы. Печень имеет обычную структуру, умеренно полнокровные межбалочные капилляры. Дистрофические изменения гепатоцитов отсутствуют. Число купферовских клеток несколько увеличено и соответствует печени этой группы животных через 1 месяц после введения материала. В селезёнке и почках нет отличий от контроля.

2 группа - Материал, полученный сшивкой *in vivo* ПВС/ГЭК=0/100

В области введения материала у всех животных материал имплантата в виде гомогенных фрагментов занимает большую часть объёма подкожного образования (70-80%). Окрашивание этого материала слабое, но несколько сильнее, чем на срок 1 месяц. На периферии этот материал прорастает тяжами макрофагов и фибробластов. В центре прорастание минимально. На периферии материал имплантата замещён фиброзирующей соединительной тканью, в которой остаются ещё фрагменты этого материала. В соединительной ткани многочисленные макрофаги и гигантские клетки (Рисунок 104).

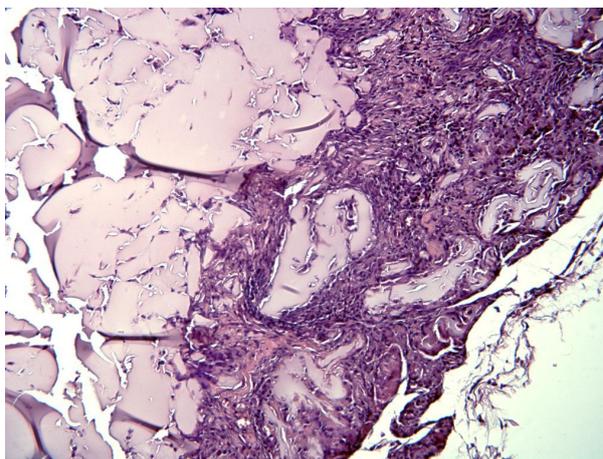


Рисунок 104 - Материал, полученный шшивкой *in vivo*, соотношение ПВС/ГЭК=0/100. 3 месяца

Слева - частично проросший фибробластами и макрофагами участок. Справа – фиброзированная грануляционная ткань с фрагментами материала. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$

Внутренние органы печень, почки и селезёнка умеренно полнокровны, дистрофические изменения гепатоцитов и эпителия извитых канальцев почки отсутствуют, лимфоидные фолликулы селезёнки не гиперплазированы. Число купферовских клеток печени несколько увеличено.

3 группа - Материал, полученный шшивкой *in vivo*, ПВС/ГЭК=50/50

В области введения материала у двух животных большая часть образования состоит из гомогенного материала - либо фрагментированного, либо сплошного. Материал проращён тяжами соединительной ткани, а также макрофагами и гигантскими клетками. При большом увеличении видно, что имплантированный материал имеет уже не гомогенную, а мелкозернистую или мелковакуолизированную структуру (Рисунок 105А). Фрагменты материала активно резорбировались макрофагами и гигантскими клетками (Рисунок 106Б).

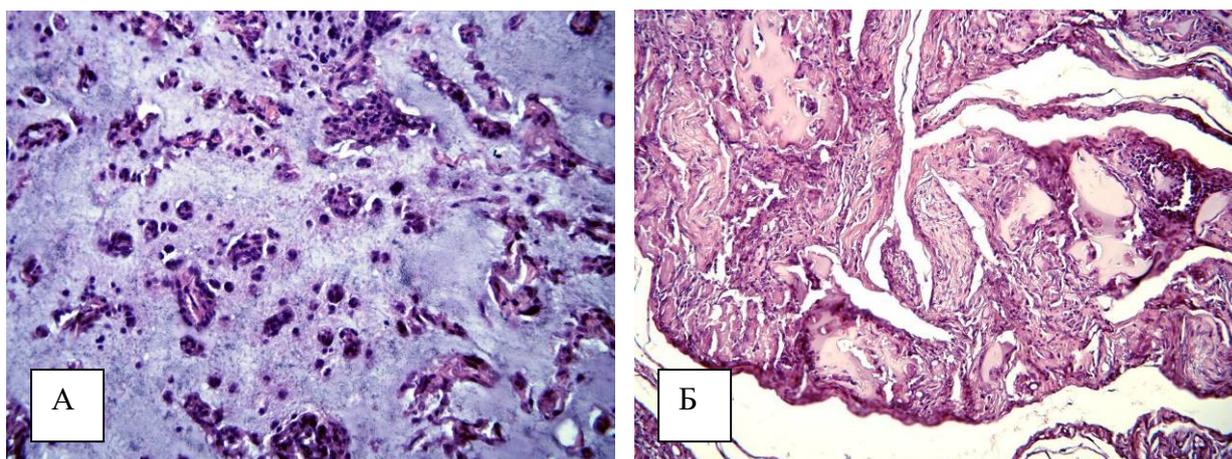


Рисунок 105- Материал, полученный шивкой *in vivo*, соотношение ПВС/ГЭК=50/50. 3 месяца

(А) - Мелковакуольная и мелкозернистая трансформация имплантированного материала. Видны небольшие тяжи соединительной ткани, многочисленные макрофаги и гигантские клетки. Окраска гемтоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$ ; (Б)- Полное прораствание имплантата соединительной тканью. Видны многочисленные фрагменты имплантата разной степени окрашиваемости. Окраска гемтоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$

Внутренние органы полнокровны, лишены дистрофических изменений. В печени несколько повышено число купферовских клеток.

При изучении препаратов, полученных в группах животных, которым вводились образцы макропористых полимерных гидрогелей, наблюдалась следующая картина.

Срок 1 месяц.

4 группа – макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=90/10

В области имплантации макроскопически обнаружено образование размером  $0,8 \times 0,5$  см. С толстой стенкой и полужидкой серединой, которая вываливается при разрезе. Гистологически внутреннее содержимое образования практически лишено пористой структуры и представляет собой скопления материала разной плотности слабо базофильной окраски. Местами

оно гомогенное, на других участках остаются сильнее окрашенные остатки пористой структуры материала (Рисунок 106).

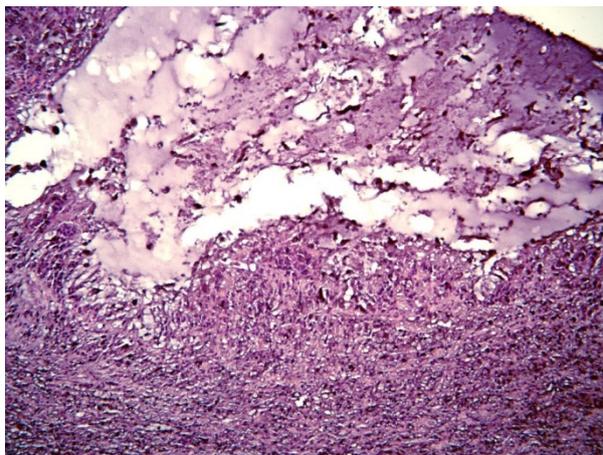


Рисунок 106 - Макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=90/10. 1 месяц.

Вверху видны остатки имплантата, внизу – грануляционно-фиброзная ткань с многочисленными макрофагами и гигантскими клетками. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 200$

Это содержимое окружено слоем грануляционно-фиброзной ткани, состоящей из коллагеновых волокон, фибробластов, многочисленных макрофагов и гигантских многоядерных клеток. Очевидно, данный слой сформировался при прорастании соединительной тканью наружных слоев имплантированного материала. Грануляционная ткань окружена тонкой соединительно-тканной капсулой. В наружном слое грануляционной ткани скопления материала гомогенной структуры, резорбируемого макрофагами и гигантскими клетками. Окружающая клетчатка слабо инфильтрирована макрофагами, но нейтрофильных лейкоцитов там не обнаруживается.

Внутренние органы. В печени полнокровие сосудов, увеличено содержание купферовских клеток, но не больше, чем у животных которым имплантировались отверждаемые *in vivo* образцы. Дистрофические изменения гепатоцитов отсутствуют. В селезёнке у 1-го животного слабая гиперплазия лимфоузлов, у остальных животных нормальная структура ткани селезёнки. Почки имеют обычную структуру и не отличаются от контроля.

### 5 группа – макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=75/25

В области имплантации имеется округлое образование, окружённое тонкой зрелой соединительно-тканной капсулой. Внутренняя часть образования представляет собой макропористую губчатую структуру (Рисунок 107А). Перегородки губки представлены мелкозернистым базофильным (гематоксилинофильным) материалом.

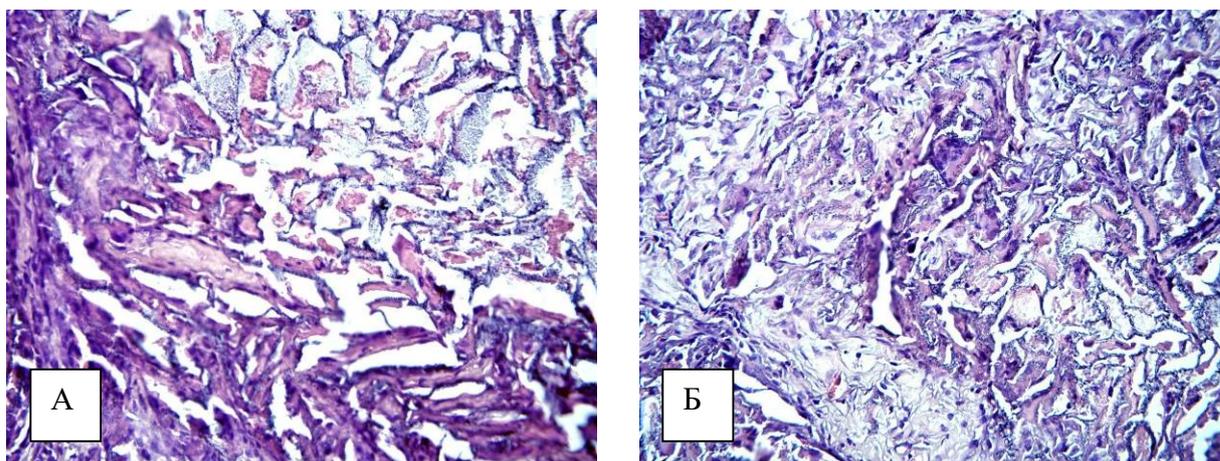


Рисунок 107 - Макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=25/75. 1 месяц.

(А) -сверху справа пористая структура из базофильного материала, в ячейках – базофильный зернистый материал и оксифильный гомогенный материал. Внизу слева - созревающая соединительная ткань, макропористый материал. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$ ; (Б) - Соединительная ткань на периферии имплантата. Видна макрофагальная и гигантоклеточная резорбция мелких фрагментов зернистого базофильного и оксифильного материала. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$

В просвете ячеек губки располагается оксифильный (эозинофильный) материал и базофильный материал. На основании окраски материалов предыдущих групп, можно предполагать, что зернистый базофильный материал содержит ГЭК, тогда как оксифильный материал преимущественно состоит из ПВС. Количество базофильного материала заметно больше, чем оксифильного.

Вокруг макропористой губки, которая занимает около 2/3 площади всего образования, располагается относительно зрелая, но очень богатая макрофагами, гигантскими клетками и лимфоцитами, ткань. Внутри этой ткани видны фрагменты полимерного материала (Рисунок 107Б), которые подвергаются резорбции макрофагами и гигантскими клетками.

Внутренние органы. Печень, селезёнка и почки имеют такую же структуру, как в контрольной и в 4-й группе.

6 группа – макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=75/25

В центре образования сохраняется пористая структура имплантированного материала, занимающая от 50 до 70 % площади. Перегородки полимерной губки состоят из базофильной зернистой субстанции, просвет ячеек либо свободен, либо занят базофильным или оксифильным материалом (Рисунок 108). На периферии губка проращена или замещена фиброзирующей грануляционной тканью, в которой идёт активная резорбция материала гигантскими клетками и макрофагами.

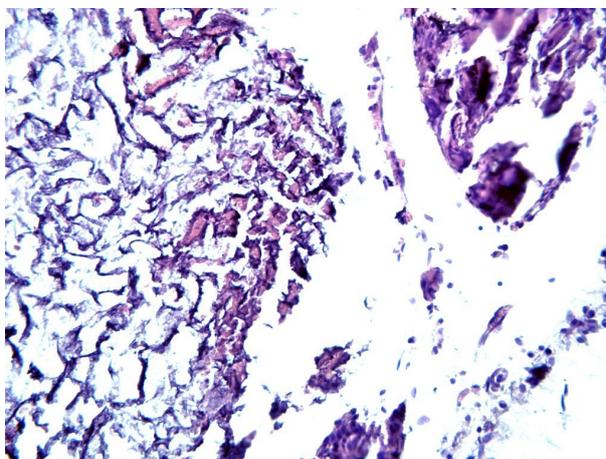


Рисунок 108 - Макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=50/50. 1 месяц. Слева губка, состоящая из базофильных перегородок и частично заполненная оксифильным материалом. Справа сверху группа гигантских многоядерных клеток.

Внутренние органы. Печень, почки и селезёнка не отличаются по гистологической структуре от контроля. Число купферовских клеток в печени увеличено в той же степени, как и в других группах этой серии.

Срок 3 месяца.

4 группа – макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=90/10

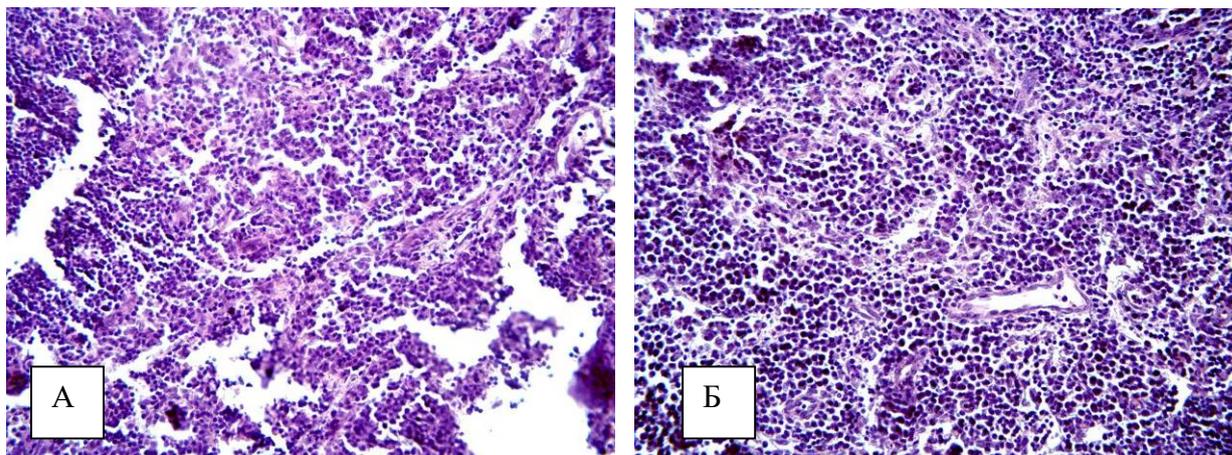


Рисунок 109 - Макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=90/10. 3 месяца.

(А)- на месте материала видна прорастающая соединительная ткань, многочисленные мелкие фрагменты оксифильной субстанции и немногочисленные участки базофильной зернистой субстанции. Видны многочисленные гигантские клетки и макрофаги, резорбирующие имплантат. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$ ; (Б) - лимфоузел с гиперплазированными фолликулами, выраженной плазматизацией и скоплением макрофагов. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 400$

У одного животного на месте губки видна соединительная ткань, многочисленные мелкие фрагменты оксифильной и субстанции и немногочисленные участки базофильной зернистой субстанции. Видны многочисленные гигантские клетки и макрофаги, резорбирующие имплантат (Рисунок 109А). В этой ткани остаются лишь небольшие участки ячеистой структуры. У двух других животных в области имплантации обнаружен только лимфоузел, а сам имплантат не обнаружен вследствие полной резорбции. В лимфоузле отмечается заметная гиперплазия лимфоидных фолликулов, выраженная плазматизация (увеличение числа плазматических

клеток) и повышенное содержание макрофагов с зернистостью в цитоплазме, что свидетельствует о фагоцитозе имплантированного материала (Рисунок 109Б).

Внутренние органы. Отсутствуют отличия от контроля в структуре и клеточном составе печени, почек и селезёнки кроме повышенного количества купферовских клеток в печени.

5 группа – макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=25/75

Имплантат при макроскопическом изучении не обнаружен у всех трёх животных. У двух животных взята уплотнённая жировая ткань, в которой гистологически отмечается умеренной полнокровие сосудов и отдельные лимфо-макрофагальные инфильтраты. У третьего животного взят лимфоузел с гиперплазированными лимфоидными фолликулами, на периферии которых, отмечается увеличение числа плазматических клеток и макрофагов.

Внутренние органы не показывают каких-либо отличий от контроля.

6 группа – макропористый полимерный гидрогель ПВС/ГЭК=50/50

У всех трёх животных не обнаружен подкожный имплантат. В двух случаях взята жировая клетчатка с небольшими лимфо-макрофагальными инфильтратами. У третьего животного была взята мышечная ткань без каких-либо изменений.

Внутренние органы: отсутствуют какие-либо изменения по сравнению с другими животными этой серии.

Таким образом, можно 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, 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.

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

Таким образом, результаты патоморфологических исследований подтверждают результаты физиологических, гематологических, биохимических, не выявивших отрицательного воздействия на организм подопытных животных.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии заметной токсичности исследуемых материалов и позволяют утверждать об их пригодности для использования в качестве основы для изделий медицинского назначения различных типов, в том числе контактирующих с кровью и внутренними средами организма.

### 3.3.3 Исследование токсичности гидрогелей на основе ПВС дополнительно содержащих заряженные группы

#### 3.3.3.1 Исследование цитотоксичности гидрогелей на основе ПВС дополнительно содержащих заряженные группы

Поскольку одной из основных рассматриваемых областей применения макропористых гидрогелей на основе поливинилового 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, руководитель проф. Е.А.Марквичева). В качестве клеточной модели была использована линия мышечных фибробластов (L929). Количество жизнеспособных клеток

определяли при помощи метода МТТ, в основе которого лежит способность митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ живых клеток восстанавливать краситель МТТ с образованием формазана, количество которого может быть легко определено с использованием методов спектрофотометрии.

Далее приведены результаты, полученные при проведении экстракт-тестов (Рисунок 110). Как можно видеть, все гидрогели, содержащие ионогенные звенья, проявляли значительную токсичность на ранних этапах культивирования. При этом, токсичность, которую демонстрировали гидрогели, содержащие звенья акриловой кислоты, была более заметной.

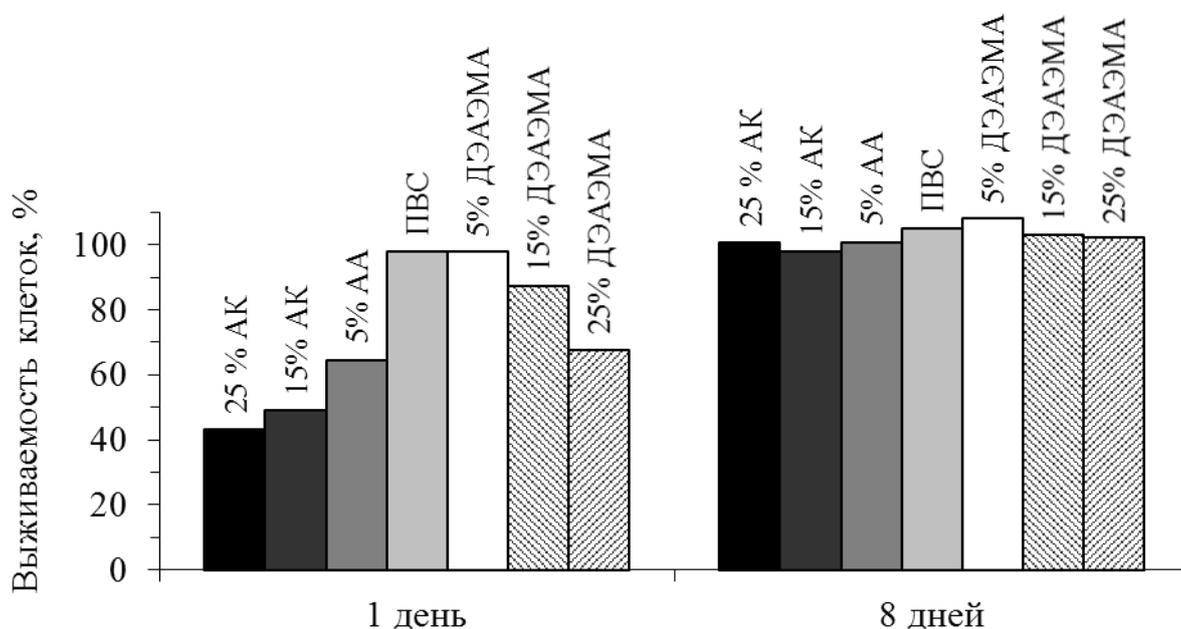


Рисунок 110 - Результаты экстракт-тестов для гидрогелей различного состава.

(Монослой клеток, культивированный в отсутствие вытяжек (контроль) принят за 100 %)

При более длительных сроках культивирования обнаруживаемая образцами гидрогелей токсичность значительно снижалась. Как можно видеть ниже (Рисунок 110), на 8-й день инкубирования в культурах, к которым были добавлены вытяжки из образцов полимерных гидрогелей, процент выживших клеток был близок к контролю.

Полученные данные явно свидетельствовали о факте наличия в объеме изученных образцов токсикантов, которые вызывали массовую гибель клеток на начальных этапах культивирования. В силу того, что при получении образцов гидрогелей проводилась их тщательная отмывка, качество которой оценивалась посредством контроля оптической плотности промывных вод в интервале длин волн 190-240 нм, в котором расположены характерные полосы поглощения функциональных групп используемых мономеров, можно было предположить, что наиболее вероятной причиной появления токсичных соединений являлась термодеструкция образцов в процессе паровой стерилизации перед проведением тестов.

В рамках проверки данного предположения в нескольких циклах «стерилизация-отмывка» изучалась оптическая плотность и рН среды вытяжек из образцов гидрогелей, помимо этого проводился и контроль изменения массы образцов.

Было выявлено, что в вытяжки из образцов обоих типов после проведения стерилизации обнаруживали поглощение в УФ-области спектра, а величина их рН для образцов, содержащих кислотные группы, находилась в кислотной, а для образцов с аминогруппами, соответственно, щелочной области.

Причем, и поглощение и изменение рН вытяжки увеличивались с ростом содержания заряженных групп в составе образцов гидрогелей, но при этом для гидрогелей, содержащих звенья акриловой кислоты, данный эффект был выражен более ярко. Более явно выражена была и потеря массы образцами при стерилизации. Так, например, если для содержащих аминогруппы образцов, потеря массы составляла от 1 до 3 %, в зависимости от содержания звеньев низкомолекулярного сомономера, то гидрогелей, имеющие в своем составе звенья акриловой кислоты, теряли от 1 до 7,5 % веса.

Наличием продуктов термодеструкции, выделяющихся из объема образцов гидрогелей, объясняется значительная цитотоксичность, продемонстрированная образцами также и в проведенных контакт-тестах.

Как можно видеть на рисунке, приведенном ниже (Рисунок 111), образцы на протяжении достаточно длительного срока сохраняли значительную токсичность, что, по-видимому, объясняется как с существенно более высоким, по сравнению с экстракт-тестом, содержанием, поступающих в культуральную среду токсикантов - продуктов термодеструкции, так и возможным пролонгированием их выделения из объема гидрогеля. Как и следовало ожидать, токсичность образцов возрастала с ростом содержания в них звеньев низкомолекулярных сомономеров, что, очевидно, связано с ростом количества токсичных продуктов, образующихся при стерилизации.

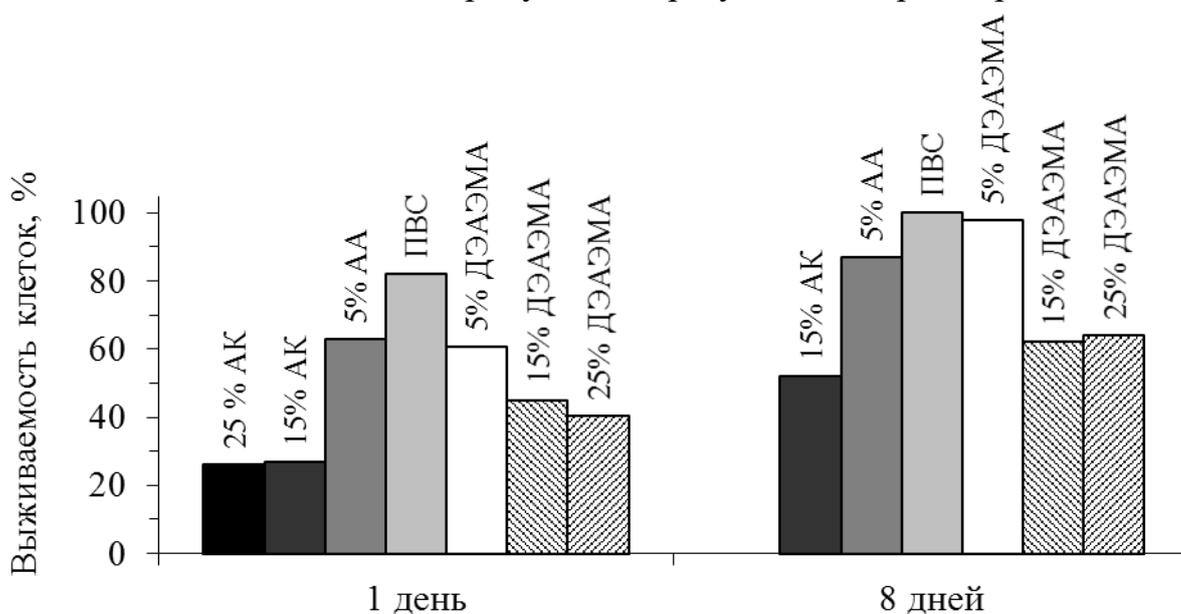


Рисунок 111 - Результаты контакт-тестов для гидрогелей различного состава.

(Монослой клеток, культивированный в отсутствие гидрогелей (контроль) принят за 100 %)

На основании полученных данных был сделан вывод о необходимости введения стадии дополнительной отмывки гидрогелей после термической

стерилизации, либо использовании альтернативных более мягких методов стерилизации.

Как можно видеть из представленных ниже выборочных данных экстракт-тестов (Рисунок 112), проведенных для образцов, которые были отмыты после стерилизации, выживаемость клеток для всех образцов, вне зависимости от их состава, был близок к аналогичному показателю контроля. Результаты, полученные при проведении контакт-тестов образцов гидрогелей, приведены в последующих главах настоящей работы.

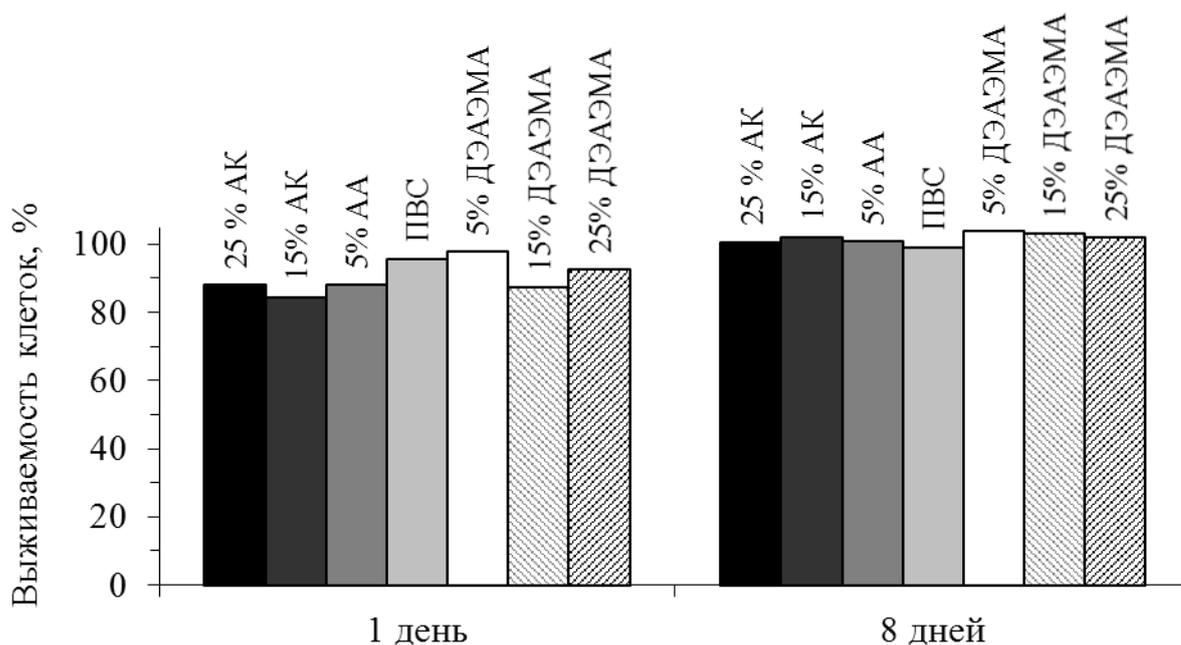


Рисунок 112 - Результаты экстракт-тестов для гидрогелей различного состава после отмывки.

(Монослой клеток, культивированный в отсутствие вытяжек (контроль) принят за 100 %)

Таким образом, можно утверждать, что разработанные полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта в случае использования мягких условий стерилизации, либо дополнительной отмывки перед применением характеризуются сравнительно низкой цитотоксичностью и потенциально могут быть использованы в качестве основы матриксов для выращивания клеток и тканей.

### 3.3.3.2 Изучение хронической токсичности полимерных гидрогелей ПВС дополнительно содержащих заряженные группы

С целью изучения хронической токсичности и реакции тканей на введение синтезированных макропористых гидрогелей различного состава были проведены эксперименты по имплантации образцов гидрогелей различного состава. В качестве экспериментальных животных выступали нелинейные белых половозрелые крысы. Образцы гидрогели имплантировались в мышечные ткани экспериментальных животных. Забор материала для изучения осуществлялся на 7, 21 сутки и спустя 2,3,4,6 месяцев, соответственно.

Материалом для гистологических и гистохимических исследований служили изъятые из места имплантации образцы мышечной ткани. Пример типичных микрофотографий гистологических препаратов приведен ниже (Рисунок 113).

В результате изучения полученных биологических материалов было установлено, что при имплантации образцов для гидрогелей всех составов на ранних сроках (7 дней, 21 день) (Рисунок 113А) было характерно развитие воспалительная реакции грануляционного характера с образованием фиброзной капсулы без рубцевания.

На гистологических препаратах можно видеть поперечно-полосатую мышечную ткань с явлениями отека, очагами фиброзной ткани со структурами геля и очаговыми кровоизлияниями в этой зоне, а также большое количество новообразованных сосудов капиллярного типа, полнокровных сосудов, единичные гигантские многоядерные клетки инородных тел и выраженную диффузно-очаговую лимфоидную инфильтрацию, представленную зрелыми лимфоцитами в виде очаговых скоплений.

При фенотипировании клеточный состав стромальной инфильтрации представлен зрелыми Т- (60-70%) и В-лимфоцитами (30-40%). Реакция с антителами к CD45, CD 3, CD15, CD20 при иммуногистохимическом анализе для всех образцов положительна.

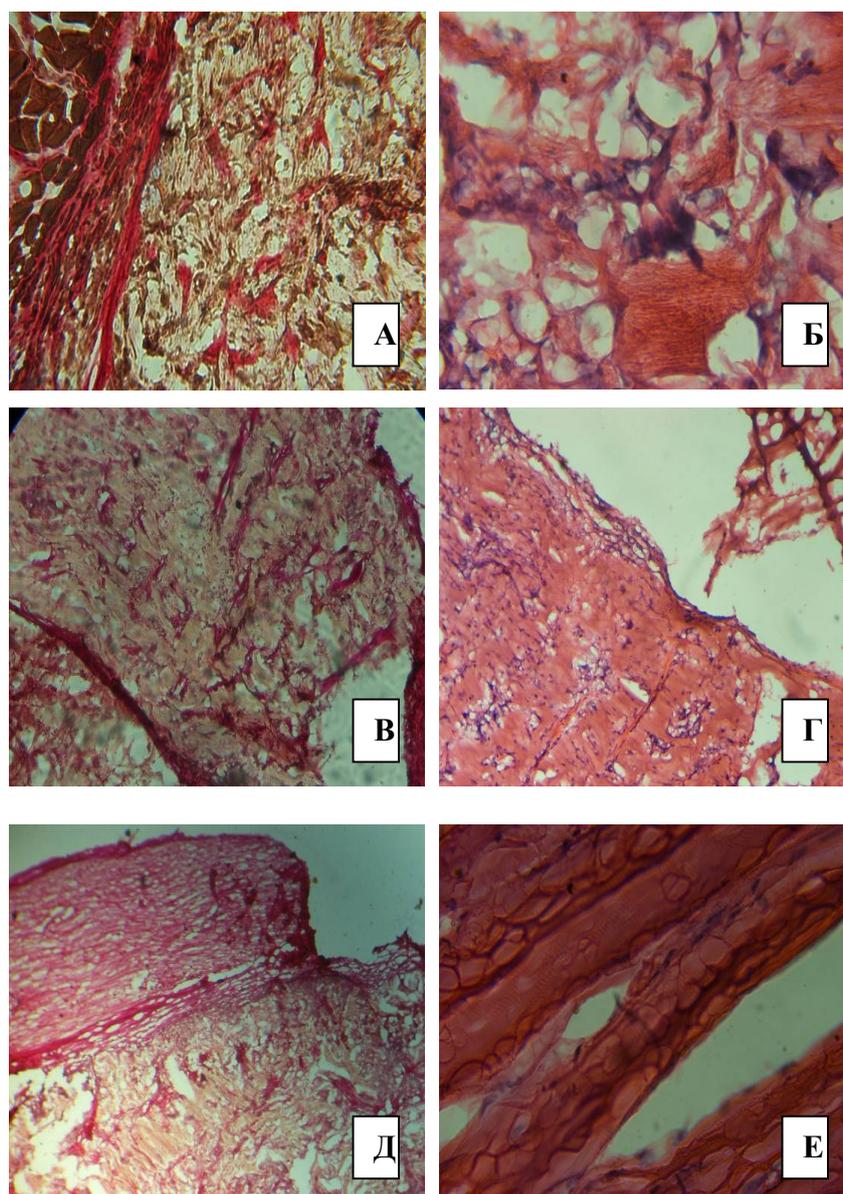


Рисунок 113 - Примеры микрофотографий гистологических препаратов

(А – гидрогель, содержащий 5 % АК, 28 дней, окраска по Ван-Гизону, Б – гидрогель, содержащий 5 % АК, 2 месяца, окраска гематоксилин-эозином, В- гидрогель, содержащий 5 % АК, 2 месяца, окраска по Ван-Гизону, Г- гидрогель, содержащий 2,5 % ДЭАЭМА, 3 месяца, окраска по Ван-Гизону, Д - гидрогель, содержащий 15 % ДЭАЭМА, 3 месяца, окраска по Ван-Гизону, Е - гидрогель, содержащий 5 % АК, 5 месяцев, окраска гематоксилин-эозином)

При этом, как этого и следовало ожидать, степень развитости наблюдавшейся воспалительной реакции, о которой можно судить по

величине отека, толщине и строению фиброзной капсулы и количеству лимфоцитов, для образцов различного строения была различна. Интенсивность воспалительной реакции возрастала с ростом количества звеньев низкомолекулярного сомономера в составе гидрогеля. Причем, для гидрогелей содержащих звенья диэтиламиноэтилметакрилата эта зависимость была более выражена, нежели для гидрогелей со звеньями акриловой кислоты, что видно из приведенных зависимостей (Рисунок 114).

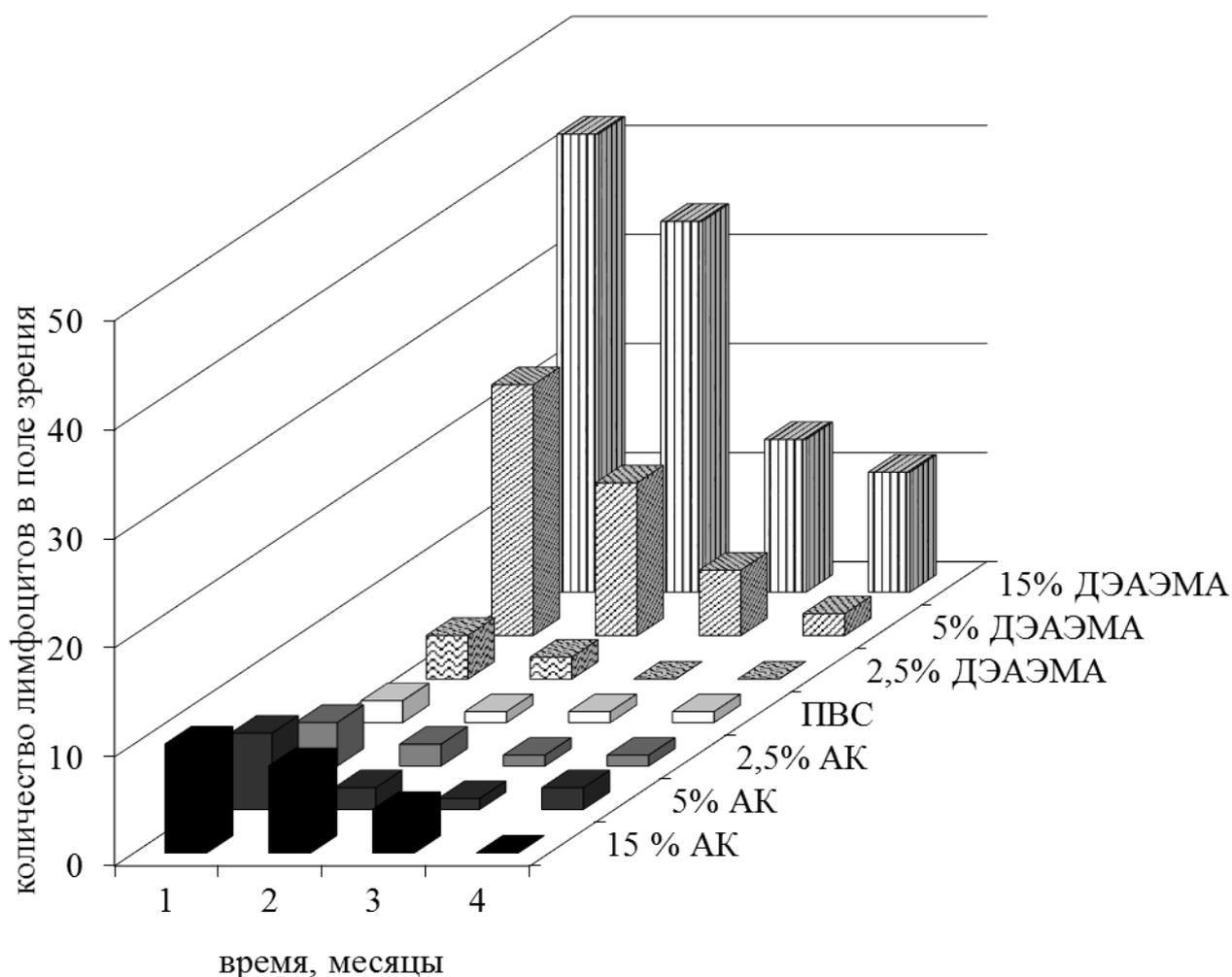


Рисунок 114 - Зависимость степени выраженности воспалительной реакции на имплантаты различного состава

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 (Рисунок 113).

При этом, при имплантации гидрогелей, содержащих отрицательные заряженные группы, либо не вообще не содержащих ионогенных групп, на месте замещенного имплантата преимущественно, обнаруживалась, поперечно-полосатая скелетная мускулатура и рыхлая соединительная ткань. В случае же имплантации гидрогелей, содержащих в своем составе более 5 % звеньев ДЭАЭМА, наблюдалось образование плотной соединительной ткани. Данный факт может объясняться как повышенной, по сравнению с реакцией на остальные образцы, воспалительной реакцией, так и какими-либо специфическими аспектами взаимодействия тканей организма с вводимыми материалами, что требует более детального изучения.

При иммуногистохимическом анализе реакция с антителами к CD45, CD15, CD3, CD20 для всех образцов, кроме образцов, содержащих большое число звеньев ДЭАЭМА, не обнаруживалась.

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.

#### 3.3.4 Оценка влияния состава и структуры полимерных гидрогелей на скорость их биодеградации.

При проведении экспериментов по имплантации образцов макропористых полимерных гидрогелей на основе поливинилового спирта экспериментальным животным, описанных нами ранее, было установлено, что

биодegradация этого типа материалов происходит за счёт биодegradации под действием макрофагов после прорастания в них соединительной ткани. Причем, динамика дegradации изотропных гидрогелей заметно уступает динамике биодegradации 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 биодegradации.

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

Эксперимент проводили на беспородных крысах-самцах. Под общим наркозом скальпелем рассекалась предварительно обритая кожа на обеих задних лапах крысы с внутренней стороны. После рассечения фасций, производилась резекция мышечной ткани пинцетом и имплантация образца гидрогеля. Мышцы и кожа зашивалась Z-образно биодegradирующим шовным материалом «Викрил» (Vicryl 3.0). Размер имплантированных образцов (цилиндры диаметром 0,7 мм и длиной 1 см) значительно превосходил размер образцов, использованных при изучении хронической токсичности гидрогелевых материалов, что должно было обеспечить большую продолжительность процесса биодegradации имплантата.

Из эксперимента животные выводились спустя 1,2,3,4,6 месяцев путём передозировки хлороформом (по 5 особей из группы). Материалом для гистологических исследований служили образцы мышечной ткани, изъятые из места имплантации.

Посредством бинокля с малым увеличением (4,5×) с помощью цифровой камеры получали фотоизображения полученных гистологических препаратов поперечных срезов, которые затем анализировали на компьютере с использованием планиметрической программы UTHSCSA Image Tool.

Определяли площадь имплантата и площадь замещенной части имплантата. Данные по каждому имплантату усреднялись.

Как можно видеть из приведенной зависимости (Рисунок 115), степень развитости пористой структуры очевидным образом влияла на динамику биодеградации имплантированных образцов - с ростом общей пористости и среднего размера динамика изменения размера имплантированного образца снижалась.

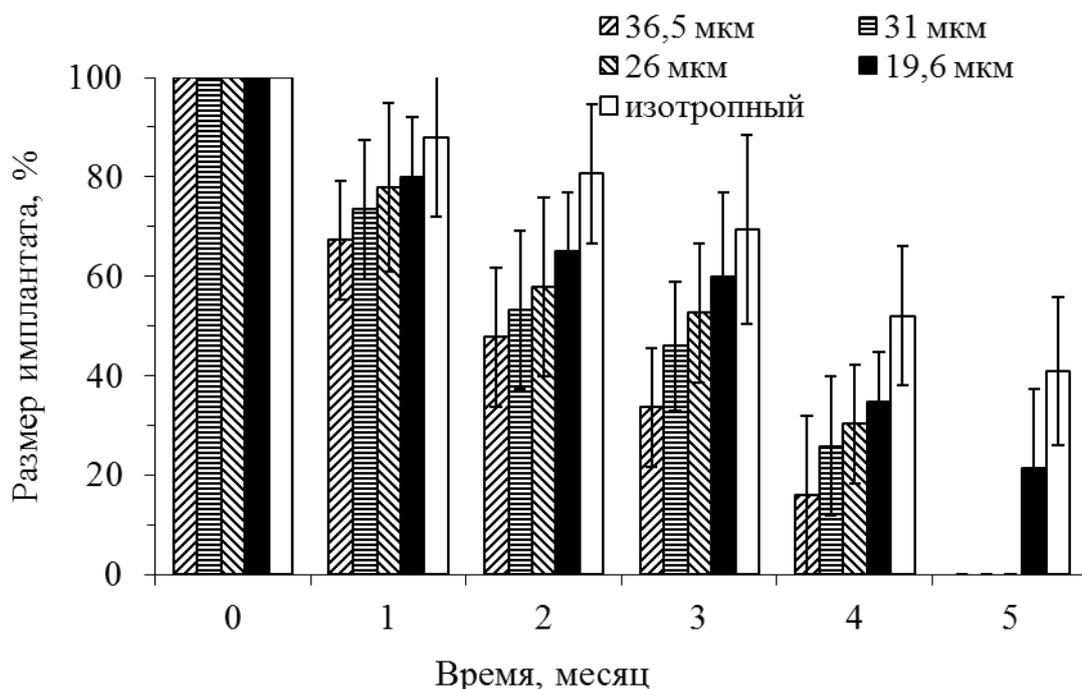


Рисунок 115 – Динамика изменения размеров имплантированных образцов гидрогелей с различным размером пор

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, к сожалению, интервал, в котором может изменяться скорость биодеградации разработанных гидрогелей на основе поливинилового спирта, сравнительно узок, а сроки биодеградации достаточно велики для целого ряда практических задач.

В силу этого, как это упоминалось ранее, нами были разработаны полимерные гидрогели на основе поливинилового спирта и 2-

гидроксиэтилкрахмала. В этом случае наличие фазы гидроксиэтилкрахмала, 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 в рамках 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 было проведено исследование аналогичное описанному в данном разделе выше.

Эксперимент также проводили на беспородных крысах-самцах. Под общим наркозом скальпелем рассекалась предварительно обритая кожа на обеих задних лапах крысы с внутренней стороны. После рассечения фасций, производилась резекция мышечной ткани пинцетом и имплантация образца гидрогеля. Из эксперимента животные выводились спустя 1,2,3,4,6 месяцев.

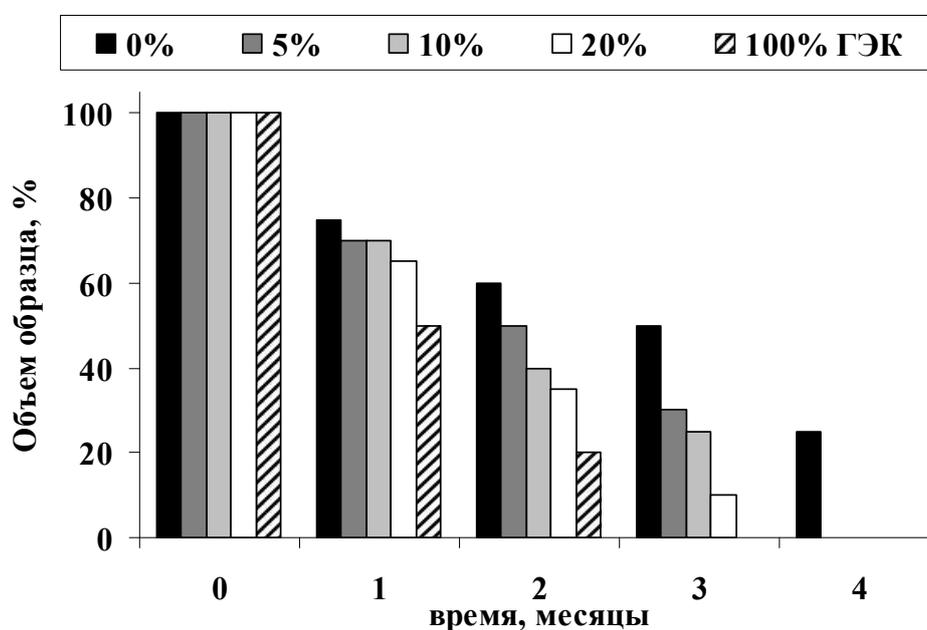


Рисунок 116 - Динамика изменения размеров имплантированных образцов гидрогелей на основе ПВС и ГЭК с различным содержанием ГЭК

Полученные экспериментальные данные приведены на диаграмме выше (Рисунок 116). Как можно видеть даже небольшое количество введенного в состав гидрогеля гидроксиэтилкрахмала приводит к заметному ускорению биодеградации введенного имплантата. Данный факт, очевидно, связан с ускорением фрагментирования образца вследствие ферментативного бесклеточного лизиса участков ГЭК, упрощающим биодеструкцию материала макрофагами и гигантскими клетками инородного тела.

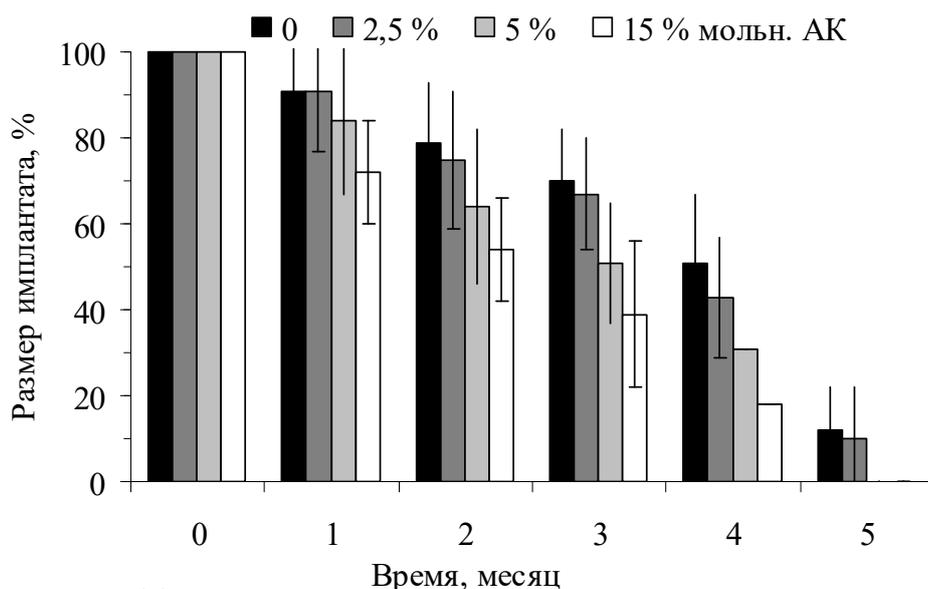


Рисунок 117 - Динамика изменения размеров имплантированных образцов гидрогелей на основе ПВС и АК различного состава

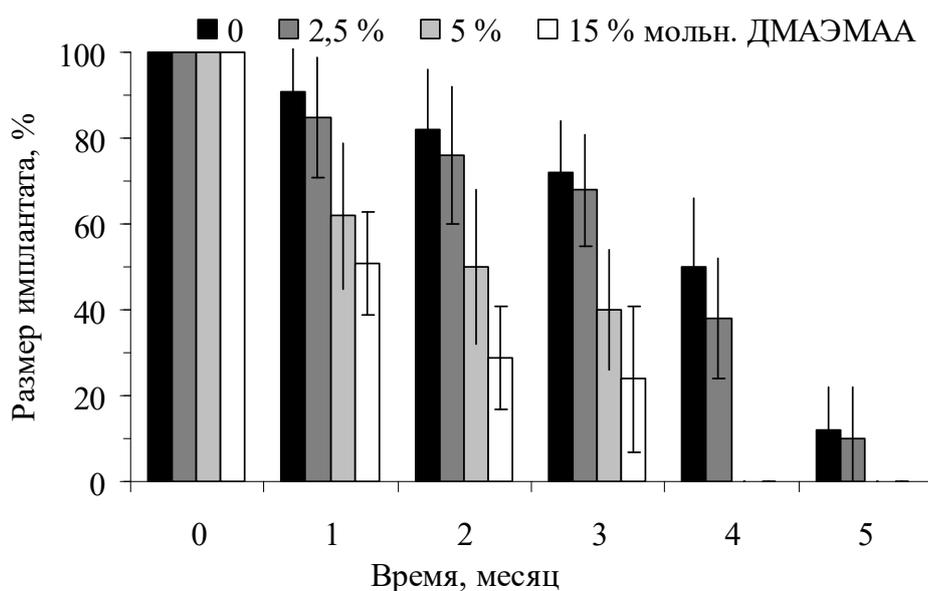


Рисунок 118 - Динамика изменения размеров имплантированных образцов гидрогелей на основе ПВС и ДЭАЭМА различного состава

Ускорение биодegradации полимерных гидрогелей, как это было показано в предыдущем разделе, наблюдалось и при введении в их состав звеньев акриловой кислоты (Рисунок 117) и диэтиламиноэтилметакрилата (Рисунок 118). Как можно видеть, и в данном случае даже при сравнительно небольшом изменении состава гидрогелей удавалось наблюдать заметное ускорение его биодegradации.

Однако, в отличие от материалов, содержащих 2-гидроксиэтилкрахмал, «заряженные» гидрогели вызывали достаточно сильную воспалительную реакцию, возрастающую по мере роста содержаний звеньев акриловой кислоты и ДЭАЭМА (Рисунок 113). Данный факт, очевидно, в заметной степени снижает спектр возможных применений подобных материалов в изделиях, контактирующих с внутренними средами организма.

### 3.3.5 Изучение возможности применения полимерных гидрогелей в качестве основы 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 профессора Голдина М.М.)

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 (в качестве примера приведены фотографии культуры ЛДКЧ через 7 суток культивирования (Рисунок 119)).

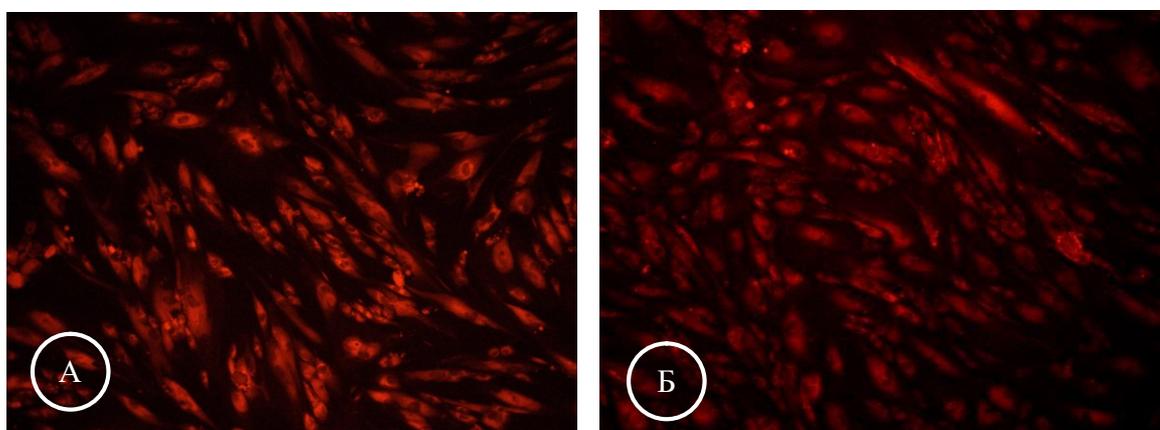


Рисунок 119 - Витальное окрашивание ЛДКЧ через 7 суток культивирования (1-й пассаж), (А) - культура клеток в отсутствие образцов (контроль), увеличение  $\times 400$ , (Б) - культура клеток в присутствии образцов, увеличение  $\times 400$ .

Присутствие образцов гидрогелевого материала в культуре практически не влияло на пролиферативную активность клеток (Таблица 28).

Процесс заселения макропористых гидрогелей клетками ЛДКЧ и ФКК был выражен весьма слабо, на материале изделий не наблюдалось оседания клеток из суспензии при посеве культуры ЛДКЧ и ФКК на планшеты. В результате, в течение 1-х и 2-х суток культивирования все образцы материала изделий не содержали клеток. Появление отдельных клеток на поверхности материала изделий отмечено лишь на 3-4-е сутки после посева (Рисунок 120А-В). Можно предположить, что это обусловлено миграцией

фибробластов ЛДКЧ и ФКК из сформировавшегося к тому времени плотного монослоя.

Таблица 28- 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.

При этом количество прикрепленных на поверхности образцов клеток составило к концу 4 суток 0,01-0,02 тыс./см<sup>2</sup>, к концу 5-х суток - 0,03-0,04 тыс./см<sup>2</sup>, к концу 7-х суток - 0,05-0,1 тыс./см<sup>2</sup>, 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.

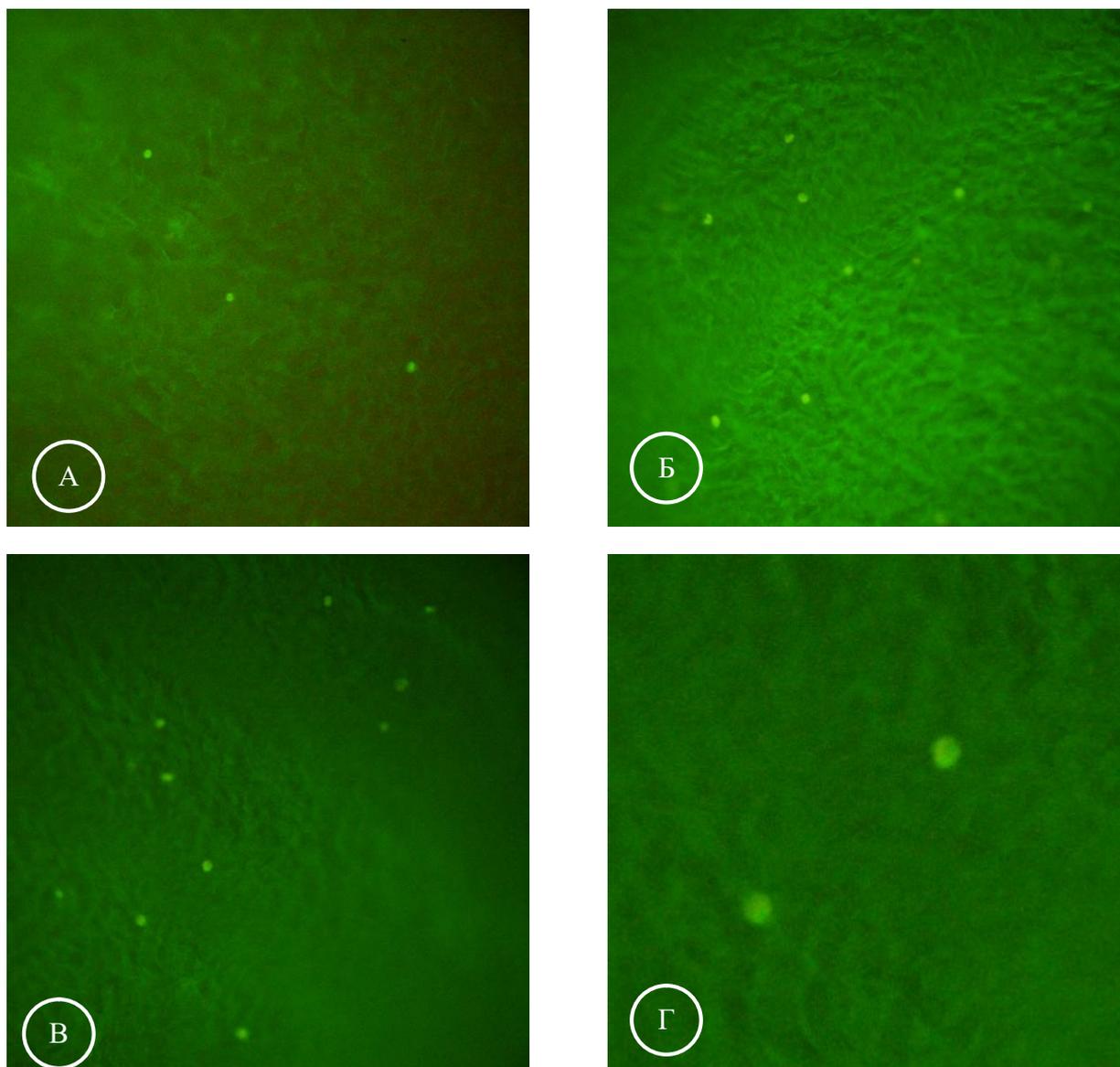


Рисунок 120 - Выявление фибробластов линии М-22 в образцах на разных сроках культивирования. (А) – 3 суток, (Б) 5 суток, (В) 7 суток, увеличение  $\times 100$ , (Г)- 10 суток, увеличение  $\times 400$ .

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 (Рисунок 120Г), не характерную для распластаных фибробластов линии ЛДКЧ и ФКК. Кроме того, отмечалось некоторое снижение целостности клеточных мембран (ЦКМ) прикрепленных клеток, которое, впрочем, не выходило за референтные границы нормы.

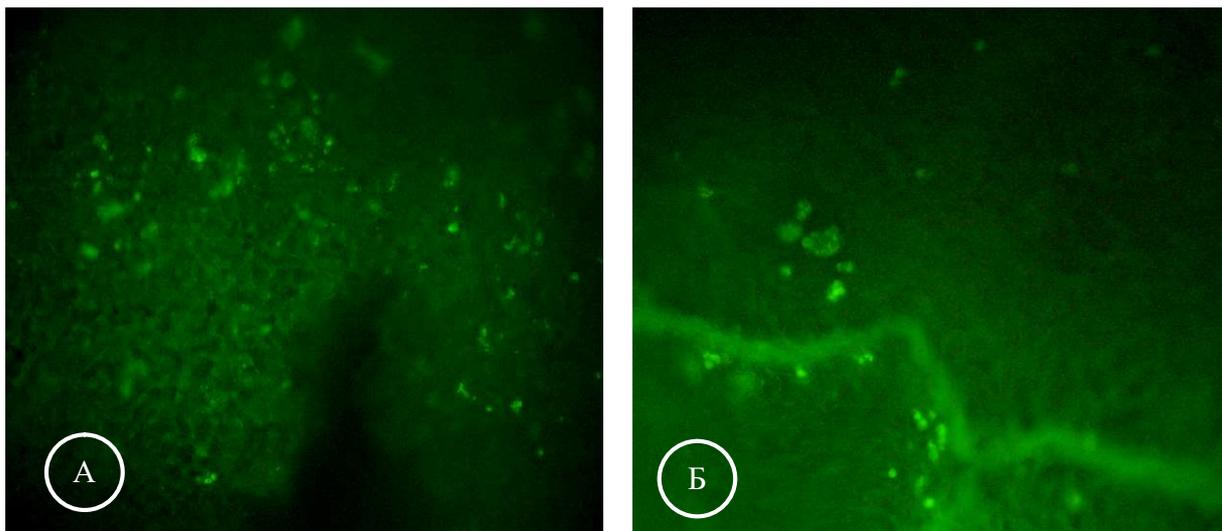


Рисунок 121 - Выявление клеток тимуса поросенка в составе материала изделий на 5-е сутки культивирования, (А) – увеличение  $\times 100$ , (Б) – увеличение  $\times 200$

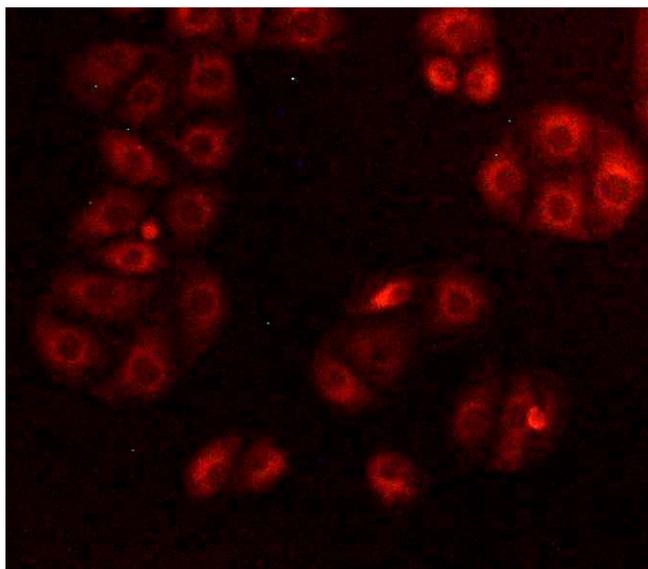


Рисунок 122 - Выявление клеток тимуса поросенка в составе образцов гидрогелевого материала на 5-е сутки культивирования: ЦКМ = 33,5 баллов (норма 28-42 балла). Увеличение  $\times 500$

В культуре клеток тимуса поросенка заселение образцов отмечено по истечении суток. На поверхности гидрогелевого материала были выявлены одиночные клетки тимуса поросенка, а также небольших группы по 2-7 клеток (Рисунок 121), что указывает на наличие у них пролиферативной активности. Прикрепленные на материале изделий клетки тимуса поросенка

имели характерную для них форму и нормальные значения ЦКМ (Рисунок 122). Вместе с тем, количество прикрепленных клеток в составе образцов не превышало 3 тыс./см<sup>2</sup> по истечении 5-ти суток наблюдения и 7,5-8 тыс./см<sup>2</sup> – 10 суток, то есть, заселенность образцов клетками всё же была достаточно низкой.

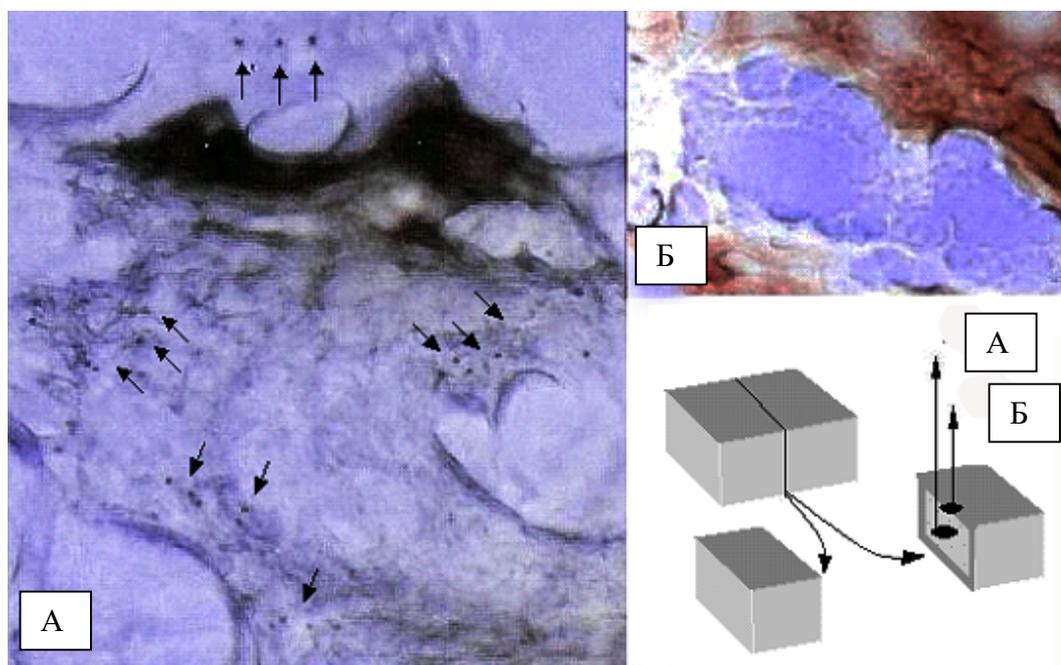


Рисунок 123 – Стволовые клетки печени человека спустя 24 часа на поверхности (А) и в объеме (Б) образца. Окраска гематоксилин-эозином

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, что подтверждает отсутствие токсичности и указывает на его адгезивные свойства в отношении данного типа клеток. Исследование срезов показало, что по истечении суток культивирования основная масса клеток всё ещё сосредоточена в верхних слоях и на поверхности образцов гидрогелей, хотя отдельные клетки обнаруживаются уже и в объеме образца (Рисунок 123). Клетки на поверхности и в объеме гидрогелевого материала характеризуются

фенотипом, свойственным недифференцированным клеткам: крупное ядро окружено узким ободком цитоплазмы.

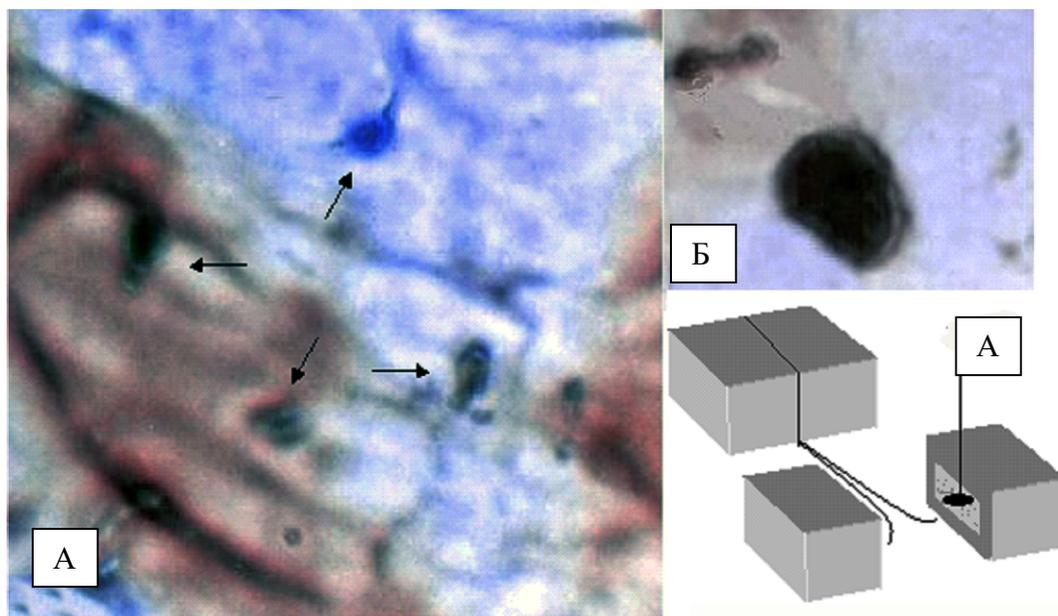


Рисунок 124 – Стволовые клетки печени человека спустя 7 суток культивирования.

На протяжении последующей культивации клетки эмбриональной печени человека мигрируют вглубь матрикса (Рисунок 124А), при этом их количество в центральных участках значительно возрастает. Наблюдаемые на 7-е сутки клетки по-прежнему сохраняют фенотип недифференцированных клеток (Рисунок 124Б), а, следовательно, и способность к делению и дифференцированию. К 14-м суткам клетки в плоскости среза распределяются более равномерно.

Следовательно, для клеток эмбриональной печени человека разработанный гидрогелевый материал является адекватным субстратом для их адгезии и локомоции, обладая выраженными матриксными свойствами. Немаловажным является то факт, что за всё время культивирования клеток не наблюдалось дифференцировки в клетках, заключённых в объеме образца, они сохраняли фенотип, свойственный стволовым клеткам, что свидетельствует о сохранении полипотентности клеточной популяции.

Таким образом, можно утверждать, что разработанные гидрогели поливинилового спирта 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 неплохие 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, [278-281]. 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.

При этом, если для случая модификации поверхности положительно заряженными функциональными группами литературные источники сообщают об однозначном улучшении адгезии и пролиферации клеток [280-281], для случая введения карбоксильных групп на данный момент не существует единого мнения. Ряд исследователей сообщает, что введение карбоксильных групп акриловой кислоты оказывает негативное влияние на клеточную адгезию, пролиферацию и рост клеток [282 - 284], другие же указывают на то, что носители, содержащие карбоксильные группы демонстрировали улучшение адгезии и пролиферации клеток по сравнению с «исходными» носителями [285-286].

В рамках настоящей работы изучались как «положительно», так и «отрицательно» заряженные носители, на основе макропористых гидрогелей ПВС дополнительно содержащих функциональные группы диэтиламиноэтилметакрилата и акриловой кислоты, 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, руководитель проф. Е.А.Марквичева).

Клетки высевали на поверхности гидрогелевых носителей и культивировали в течение 1 недели. Для изучения морфологии клеток и их распределения в объеме гидрогелей в процессе культивирования, использовали лазерную сканирующую конфокальную флуоресцентную микроскопию. Для визуализации жизнеспособных клеток образцы перед микроскопическим исследованием обрабатывали с нефлуоресцентным кальцеином АМ, который в живых клетках после взаимодействия с внутриклеточными эстеразами превращается в зеленый флуоресцентный кальцеин [287].

Как можно видеть на приведенных ниже фотографиях (Рисунок 125), 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.

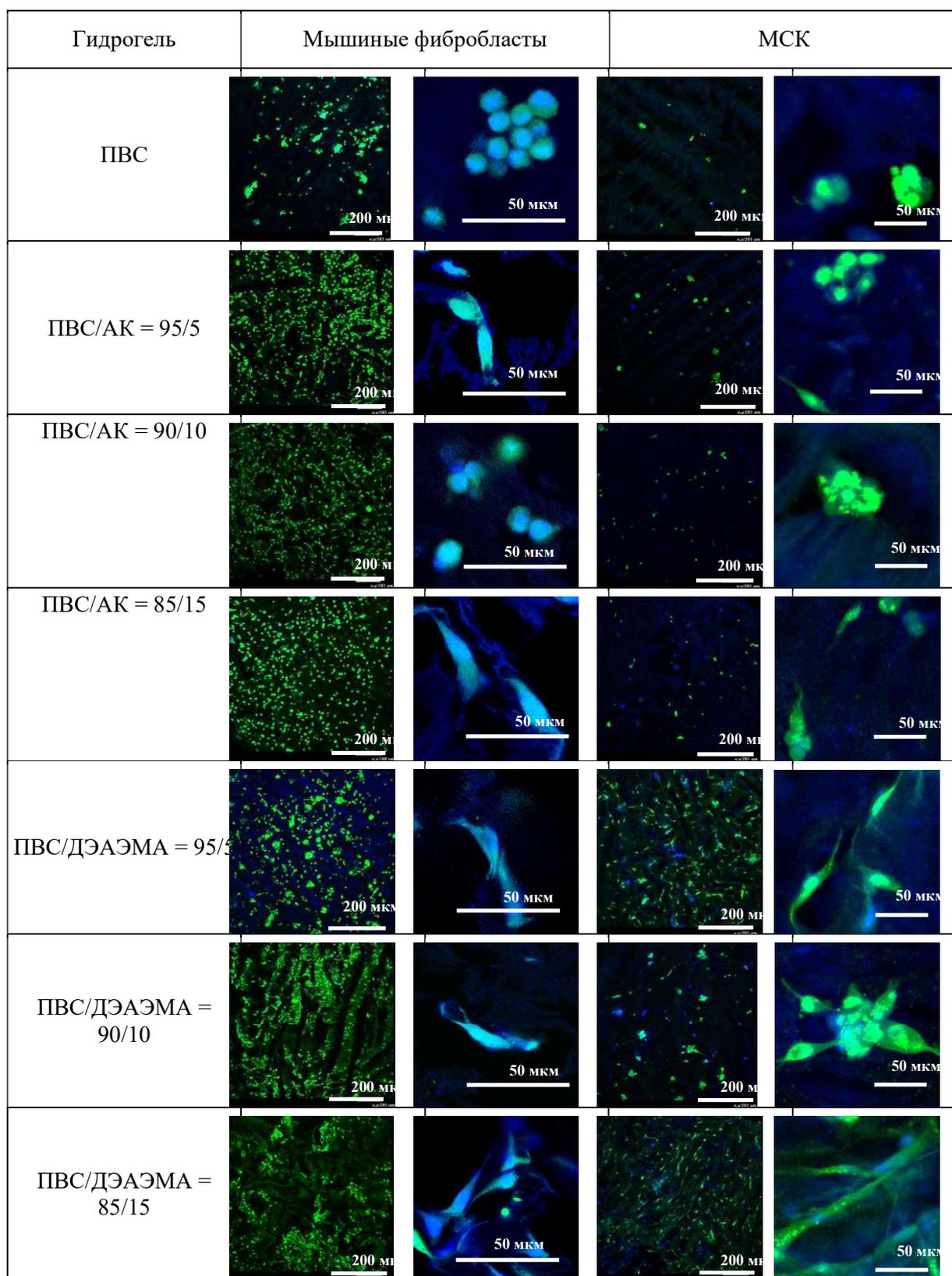


Рисунок 125 – Конфокальные микрофотографии мышечных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток на полимерных гидрогелях. Срок культивирования 7 дней.

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 ДЭАЭМА 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 мольн. %.

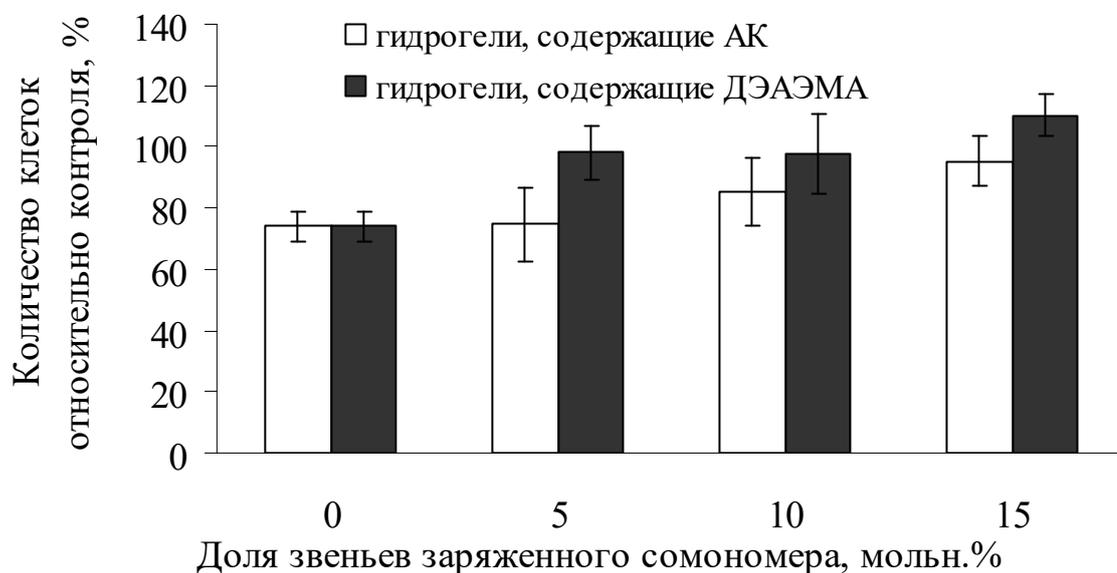


Рисунок 126 – Зависимость роста клеток мышинных фибробластов линии L929 от состава гидрогелей. Время культивирования 7 дней. (За 100% принято количество клеток монослоя, растущих в стандартных условиях)

Для количественной оценки роста клеток на разработанных полимерных гидрогелях использовали метод МТТ. Как можно видеть из приведенных зависимостей (Рисунок 126 и Рисунок 127), 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 сомономера в составе гидрогелей.

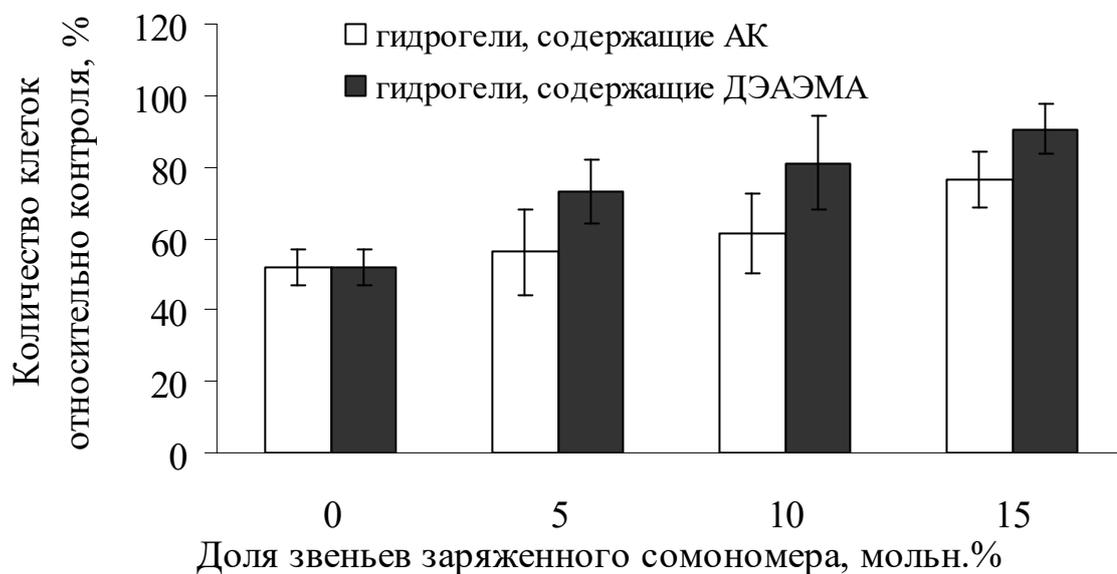


Рисунок 127 – Зависимость роста МСК от состава гидрогелей. Время культивирования 7 дней. (За 100% принято количество клеток монослоя, растущих в стандартных условиях)

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.

3.3.6 Изучение возможности применения разработанных полимерных гидрогелей для лечения ран и ожогов.

Комплекс демонстрируемых разработанными макропористыми полимерными гидрогелями свойств – развитая пористость, способность к сорбции и удерживанию больших объемов жидкости, биосовместимость, низкая токсичность, пластичность, позволяла 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) [288].

Объектом исследования стали образцы гидрогелей на основе ПВС с оптимальными, на наш взгляд, с позиций рассматриваемой в данном разделе области применения (пористость, распределения пор по размерам, механические свойства и др.) характеристиками (Таблица 29).

Таблица 29 - Некоторые характеристики макропористого гидрогелевого материала, использованного для обработки ран

Средний размер пор, $d_{\text{экв}}$ , мкм	Общая пористость, %	Модуль упругости, кПа	Равновесная набухаемость, мл/г.	Набухаемость полимерной части, мл/г.
36,4	86,2	22,1	17,2	4,2

Как было показано ранее, образцы сшитых полимерных гидрогелей, полученные в результате реакций, проведенных в криоусловиях, содержат

большое число связанных между собой пор занимающих основную часть объема образца. Объем же, собственно, полимерной гидрогелевой части в таких системах сравнительно мал. Открытая пористая структура таких макропористых гидрогелей делает возможным чрезвычайно быструю сорбцию жидкости в направлении центра высушенной матрицы за счет действия капиллярных сил, что и определяет их быстрое набухание вне зависимости от размера образца (Рисунок 66, страница 118).

И поскольку разработанные в данной работе гидрогели представляют собой систему, состоящую из плотно сшитого полимерного гидрогелевого каркаса, степень набухания которого невелика и мало изменяется при изменении внешних условий, и системы сообщающихся макропор, в которых находится основная часть поглощаемой макропористым гидрогелем жидкости, они, в отличие от «обычных» непористых изотропных гелей, незначительно изменяют свое равновесное набухание при изменении внешних условий, таких как, например, ионная сила или величина рН раствора (Рисунок 72, страница 123).

Таким образом, можно предполагать, что эти полимерные материалы должны эффективно сорбировать и удерживать раневой экссудат при их нахождении на ране.

Эффективное раневое покрытие должно обеспечивать оптимальное испарение воды с поверхности раны. Известно, что скорость испарения воды с поверхности неповрежденной кожи составляет порядка  $204 \pm 12$  г/м<sup>2</sup>/день, а для поврежденной может меняться от  $279 \pm 19$  г/м<sup>2</sup>/день для ожога первой степени, до  $5150 \pm 140$  г/м<sup>2</sup>/день для раны на стадии грануляции [289]. Паропроницаемость раневого покрытия должно быть такова, чтобы препятствовать чрезмерному обезвоживанию раны, но при этом не допускать накопления экссудата, в силу этого рекомендованным оптимальным значением величины паропроницаемости является значение 2000-2500 г/м<sup>2</sup>/день [289]. В то же время, стоит указать на тот факт, что наиболее распространенные на рынке перевязочные средства имеют

значительно более высокий показатель паропроницаемости: Promogran (Jonson&Jonson, США) –  $8357 \pm 325$ , Geliperms (Geistlich, Швейцария)  $9009 \pm 319$ , Vigilons (Bard, Великобритания)  $9360 \pm 34$  г/м<sup>2</sup>/день [290].

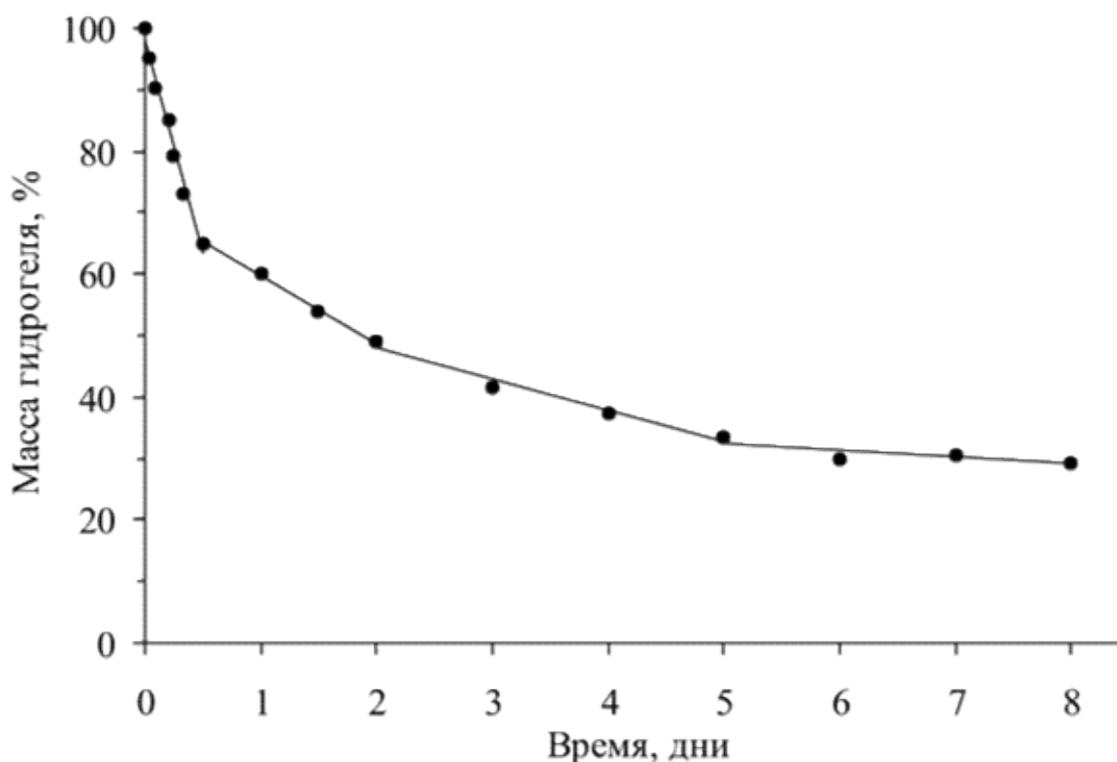


Рисунок 128 - Потеря влаги образцами гидрогелей.

Для исследованного гидрогелевого материала паропроницаемость составила  $2317 \pm 242$  г/м<sup>2</sup>/день, таким образом, можно ожидать, что покрытие на его основе будет способно поддерживать требуемый водный баланс в области раны, способствуя необходимой клеточной миграции и ускорению реэпитализации.

Другим требованием, предъявляемым к современным раневым покрытиям, является способность находиться на ране во влажном состоянии на протяжении продолжительного времени. В силу нами изучалась потеря гидрогелем воды во времени. Как можно видеть (Рисунок 128), потеря воды с наибольшей скоростью линейно возрастала со временем в первые 12 часов инкубирования, после чего значительно снижалась.

После первого дня инкубации потеря воды составила около 40%, второго- 50 %. Достигнув своего максимума ~70% на 5-6 день, в дальнейшем она почти не изменялась. Соответствующим образом изменялась и скорость испарения: спустя 12 часов потеря воды составляла порядка 17,6 г/м<sup>2</sup>/ч, спустя сутки 14 г/м<sup>2</sup>/ч, спустя 2 дня 10,5 г/м<sup>2</sup>/ч, после чего снизился до 7,6 г/м<sup>2</sup>/ч.

На основании полученных данных было сделано предположение, что при нахождении на сухой ране разрабатываемый материал будет терять влагу с достаточно большой скоростью, что, возможно может потребовать дополнительного увлажнения, то есть, рассматриваемый гидрогелевый материал будет более полезен для умеренно экссудирующих ран.

Изучение закономерностей влияния полимерных гидрогелевых материалов на течение раневого процесса проводилось на примере ожоговой раны. В качестве экспериментальных животных выступали крысы. Животные были разделены на две группы - контрольную (КГ), и экспериментальную (ЭГ) - по 18 животных в каждой группе. В контрольной группе раны крыс покрывали коммерческим раневым покрытием на основе окисленной целлюлозы. Раны площадью 4 см<sup>2</sup> наносились под эфирным наркозом в межлопаточной области.

Через 24 часа после нанесения ран у животных обеих групп наблюдалось нарушение целостности эпидермиса, кровоизлияния и отек, дерма была денатурирована и инфильтрирована вместе с поверхностной фасцией макрофагами, лимфоцитами и сегментоядерными лимфоцитами. Кровеносные сосуды гемоциркуляторного русла (ГМЦР) были наполнены, в большинстве из них имел место стаз форменных элементов.

На третьи сутки в цитограммах животных, входивших в контрольную группу, можно было наблюдать значительное количество клеточного детрита и дегенеративно измененных клеток лейкоцитарного ряда, раны были заполнены гнойно-некротическими массами и омертвевшими тканями. По сравнению с животными контрольной группы, в ранах животных, входивших в экспериментальную группу, наблюдалось меньшее количество лейкоцитов,

определялись макрофаги и лимфоциты. Раны этих животных очищались от омертвевших тканей и гнойно-некротических масс, в них начиналось формирование грануляционной ткани. Мазки-отпечатки были характерными для цитограмм регенеративного типа.

Через 7 дней (Рисунок 129) в тканевых структурах ран животных экспериментальной группы практически не наблюдалось отека, а сформировавшаяся грануляционная ткань имела свойственное ей строение и была покрыта эпителием. Площадь самой раны уменьшалась более чем в два раза.

У животных контрольной группы сохранялась отечность тканевых структур вокруг ран, сами раны содержали гнойно-некротические массы, грануляционная ткань лишь начинала формироваться.

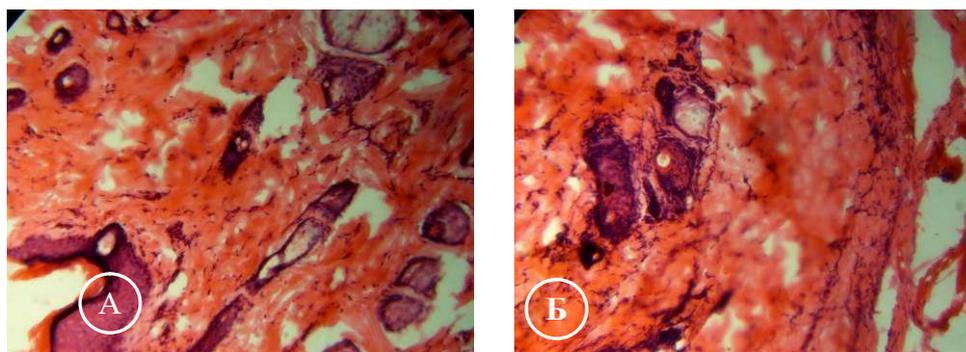


Рисунок 129 -Биопсия ожоговой раны с неповрежденным участком кожи, 7-е сутки, увеличение  $\times 20$ , окраска гематоксилин-эозином.

Через 14 суток у крыс ЭГ раны были полностью заполнены новообразованными кожными покровами. Гистологически в границах ран протекали пролиферативные процессы, связанные с формированием характерных для нормальной кожи гистоструктур.

У животных, входящих в КГ, наблюдалась реорганизация грануляционной ткани и эпителизация.

На 21 сутки (Рисунок 130) раны у исследуемых обеих групп животных зажили. Однако у животных ЭГ 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.

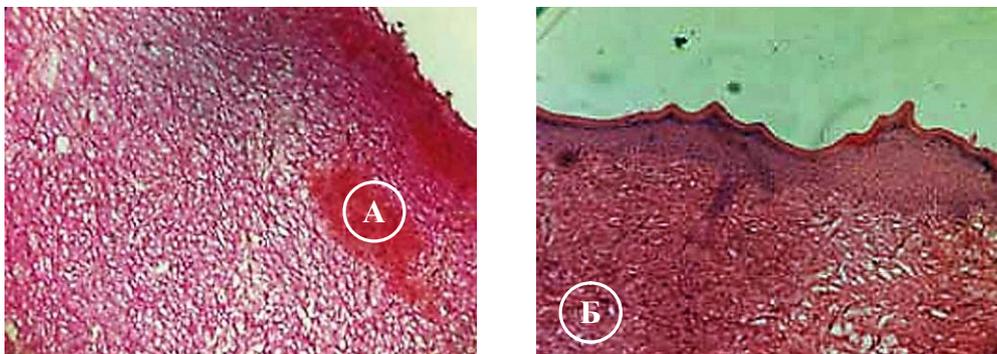


Рисунок 130 - Биопсия на месте ожоговой раны, 21-е сутки, увеличение  $\times 20$ , А - окраска гематоксилин-эозин, Б- окраска по Ван-Гизону

На основании приведенных выше данных можно утверждать, 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. Использованный гидрогелевый материал полностью отвечал этим требованиям.

В третьей фазе раневого процесса (Рисунок 131) у экспериментальных животных используемый гидрогелевый материал обеспечил реорганизацию грануляционной ткани, направленную на формирование гистоструктур, характерных для нормальной кожи.

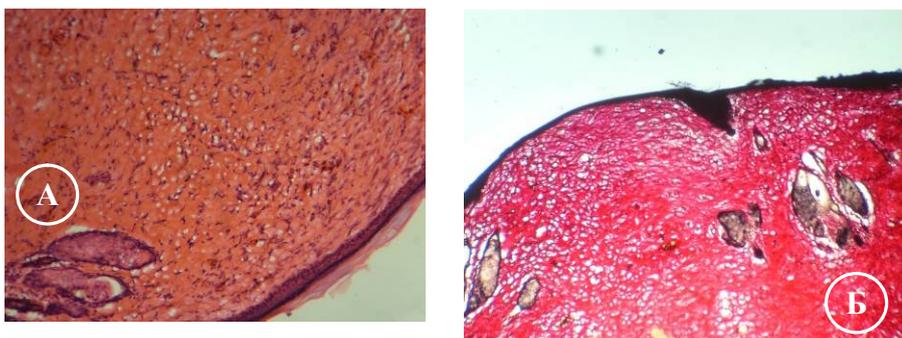


Рисунок 131 - Биопсия на месте ожоговой раны, 3 месяца, увеличение  $\times 20$ , А - окраска гематоксилин-эозин, Б- окраска по Ван-Гизону

По сравнению с контрольной группой у животных экспериментальной группы реорганизация грануляционной ткани в кожу происходило в 2-2,5 быстрее раза, 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.

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 Лесовым Д.Е.). Был проведен анализ результатов лечения 120 пациентов, страдающих хроническими ранами, различной этиологии.

Средний возраст пациентов составлял 50,2 года, при их лечении использовались как раневое покрытие на основе макропористых полимерных гидрогелей ПВС в виде пластин (ММ-Гель), так и традиционные раневые покрытия, в том числе содержащие сульфадиазин серебра, надифлокацин, повидон иодин, мед. Пациенты с сопутствующими заболеваниями, способными оказывать значимое влияние на течение раневого процесса, такими как неконтролируемый сахарный диабет, хроническая печеночная и почечная недостаточность и прочее в выборку включены не были. Пациенты были разделены на две группы – «гидрогель»-группу и «традиционные»-группу, по 60 человек в каждой. Проводился анализ состояния ран (размер, форма, глубина, состояние дна, наличие некротических масс, грануляционной ткани и пр.). С момента начала лечения для пациентов обеих групп проводилась оценка времени появления грануляционной ткани, полноты заживления, необходимости дополнительной пересадки кожи, удовлетворенность пациентов результатами лечения.

По истечении двух недель у 90 % ( $P=0.03$ ) пациентов «гидрогель»-группы раны оставались стерильными, среди пациентов «традиционные» - группы это число составило лишь 42 % ( $P=0.03$ ). У всех пациентов, для лечения которых использовалось гидрогелевое раневое покрытие, образование здоровой грануляционной ткани происходило раньше. По истечении 6 недель у 56 (93 %) пациентов «гидрогель»-группы и 28 (47 %) пациентов «традиционные»-группы ( $P=0,21$ ) наблюдалось полное заживление ран. Двенадцати пациентов «традиционные»-группы потребовалась частичная сплит-пересадка кожи.

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 полученного опыта можно утверждать, что для всех пациентов использование данного раневого покрытия вело к полному восполнению дефектов тканей с образованием нормальных анатомических

структур, сопровождающемуся заметным снижением болевых ощущений в области дефекта и приводящему к быстрой регенерации кожных покровов. При этом внешний вид, упругость и эластичность образованной в процессе заживления дермы заметно отличаются от рубцовой ткани и близки к аналогичным характеристикам нормальной кожи.

3.3.7 Изучение возможности применения гидрогелевых материалов в офтальмологии.

Достаточно активно изучаемыми вопросами в лечении ряда заболеваний глаз являются методы точечной доставки и контролируемого выделения лекарственного препарата во внутренние оболочки глаза [291]. Основной сложностью практической реализации этого подхода является наличие различных офтальмологических барьеров и в быстрая элиминации препаратов из тканей глаза. На сегодняшний день наиболее эффективными методами являются субтеноновый и интравитреальный пути введения препаратов. Однако основным препятствием для проникновения лекарственного препарата внутрь глаза при субтеноновом пути введения является склера [291,292]. В тоже время интравитреальное введение требует особых условий и сопряжено с риском серьезных осложнений. Гораздо менее изученным, однако потенциально более безопасными по сравнению с интравитреальными, остаются методы, основанные на введении лекарственных веществ в супрахороидальное пространство [293,294].

В отличие от традиционных методов введения лекарственного препарата (субконъюнктивальный, парабульбарный) транссклеральные методики требуют использования различных пролонгирующих устройств [292]. Основным недостатком известных на данный момент имплантатов-пролонгирующих устройств, вводимых в полость глаза, является лежащая в их основе матрица, которая не разрушается по мере выделения из нее лекарственного препарата [295]. Поэтому, в свете полученных нами данных о способности разрабатываемых полимерных гидрогелей к биодеградации,

была изучена возможность использования их в качестве основы биodeградирующего носителя лекарственных веществ для супрахороидальной имплантации [296,297]. (Работы проводились совместно с НМХЦ им. Н.И. Пирогова под руководством профессора Шишкина М.М.)

Используемый в эксперименте макропористый полимерный гидрогелевый материал был изготовлен в виде пластин толщиной 1-2 мм. Стерилизация осуществлялась при помощи автоклавирования.

В качестве экспериментальных животных выступали кролики породы «шиншилла» серой окраски, в возрасте 12-17 месяцев. Вес животных составлял 2,4-3,1 кг.

В экспериментальную группу (ЭГ) для изучения действия исследуемого гидрогелевого макропористого материала вошли 18 (36 глаз) животных. Животным этой группы супрахороидально имплантировали исследуемый гидрогелевый материал

Введение материала осуществляли в условиях общей анестезии. Выполнялся разрез конъюнктивы и теноновой капсулы в области верхненаружного квадранта глазного яблока. В 6 мм от лимба производился разрез склеры длиной 5 мм параллельно лимбу. После этого с помощью шпателя был сформирован соответствующий размерам имплантата тоннель в супрахороидальном пространстве. С целью профилактики офтальмогипертензии производился парацентез передней камеры с постепенным дренированием влаги. Полимерную пластинку имплантата (5,0×3,0 мм ×1,5мм) вводили в супрахороидальное ложе, после чего склеру и конъюнктиву герметизировали узловым швом. В конъюнктивальную полость закладывали тетрациклиновую мазь.

Животным контрольной группы- 3 кролика (6 глаз) - также под общим наркозом по вышеописанной методике вместо гидрогелевого материала вводили препарат «Остенил» 0,3 мл (1% гиалуронат натрия). Из литературных источников известно, что данный препарат применяют в хирургии отслоек сетчатки для введения в супрахороидальное пространство в качестве

пломбировочного материала. Доказано, что при этом отсутствуют воспалительная и токсическая реакции [298,299].

Для изучения состояния животных обеих групп были использованы следующие клинические методы исследования: тонометрия, биомикроскопия и офтальмоскопия с линзами (60D). Исследования выполняли на 1-е, 3-и, 10-е сутки и через 1,2 и 3 месяца от начала эксперимента. Электроретинограмму регистрировали до имплантации образцов гидрогелевого материала и на 1-е, 3-и, 10-е сутки и через 1 месяц от начала эксперимента. Статистическую обработку данных проводили средствами программы Analystsoft Biostat 2007.

Из эксперимента животных выводили передозировкой препарата «Наркотан», по три кролика в сроки 1,3,10 день и 1,2 и 3 месяцы с выполнением энуклеации обоих глаз. В контрольной группе забор материала осуществляли в сроки 1, 3 день и через 1 месяц.

Состояние животных сразу после имплантации было удовлетворительным, глаз был спокоен, среды прозрачны. Сетчатка прилежала на всем протяжении, кровоизлияний не наблюдалось. В течение 3-5 суток у животных обеих групп сохранялись гиперемия, отек конъюнктивы и беспокойство при пальпации через веко в области послеоперационной раны. На 3-10 сутки имела место слабо выраженная перикорнеальная инъекция у 3 животных (6 глаз) экспериментальной группы. На 2-4 сутки отмечали незначительный отек радужки и сглаженность её рисунка в 23,3% наблюдений, которые самостоятельно купировались на 10 сутки. В стекловидном теле (СТ) в 10% наблюдений регистрировали слабую опалесценцию (1 степень [300] ). При офтальмоскопии в 40% наблюдений обнаруживался незначительный отек по ходу вен на стороне имплантации. Через 1 месяц все изменения сетчатки полностью исчезали. Только у 1 экспериментального животного (2 глаза) помутнение в СТ несколько усилилось (2 степень [300]). На 3 месяц наблюдения у 2 животных (30%) в зоне имплантации при склеропрессии отмечали зону перераспределения пигмента. У животных контрольной группы в зоне имплантации через 3-10

дней после имплантации отмечали побледнение сетчатки, а спустя 1 месяц при склеропрессии выявляли локальную депигментацию над имплантированным материалом.

Контроль внутриглазного давления (ВГД) у животных экспериментальной группы выявил тенденцию к постепенному его повышению в течение первых 3 дней до  $19,9 \pm 2,66$  мм рт. ст. ( $p=0,05$ ), с колебаниями 12-25 мм рт.ст. (при норме 12-20 мм рт.ст.), что, на наш взгляд, может быть объяснено, некоторым дополнительным набуханием гидрогеля, связанным с его частичной биодеструкцией. На 10 день ВГД нормализовалось ( $18,1 \pm 2,08$  мм рт.ст).

У животных контрольной группы также отмечалось повышение ВГД в 1-3 сутки после вмешательства, но к 10 суткам давление у всех животных нормализовалось (Рисунок 132).

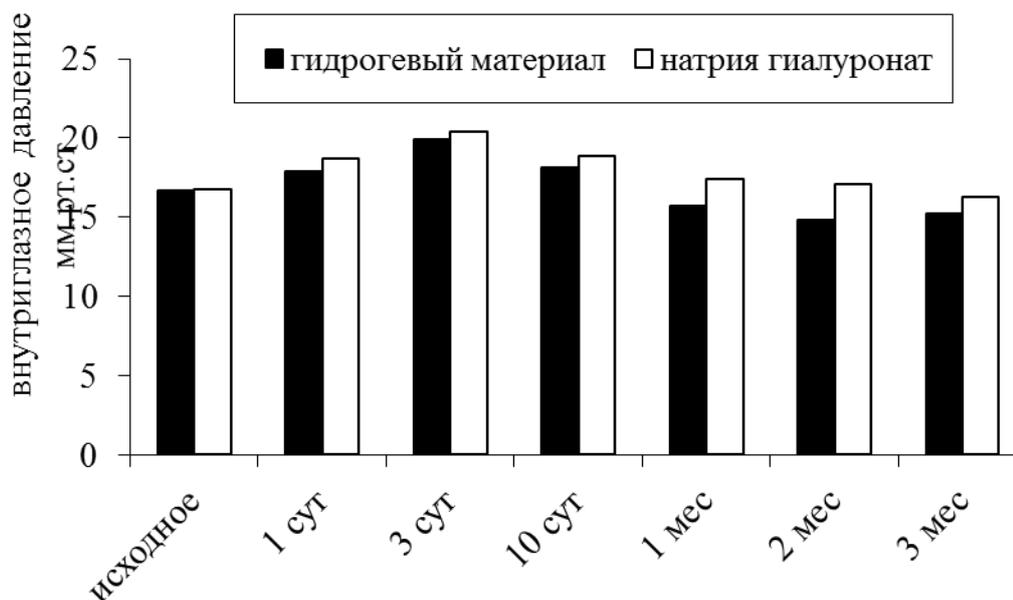


Рисунок 132 - Динамика показателей внутриглазного давления у животных после супрахороидальной имплантации гидрогелевого материала

На ЭРГ у животных ЭГ выявили умеренное снижение амплитуды а-волны (до 84-79% от исходных значений) и b-волны (до 75-84%) в 1 сутки после введения макропористого гидрогеля. На 3-10 сутки наблюдалась картина слабовыраженной гиперреакции (а-волна - 114-123% и b-волна до

110-116% от исходного уровня) (Рисунок 133, Рисунок 134). К концу 1 месяца исследования у животных экспериментальной группы отмечалась лишь незначительная депрессия а-волны ретинограммы (Рисунок 133).

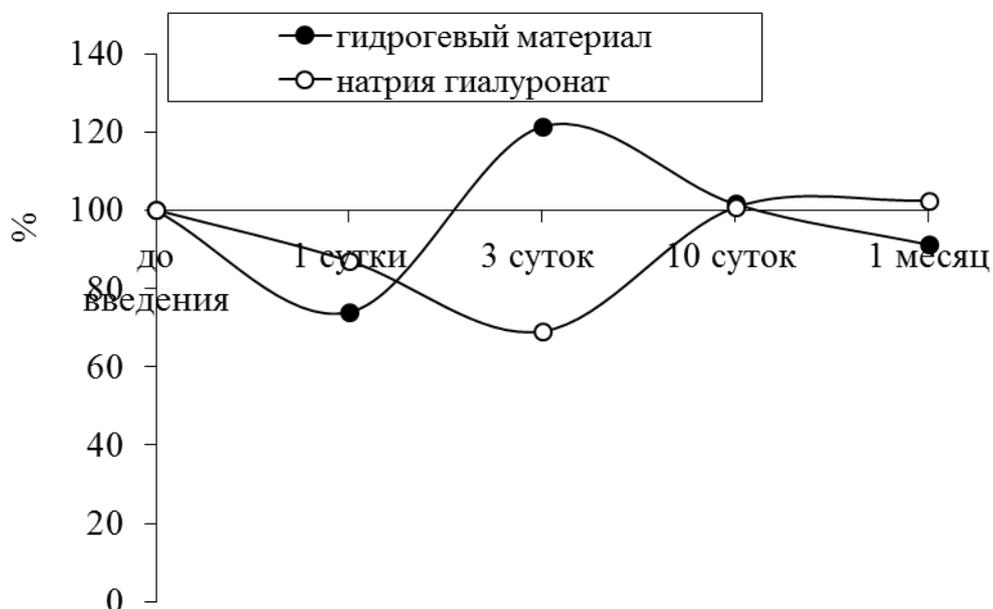


Рисунок 133 - Динамика а-волны ЭРГ после супрахороидальной имплантации гидрогелевого материала

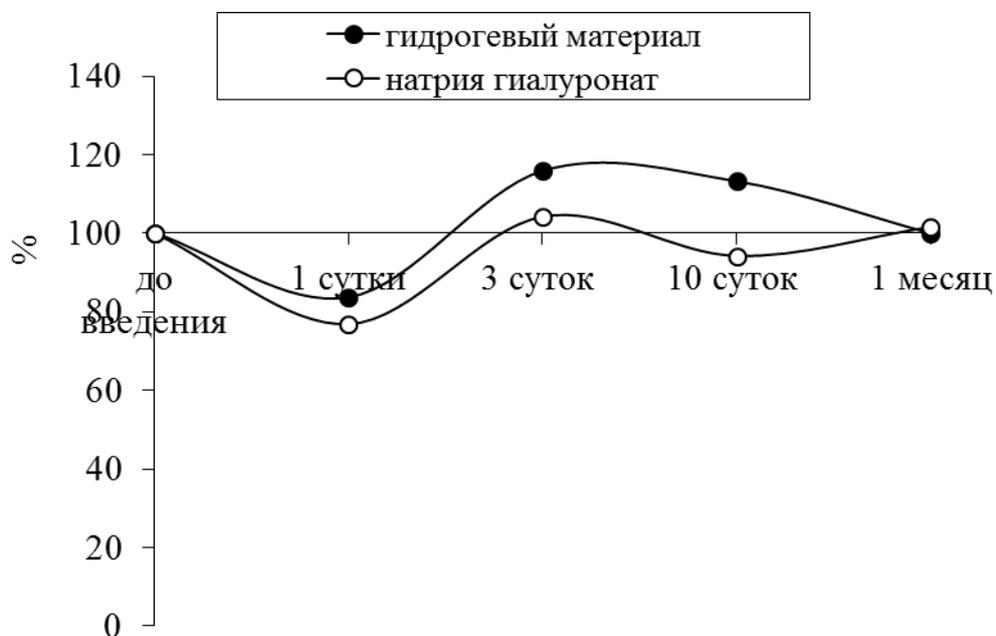


Рисунок 134 - Динамика б-волны ЭРГ после супрахороидальной имплантации гидрогелевого материала

Стоит, впрочем, отметить, что изменения ЭРГ мало отличались друг от друга у животных обеих групп. Депрессию а- и в-волн ЭРГ, зарегистрированную в 1-е сутки после имплантации, можно считать ответной реакцией на хирургическое вмешательство. Увеличение амплитуды а- и в-волн на 3-10 сутки, связано, очевидно, с раздражающим воздействием нейромедиаторов в ответ на гибель клеточных структур в зоне имплантации, однако быстро наступающая стабилизация показателей свидетельствует об обратимости возникших повреждений ретины [301]. Показатели ЭРГ животных с супрахороидальной имплантацией исследуемого гидрогелевого материала спустя 1 месяц совпадают с показателями ЭРГ животных с введением гиалуроната натрия.

По данным световой микроскопии у животных экспериментальной группы изменения дренажной зоны отсутствовали (Рисунок 135А). На гистологических срезах препаратов радужки на 1-3 сутки отмечено незначительное сужение просвета капилляров (Рисунок 135Б).

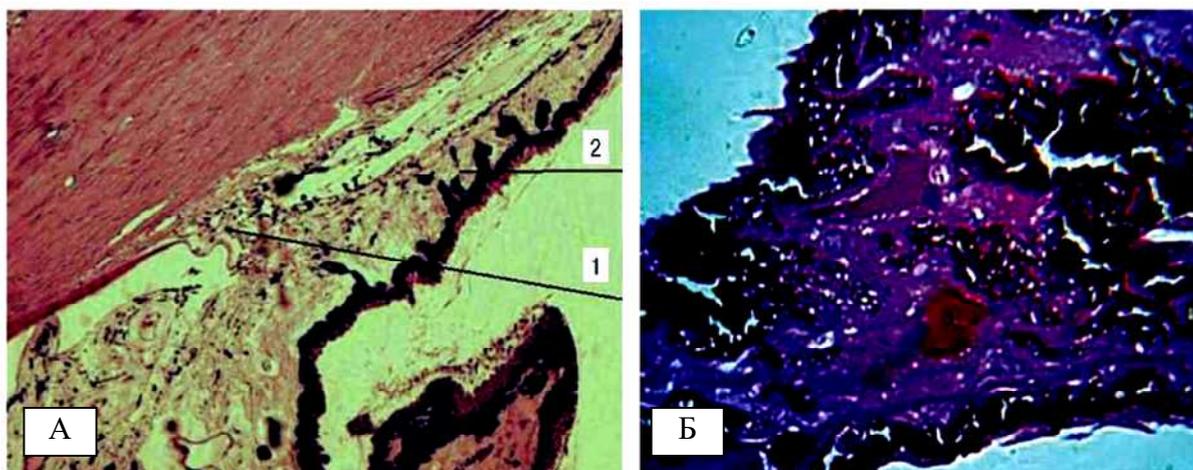


Рисунок 135 - Гистологический срез тканей глаза животных с супрахороидальной имплантацией гидрогелевого материала: А - область угла передней камеры (1) и цилиарного тела (2) увеличение  $\times 40$ ; Б- ткань радужки, увеличение  $\times 100$ . Окраска - метиленовая синь и основной фуксин.

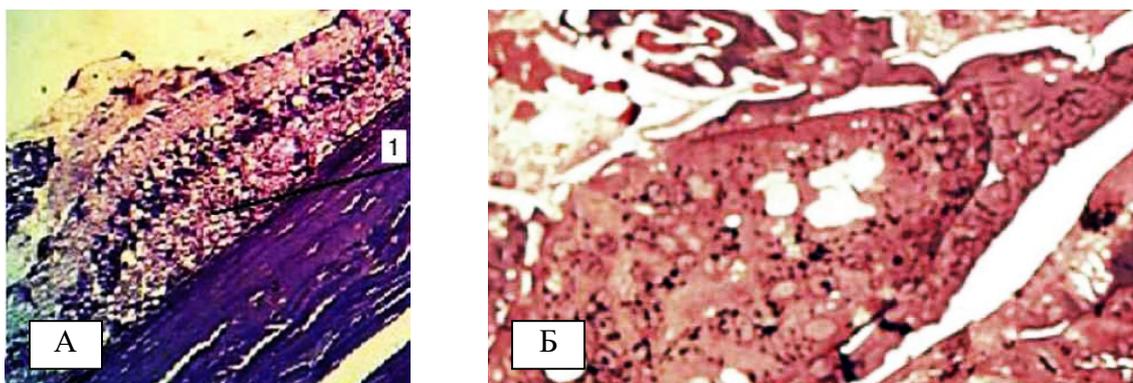


Рисунок 136 - Гистологический срез тканей глаза. А- гидрогель в супрахороидальном пространстве (указан стрелкой) увеличение×10 (10 сутки), Б - формирование сосуда вокруг полимера, увеличение ×100 (10 сутки). Окраска: основной фуксин и метиленовая синь

Сетчатка и хороидея в зоне имплантации слегка приподняты над гидрогелевым материалом, вследствие его набухания. Также наблюдается дезорганизация рецепторного и наружного ядерных слоев. Структура внутренних слоев на препаратах не изменена (Рисунок 136А). Гидрогелевый материал (1 сутки) на препаратах выглядел как плотно упакованные разноориентированные волокна (Рисунок 137А, Б), окрашенные в темно-синий цвет. На препаратах хороидеи отмечается расширение просвета артериол. На гистологических срезах к 10 суткам в краевой зоне ткани окружающей гидрогелевый материал присутствует зона с единичными макрофагами и фибробластами, а также формирующиеся сосуды (Рисунок 136Б). Среди синих волокон гидрогелевого материала присутствуют участки, увеличенные в объеме и пропитанные плазмой (розоватого оттенка) (Рисунок 137А, Б, В). По краю резорбируемого материала обнаруживаются крупные клетки со светлым ядром. Признаков скопления субретинальной жидкости не отмечено.

Через 1 месяц на гистологических срезах по периферии полимера наблюдаются зоны частичного распада и замещения, хотя формирования соединительнотканной капсулы не отмечено. На отдельных участках, контактирующих с полимером, имеет место легкое уплотнение волокон склеры (Рисунок 137А). Спустя 2 месяца, на гистологических срезах 1/2 часть

площади имплантированного гидрогеля находится в стадии плазматического пропитывания и эрозии (Рисунок 137Г). Вокруг него присутствует обильная сеть кровеносных сосудов с околосоудистой клеточной инфильтрацией.

Спустя 3 месяца на препаратах отмечается почти полная деградация гидрогелевого материала и замещение его рыхлыми волокнами соединительной ткани, с единичными макрофагами и полиморфноядерными лейкоцитами. Можно наблюдать единичные островки эрозированного полимера и сосуды. В отдельных случаях в ретине выявляются участки разрушения пигментного эпителия. В интактной зоне сетчатка сохраняла свою клеточную структуру (Рисунок 137В). Признаков отслоения сетчатки и сосудистой оболочки не обнаружено ни в одном случае, равно как и повреждения зрительного нерва.

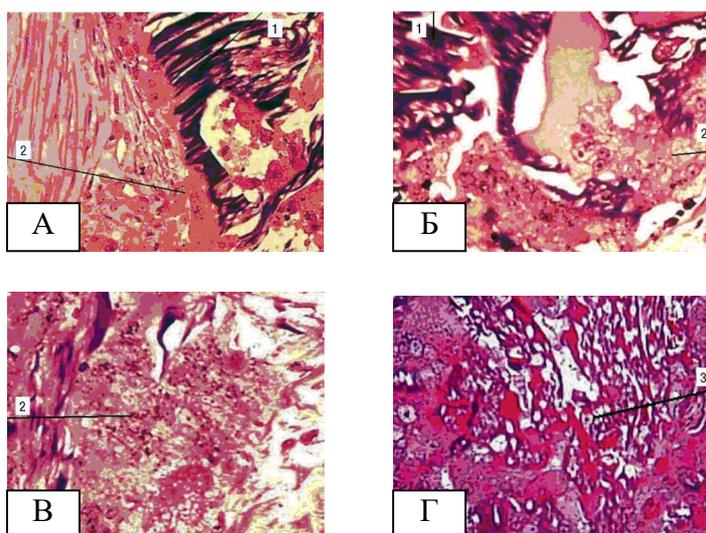


Рисунок 137- Гистологический срез тканей глаза животных I группы. Эволюция полимера в супрахароидальном пространстве: 1 - неизмененные волокна полимера, 2 - волокна полимера в стадии плазматического пропитывания, 3 - волокна полимера в стадии эрозирования. А - полимер через 10 дней после имплантации, Б - полимер через 1 месяц после имплантации, В- полимер через 2 месяца после имплантации, Г - полимер через 3 месяца после имплантации. Окраска метиленовая синь, основной фуксин. Увеличение  $\times 100$ .

У животных контрольной группы в зоне введения гиалуроната натрия в супрахороидальное пространство обнаруживается атрофия пигментного эпителия сетчатки над зоной введения.

Результаты гистологического исследования дополняют приведенные ранее клинико-функциональные наблюдения и свидетельствуют о минимально допустимых патологических изменениях во внутренних структурах глаза экспериментальных животных при имплантации супрахороидально исследуемого гидрогелевого материала.

Нахождение полимерного материала в супрахороидальном пространстве хорошо переносится глазом животных и не сопровождается заметными клиническими осложнениями. Небольшая зона перераспределения пигмента над зоной имплантации не сопровождалась атрофией пигментного эпителия, как при введении натрия гиалуроната в супрахороидальное пространство. Наличие макрофагов вокруг гидрогелевой пластинки свидетельствует в пользу его биологической деградации. Имплантация материала не вызывала скопления субретинальной жидкости и ни в одном случае не вызвала отслойки сосудистой оболочки. Это еще раз подтверждает безопасность данного метода имплантации носителя лекарственных препаратов. Тесный контакт полимера с хороидальной тканью не сопровождался формированием соединительнотканной капсулы, что необходимо для обеспечения быстрого проникновения фармпрепаратов в хороидальный кровоток. Постепенная биodeградация гидрогелевого материала в течение 2-3 месяцев дает потенциальную возможность не только максимально приблизить вводимый лекарственный препарат к внутренним оболочкам глаза, но и длительно поддерживать его терапевтическую концентрацию.

### 3.3.8 Изучение возможности использования разработанных гидрогелевых материалов для заполнения полостей и протоков

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 мобилизации кровеносных сосудов, протоков (например, желчного), заполнения полостей и послеоперационных дефектов и т.д.

В силу этого нами была изучена возможность использования подобного использования разработанной отверждаемой системы. В качестве экспериментальной модели нами была выбрана облитерация желчного пузыря [302,303]. (Работы проводились совместно с Сидорук А.А. на базе МГМСУ им. А.Е.Евдокимова под руководством профессора, д.м.н. Чудных С.М.)

На первом этапе проводился эксперимент на животных. В качестве экспериментальных животных выступали разнополые кролики серого цвета породы «советская шиншилла», массой  $2200 \pm 100$  г. Работу с животными проводили с соблюдением правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов с участием экспериментальных животных различных видов. Животные были разделены на четыре группы по 5 особей. Первая группа животных выводилась из эксперимента через 1 месяц, вторая - через 2 месяца, третья - через 3 месяца, соответственно. Четвертая группа была контрольной.

Введение и отверждение композиции, состоящей из очищенного раствора модифицированного поливинилового спирта и иницирующей системы перекись водорода - аскорбиновая кислота, животным осуществляли в условиях общей анестезии. Введение препарата производили следующим образом. Всем животным экспериментальных групп под визуальным контролем проводили с помощью танталовой клипсой клипирование пузырного протока или шейки желчного пузыря, после чего вводили отверждаемый раствор и герметизировали место введения шовным материалом Викрил. У животных контрольной группы выполнялось клипирование желчного протока без введения полимерной композиции.

Из эксперимента животных выводили передозировкой миорелаксанта, после чего удаляли желчный пузырь. Полученный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, с последующей проводкой в спиртах восходящей концентрации. Микросрезы исполняли на микротоме «Raiber», толщина среза 2 мкм, окраска гематоксилин-эозином по стандартной методике. Исследование гистологических препаратов проводилось с использованием светооптического микроскопа «Olimpus BX 51» с камерой «Color View».

Оценку результатов экспериментального исследования осуществляли путем клинических наблюдений и анализа полученных гистологических препаратов.

В ходе экспериментального этапа исследования состояние кроликов после имплантации материала удовлетворительное. В течение всего периода у животных не было выявлено нарушений в питании и выделительной функции, цвет и густота мехового покрова также оставались без изменений, отмечался прирост массы тела животных к 3 месяцам до  $3500 \pm 100$  г.



Рисунок 138 - Склерозированный желчный пузырь через 3 месяца после имплантации

После вывода из эксперимента осуществляли патологоанатомическое исследование с макроскопической оценкой внутренних органов животных. Было установлено, что практически полная биodeградация вводимого

материала и замещение его соединительной тканью наблюдалось к концу 3-го месяца эксперимента.

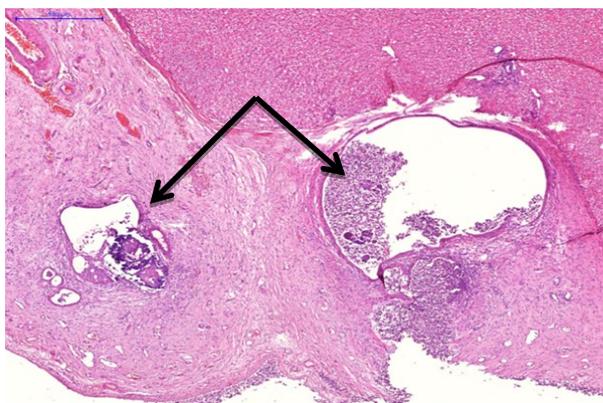


Рисунок 139 - Поперечный срез макропрепарата. Желчный пузырь частично облитерирован и замещен фиброзной тканью (указан стрелками). Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 100$

При патологоанатомическом исследовании наблюдалась следующая картина. При вскрытии в брюшной полости животного выпота нет, брюшина серо-розового цвета без геморрагий, печень нормального размера, без внешних изменений, желчный пузырь представляет собой рубцовый тяж диаметром порядка 5 мм и длиной 2 см, представлен плотной соединительной тканью белесого цвета, плотный на ощупь, просвет на разрезе не определяется, (Рисунок 138), другие внутренние органы без видимых изменений.

При исследовании полученных гистологических препаратов, было обнаружено, что область желчного пузыря, на поперечном разрезе представляет собой полость с коллагенизированными фиброзными стенками и частично сохраненной эпителиальной выстилкой. В просвете полости обнаруживается слущенный некротизированный эпителий, детрит, бесструктурные массы, гидрогелевый материал не визуализируется (Рисунок 139). В стенке желчного пузыря отмечено частичное, а местами и полное замещение мышечной оболочки фиброзной тканью. В мышечной оболочке обнаружены исчезновение разделения на пучки из-за фиброзирования

межмышечных пространств, потеря структурности мышечного слоя, ведущая к снижению васкуляризации вследствие облитерирования капилляров во всех слоях мышечной стенки. Сосуды в области ложа желчного пузыря были сохранены (Рисунок 140). Наблюдается выраженная атрофия слизистой оболочки. На сохранных участках слизистая оболочка представлена одним слоем кубического эпителия без подлежащей рыхлой соединительной ткани, эпителиальный слой лежит непосредственно на фиброзированной стенке. Прилежащий слой печеночной ткани характеризуется гидропической дистрофией гепатоцитов (Рисунок 141).

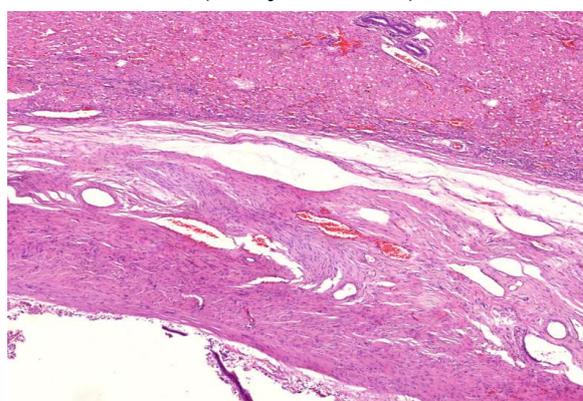


Рисунок 140 - Стенка пузыря представлена грубой фиброзной тканью с частично слущенным эпителиальным слоем. Мышечная оболочка не визуализируется. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 100$

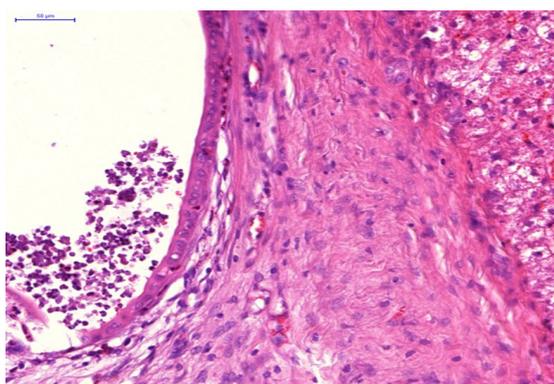


Рисунок 141 - Биodeградирующий материал в полости ЖП отсутствует, в просвете детрит. Слизистая оболочка в виде однослойной выстилки. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 100$

Тем не менее, большая часть печени имеет обычное строение, без наблюдаемой воспалительной инфильтрации портальных трактов и долек и полным сохранением архитектоники (Рисунок 142).

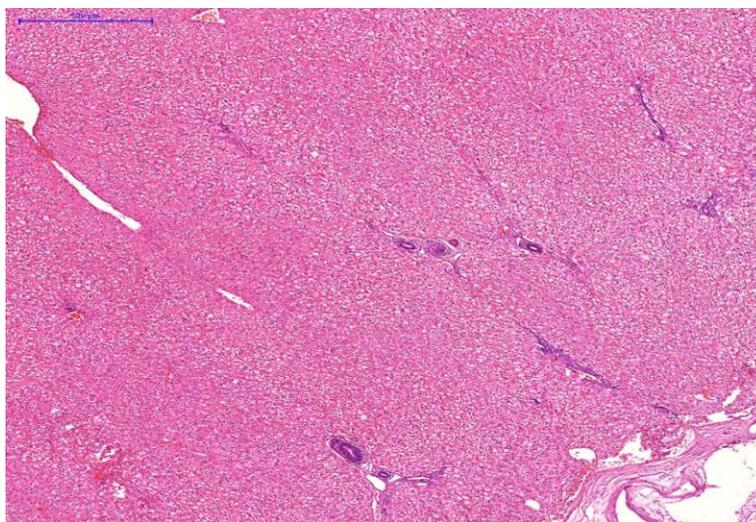


Рисунок 142 - Паренхима печени с сохранением нормальной клеточной и тканевой архитектоники. Окраска гематоксилин-эозином, увеличение  $\times 100$

Полученные данные позволили сделать вывод о том, 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 в сочетании с имеющимися положительными данными о токсикологических и санитарно-химических характеристиках разработанной отверждаемой композиции позволили перейти к клиническому этапу исследований (работы проводились под руководством д.м.н., профессора Чудных С.М.).

В ходе клинического этапа исследования отверждаемая композиция была применена у 11 больных острым холециститом с целью облитерации желчного пузыря [304]. В данную группу входили 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. Характеристика больных вошедших в данную группу представлена ниже (Таблица 30).

Таблица 30 - Характеристика исследуемых больных

Параметр	Бескаменный холецистит	Калькулезный холецистит	Всего
Количество мужчин	2 (18,2%)	1 (9,1%)	3 (27,3%)
Количество женщин	2 (18,2%)	6 (54,5%)	8 (72,7%)
Средний возраст	68,7 ±3,5	79,6 ±6,7	75,6±8,2
Сроки заболевания	3,4	2,8	3,0

При оценке состояния пациента в послеоперационном периоде учитывали клиническую картину (болевой синдром, тошнота, рвота, температурная реакция), контроль лейкоцитарной формулы крови, биохимических показателей, эхографическую картину.

При анализе лабораторных данных у всех пациентов было отмечено снижение уровня лейкоцитов крови ( $p \leq 0,05$ ), снижения уровня гемоглобина и эритроцитов отмечено не было. В биохимическом анализе крови уровень креатинина, трансаминаз, глюкозы ( $p \leq 0,05$ ), был достоверно ниже.

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.

Во время разработки методики имплантации композиции в полость желчного пузыря было отмечено два случая его обратной эвакуации по холецистостоме, что было связано с нарушением соблюдения необходимых

пропорций компонентов смеси, а также времени экспозиции. В последующем, в ходе доработки методики, подобных явлений более не наблюдались.

Ни один из случаев применения в клинике исследуемого полимерного материала не явился причиной, приведшей к тяжелым осложнениям и летальности.

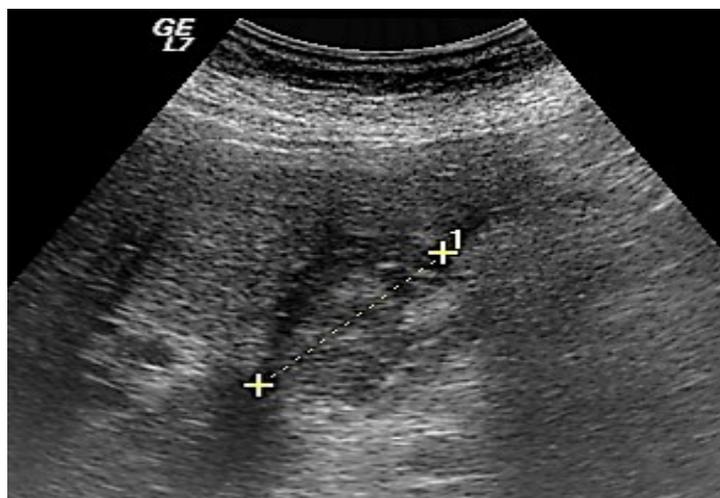


Рисунок 143 - Желчный пузырь через год после имплантации гидрогелевого материала

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 (Рисунок 143), что свидетельствует об эффективности использования данного метода для облитерации полости желчного пузыря. Рецидивы заболевания за рассматриваемый период отмечены не были.

## 4 Экспериментальная часть

### 4.1 Модификация исходных полимеров

В трехгорлую стеклянную колбу, снабженную термометром, верхнеприводной мешалкой, обратным холодильником заливали диметилсульфоксид, добавляли навеску полимера и перемешивали при нагревании до полного растворения полимера. Затем раствор нагревали до температуры реакции, после чего добавляли глицидилметакрилат и катализатор (серная кислота, либо ТМЭД, соответственно) в диметилсульфоксиде и перемешивали в течении заданного времени, поддерживая требуемую температуру.

После завершения реакции реакционную систему охлаждали. Продукт высаждали в охлажденный ацетон. Выпавший полимер промывали в ацетоне в течение часа и отделяли центрифугированием (Sigma 16P, Германия). Полученный продукт растворяли в дистиллированной воде после чего упаривали на ротационном испарителе (Laborota 4010, Германия).

Для определения степени замещения, полученный модифицированный полимер после осаждения растворяли в дистиллированной воде и очищали диализом против воды (диализные мешки Sigma 12 000), очищенный раствор сушили с использованием лиофильной сушки (Martin Christ Alpha 1-4 LD, Германия).

Степень замещения определяли, анализируя соотношения интегральных интенсивностей сигналов на спектрах  $^1\text{H}$ -ЯМР полимера.

### 4.2 Синтез полимерных гидрогелей и изучение их свойств.

#### 4.2.1 Радиационно-химический синтез полимерных гидрогелей.

Изучение радиационно-химического синтеза полимерных гидрогелей проводили под руководством проф., д.х.н. Дуфлота на базе Обнинского В.Р.ФГУП НИФХИ им. Л.Я. Карпова»

Радиационно-химический синтез полимерных гидрогелей проводили в стеклянных ампулах объемом 25 см<sup>3</sup> под вакуумом. Объем реакционной смеси составлял, обыкновенно, около 10 см<sup>3</sup>.

Раствор модифицированного полимера заливали в ампулу при комнатной температуре. Обезгаживание раствора осуществляли посредством вакуумирования при трехкратном замораживании в жидком азоте и с последующим оттаиванием при погружении в теплую воду. Затем ампулы при остаточном давлении 0,15÷0,20Па запаивали в замороженном состоянии, после чего хранили в холодильнике.

Перед началом облучения в боксе  $\gamma$ -установки устанавливали термостатируемый стакан с водой, в который помещали ампулу с раствором. Раствор нагревали до требуемой температуры. Инициирование полимеризации осуществляли  $\gamma$ -излучением <sup>60</sup>Co с использованием установки К-200.

Мощность дозы облучения при проведении процесса регулировали посредством изменения расстояния между облучаемым раствором источником излучения.

Определение количества образовавшейся гель-фракции проводили следующим образом. Поученные облучением образцы, взвешивали на аналитических весах и помещали в заранее взвешенный конверт из фильтровальной бумаги, который затем помещали в Сокслета и проводили экстракцию дистиллированной водой. После завершения экстракции конверт с образцом гидрогеля сушили в вакууме до постоянной массы, после чего взвешивали и определяли количество образовавшейся гель-фракции (G, %) по формуле:

$$G = \frac{m}{m_0} \cdot 100\% \quad (4.1)$$

где  $m$  – масса сшитого гидрогеля после экстракции,  $m_0$  – масса полимера в исходном образце.

4.2.2 Синтез полимерных гидрогелей в присутствии инициаторов радикальной полимеризации при положительных температурах.

Полимерные гидрогели получали в тонкостенных стеклянных пробирках диаметром 15 мм. Для этого раствор модифицированного полимера заливали в пробирки, добавляли иницирующую систему или водный раствор инициатора и выдерживали при заданной температуре в течение заданного времени. По завершении процесса сшивки образовавшийся гидрогель извлекали, измельчали и тщательно промывали большим избытком воды, после чего фильтровали и определяли выход гель-фракции аналогично тому, как это указано в п.4.2.1.

4.2.3 Синтез полимерных гидрогелей в воднозамороженных системах

Синтез гидрогелей осуществляли тонких стеклянных пробирках объемом 15 мл. Навески сомономеров растворяли в дистиллированной воде, полученный раствор охлаждали до температуры  $0 \pm 5$  °С, добавляли инициатор и в течение одной минуты помещали в криотермостат (Julabo F-32, США), где поддерживали заданную температуру с точностью  $\pm 0,2$  °С в течение требуемого времени.

По завершении процесса реакцию систему быстро размораживали, образовавшиеся гидрогели извлекали и промывали в горячей воде до полного исчезновения в промывных водах непрореагировавших компонентов. Критерием качества отмывки служила величина оптической плотности промывных вод в интервале длин волн 200-400 нм (оптическую плотность определяли с использованием Unico 2804, Япония). После отмывки гидрогели замораживали и сушили с использованием лиофильной сушки (Martin Christ Alpha 1-4 LD, Германия) до постоянной массы.

Выход гель-фракции определи аналогично тому, как это указано в п.4.2.1.

4.2.4 Измерение модуля сдвига образцов гидрогелей

Для определения модуля сдвига гидрогелей применяли метод пенетрации сферического индентора [305, 306]. Образцами гидрогелей

готовили в виде дисков толщиной от 1 до 3 см и диаметром  $\sim 2$  и  $\sim 6$  см. Измерение проводили следующим образом. Шарик из нержавеющей стали радиусом  $R = 1,9$  или  $3,4$  мм, вдавливался в плоское верхнее основание образца и после релаксации, занимавшей, обыкновенно, 10–15 секунд измерялась глубина вдавливания  $h$  (Рисунок 144). Как правило глубина вдавливания возрастала на протяжении нескольких первых секунд наблюдения, после чего становилась постоянной. Данный факт свидетельствует о достижении равновесного значения деформации, и измерении именно равновесного модуля упругости. При ступенчатом увеличении силы воздействия шарика на гель  $f$ , диапазон которой находился в интервале от 0,0001–до 0,01 Н, определяли зависимость  $h(f)$  (10–15 точек). Область деформаций  $h$ , в которой проводили измерения не превышала  $0,2R$ .

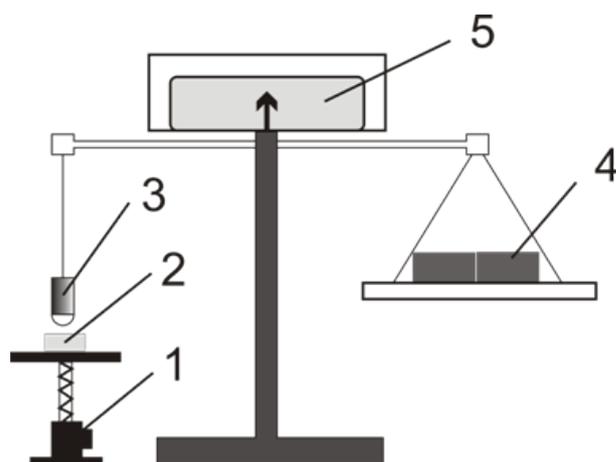


Рисунок 144 – Принципиальная схема прибора для измерения модуля упругости геля методом пенетрации: 1 - предметный столик, 2 - образец гидрогеля, 3 - массивный цилиндр с шариком, 4 - противовесы, 5 - оптическая шкала.

Обработку полученных экспериментальных данных проводили с использованием решения контактной задачи теории упругости [307], согласно которому, в рассматриваемом случае (гель значительно мягче, чем стальной

шарик) соотношение между глубиной вдавливания шарика  $h$  и силой  $f$  должно иметь вид:

$$h = h_0 + bf^{2/3} \quad (4.2)$$

где коэффициент  $b$  зависит от модуля сдвига  $G$  и радиуса шарика  $R$  как  $b = [3/(16GR^{1/2})]^{2/3}$ . В соответствии с уравнением (4.2), экспериментальная зависимость  $h$  от  $f^{2/3}$  хорошо описывалась, за исключением первых нескольких точек при силе  $f$ , близкой к нулю, прямыми линиями. Пример такого описания показан ниже (Рисунок 145).

Наклон прямой  $b$  определяли, исключая из рассмотрения начальные точки. Из значения наклона по формуле  $G = 3/(16b^{3/2}R^{1/2})$  рассчитывали модуль сдвига. Как правило, разброс в значениях модуля, определенных для нескольких образцов одного и того же образца геля, составлял в среднем  $\pm 6\%$ .

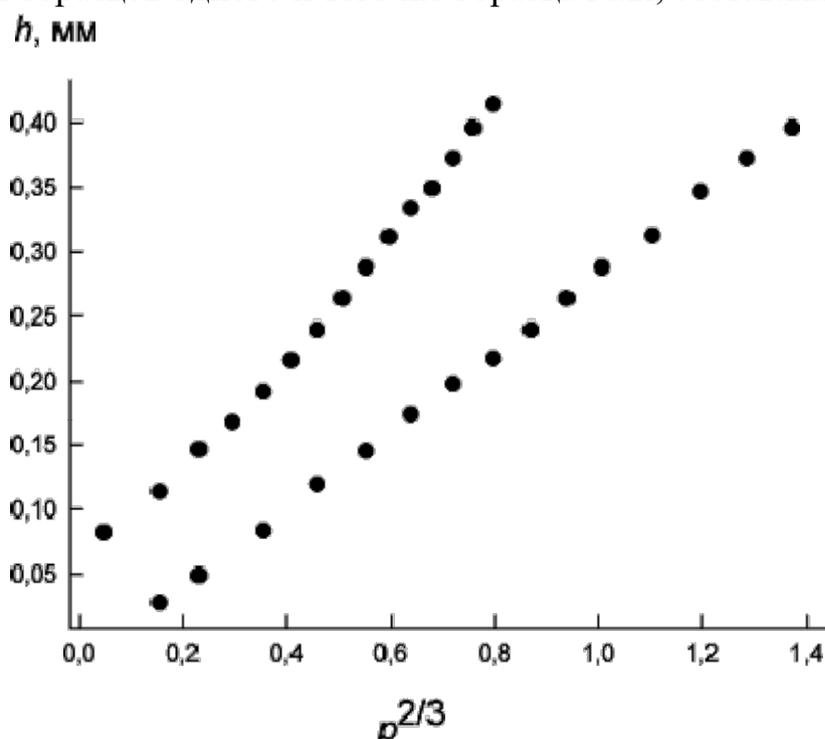


Рисунок 145- Пример деформационной зависимости для расчета модуля упругости гелей.

#### 4.2.5 Исследование морфологии поверхности полимерных гидрогелей.

Образцы для исследования получали в разъемных стеклянных формах размером  $100 \times 50 \times 3$  мм, согласно методикам, приведенным в п. 4.2.3. но после промывки полученные для фиксации пористой структуры гидрогели

замораживали в жидком азоте, поскольку при быстром охлаждении снижается вероятность образования в структуре гидрогелей артефактов, и сушили с использованием лиофильной сушки (Martin Christ Alpha 1-4 LD, Германия).

Для получения микрофотографий использовали сканирующий растровый электронный микроскоп JSM U3 (Япония) (ускоряющее напряжение 15 кВ; ток электронного пучка –  $1 \times 10^{-10}$  Ампер), снабженный системой WinEDS. Микрофотографии получали при четырех увеличениях  $\times 3000$ ,  $\times 1000$ ,  $\times 300$ ,  $\times 100$ ,  $\times 40$  раз, соответственно.

Обработка микрофотографий образцов гидрогелей, проводилась путем выбора эквивалентного диаметра поры с площадью которой равной площади неопределенной фигуры поры. Причем поиск этого оптимума проводили визуально с использованием специальных шаблонов.

Диаметр эквивалентной сферы определяли согласно выражению:

$$d_{\text{э}} = 4\sqrt{a \cdot b}, \quad (4.3)$$

где  $a, b$ - радиусы эллипса с площадью равной площади поры

Проводилась обработка не менее трех микрофотографии для каждого образца (как правило при увеличении  $\times 300$  раз). Количество обработанных пор на каждой микрофотографии было не менее 500. По результатам, в соответствии с принятой методикой, строили гистограммы распределения пор по размерам.

Средний диаметр пор определяли по формуле:

$$d_{\text{ср}} = \frac{\sum_{i=0}^N d_{\text{э},i}}{N}, \quad (4.4)$$

где  $d_{\text{э},i}$ - эквивалентный диаметр поры  
 $N$ - общее число пор

Также определяли общую пористость полимерных гидрогелей по формуле:

$$P = \frac{\sum_{i=1}^N \pi \cdot a_i \cdot b_i}{S}, \quad (4.5)$$

где  $a_i, b_i$ , - радиусы эллипса

$S$ - общая площадь поверхности

$N$ - число пор

#### 4.2.6 Изучение динамики выделения включённых биологически активных веществ из объема полимерных гидрогелей

Включение модельного препарата проводили на стадии синтеза полимерного гидрогеля.

Для получения пористых гидрогелей с включенным препаратом к раствору макромера добавляли иницирующую систему и вводимый препарат, заливали в разъемные формы и помещали в криотермостат. По окончании процесса гелеобразования формы размораживали, извлекали образовавшийся гидрогель. Полученные образцы сушили лиофильно без предварительной отмывки.

Для получения изотропных гидрогелей с включенным препаратом к раствору макромера добавляли иницирующую систему и вводимый препарат, заливали в разъемные формы и выдерживали при комнатной температуре в течение 5-6 часов. По окончании процесса гелеобразования формы размыкали, извлекали образовавшийся гидрогель. Гидрогели хранили во влажном состоянии.

При получении «гибридного» гидрогеля, предварительно полученный образец лиофильно высушенного макропористого гидрогеля помещали в раствор макромера, содержащий лекарственный препарат и иницирующую систему (для всех образцов в качестве каркаса использовался макропористый гидрогель, полученный при следующих условиях: концентрация макромера 4

г/100 мл, температура минус 15 °С). По истечении 5-6 часов образец извлекали и далее процесс проводили также как это описано выше

Наноагрегаты на основе амфифильных производных поли-N-винилпирролидона были синтезированы Кусковым А.Н. с сотр. по известным методикам.

Для включения рифампицина применяли диализный метод, а для метилурацила – эмульсионный метод, в обоих случаях соотношение полимер: лекарственное вещество составляло 1:1.

Для получения гидрогелей, содержащих наноагрегаты с включенным препаратом, к раствору макромера добавляли иницирующую систему и наноагрегаты с включенным лекарственным препаратом, заливали в разъемные формы и помещали в криотермостат. По окончании процесса гелеобразования формы размораживали, извлекали образовавшийся гидрогель. Полученные образцы сушили лиофильно без предварительной отмывки.

Для определения скорости выделения включенного лекарственного препарата приготовленные образцы гидрогелей помещали в физиологический раствор (модуль ванны 100) и инкубировали при температуре 37 °С, определяя через заданные промежутки времени концентрации препарата в растворе. Концентрацию определяли спектрофотометрически измеряя интенсивность поглощения при длине волне характерной для используемого лекарственного вещества.

### 4.3 Изучение биосовместимости полимерных гидрогелей

4.3.1 Определение содержания потенциально токсичных веществ в образцах гидрогелевого материала

Готовые к испытаниям образцы полимерных гидрогелей помещали в стеклянные плоскодонные конические колбы с плотно притертыми пробками,

заливали дистиллированной водой и термостатировали при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  в «динамическом» режиме на протяжении 14 суток.

Соотношение между массой образца ( $M$ ) и объемом добавляемой дистиллированной воды ( $V$ ), играющей роль модельной среды рассчитывали из уравнения:

$$\frac{M}{V} = \frac{m}{V} \cdot k \quad , \quad (4.6)$$

где  $m$  – максимальная масса образца при его практическом применении, г;

$k$  - коэффициент аггравации, равный 10.

В качестве контрольного раствора использовали дистиллированную воду, на которой готовились вытяжки, которую термостатировали в тех же условиях.

Измерение значений pH вытяжек проводили с использованием pH-метра HI 9321 («HANNA», Германия). УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре модели UV-mini 1240 («Shimadzu», Япония).

Количественное определение концентраций ацетальдегида, формальдегида, глицидилметакрилат проводили с использованием метода обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке с неподвижной фазой «Нуклеосил C18» (5 мкм) длиной 150 мм и внутренним диаметром 4,6 мм. Детектирование сигнала проводилось при 360 нм (производные формальдегида и ацетальдегида), и 200 нм (определение ГМА), что соответствовало специфическим максимумам на ультрафиолетовых спектрах указанных соединений. Скорость подвижной фазы составляла 1 мл/мин.

Для обеспечения необходимых селективности и чувствительности определения альдегидов последние переводили в 2,4-динитрофенилгидразоны путем обработки анализируемых водных вытяжек 2,4-динитрофенилгидразином в условиях кислотного катализа.

При определении концентраций альдегидов в качестве подвижной фазы выступал 57,5%-ный водный ацетонитрил; для определения концентрации ГМА- 20%-ный водный ацетонитрил. Времена удерживания составляли: 3,98 мин и 4,96 мин для производных формальдегида и ацетальдегида, соответственно; 9,66 мин для ГМА.

Концентрации растворенных форм металлов (кадмия, свинца, бария, железа, хрома, алюминия, меди, олова, мышьяка) в вытяжках определяли при помощи атомно-абсорбционной спектрометрии с использованием модульного спектрального аналитического комплекса «КВАНТ-Z.ЭТА».

#### 4.3.2 Изучение цитотоксичности экспериментальных образцов гидрогелевых материалов

Для оценки цитотоксического и цитостатического действия водных вытяжек из образцов использовали суспензионную кратковременную культуру подвижных половых клеток, приготовленную из замороженной спермы крупного рогатого скота, с последующим определением индекса токсичности.

В качестве контрольного раствора использовалась глюкозо-цитратная среда следующего состава: глюкоза – 4 г, цитрат натрия – 1 г, дистиллированная вода - 100 мл. Одновременно раствор служил и разбавителем для оттаивания замороженной спермы. Опытный раствор (вытяжки из образцов) доводили до изотонии глюкозой и цитратом.

Стеклянные пробирки с плотно притертыми пробками с контрольным и опытными растворами (по 0,4 мл) помещали в водяную баню при температуре  $40^{\circ}\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ . Для приготовления маточного раствора спермы в пробирку вносили 0,4 мл разбавителя и ставят в водяную баню при температуре  $40 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ , в нагретый раствор опускали извлеченную из сосуда Дьюара гранулу замороженной спермы.

Для приготовления рабочих образцов в пробирки с контрольным и опытными растворами помещали по 0,1 мл маточного раствора спермы.

Рабочие образцы переносили в капилляры. Капилляры помещали в анализатор (стенд для определения подвижности суспензионной культуры подвижных клеток типа АТ-04). Производили обработку экспериментальных данных.

Индекс токсичности определяли по формуле:

$$It = \frac{t_{\text{cp}}^0}{t_{\text{cp}}^k} \times 100\% \quad , \quad (4.7)$$

где  $t_{\text{cp}}^0$  и  $t_{\text{cp}}^k$  - средние арифметические значения времени подвижности соответственно для опытной и контрольной выборок образцов.

Исследуемые вытяжки из экспериментальных образцов можно считать нетоксичными, если индекс токсичности находится в интервале от 70 до 120 %.

#### 4.3.3 Определение гемотоксического действия экспериментальных образцов гидрогелевых материалов

Пробоподготовку проводили аналогично п. 4.3.2. Оценку гемолитического действия водных вытяжек проводили в опытах «in vitro» с изолированными эритроцитами кроликов. Для приготовления взвеси эритроцитов использовали цитратную кровь кролика, приготовленную на 3,8% растворе цитрата натрия в соотношении 1:9.

Для обеспечения статистической достоверности отбирали 3 образца крови. Цитратную кровь в количестве 5 мл центрифугировали в течение 10 минут при 900 об/мин, отделяя надосадочную жидкость. К осадку добавляли 8 мл физиологического раствора. Содержимое перемешивали и центрифугировали еще 10 минут, надосадочную жидкость отделяли. Надосадочная жидкость должна быть прозрачной, бесцветной, не иметь следов гемолиза. При несоответствии надосадочной жидкости указанным требованиям, операцию по отмыванию осадка эритроцитов физиологическим раствором повторяли.

Для получения 10% взвеси эритроцитов 1 мл осадка клеток смешивали с 9 мл физиологического раствора.

Опытную пробу готовили, используя 10% взвесь эритроцитов крови кролика и вытяжку из образцов (5 мл), контрольную пробу - 10% взвесь эритроцитов и изотонический раствор хлорида натрия. Пробы помещали в термостат на 1 час при температуре  $37\pm 3$  °С, после чего центрифугировали и определяли оптическую плотность на фотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540 нм против дистиллированной воды.

Расчет процента гемолиза производят по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{E_{\text{опт}} - E_{\text{к}}}{E_{100}} \times 100, \quad (4.8)$$

где  $E_{\text{опт}}$  - оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{к}}$  - оптическая плотность контрольной пробы;

$E_{100}$  - оптическая плотность пробы со 100%-ным гемолизом.

Исследуемые вытяжки из образцов имплантатов можно считать свободными от гемолитически действующих веществ, если процент гемолиза во всех трех образцах крови менее двух.

#### 4.3.4 Определение раздражающего действия образцов гидрогелевых материалов

Пробоподготовку проводили аналогично п. 4.3.2.

Раздражающее действие вытяжек из образцов изучали при воздействии на слизистую оболочку глаз кроликов

В эксперимент отбирали не менее трех животных на каждый из образцов, с этой целью за сутки до начала исследования визуально оценивали состояние глаз каждого кролика для выявления выраженных повреждений.

В случае обнаружения патологических изменений хотя бы в одном глазу животное заменяли. С целью более четкого выявления изменений роговицы использовали 2% раствор флуоресцеина натрия, офтальмоскоп, ручную щелевую лампу и другие устройства.

Таблица 31 - Система классификации повреждений глаза

Наблюдаемая реакция	Оценка в баллах
1.Роговица	
Степень помутнения	
Отсутствие	0
Генерализованное или диффузное помутнение, детали радужной оболочки хорошо различимы	1
Легко различимое полупрозрачное помутнение, детали радужной оболочки замутнены	2*
Опалесцирующее помутнение, детали радужной оболочки не различимы, размер зрачка определить невозможно	3*
Помутнение светонепроницаемо, радужная оболочка не видна	4*
Площадь пораженной роговицы	
Одна четверть (или менее)	0
Более одной четверти, но меньше половины	1
Более половины, но меньше трех четвертей	2
Более трех четвертей или площадь всего глаза	3
2.Радужная оболочка	0
Нормальная	1*
Складчатость выше нормы, заметно набухание, сосуды инъецированы, радужная оболочка реагирует на свет	2*
Реакция на свет отсутствует, увеличено количество кровоизлияний	0
3. Конъюнктивa	1
Нормальные сосуды	2*
Сосуды заметно инъецированы	3*
Более выраженная диффузная гиперемия, отдельные сосуды плохо различимы	
Диффузная резко выраженная краснота	0
4.Отек конъюнктивы	1
Отсутствие отека	2*
Слегка заметный отек	3*
Выраженный отек с частичным закрытием века	4*
отек с половинным закрытием века	
отек с закрытием века от половинного до полного	
5.Выделения	0
Отсутствие выделений	1
Незначительные выделения, отличающиеся от нормальных	2*
Выделения на веках и шерсть вокруг глаз	3*
Выделения на веках и шерсть вокруг глаз и значительной площади мордочки	
*Положительный результат	

Испытуемую вытяжку из образцов инстиллировали в один глаз кролика в количестве 1-2 капель, другой глаз оставляли для контроля (в него вносили дистиллированную воду). Оба глаза животных, которым инстиллировали вытяжку из образцов, осматривали через 1, 24, 48, 72 часа после воздействия.

Наблюдаемую реакцию оценивали и регистрировали в соответствии с системой классификации повреждений (

Таблица 31).

Если при воздействии на слизистую оболочку глаза более чем у одного животного на любой стадии исследования возникали патологические изменения, отмеченные в таблице знаком «\*», считали, что вытяжка обладает раздражающим действием. В том случае, если патологические изменения выявлялись в подопытном глазу только у одного из трех кроликов, и сомнительных результатах исследования повторяли на большем количестве животных. Если патологические изменения при повторных исследованиях обнаруживались более чем у половины кроликов, считали, что вытяжка обладает раздражающим действием.

#### 4.3.5 Исследование сенсibiliзирующего действия

Пробоподготовку проводили аналогично п. 4.3.2.

Для исследования сенсibiliзирующего действия образцов белым крысам в наружную поверхность уха внутрикожно вводили по 0,02 мл вытяжек. Контрольным животным вводили по 0,02 мл модельной среды (дистиллированная вода). Наблюдение за состоянием кожи проводили через 15 мин, 1, 24, 48 и 72 часа после введения.

Через 10 суток проводили по 5 накожных аппликаций - наносили по 0,5 мл вытяжки на выстриженные заранее участки кожи животных размером 1x1 см. Контрольным животным проводили аппликации модельной среды в том же режиме. Ежедневно наблюдали и оценивали реакцию раздражения.

Через сутки после последней аппликации проводили провокационную пробу путем внутрикожного введения 0,02 мл вытяжки в противоположный проведенным аппликациям бок каждого животного. Реакцию на провокационную пробу отмечали через 24, 48 и 72 часа.

Таблица 32 - Оценка кожно-раздражающего действия

Кожная реакция (изучаемые показатели)	Оценка в баллах	Оценка результатов эксперимента	Средний балл
Эритема		Отсутствие реакции	0 – 0,4
Отсутствие эритемы	0		
Очень слабая эритема	1		
Отчетливая эритема	2		
Средняя эритема	3	Слабая реакция	0,5 – 0,9
Сильная эритема	4		
Образование отека			
Отсутствие отека	0		
Очень слабый отек	1	Средняя реакция	2,0 – 4,9
Отчетливый отек	2		
Средний отек (возвышение на 1 мм)	3		
Сильный отек (возвышение более 1 мм)	4		
Общий максимальный балл, оценивающий раздражение	8		

В соответствии с классификацией (Таблица 32) оценивали степень кожной реакции, включая эритему и отек для каждого животного и каждого интервала времени (24, 48 и 72 часа) после воздействия. Для каждого животного складывали баллы кожной реакции, вызванной исследуемым материалом (включая отек и эритему) в каждый интервал времени наблюдения и делили на общее число наблюдений, получали балл первичного раздражения, который вычисляли и для контроля. Из балла первичного раздражения подопытных животных вычитали показатель контроля. Затем складывали полученные баллы кожной реакции всех подопытных животных и делят на количество особей. Полученный индекс суммарного раздражения сравнивали с показателями, представленными в таблице, отмечая слабую, среднюю или сильную реакцию на воздействие изучаемого материала.

Оценку возможного сенсibilизирующего действия проводили с использованием диагностического метода специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ). Через 24 часа после проведения внутрикожной пробы животных забивали декапитацией, брали кровь для проведения РСЛЛ.

Исследуемую кровь в количестве 0,1 мл, добавляли в две центрифужные или видалевские пробирки:

1 (опытная) - по 0,05 мл антикоагулянта и вытяжки, которая доведена до изотонии хлоридом натрия

2 (контрольная) - по 0,05 мл антикоагулянта и физиологического раствора

Обе пробирки инкубировали в течение 2-х часов при температуре 37°C. Подсчет абсолютного количества лейкоцитов проводили на приборе Picoscale

Показатель РСЛЛ рассчитывали по формуле:

$$\text{Показатель РСЛЛ} = \frac{L_{\text{контроль}} - L_{\text{опыт}}}{L_{\text{контроль}}} \times 100\% \quad (4.9)$$

где  $L_{\text{контроль}}$  – количество лейкоцитов в пробе без аллергена;

$L_{\text{опыт}}$  - количество лейкоцитов в пробе с вытяжкой.

Реакцию расценивали как положительную при показателе РСЛЛ выше 10%. Показатель РСЛЛ превышающий 20 % свидетельствует о высоком уровне сенсибилизации животных.

#### 4.3.6 Исследование острого общетоксического действия

Пробоподготовку проводили аналогично п. 4.3.2.

Действие вытяжек образцов изучали на белых беспородных мышах массой 20-22 г. Животных разделяли на подопытные и контрольную группы не менее чем по 10 голов в каждой. Содержание животных полностью соответствовало санитарным нормам. Подопытным животным однократно внутрибрюшинно вводили по 1 мл вытяжек (из расчета 50 мл/1кг массы тела). Контрольные животные в том же режиме получали дистиллированную воду. Температура вводимых растворов -  $37 \pm 1,5^\circ\text{C}$ .

В течение эксперимента оценивали общее состояние животных, изменение внешнего вида, поведения, двигательной активности, контролировали прирост массы тела. По окончании эксперимента животных забивали методом декапитации, макроскопически оценивали состояние брюшины и внутренних органов, определяли органо-соматические показатели

(ОСП), рассчитываемые как соотношение массы органа в миллиграммах к массе тела в граммах.

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента «t» и проверяли наличие, статистически достоверных изменений массы тела и ОСП (органо-соматических показателей) у подопытных животных по сравнению с контрольной группой.

#### 4.3.7 Исследование подострого и хронического общетоксического действия

Изучение подострой и хронической токсичности образцов гидрогелей проводили на беспородных белых крысах-самцах, являющихся наиболее подходящим видом животных для проведения токсикологических исследований. Стерильные растворы для отверждения «in vivo», после добавления к содержимому ампулы (1 мл) 30 мкл 2%-ного раствора персульфата аммония в качестве отвердителя вводили с помощью шприца подкожно в область спины подопытным животным. Пористые и изотропные гидрогели в виде специально изготовленных образцов, под медикаментозным наркозом (препарат зоолетил в дозе 15 мг/кг) имплантировали подопытным животным подкожно в область спины. Контрольным животным в тех же условиях вживляли образцы медицинского стекла марки ВС-3 ГОСТ 19808.

Расчет массы имплантата проводили по формуле:

$$m = \frac{M}{P} \cdot p \cdot K, \quad (4.10)$$

где M - максимальное количество для одного пациента;

P - средняя масса тела человека (70 кг);

p - средняя масса тела подопытных животных (0,250 кг);

K- коэффициент аграваии, равный 10.

Содержание подопытных и контрольных животных полностью соответствовало санитарным нормам.

Длительность эксперимента с момента имплантации составляла 1, 2, 3, 4 месяца.

Часть подопытных и контрольных животных (по 5 особей из группы) выводили из эксперимента методом декапитации через месяц, два месяца, три месяца после введения образцов и отбирали материал для проведения патоморфологических исследований.

В конце эксперимента (через 4 месяца после имплантации) оставшихся животных обследовали с использованием физиологических, гематологических, биохимических методов.

В течение всего эксперимента проводили наблюдения за внешним видом поведением, двигательной активностью подопытных и контрольных животных. Определяли прирост массы тела. Состояние центральной нервной системы оценивали по способности к суммации подпороговых импульсов, то есть, определению суммационно-порогового показателя (СПП). Для проведения эксперимента использовали установку, состоящая из аппарата, дающего электроимпульсный ток, и, присоединенных к его выходным клеммам (аноду и катоду), металлических пластин-электродов. Задние лапки животного помещали на электроды при нулевом напряжении, включали подачу импульсного тока, одновременно увеличивая подаваемое напряжение. При возникновении рефлекторного ответа (животное поднимает лапку) переводили ток на «постоянный» и фиксировали результат в мА.

Кроме того, в качестве интегрального показателя состояния организма животных использовали показатель двигательной работоспособности, который определяли по времени движения на роторной установке (Ugo Basile, Италия).

Биохимические исследования сыворотки крови подопытных животных заключались в определении активности аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз, содержания мочевины. Биохимические показатели сыворотки крови определяли на биохимическом анализаторе «Stat Fax 1904 Plus» в комплексе с проточной кюветой «Mosquito 2400» (Awarenes Technology inc., США).

Количество лейкоцитов и эритроцитов в крови определяли на приборе «Picoscell» PS-4M и ветеринарном автоматическом 17-канальном гематологическом анализаторе Exigo; содержание гемоглобина – на биохимическом анализаторе «Stat Fax 1904 Plus».

По окончании исследований животных выводили из эксперимента методом декапитации, определяли органо-соматические показатели, отбирали материал для патоморфологических исследований.

Полученные результаты экспериментальных исследований подвергали статистической обработке методом вариационной статистики с использованием критерия «t» Стьюдента.

Внутренние органы подопытных и контрольных животных (печень, почки, селезенка), а также соединительнотканная капсула, окружающая образцы, взятые у подопытных и контрольных животных через 1,2, 3 и 4 месяца после имплантации подвергали патоморфологическим исследованиям.

4.3.8 Оценка биосовместимости образцов по отношению к эритроцитарной массе и лейко-тромбоцитарному слою

Подготовка образцов. Перед проведением эксперимента образцы, измельчали. В случае изучения свойств пористых материалов их перед измельчением помещали в физиологически раствор для набухания, образцы, представляющие собой раствор для отверждения, перед измельчением сшивали

Подготовка эритроцитарной массы. Перед проведением испытаний донорская эритроцитарная масса с хранением не более 5 дней многократно промывалась физиологическим раствором с помощью центрифугирования на центрифуге при 1500g в течение 15 мин с последующим удалением надосадочной жидкости и заменой ее новым физиологическим раствором. После тщательной отмывки ЭР-массы ее разбавляли в два раза физиологическим раствором и перемешивают качающими движениями.

Взаимодействие образцов биodeградируемых полимеров с эритроцитарной массой. К измельченным образцам добавляли разбавленную в

два раза физиологическим раствором отмытую ЭР-массу. После перемешивания качающими движениями смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 часов. После двухчасовой выдержки образцы ЭР - массы отделяли от исследуемых образцов и направляли на гемоанализ. Контролем в анализе служила исходная эритроцитарная масса, не вступавшая в контакт ни с одним образцом. Гемоанализ образцов эритроцитарной массы проводили с помощью гемоанализатора.

Взаимодействие образцов биodeградируемых полимеров с лейко-тромбоцитарным слоем. К измельченным образцам добавляли разбавленный в десять раз лейко-тромбоцитарный слой. После перемешивания качающими движениями смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа. После часовой выдержки образцы ЛТС отделяли от исследуемых образцов и отправляли на гемоанализ. Контролем в анализе служил исходный ЛТС, не вступавший в контакт ни с одним образцом.

Гемоанализ образцов лейко-тромбоцитарного слоя проводили с помощью гемоанализатора Beckman Coulter AcTdiff (США).

4.3.9 Оценка биосовместимости по содержанию свободного гемоглобина в надосадочной жидкости после контакта образцов с эритроцитарной массой

Подготовка образцов аналогична подготовке, описанной в п 4.3.8

Взаимодействие с эритроцитарной массой. К образцам добавляли разбавленную в два раза физиологическим раствором отмытую ЭР-массу. После перемешивания качающими движениями смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 часов.

После контакта образцы ЭР - массы отделяли от исследуемых образцов материала, помещали в чистые, сухие пробирки и центрифугировали при 1500g в течение 15 мин. После центрифугирования надосадочная жидкость отделялась от осевших эритроцитов и подвергалась анализу на содержание свободного гемоглобина. Контролем в анализе служила надосадочная

жидкость, отделенная от осевших эритроцитов, не вступающих в контакт ни с одним образцом.

Определение концентрации свободного гемоглобина в надосадочной жидкости. Определение концентрации свободного гемоглобина проводили спектрофотометрическим методом согласно методу Harboe. Метод позволяет определять концентрацию свободного гемоглобина в диапазоне от 0,08 до 2,00 г/л. Первоначально готовили стоковый раствор карбоната натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) с концентрацией 10 г/л – 1 г.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  растворяли в 100 мл дистиллированной воды. В день проведения исследований по определению концентрации свободного гемоглобина готовили рабочий раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  путем растворения 1 мл стокового раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в 100 мл дистиллированной воды. Концентрация  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в рабочем растворе должна составлять 0,1 г/л. Спектрофотометрическое определение относительной оптической плотности исследуемых растворов относительно рабочего раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  проводили в кварцевых кюветах с толщиной слоя жидкости 1 см при трех фиксированных длинах волн: 380, 415 и 450 нм. Исследуемые растворы готовили следующим образом: 0,3 мл анализируемого раствора надосадочной жидкости добавляли к 3 мл рабочего раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  с концентрацией 0,1 г/л. Концентрацию свободного гемоглобина в г/л рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{Hb}} = 0,836(2A_{415} - A_{380} - A_{450}) \quad (4.11)$$

где  $A_{415}$ ,  $A_{380}$ ,  $A_{450}$  – относительная плотность анализируемых растворов при 415, 380 и 450 нм соответственно.

4.3.10 Оценка биосовместимости на основании микроскопических исследований эритроцитарной массы и лейко-тромбоцитарного слоя после контакта с образцами

Подготовка образцов аналогична подготовке, описанной в п 4.3.8

Подготовка эритроцитарной массы аналогична подготовке, описанной в п.4.3.9

Подготовка тромбоцитов. Забор крови для исследования тромбоцитов чаще всего проводили из локтевой вены, с предварительным накладыванием сдавливающей манжетки. Кровь собирали в пластиковые пробирки (или другие контейнеры) с антикоагулянтом. Сразу после взятия крови пробирку закрывали и несколько раз переворачивали для лучшего распределения антикоагулянта.

Для получения обогащенной (или богатой) тромбоцитами плазмы (ОТП) кровь центрифугировали в бакет-роторах при 120 – 200 g при комнатной температуре в течение 10 – 20 минут.

Взаимодействие образцов с эритроцитарной массой и тромбоцитами. К каждому из образцов добавляли разбавленную в два раза физиологическим раствором отмытую ЭР-массу. После перемешивания качающими движениями смесь выдерживали при комнатной температуре в течение 2 часов. После двухчасовой выдержки образцы ЭР - массы отделяли от исследуемых образцов и отправляли на микроскопические исследования. Контролем в анализе служила исходная эритроцитарная масса, не вступавшая в контакт ни с одним образцом.

Микроскопические исследования образцов эритроцитарной массы и обогащенной тромбоцитами плазмы проводили с помощью микроскопа Nikon Eclipse 80i (Япония). Для обнаружения «теней» эритроцитов использовали витальный краситель, поскольку без подкрашивания «тени» эритроцитов не видны. Для морфофункционального исследования тромбоцитов использовали метод, основанный на окрашивании клеток витальными (прижизненными) флуорохромными красителями с последующим анализом во флуоресцентном микроскопе. Для оценки биологической полноценности тромбоцитов использовали количество функционально пригодных тромбоцитов, то есть тромбоцитов, содержащих гранулы.

## 5 Выводы.

1. Путем радикального сшивания водорастворимого модифицированного глицидилметакрилатом поливинилового спирта, а также смесей модифицированного поливинилового спирта с модифицированным гидроксиэтилкрахмалом, либо заряженными низкомолекулярными мономерами получены низкотоксичные изотропные и пористые гидрогели пригодные для медико-биологического использования.
2. Исследованием процесса модификации поливинилового спирта и гидроксиэтилкрахмала глицидилметакрилатом, выявлены условия, позволяющие синтезировать полимеры 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 гелей 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 матрицы гидрогелей в наибольшей степени оказывает влияние количество введенного инициатора и в меньшей степени – концентрация полимера и температура образования гидрогеля.

6. Продемонстрирована возможность использования синтезированных гидрогелей в качестве основы для матриц для культивирования различных типов клеток. Показано, что посредством регулирования состава полимерных гидрогелей возможно создание матрикса, с преимущественным ростом определенного типа клеток.
7. Установлена высокая степень биосовместимости полученных полимерных систем. Показана их способность к биодеградации с замещением собственными тканями организма. Продемонстрирована возможность регулирования скорости биодеградации посредством варьирования состава полимерного гидрогелевого материала
8. Продемонстрирована возможность использования разработанных гидрогелевых материалов для создания ряда изделий медико-биологического назначения: высокоэффективных раневых покрытий, материалов для заполнения дефектов мягких тканей, систем доставки лекарственных препаратов и ряда других

## 6 Список литературы

- <sup>1</sup> Hydrogels in Medicine and Pharmacy / N.A. Peppas. — Florida: CRC Press, Boca Raton, 1986. — Vols. 1-3
- <sup>2</sup> Rosiak J.M., Yoshii F. Hydrogels and their medical applications // Nucl. Instrum Methods Phys. Res. Sec. B. — 1999. — Vol. 151. — 56-64 p.
- <sup>3</sup> Galaev I.Y., Mattiasson B. Smart polymers and what they could do in biotechnology and medicine // Trends Biotechnol. — 1999. — Vol.17. — 335-340 p.
- <sup>4</sup> Baldwin S.P., Saltzman W.M. Materials for protein delivery in tissue engineering // Adv. Drug Deliv. Rev. — 1998. — Vol. 33. — 71-86 p.
- <sup>5</sup> Gombotz W.R., Pettit D.K. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery // Bioconjug. Chem. — 1995. — Vol. 6. — 332-351 p.
- <sup>6</sup> Hoffman A.S. Hydrogels for biomedical applications // Advanced Drug Delivery reviews. — 2002. — Vol.43. — 3-12 p.
- <sup>7</sup> Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations // Eur. J. Pharm. Biopharm. — 2000. — Vol. 50. — 27-46 p.
- <sup>8</sup> Peppas N.A., Huang Y., Torres-Lugo M., Ward J.H., Zhang J. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology // Annu. Rev. Biomed. Eng. — 2000. — Vol. 2. — 9-29 p.
- <sup>9</sup> Drury J. L., Mooney D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications // Biomaterials. — 2003. — Vol. 24. — 4337–4351 p.
- <sup>10</sup> Gehrke S.H. Synthesis and properties of hydrogels used for drug delivery // Drugs Pharm. Sci. — 2000. — Vol. 102 — 473-546 p.
- <sup>11</sup> Park K., Shalaby W.S.W. Biodegradable hydrogels for drug delivery / Park H. — Basle: Technomic Publishing Co., 1993. — 252 p.

12. Папков С.П. Студнеобразное состояние полимеров. — М.: Химия, 1974. — 256 с.
13. Wichterle O., Lim D. Hydrophilic gels for biological use // *Nature*. — 1960. Vol. 185. — 117-118 p.
14. Park H., Park K. Biocompatibility issues of implantable drug delivery systems // *Pharm. Res.* — 1996. — Vol. 13. — 1770-1776 p.
15. Smetana K. Cell biology of hydrogels // *Biomaterials*. — 1993. — Vol. 14. — 1046-1050 p.
16. Anderson J.M., Langone J.J. Issues and perspectives on the biocompatibility and immunotoxicity evaluation of implanted controlled release systems // *J. Controlled Release*. — 1999. — Vol. 32. — 107-113 p.
17. Anderson J.M. In vivo biocompatibility of implantable delivery systems and biomaterials // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* — 1994. — Vol 40. — 1-8 p.
18. Langer R.S., Peppas N.A. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems // *Biomaterials*. — 1981. — Vol 2. — 201-214 p.
19. Bettini R., Colombo P., Peppas N.A. Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: Transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride // *J. Controlled Release*. — 1995. — Vol. 37. — 105-111 p.
20. Cicek H., Tuncel A. Immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin in thermally reversible isopropylacrylamide-hydroxyethylmethacrylate copolymer gel // *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* — 1998. — Vol. 36. — 543-552 p.
21. Штильман М.И., Остаева Г.Ю., Артюхов А.А., Тсатсакис А.А., Козлов В.С. Эпоксидсодержащие пористые гидрогели акриламида: исследование влияния условий синтеза // *Пластмассы*. — 2002. — №.3. — 25-28 с.
22. Штильман М.И., Артюхов А.А., Козлов В.С., Тсатсакис А.М. Эпоксидсодержащие пористые гидрогели поли(2-

- 
- гидроксиэтил)метакрилата: исследование влияния условий синтеза // Пластмассы. — 2002. — №.7. — 24-28 с.
- 23 Артюхов А.А., Штильман М.И., Тсатсакис А.М., Козлов В.С., Остаева Г.Ю. Эпоксидсодержащие пористые гидрогели полиакриламида: исследование физико-химических характеристик // Пластмассы. — 2002. — №.9. — 32-37 с.
- 24 Chen J., Park P., Park K. Synthesis of superporous hydrogel: Hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties // Biomed. Mater. Res. — 1999. — Vol. 44 — 53-62 p.
- 25 Přadný M., Lesný P., Fiala J., Vacík J., Šlof M., Michálek J., Sukova E. Macroporous hydrogel based on 2-hydroxyethylmethacrylate. Part 1. Copolymers of 2-hydroxyethylmethacrylate with methacrylic acid // Collect. Czech. Commun. — 2003. — Vol 68. — 812-822 p.
- 26 Horak D., Lednický F., Bleha M. Effect of inert components on the porous structure of 2-hydroxyethyl methacrylate–ethylene dimethacrylate copolymers // Polymer. — 1996. — Vol. 37. — 4243–4249 p.
- 27 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.
- 28 Edman P., Ekman B., Sjöholm I. Immobilization of proteins in microspheres of polyacryldextran // J. Pharm. Sci. — 1980. — Vol. 69. — 838-842 p.
- 29 Sjöholm I.P., Edman P. The use of biocompatible microparticles as carriers of enzymes and drugs in vivo. In: Microspheres and Drug Therapy. Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects / S.S. Davies, L. Illum, J.G. Vie, E. Tomlinson. — Amsterdam: Elsevier, 1984. — 245-262 p.
- 30 Mehvar R. Dextran for the targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents // J. Controlled Release. — 2000. — Vol. 69. — 1-25 p.

- 
- 31 Brondsted H., Anderson C., Hovgaard L. Crosslinked dextran, a new capsule material for colon targeting of drugs // *J. Controlled Release*. — 1998. — Vol. 53 — 7-13 p.
- 32 Park K. Enzyme-digestible swelling hydrogels as platforms for long-term oral drug delivery: synthesis and characterization // *Biomaterials*. — 1988. — Vol. 9 — 435-441 p.
- 33 Artursson P., Edman P., Laakso T., Sjöholm I. Characterization of polyacryl starch microparticles as carrier for proteins and drugs // *J. Pharm. Sci.* — 1984. — Vol. 73, № 11. — 1507-1513 p.
- 34 Heller J., Pangburn S.H., Roskos K.V. Development of enzymatically degradable protective coatings for use in triggered drug delivery systems: derivatized starch hydrogels // *Biomaterials*. — 1990. — Vol. 11. — 345-350 p.
- 35 Stureson C., Wikingsson L.D. Comparison of poly(acryl starch) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres as drug delivery system for a rotavirus vaccine // *J. Controlled Release*. — 2000. — Vol. 68. — 441-550 p.
- 36 Giammona V., Tomarchio V., Pitarresi G., Cavallaro G. Glycidyl methacrylate derivatization of  $\alpha,\beta$ -poly(N-hydroxyethyl)-D,L-aspartamide and  $\alpha,\beta$ -polyasparthydrazide // *Polymer*. — 1997. — Vol. 38. — 3315-3323 p.
- 37 Giammona G., Pitarresi G., Cavallaro G., Buscemi S., Saiano F. New biodegradable hydrogels based on photocrosslinkable modified polyaspartamide: synthesis and characterization // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1999. — Vol. 1428. — 29-38 p.
- 38 Giammona G., Pitarresi G., Cavallaro G., Spadaro G. New biodegradable hydrogels based on an acryloylated polyaspartamide crosslinked by gamma irradiation // *J. Biomed. Sci. Polym. Ed.* — 1999. — Vol. 10. — 969-987 p.

- 
- 39 Martens P., Anseth K.S. Characterization of hydrogels from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers // *Polymer*. — 2000. — Vol. 41. — 7715-7722 p.
- 40 Jin Y., Yamanaka J., Sato S., Miyata I., Yomota C., Yonese M. Recyclable characteristics of hyaluronate-polyhydroxyethyl acrylate blend hydrogel for controlled releases // *J. Controlled Release*. — 2001. — Vol. 73. — 173-181 p.
- 41 Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Franssen O., Talsma H., Van Steenberg M.J., Kettenes-Van den Bosch J.J., Hennink W.E. Synthesis, characterization and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran // *Macromolecules*. — 1995. — Vol. 28. — 6317-6322 p.
- 42 Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Kettenes-Van den Bosch J.J., Van der Kerk-Van-  
Hoof A., Hennink W.E. Reaction of dextran with glycidyl methacrylate: an unexpected transesterification // *Macromolecules*. — 1997. — Vol. 30. — 3411-3413 p.
- 43 Franssen O., Van Ooijen R.D., de Boer D., Maes R.A.A., Herron J.N., Hennink W.E. Enzymatic degradation of methacrylates dextrans // *Macromolecules*. — 1997. — Vol. 30. — 7408-7413 p.
- 44 Stubbe B., Maris B., Van den Mooter G., de Smedt S.C, Demeester J. The in vitro evaluation of azo-containing polysaccharide gels for colon delivery // *J. Controlled Release*. — 2001. — Vol. 75. — 103-114 p.
- 45 Ferreira L., Vidal M.M., Geraldés C.F.G.C., Gil M.H. Preparation and characterization of gels based on sucrose modified with glycidyl methacrylate // *Carbohydr. Polym.* — 2000. — Vol. 41. — 15-24 p.
- 46 Marsano E., Bianchi E., Gagliardi S., Ghioni F. Hydroxypropyl-cellulose derivatives: phase behaviour of hydroxypropylcellulose methacrylate // *Polymer*. — 2000. — Vol. 41. — 533-538 p.

- 
- 47 Huang L.K., Metha R.C., de Lucca P.P. Evaluation of a statistical model for the formation of poly(acryloyl hydroxyethyl starch) microspheres // *Pharm. Res.* — 1997. — Vol. 14. — 475-482.
  - 48 Kim S.J., Park S.J., Kim S.I. Swelling behavior of interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly (vinyl alcohol) and chitosan // *Reactive and Functional Polymers.* — 2003. — Vol. 55. — 53-59 p.
  49. Yih-Wen Gung, Shyh Ming Kuo, Yng-Jiin Wang. Effect of PVA-AA on dentine bonding of HEMA // *Biomaterials.* — 1997. — Vol. 18. — 367-371 p.
  - 50 Kim S.H., Chu C.C. Synthesis and characterization of dextran-methacrylate hydrogels and structural study by SEM // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2000. — Vol. 49. — 517-527 p.
  51. Gunanan C.M., Storie B., Smith P., Knight P.M // *Polym.Mater.Sci.Eng.* — 1993. — Vol. 69. — 506-507 p.
  52. Schmedlen R.H., Masters K.S., West J.L. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering // *Biomaterials.* — 2002. — Vol. 23. — 4325–4332 p.
  - 53 Patil N.S., Dordick J.S., Rethwisch D.G. Macroporous poly(sucrose acrylate) hydrogels for controlled release of macromolecules // *Biomaterials.* — 1996. — Vol. 17. — 2343-2350 p.
  - 54 Martin B.D., Linhardt R.J., Dordick J.S. Highly swelling hydrogels from orderegalactose-based polyacrylates // *Biomaterials.* — 1998. — Vol. 19. — 69-76 p.
  - 55 Patil N.S., Li Y., Rethwisch D.G., Dordick J.S. Sucrose diacrylate: A unique chemically and biologically degradable crosslinker for polymeric hydrogels // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* — 1997. — Vol. 35. — 2221-2229 p.
  - 56 Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Van Steenberg M.J., Underberg W.J.M., Hennink W.E. Degradation kinetics of methacrylated dextrans in aqueous solution // *J. Pharm. Sci.* — 1997. — Vol. 86. — 413-417 p.

- 
- 57 Hennink W.E., Talsma H., Borchert J.C.H., de Smedt S.C., Demeester J. Controlled release of proteins from dextran hydrogels // *J. Controlled Release*. — 1996. — Vol. 39. — 47-55 p.
- 58 Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Hoogeboom J.A.M., Van Steenberghe M.J., Tsang S.K.Y., Hennink W.E. Degradation and release behaviour of dextran based hydrogels // *Macromolecules*. — 1997. — Vol. 30. — 4639-4645 p.
- 59 Franssen O., Vos O.P., Hennink W.E. Delayed release of a model protein from enzymatically degrading dextran hydrogels // *J. Controlled Release*. — 1997. — Vol. 44. — 237-245 p.
- 60 Franssen O., Van Rooijen R.D., de Boer D., Maes R.A.A., Hennink W.E. Enzymatic degradation of crosslinked dextrans // *Macromolecules*. — 1999. — Vol. 32. — 2896-2902 p.
- 61 Meyvis T.K.L., de Smedt S.C., Demeester J., Hennink W.E. Rheological monitoring of long-term degrading polymer hydrogels // *J. Rheol.* — 1999. — Vol. 43. — 933-950 p.
- 62 Sawhney A.S., Pathak C.P., Hubbell J.A. Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly( $\alpha$ -hydroxy acid) diacrylate macromers // *Macromolecules*. — 1993. — Vol. 26. — 581-587 p.
- 63 Metters A.T., Anseth K.S., Bowman C.N. Fundamental studies of a novel, biodegradable PEG-b-PLA hydrogel // *Polymer*. — 2000. — Vol. 41. — 3993-4004 p.
- 64 West J.L., Hubbell J.A. Photopolymerized hydrogel materials for drug delivery applications // *React. Polym.* — 1995. — Vol. 25. — 139-147 p.
- 65 Hubbell J.A. Hydrogel systems for barriers and local drug delivery in the control of wound healing // *J. Controlled Release*. — 1996. — Vol. 39. — 305-313 p.
- 66 Lu S., Anseth K.S. Release behaviour of high molecular weight solutes from poly(ethylene glycol)-based degradable networks // *Macromolecules*. — 2000. — Vol. 33. — 2509-2515 p.

- 
- 67 Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Tsang S.K.Y., Kettenes-van den Bosch J.J., Hennink W.E. A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacrylated dextran with and without oligolactate spacer // *Polymer*. — 1997. — Vol. 38. — 6235-6242 p.
- 68 Cadée J.A., de Kerf M., de Groot C.J., den Otter W., Hennink W.E. Synthesis and characterization of 2-(methacryloyloxy)ethyl-(di)-L-lactate and their application in dextran-based hydrogels // *Polymer*. — 1999. — Vol. 40. — 6877-6881 p.
- 69 Cadée J.A., Van Luyn M.J.A., Brouwer L.A., Plantinga J.A., Van Wachem P.B., de Groot C.J., Otter W., Hennink W.E. In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2000 — Vol. 50 — 397-404 p.
- 70 Groot C.J., Van Luyn M.J.A., Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Cadée J.A., Plantinga J.A., Otter W., Hennink W.E. In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts // *Biomaterials*. — 2001. — Vol. 22. — 1197-1203 p.
- 71 Cadée J.A., Brouwer L.A., Otter W., Hennink W.E., Van Luyn M.J.A. A comparative biocompatibility study of microspheres based on dextran or poly (lactic-co-glycolic acid) after subcutaneous injection in rats // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2001. — Vol 56. — 600-609 p.
- 72 Cadée J.A., de Groot C.J., Jiskoot W., Otter W., Hennink W. Release of recombinant human interleukin-2 from dextran-based hydrogels // *J. Controlled Release*. — 2001. — Vol. 18. — 1461-1467 p.
- 73 Stenekes R.J.H., Franssen O., Van Bommel E.M.G., Crommelin D.J.A., Hennink W.E. The preparation of dextran microspheres in an all-aqueous system: effect of the formulation parameters on particle characteristics // *Pharm. Res.* — 1998. — Vol. 15. — 557-561 p.

- 
- 74 Franssen O., Van der Vennet L., Roders P., Hennink W.E. Degradable dextran hydrogels: controlled release of a model protein from cylinders and microspheres // *J. Controlled Release*. — 1999. — Vol. 60. — 211-221 p.
- 75 Stenekes R.J.H., Loebis A.E., Fernandes C.M., Crommelin D.J.A., Hennink W.E. Controlled release of liposomes from biodegradable dextran microspheres: A novel delivery concept // *Pharm. Res.* — 2000 — Vol. 17. — 690-695 p.
- 76 Nuttelman C.R., Henry S.M., Anseth K.S. Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds. // *Biomaterials*. — 2002. — Vol. 23. — 3617-3626 p.
- 77 Martens P.J., Bowman C.N., Anseth K.S. Degradable networks formed from multi-functional poly(vinyl alcohol) macromers: comparison of results from a generalized bulk-degradation model for polymer networks and experimental data // *Polymer*. — 2004. — Vol. 45. — 3377-3387 p.
- 78 Zhang Y., Won C.Y., Chu C.C. Synthesis and characterization of biodegradable network hydrogels having both hydrophobic and hydrophilic components with controlled swelling behavior // *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* — 1999. — Vol. 37. — 4554-4569 p.
- 79 Zhang Y., Won C.Y., Chu C.C. Synthesis and characterization of biodegradable hydrophobic-hydrophilic hydrogel networks with a controlled swelling property // *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* — 2000. — Vol. 38. — 2392-2404 p.
- 80 Zhang Y., Chu C.C. Biodegradable dextran-poly(lactide) hydrogel network and its controlled release of albumin // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2000. — Vol. 54 — 1-11 p.
- 81 Peppas N.A., Benner R.E. Proposed method of intracordal injection and gelation of poly(vinyl alcohol) solution in vocal cords: polymer considerations // *Biomaterials*. — 1980. — Vol. 1. — 158-162 p.

- 
- 82 Dai W.S., Barbari T.A. Hydrogel membranes with mesh size asymmetry based on the gradient crosslinking of poly(vinyl alcohol) // *J. Membr. Sci.* — 1999. — Vol. 156. — 67-79 p.
- 83 Willmott N., Kamel H.M.H., Cummings J., Stuart J.F.B., Florence A.T. Adriamycin-loaded albumin microspheres: lung entrapment and fate in the rat. In: *Microspheres and Drug Therapy. Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects* / Davies S.S., Illum L., Vie J.G., Tomlinson E. — Amsterdam: Elsevier, 1984. — 189-205 p.
- 84 Tabata Y., Ikada Y. Synthesis of gelatin microspheres containing interferon // *Pharm. Res.* — 1989. — Vol. 6. — 422-427 p.
- 85 Yamamoto M., Tabata Y., Hong L., Miyamoto S., Hashimoto N., Ikada Y. Bone regeneration by transforming growth factor  $\beta$ 1 released from a biodegradable hydrogel // *J. Controlled Release.* — 2000. — Vol. 64. — 133-142 p.
- 86 Jameela S.R., Jayakrishnan A. Glutaraldehyde crosslinked chitosan as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle // *Biomaterials.* — 1995. — Vol. 16. — 769-775 p.
- 87 Draye J.P., Delaey B., Van der Voorde A., Van den Bulcke A., Bogdanov B., Schacht E. In vitro release characteristics of bioactive molecules from dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films // *Biomaterials.* — 1998. — Vol. 19. — 99-107 p.
- 88 Draye J.P., Delaey B., Van de Voorde A., Van den Bulcke A., de Reu B., Schacht E. In vitro and in vivo biocompatibility of dextran dialdehyde crosslinked gelatin hydrogel films // *Biomaterials.* — 1998. — Vol. 19. — 1677-1687 p.
- 89 . Shafee E. El., Nag H.F. Water sorption in cross-linked poly(vinyl alcohol) networks // *Polymer.* — 2003. — Vol. 44. — 1647-1653 p.

- 
90. Darwis D., Stasica P., Razzak M.T., Rosiak J. M. Characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus // *Radiation Physics and Chemistry*. — 2002. — Vol. 63. — 539–542 p.
91. Ruiz J., Mantecon A., Cadiz V. Synthesis and properties of hydrogels from poly (vinyl alcohol) and ethylenediaminetetraacetic dianhydride // *Polymer*. — 2001. — Vol. 43. — 6347-6354 p.
92. Brondsted H., Hovgaard L., Simonsen L. Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. Comparative release study of hydrocortisone and prednisolone sodium phosphate // *Stp Pharma Sci*. — 1995. — Vol. 5. — 65-69 p.
93. Gehrke H., Uhden L.H., Mc Bride J.F. Enhanced loading and activity retention of bioactive proteins in hydrogel delivery systems // *J. Controlled Release*. — 1998. — Vol. 55 — 21-33 p.
94. Coviello T., Grassi M., Rambone G., Santucci E., Carafa M., Murtas E., Ricciari F.M., Alhaique F. Novel hydrogel system from sceroglycan: synthesis and characterization // *J. Controlled Release*. — 1999. — Vol. 60. — 367-378 p.
95. Elbert D.L., Luthof M.P., Pratt A.B., Halstenberg S., Hubbell J.A. Protein release from PEG hydrogels that are similar to ideal Flory-Rehner Networks // *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater*. — 2001. — Vol. 28. — 987-988 p.
96. De Nooy A.E.J., Masci G., Crescenzi V. Versatile synthesis of polysaccharide hydrogels using the Passerini and Ugi multicomponent condensations // *Macromolecules*. — 1999. — Vol. 32. — 1318–1320 p.
97. De Nooy A.E.J., Capitani D., Masci G., Crescenzi V. Ionic polysaccharide hydrogels via the Passerini and Ugi multicomponent condensations: synthesis, behavior and solid-state NMR characterization // *Biomacromolecules*. — 2000. — Vol. 1. — 259–267 p.

- 
- 98 Ichi T., Watanabe J., Ooya T., Yui N. Controllable erosion time and profile in poly(ethylene glycol) hydrogels by supramolecular structure of hydrolysable polyrotaxane // *Biomacromolecules*. — 2001. — Vol. 2. — 204–210 p.
- 99 Caliceti P., Salmaso S., Lante A., Yoshida M., Katakai R., Martellini F., Mei L.H.I., Carenza M. Controlled release of biomolecules from temperature-sensitive hydrogels prepared by radiation polymerization // *J. Controlled Release*. — 2001. — Vol. 75. — 173–181 p.
- 100 Peppas N.A., Mikos A.G. Preparation methods and structure of hydrogels. In: *Hydrogels in Medicine and Pharmacy / N.A. Peppas* — Florida: CRC Press, Boca Raton, 1986. — Vol. 1. — Chapter 1
- 101 Peppas N.A., Merrill E.W. Hydrogels as swollen elastic networks // *J. Appl. Polym.Sci.* — 1977. — Vol. 21. — 1763–1770 p.
- 102 Kofinas P., Athanasssiou V., Merrill E.W. Hydrogels prepared by electron irradiation of poly(ethylene oxide) in water solution: unexpected dependence of crosslink density and protein diffusion coefficients on initial PEO molecular weight // *Biomaterials*. — 1996. — Vol. 17. — 1547–1550 p.
- 103 Merrill E.W., Dennison K.A., Sung C. Partitioning and diffusion of solutes in hydrogels of poly(ethylene oxide) // *Biomaterials*. — 1993. — Vol. 14. — 1117–1126 p.
- 104 Stringer J.L., Peppas N.A. Diffusion of small molecular weight drugs in radiation-crosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels // *J. Controlled Release*. — 1996. — Vol. 42. — 195–202 p.
- 105 Jabbari E., Nozari S. Swelling behavior of acrylic acid hydrogels prepared by  $\gamma$ -radiation crosslinking of polyacrylic acid in aqueous solution // *Eur. Polym. J.* — 2000. — Vol. 36. — 2685–2692 p.
- 106 Lee J., Macosko C.W., Urry D.W. Swelling behavior of  $\gamma$ -irradiation crosslinked elastomeric polypentapeptide-based hydrogels // *Macromolecules*. — 2001. — Vol. 34. — 4114–4123 p.

- 
- 107 Lee J., Macosko C.W., Urry D.W. Elastomeric polypentapeptides crosslinked into matrices and fibers // *Biomacromolecules*. — 2001. — Vol. 2. — 170–179 p.
  108. Zhai M., Yoshii F., Kume T., Hashim K. Syntheses of PVA/starch grafted hydrogels by irradiation // *Carbohydrate Polymers*. — 2002. — Vol. 50. — 295-303 p.
  109. Yamamoto Y., Tagawa S. Radiolytically prepared poly(vinyl alcohol) hydrogel containing  $\alpha$ -cyclodextrin // *Radiation Physics and Chemistry*. — 2004. — Vol. 69. — 347-349 p.
  - 110 Sperinde J.J., Griffith L.G. Synthesis and characterization of enzymatically-crosslinked-poly(ethylene glycol) hydrogels // *Macromolecules*. — 1997. — Vol. 30. — 5255-5264 p.
  - 111 Sperinde J.J., Griffith L.G. Control and predication of gelation kinetics in enzymatically cross-linked poly(ethylene glycol) hydrogels // *Macromolecules*. — 2000. — Vol. 33. — 5467-5480 p.
  - 112 Westhaus E., Messersmith P.B. Triggered release of calcium from lipid vesicles: a bioinspired strategy for rapid gelation of polysaccharide and protein hydrogels // *Biomaterials*. — 2001. — Vol. 22. — 453-462 p.
  - 113 Gacesa P. Alginates // *Carbohydr. Polym.* — 1998. — Vol. 8 — 161-182 p.
  - 114 Goosen M.F.A., O'Shea G.M., Gharapetian H.M., Chou S., Sun A.M. Optimization of microencapsulation parameters: semipermeable microcapsules as a bioartificial pancreas // *Biotechnol. Bioeng.* — 1985. — Vol. 27. — 146-150 p.
  - 115 Gombotz W.R., Wee S.F. Protein release from alginate matrices // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 1998. — Vol. 31. — 267-285 p.
  - 116 Polk A., Amsden B., de Yao K., Peng T., Goosen M.F.A. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules // *J. Pharm. Sci.* — 1994. — Vol. 83. — 178-185 p.

- 
- 117 Liu L.S., Liu S.Q., Ng S.Y., Froix M., Ohno T., Heller J. Controlled release of inter-leukin-2 for tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous micro-spheres // *J. Controlled Release*. — 1997. — Vol. 43. — 65-74 p.
- 118 Andrianov A.K., Payne L.G., Visscher K.B., Allcock H.R., Langer R. Hydrolytic degradation of ionically crosslinked polyphosphazene microspheres // *J. Appl. Polym. Sci.* — 1994. — Vol. 53. — 1573-1578 p.
- 119 Chenite A., Chaput C., Wang D., Combes C., Buschmann M.D., Hoemann C.D., Leroux J.C., Atkinson B.L., Binette F., Selmani A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ // *Biomaterials*. — 2000. — Vol. 21. — 2155-2161 p.
- 120 Hossain K.S., Miyanaga K., Maeda H., Nemoto N. Sol-gel transition behavior of pure ι-carrageenan in both salt-free and added salt states // *Biomacromolecules*. — 2001. — Vol. 2. — 442-449 p.
- 121 Janes K.A., Fresneau M.P., Marazuela A., Fabra A., Alonso M.J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin // *J. Controlled Release*. — 2001. — Vol. 73. — 255-267 p.
- 122 Yokoyama F., Masada I., Shimamura K., Ikawa T., Monobe K. Morphology and structure of highly elastic poly-(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting // *Colloid Polym. Sci.* — 1996. — Vol. 264. — 595-601 p.
- 123 Hassan C.M., Peppas N.A. Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels // *Macromolecules*. — 2000. — Vol. 33. — 2472-2479 p.
- 124 Peppas N.A., Scott J.E. Controlled release from poly(vinyl alcohol) gels prepared by freeze-thawing processes // *J. Controlled Release*. — 1992. — Vol. 18. — 95-100 p.
- 125 Takamura A., Ishii F., Hidaka H. Drug release from poly(vinyl alcohol) gel prepared by freeze-thaw procedure // *J. Controlled Release*. — 1992. — Vol. 20. — 21-27 p.

- 
- 126 Lim D.W., Choi S.H., Park T.G. A new class of biodegradable hydrogels stereocomplexed by enantiomeric oligo(lactide) side chains of poly(HEMA-g-OLA)s // *Macromol. Rapid Commun.* — 2000. — Vol. 21. — 464-471 p.
- 127 Ikada Y., Jamshidi K., Tsuji H., Hyon S.-H. Stereocomplex formation between en-antiomeric poly(lactides) // *Macromolecules.* — 1987. — Vol. 20. — 904-906 p.
- 128 Lim D.W., Park T.G. Stereocomplex formation between enantiomeric PLA-PEG-PLA triblock copolymers: characterization and use as protein delivery microparticulate carriers // *J. Appl. Polym. Sci.* — 2000. — Vol. 75. — 1615-1623 p.
- 129 De Jong S.J., Van Dijk-Wolthuis W.N.E., Kettenes-Van den Bosch J.J., Schuyl P.J.W., Hennink W.E. Monodisperse enantiomeric lactic acid oligomers: preparation, characterization and stereocomplex formation // *Macromolecules.* — 1998. — Vol. 31. — 6397-6402 p.
- 130 De Jong S.J., De Smedt S.C., Wahls M.W.C, Demeester J., Kettenes-van den Bosch J.J., Hennink W.E. Novel self-assembled hydrogels by stereocomplex formation in aqueous solution of enantiomeric lactic acid oligomers grafted to dextran // *Macromolecules.* — 2000. — Vol. 33. — 3680-3686 p.
- 131 De Jong S.J., De Smedt S.C., Demeester J., Van Nostrum C.F., Kettenes-Van den Bosch J.J., Hennink W.E. Biodegradable hydrogels based on stereocomplex formation between lactic acid oligomers grafted to dextran // *J. Controlled Release.* — 2001. — Vol. 72. — 47-56 p.
- 132 De Jong S.J., Van Eerdenbrugh B., Van Nostrum C.F., Kettenes-Van den Bosch J.J., Hennink W.E. Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior // *J. Controlled Release.* — 2001. — Vol. 71. — 261-275 p.
- 133 Forster S., Antonietti M. Amphiphilic block copolymers in structure-controlled nanomaterial hybrids // *Adv. Mater.* — 1998. — Vol. 10. — 195-217 p.

- 
- 134 Lee D.S., Jeong B., Bae Y.H., Kim S.W. New thermoreversible and biodegradable block copolymer hydrogels // Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater. — 1996 — Vol. 23. — 228-229 p.
- 135 Jeong B., Bae Y.H., Kim S.W. Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions // Macromolecules. — 1999. — Vol. 32. — 7064-7069 p.
- 136 Jeong B., Lee D.S., Shon J.-I., Bae Y.H., Kim S.W. Thermoreversible gelation of poly(ethylene oxide) biodegradable polyester block copolymers // J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem. — 1999. — Vol. 37. — 751-760 p.
- 137 Rashkov I., Manolova N., Li S., Espartero J., Vert M. Synthesis, characterization and hydrolytic degradation of PLA/PEO/PLA triblock copolymers with short poly(L-lactic acid) chains // Macromolecules. — 1996. — Vol. 29. — 50-56 p.
- 138 Li S., Rashkov I., Espartero J., Manolova N., Vert M. Synthesis, characterization and hydrolytic degradation of PLA/PEO/PLA triblock copolymers with long poly(L-lactic acid) blocks // Macromolecules. — 1996. — Vol. 29. — 57-62 p.
- 139 Hu D.S.G., Liu H.J. Structural analysis and degradation behavior in polyethylene glycol/poly(L-lactide) copolymers // J. Appl. Polym. Sci. — 1994. — Vol. 51. — 473-482 p.
- 140 Kricheldorf H., Meier-Haack J. Polylactones 22. ABA triblock copolymers of L-lactide and poly(ethylene glycol) // Makromol. Chem. — 1993. — Vol. 194. — 715-725 p.
- 141 Li Y., Kissel T. Synthesis and properties of biodegradable ABA triblock copolymers consisting of poly(L-lactic acid) or poly(L-lactic-co-glycolic acid) A-blocks attached to central poly(oxyethylene) B-blocks // J. Controlled Release. — 1993. — Vol. 23. — 247-257 p.

- 
- 142 Molina I., Li S., Martinez M.B., Vert M. Protein release from physically crosslinked hydrogels of the PLA/PEO/PLA triblock copolymer-type // *Biomaterials*. — 2001. — Vol. 22. — 363-369 p.
- 143 Witt C., Mäder K., Kissel T. The degradation, swelling and erosion properties of biodegradable implants prepared by extrusion or compression moulding of poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers // *Biomaterials*. — 2000. — Vol. 21. — 931-938 p.
- 144 Witt C., Kissel T. Morphological characterization of microspheres, films and implants prepared from poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: is the erosion controlled by degradation, swelling or diffusion // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* — 2001. — Vol. 51. — 171-181 p.
- 145 Pistel K., Bittner B., Koll H., Winter G., Kissel T. Biodegradable recombinant human erythropoietin loaded microspheres prepared from linear and star-branched block copolymers: influence of encapsulation technique and polymer composition on particle characteristics // *J. Controlled Release*. — 1999. — Vol. 59. — 309-325 p.
- 146 Bittner B., Witt C., Mader K., Kissel T. Degradation and protein release properties of microspheres prepared by biodegradable poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: influence of buffer media on polymer erosion and bovine serum albumin release // *J. Controlled Release*. — 1999. — Vol. 60. — 297-309 p.
- 147 Li Y., Volland C., Kissel T. In vitro degradation and bovine serum albumin release of the ABA triblock copolymers consisting of poly(L(+)) lactic acid or poly(L(+)) lactic acid-co-glycolic acid) A-blocks attached to central polyoxyethylene B-blocks // *J. Controlled Release*. — 1994. — Vol. 32. — 121-128 p.
- 148 Huh K.M., Bae Y.H. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)/poly(L-lactic acid) alternating multiblock copolymers // *Polymer*. — 1999. — Vol 40. — 6147-6155 p.

- 
- 149 Bae Y.H., Huh K.M., Kim Y., Park K.H. Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications // *J. Controlled Release*. — 2000. — Vol. 64. — 3-13 p.
- 150 Jeong B., Kibbey M.R., Birnbaum J.C., Won Y.Y., Gutowska A. Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA // *Macromolecules*. — 2000. — Vol. 33. — 8317-8322 p.
- 151 Bezemer J.M., Grijpma D.W., Dijkstra P.J., Van Blitterswijk C.A., Feijen J. A controlled release system for proteins based on poly(ether ester) block-copolymers: polymer network characterization // *J. Controlled Release*. — 1999. — Vol. 62. — 393-405 p.
- 152 Bezemer J.M., Radersma R., Grijpma D.W., Dijkstra P.J., Feijen J., Van Blitterswijk C.A. Zero-order release of lysozyme from poly(ethylene glycol)/poly(butylene tere-phthalate) matrices // *J. Controlled Release*. — 2000. — Vol. 64. — 179-192 p.
- 153 Bezemer J.M., Grijpma D.W., Dijkstra P.J., Blitterswijk C.A., Feijen J. Control of protein delivery from amphiphilic poly(ether ester) multiblock copolymers by varying their water content using emulsification techniques // *J. Controlled Release*. — 2000. — Vol. 66. — 307-320 p.
- 154 Bezemer J.M., Radersma R., Grijpma D.W., Van Blitterswijk C.A., Feijen J. Micro-spheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers. Influence of preparation techniques on particle characteristics and protein delivery // *J. Controlled Release*. — 2000. — Vol.67. — 233-248 p.
- 155 Bezemer J.M., Radersma R., Grijpma D.W., Van Blitterswijk C.A., Feijen J. Micro-spheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers. Modulation of release rate // *J. Controlled Release*. — 2000. — Vol.67. — 249-260.
- 156 Akiyoshi K., Deguchi S., Moriguchi N., Yamaguchi S., Sunamoto J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water — formation and

- 
- characteristics of nanoparticles // *Macromolecules*. — 1993. — Vol. 26. — 3062-3068 p.
- 157 Akiyoshi K., Deguchi S., Tajima H., Nishikawa T., Sunamoto J. Microscopic structure and thermoresponsiveness of a hydrogel nanoparticle by self-assembly of a hydrophobized polysaccharide // *Macromolecules*. — 1997. — Vol. 30. — 857-861 p.
- 158 Akiyoshi K., Taniguchi I., Fukui H., Sunamoto J. Hydrogel nanoparticle formed by self-assembly of hydrophobized polysaccharide. Stabilization of adriamycin by complexation // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* — 1996. — Vol. 42. — 286-290 p.
- 159 Akiyoshi K., Kobayashi S., Shichibe S., Mix D., Baudys M., Kim S.W., Sunamoto J. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin // *J. Controlled Release*. — 1998. — Vol. 54 (1998) 313-320.
- 160 Akiyoshi K., Deguchi S., Tajima H., Nishikawa T., Sunamoto J. Microscopic structure and thermoresponsiveness of a hydrogel nanoparticle by self-assembly of a hydrophobized polysaccharide // *Macromolecules*. — 1997. — Vol. 30. — 857-861 p.
- 161 Taniguchi I., Akiyoshi K., Sunamoto J. Self-aggregate nanoparticles of cholesteryl and galactoside groups-substituted pullulan and their specific binding to galactose specific lectin, RCA120 // *Macromol. Chem. Phys.* — 1999. — Vol. 200. — 1555-1560 p.
- 162 Akiyoshi K., Kang E.-C., Kurumada S., Sunamoto J. Controlled association of amphiphilic polymers in water: thermosensitive nanoparticles formed by self-assembly of hydrophobically modified pullulans and poly(N-isopropylacrylamides) // *Macromolecules*. — 2000. — Vol. 33. — 3244-3249 p.
- 163 Na K., Park K.H., Kim S.W., Bae Y.H. Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug

- 
- release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2) // *J. Controlled Release*. — 2000. — Vol. 69. — 225-236 p.
- 164 Uchegbu I.F., Schatzlein A.G., Tetley L., Gray A.I., Sludden J., Siddique S., Mosha E., Polymeric chitosan-based vesicles for drug delivery // *J. Pharm. Pharmacol.* — 1998. — Vol. 50. — 453-458 p.
- 165 Sludden J., Uchegbu I.F., Schatzlein A.G. The encapsulation of bleomycin within chitosan based polymeric vesicles does not alter its biodistribution // *J. Pharm. Pharmacol.* — 2000. — Vol. 52. — 377-382 p.
- 166 Noble L., Gray A.I., Sadiq L., Uchegbu I.F. A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel // *Int. J. Pharm.* — 1999. — Vol. 192. — 173-182 p.
- 167 Qu X., Wirsén A., Albertsson A.C. Structural change and swelling mechanism of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid // *J. Appl. Polym. Sci.* — 1999. — Vol. 74. — 3186-3192 p.
- 168 Qu X., Wirsén A., Albertsson A.C. Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water // *Polymer* . — 2000. — Vol. 41. — 4589-4598 p.
- 169 Yazdani-Pedram M., Retuert J., Quijada R. Hydrogels based on modified chitosan, 1 — Synthesis and swelling behavior of poly(acrylic acid) grafted chitosan, *Macromol. Chem. Phys.* — 2000. — Vol. 201. — 923-930 p.
- 170 Kim S.Y., Cho S.M., Lee Y.M., Kim S.J. Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide // *J. Appl. Polym. Sci.* — 2000. — Vol. 78. — 1381-1391 p.
- 171 Huh K.M., Hashi J., Ooya T., Yui N. Synthesis and characterization of dextran grafted with poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide) // *Macromol. Chem. Phys.* — 2000. — Vol. 201 — 613-619 p.
- 172 Kurian P., Zschoche S., Kennedy J.P. Synthesis and characterization of novel amphiphilic block copolymers di-, tri-, multi-, and star blocks of PEG and

- 
- PIB // *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* — 2000. — Vol. 38. — 3200-3209 p.
- 173 Cho C.-S., Jeong Y.-I., Kim S.-H., Nah J.-W., Kubota M., Komoto T. Thermoplastic hydrogel based on hexablock copolymer composed of poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate) and poly(ethylene oxide) // *Polymer.* — 2000. — Vol. 41. — 5185-5193 p.
- 174 S.C. Lee, C Kim, I.C Kwon, Y.H. Kim, Thermosensitive hydrogels based on poly(2-ethyl-2-oxazoline)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) multiblock copolymers, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.* — 1998. — Vol. 25. — 717-718 p.
- 175 Lin H.H., Cheng Y.L. In-situ thermoreversible gelation of block and star copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide) of varying architectures // *Macromolecules.* — 2001. — Vol. 34. — 3710-3715 p.
- 176 Matyjaszewski K., Beers K.L., Kern A, Gaynor S.G. Hydrogels by atom transfer radical polymerization. I. Poly (N-vinylpyrrolidinone-g-styrene) via the macromonomer method // *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* — 1998. — Vol. 36. — 823-830 p.
- 177 Ming W., Zhao Y., Cui J., Fu S., Jones F.N. Formation of irreversible nearly transparent physical polymeric hydrogels during a modified microemulsion polymerization, *Macromolecules.* — 1999. — Vol. 32. — 528-530 p.
- 178 Eagland D., Crowther N.J., Butler C.J. Complexation between polyoxyethylene and polymethacrylic acid — The importance of the molar mass of polyethylene, *Eur. Polym. J.* — 1994. — Vol. 30. — 767-773 p.
- 179 Bell C.L., Peppas N.A. Modulation of drug permeation through interpolymer complexed hydrogels for drug delivery applications // *J. Controlled Release.* — 1996. — Vol. 39. — 201-207 p.

- 
- 180 Mathur A.M., Hammonds K.F., Klier J., Scanton A.B. Equilibrium swelling of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels // *J. Controlled Release*. — 1998. — Vol. 54. — 177-184 p.
- 181 Haglund B.O., Joshi R., Himmelstein K.J. An in situ gelling system for parenteral delivery // *J. Controlled Release*. — 1996. — Vol. 41. — 229-235 p.
- 182 Nagahara S., Matsuda T. Hydrogel formation via hybridization of oligonucleotides derivatized in water-soluble vinyl polymers // *Polym. Gels Networks*. — 1996. — Vol. 4. — 111-127.
- 183 K.P. McGrath, M.J. Fournier, T.L. Mason, D.A. Tirrell, Genetically directed syntheses of new polymeric materials — expression of artificial genes encoding proteins with repeating (AlaGly)<sub>3</sub>ProGluGly elements // *J. Am Chem. Soc.* — 1992. — Vol. 114. — 727-733 p.
- 184 Cappello J., Crissman J., Dorman M., Mikolajczak M., Textor G., Marquet M., Ferrari F. Genetic-engineering of structural protein polymers // *Biotechnol. Prog.* — 1990. — Vol. 6. — 198-202 p.
- 185 Yoshikawa E., Fournier M.J., Mason T., Tirrell D.A. Genetically engineered fluoropolymers. Synthesis of repetitive polypeptides containing p-fluorophenylalanine residues // *Macromolecules*. — 1994. — Vol. 27. — 5471-5475 p.
- 186 Cappello J., Crissman J.W., Crissman M., Ferrari F.A., Textor G., Wallis O., Whitley J.R., Zhou X., Burman D., Aukerman L., Stedronsky E.R. In-situ self-assembling protein polymer gel systems for administration, delivery, and release of drugs // *J. Controlled Release*. — 1998. — Vol. 53. — 105-117 p.
- 187 Petka W., Harden J., McGrath K., Wirtz D., Tirrell D.A. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins // *Science*. — 1998. — Vol. 281. — 389-392 p.

- 
- 188 Wang C., Stewart R.J., Kopecek J. Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains // *Nature*. — 1999. — Vol. 397. — 417-420 p.
- 189 Tang A., Wang C., Stewart R.J., Kopecek J. The coiled coils in the design of protein-based constructs: hybrid hydrogels and epitope displays // *J. Controlled Release*. — 2001. — Vol. 72. — 57-70 p.
- 190 Chen L., Kopecek J., Stewart R.J. Responsive hybrid hydrogels with volume transitions modulated by a titin immunoglobulin module // *Bioconjug. Chem.* — Vol. 11. — 734-740 p.
- 191 Miyata T., Asami N., Uragami T. Preparation of an antigen-sensitive hydrogel using antigen-antibody bindings // *Macromolecules*. — 1999. — Vol. 32. — 2082-2084 p.
- 192 Miyata T., Asami N., Uragami T. A reversibly antigen-responsive hydrogel // *Nature*. — 1999. — Vol. 399. — 766-769 p.
193. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения // *Успехи химии*. — 2002. — Т. 71, № 6. — 559-585 с.
194. Рихтер М., Аугустат З., Ширбаум Ф. Избранные методы исследования крахмала: перевод с немецкого (под ред. Н. П. Козьмной и В. С. Грюнера). — М.: Пищевая промышленность, 1975. — 183 с.
195. Lozinsky V. I., Vainerman E. S., Rogozhin S. V. Study of cryostructurization of polymer systems. II. The influence of freezing of a reacting mass on the properties of products in the preparation of covalently cross-linked gels // *Colloid and Polymer Science*. — 1982. — Vol. 260, № 8. — 776-780 p.
196. Hsieh C.Y., Tsai S.P., Ho M.H., D.M. Wang, Liu C.E., Hsieh C.H., R-C. Tseng, H.-J. Hsieh. Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds // *Carbohydrate Polymers*. — 2007. — Vol. 67, № 1. — 124-132 p.

- 
197. Noppe W., Plieva F. M., Vanhoorelbeke K., Deckmyn H., Tuncel M., Tuncel A., Galaev I.Yu., Mattiasson B. Macroporous monolithic gels, cryogels, with immobilized phages from phage-display library as a new platform for fast development of affinity adsorbent capable of target capture from crude feeds // *Journal of Biotechnology*. — 2007. — Vol. 131, № 3. — 293-299 p.
198. Damshkaln L.G., Simenel L.A., Lozinsky V.I. Study of cryostructurization of polymer systems. XV. Study of cryostructuration of polymer systems. XV. Freeze-Thaw-induced formation of cryoprecipitate matter from low-concentrated aqueous solutions of poly(vinyl alcohol) // *Journal of Applied Polymer Science*. — 1999. — Vol. 74, № 8. — 1978-1986 p.
199. Сергеев Г.Б., Батюк В.А. Криохимия. — М.: Химия, 1978. — 296 с.
200. Сергеев Г.Б., Батюк В. А. Реакции в многокомпонентных замороженных системах // *Успехи химии*. — 1976. — Т. 45, № 5. — 793-826 с.
201. Konstantinova N.R., Lozinsky V.I. Cryotropic gelation of ovalbumin solutions // *Food Hydrocolloids*. — 1997. — Vol. 11, № 2. — 113-123 p.
202. Lozinsky V.I., Golovina T.O., Gusev D.G. Study of cryostructuration of polymer systems: XIII. Some characteristic features of the behaviour of macromolecular thiols in frozen aqueous solutions // *Polymer*. — 2000. — Vol. 4. — 35-47 p.
203. Лозинский В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения // *Успехи химии*. — 2002. — Т. 71, № 6. — 559-585 с.
204. 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
205. 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
- 206 Rosiak J.M., Ulanski P. Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution // Radiation Physics and Chemistry. — 1999. — Vol. 55. — 139-151 p.
- 207 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.
- 208 Ожиганов В.В. Структурно-кинетические аспекты формирования густосетчатых макромолекулярных структур в присутствии полимеров разветвленного строения: автореф. дис... канд. хим. наук: 02.00.06/ Ожиганов Виктор Викторович. — М., 2010. — 26 с.
- 209 Семчиков Ю.Д. Высокомолекулярные соединения. — Н. Новгород: Изд-во Нижегородского государственного университета имени Н.И. Лобачевского, 2003. — 367 с.
- 210 Тагер А.А. Физико-химия полимеров. — М.: Научный мир, 2007. — 576 с.
- 211 . Нестеров А.Е. Справочник по физической химии полимеров в трех томах. Т 1. Свойства растворов и смесей полимеров. — Киев: Наукова Думка, 1984. — 374 с.
- 212 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.
- 213 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
- 214 Obukhov S. P., Rubinstein M., Colby R. H. Network modulus and superelasticity // *Macromolecules*. — 1994. — Vol. 27, № 12. — 3191–3198 p.
- 215 James H. M., Guth E. Simple presentation of network theory of rubber, with a discussion of other theories // *J. Polym. Sci.* — 1949. — Vol. 4, № 2 — 153–182 p.
- 216 Katchalsky A., Michaely I. Polyelectrolyte gels in salt solutions // *J. Polym. Sci.* — 1955. — Vol. 15, № 79. — 69–86 p.
- 217 Wall F. T., Flory P. J. Statistical thermodynamics of rubber elasticity // *J. Chem. Phys.* — 1951. — Vol. 19, № 12. — 1435–1439 p.
- 218 James, H. M. Statistical properties of networks of flexible chains // *J. Chem. Phys.* — 1947. — Vol. 15, № 9. — 651–668 p.
- 219 Дубровский С. А., Харитонов Л. А. Упругость гидрогелей, получаемых фотополимеризацией макромономеров полиэтиленоксида // *Высокомолек. соед., А.* — 2004. — Т. 46, № 9. — 1505–1510 с.
- 220 Дубровский С.А. Набухание и упругость слабосшитых полимерных гидрогелей: дис... д-ра физ.-мат. наук: 02.00.06 / Дубровский Сергей Александрович. — М., 2008. — 408 с.
- 221 Geissler E., Hecht A.-M., Horkay F., Zrinyi M. Congressional modulus of swollen polyacrylamide networks // *Macromolecules*. — 1988. — Vol. 21, № 8 — 2594-2599 p.
- 222 Muta H., Miwa M., Satoh M. Ion-specific swelling of hydrophilic polymer gels // *Polymer*. — 2001. — Vol. 42. — 6313-6316 p.
- 223 Де Жен П. Концепция скейлинга в физике полимеров. — М.: Мир, 1982. — 448 с.

- 
- 224 Baker J. P., Le H. Hong, Blanch H. W., Prausnitz J. M. Effect of initial total monomer concentration on the swelling behavior of cationic acrylamide-based hydrogels // *Macromolecules*. — 1994. — Vol. 27. — 1446-1454 p.
- 225 Берлин Ал.Ал., Вольфсон С.А., Ениколопян Н.С. Кинетика полимеризационных процессов. — М.: Химия, 1978. — 320 с.
- 226 James, H. M. Statistical properties of networks of flexible chains // *J. Chem. Phys.* — 1947. — Vol. 15, № 9. — 651–668 p.
- 227 Де Жен П. Концепция скейлинга в физике полимеров. — М.: Мир, 1982. — 448 с.
- 228 McKenna G. B., Horkay F., Effect of crosslinks on the thermodynamics of poly(vinyl alcohol) hydrogels // *Polymer*. — 1994. — Vol. 26, № 35. — 5737-5742 p.
- 229 Martens P., Blundo J., Nilasaroya A, Odell R A., Cooper-White J., Poole-Warren L. A. Effect of Poly(vinyl alcohol) Macromer Chemistry and Chain Interactions on Hydrogel Mechanical Properties // *Chem. Mater.* — 2007. — Vol. 19. — 2641-2648 p.
- 230 P. Martens, K.S. Anseth, Characterization of hydrogels formed from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers // *Polymer*. — 2000. — Vol. 41. — 7715-7722 p.
- 231 Ковалева С.С., Струсовская Н.Л., Ферапонтов Н.Б. Особенности поведения сшитого поливинилового спирта в водных растворах низкомолекулярных электролитов // Сорбционные и хроматографические процессы. — 2006. — Т. 6, Вып.2. — 198-210 с.
- 232 Peppas N.A., Merrill E.W. Determination of interaction parameter  $\chi$  for poly(vinyl alcohol) and water in gels crosslinked from solutions // *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* — 1976. — Vol. 14. — 459-464 p.
- 233 Paradossi G., Cavalieri F., Capitani D., Crescenzi V. Physicochemical Characterization of Chemical Hydrogels Based on PVA // *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.* — 1999. — Vol. 37. — 1225-1233 p.

- 
- 234 Shapiro L., Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation // *Biomaterials*. — 1997. — Vol. 18. — 583-593 p.
- 235 Chen J., Park P., Park K. Synthesis of superporous hydrogel: Hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties // *Biomed. Mater. Res.* — 1999. — Vol. 44. — 53-62 p.
- 236 Chen J, Blevins W.E, Park H, Park K. Gastric retention properties of superporous hydrogel composites // *J Controlled Rel.* — 2000. — Vol.64. — 39-51 p.
- 237 Horak D., Lednický F., Bleha M. Effect of inert components on the porous structure of 2-hydroxyethyl methacrylate–ethylene dimethacrylate copolymers // *Polymer*. — 1996. — Vol. 37. — 4243–4249 p
- 238 Liu Q, Hedberg E.L., Liu Z., Bahulekar R., Meszlenyi R.K., Mikos A.G. Preparation of macroporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels by enhanced phase separation // *Biomaterials*. — 2000. — Vol. 21. — 2163-2169 p.
- 239 Lozinsky V.I., Plieva F.M., Galaev I.Yu. The potential of polymeric cryogels in bioseparation // *Bioseparation*. — 2001. — Vol. 10. — 163-188 p.
- 240 Oxley H.R, Corkhill P.H., Fitton J.H., Tighe B.J. Macroporous hydrogels for biomedical applications: methodology and morphology // *Biomaterials*. — 1996. — Vol.14. — 1064–1072 p.
- 241 Přadný M., Lesný P., Fiala J., Vacík J., Šlof M., Michálek J., Sukova E. Macroporous hydrogel based on 2-hydroxyethylmethacrylate. Part 1. Copolymers of 2-hydroxyethylmethacrylate with methacrylic acid // *Collect. Czech.Comm.* — 2003. — Vol. 68. — 812-822 p.
- 242 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.

- 
- 243 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.
- 244 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.
- 245 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 аминогруппы // *Пластические массы*. — 2010. — № 4. — 15-21 с.
- 246 Artyukhov A.A., Shtilman M.I. Kuskov A.N. Fomina A.P., Lisovyuy 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.
- [247] 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.
- 248 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.
- 249 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.

- 
- 250 Lozinsky V.I. A brief history of polymeric cryogel // *Advances in Polymer Science*. — 2014. — V. 263. — 24-38 p.
- 251 Штильман М.И., Артюхов А.А., Чалых А.Е., Семенчук О.В., Тсатсакис А.М. Криогели ионогенных мономеров // *Пластические массы*. — 2006. — №3. — 21-25 с.
252. Ferry P.W. Melchels, Ana M.C. Barradas, Clemens A. van Blitterswijk, Jan de Boer, Jan Feijen, Dirk W. Grijpma Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing // *Acta Biomaterialia*. — 2010. — Vol. 6, № 11. — 4208–4217 p.
- 253 Murphy C.M., Haugh M.G., O'Brien F.J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering // *Biomaterials*. — 2010. — Vol. 31. — 461–466 p.
- 254 Козлов В.С. Эпоксидсодержащие криогели 2-гидроксиэтилметакрилата : дис. ... канд. хим. наук: 02.00.06 / Козлов Василий Сергеевич. — М.: РХТУ, 2003. — 136 с.
- 255 Чалых А.Е., Штильман М.И., Артюхов А.А. Строение пористых гидрогелей // *Структура полимеров*. — 2004. — 35-41 с.
- 256 Чалых А.Е., Штильман М.И., Артюхов А.А. Упругие свойства криогелей поливинилового спирта // *Структура полимеров*. — 2004. — 42-46 с.
- 257 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 XXVI, № 1 (130) — 88-93 с.
- 258 Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 3. Hydrogels as carriers for immobilization of proteins. Michálek J., Přadný M.,

- 
- Artyukhov A., Šlouf M., Smetana K. // Journal of Materials Science: Material in Medicine. — 2005. — Vol. 16, № 8. — 783-786 p.
259. Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers / Andrade J. D. — New York: Plenum Press, 1985, Vol. 2 — 347 p.
- 260 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
- 261 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
- 262 Kuskov A.N., Voskresenskaya A.A., Goryachaya A.V., Artyukhov A.A., Shtilman M.I., Tsatsakis A.M. Preparation and characterization of amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidone nanoparticles containing indomethacin // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. — 2010. — Vol. 21. № 5. — 1521-1530 p.
- 263 Ланина С.Я., Сусллова В.Ю., Беняев Н.Е. Токсикологическая и биологическая безопасность медицинских изделий // Медицинские технологии. — 2011. — №4. — 31-35 с.
- 264 Ланина С.Я. Санитарно-химические исследования как обязательный этап в оценке безопасности полимерных материалов и изделий для медицины // 1-я Международная научно-практическая конференция «Современные полимерные материалы в медицине и медицинской технике». — С.-Петербург, 2005. — 216-221 с.
- 265 Лаппо В.Г., Ланина С.Я., Тимохина В.И. Токсиколого-гигиенический контроль полимеров и изделий медицинского назначения // Ж.

- 
- Всесоюзного химического общества им. Д.И.Менделеева. — 1985. — Т. XXX, № 4. — 461-465 с.
- 266 Предельно допустимые количества химических веществ, выделяющихся из материалов, контактирующих с пищевыми продуктами. Гигиенические нормативы. ГН 2.3.3.972-00. МЗ РФ. — М., 2000. — 16-25 с.
- 267 Ланина С. Я., Ивлев Л. Я., Вдовина З. Н. Методологические и методические вопросы гигиены и токсикологии полимерных материалов и изделий медицинского назначения. Научный обзор. — М., 1982. — 61-86 с.
- 268 ГОСТ Р ИСО 10993.12-99 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 12. Приготовление проб и стандартные образцы. — М.: ИПК Издательство стандартов, 2000. — 16 с.
- 269 ГОСТ Р 50855-96 Контейнеры для крови и ее компонентов. Требования химической и биологической безопасности и методы испытаний. — М.: ИПК Издательство стандартов, 1996. — 46 с.
- 270 Стандарты серии ГОСТ Р ИСО 10993 «Оценка биологического действия медицинских изделий: Ч.9. Основные принципы идентификации и количественного определения потенциальных продуктов деструкции.
- 271 Ермаченко Л.А. Атомно-абсорбционный анализ в санитарно-гигиенических исследованиях / Л.Г. Подунова. — М.: Чувашия, 1997. — 208 с.
- 272 ГОСТ Р ИСО 10993-4-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4. Исследование изделий, взаимодействующих с кровью. — М.: Стандартиформ, 2010. — 32 с.
- 273 ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование

- 
- на цитотоксичность: методы «in vitro». — М.: Стандартиформ, 2010. — 16 с.
- 274 ГОСТ Р ИСО 10993-10-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследование раздражающего и сенсибилизирующего действия. — М.: Стандартиформ, 2010. — 42 с.
- 275 ГОСТ Р ИСО 10993-11-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия. — М.: Стандартиформ, 2009. — 27 с.
- 276 Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. — М.: Медицина. - 2000. — 544 с.
- 277 ГОСТ Р ИСО 10993-3-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 3. Исследование генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию — М.: Стандартиформ, 2009. — 20 с.
- 278 Altankov G., Richau K., Groth Th. The role of surface zeta potential and substratum chemistry for regulations of dermal Fibroblast interaction // *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. — 2003. — Vol 34, № 12.— 1120—1128 p.
- 279 Lee J.H., Jung H.W., Kang I.-K., Lee H.B. Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups // *Biomaterials*. — 1994. — Vol. 15. — 705—711 p.
- 280 Chen H., Huang J., Yu J., Liu S., Gu P. Electrospun chitosan-graft-poly ( $\epsilon$ -caprolactone)/poly ( $\epsilon$ -caprolactone) cationic nanofibrous mats as potential scaffolds for skin tissue engineering // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2011. — Vol. 48. — 13—19 p.
- 281 J.H. Lee, J.W. Lee, G. Khang, H.B. Lee. Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces // *Biomaterials*. — 1997. — Vol. 18. — 351—358 p.

- 
- 282 Kishida A., Iwata H., Tamada Y., Ikada Y. Cell behaviour on polymer surfaces grafted with non-ionic and ionic monomers, *Biomaterials*. — 1991. — Vol. 12. — 786–792 p.
- 283 Sugimoto Y. Effect on the adhesion and locomotion of mouse fibroblasts by their interacting with differently charged substrates. A quantitative study by ultrastructural method // *Exp. Cell Res.* — 1981. — Vol. 135, №1. — 39-45 p.
- 284 K. Smetana, J. Vacik, D. Souckova, Z. Krcova, J. Sulc, The influence of hydrogel functional groups on cell behavior // *J. Biomed. Mater. Res.* — 1990. — Vol. 24. — 463–470 p.
- 285 Lydon M.J., Clay C.S. Substratum topography and cell traction on sulphuric acid treated bacteriological-grade plastic // *Cell Biol. Int. Rep.* — 1985. — Vol. 9. — 911–921 p.
- 286 N.G. Maroudas. Adhesion and spreading of cells on charged surfaces // *J. Theor. Biol.* — 1975. — Vol. 49. — 417–424 p.
- 287 Bratosin D., Mitrofan L., Palii C., Estaquier J., Montreuil J. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging // *Cytom. Part A.* — 2005. — Vol. 66. — 78–84 p.
- 288 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.
- 289 Lamke L.O., Nilsson G.E., Reithner H.L. The evaporative water loss from burns and the water permeability of grafts and artificial membranes used in the treatment of burns // *Burns.* — 1977. — Vol. 3. — 159–165 p.
- 290 Wu P., Fisher A.C., Foo P.P., Queen D., Gaylor J.D. In vitro assessment of water vapour transmission of synthetic wound dressings // *Biomaterials.* — 1995. — Vol. 16. — 171–175 p.

- 
- 291 Басинский С.Н. Способ адресной доставки лекарственных препаратов в лечении дистрофических состояний глаз // Клиническая офтальмология. — 2004. — Т. 5, №1. — 5-7 с.
- 292 Del Amo E.M., Urtii A. Current and future ophthalmic drug delivery systems // Drug Discov. Today. — 2008. — Vol. 13, № 3-4. — 135-143 p.
- 293 Eljarrat-Binstock E., Raiskup F., Frucht-Pery J. et al. Transcorneal and transscleral iontophoresis of dexamethasone phosphate using drug loaded hydrogel // J. Control Release. — 2005. — Vol. 106, N3. — P. 386-390
- 294 Olsen T.W., Feng X., Wabner K. et al. Cannulation of the suprachoroidal space: a novel drug delivery methodology to the posterior segment//Am. J. Ophthalmol. — 2006.—Vol. 142, № 5.— 777-787 p.
- 295 Mohammad D.A., Sweet B.V., Elner S.G. Retisert: Is the New Advance in Treatment of Uveitis a Good One? //The Annals of Pharmacotherapy. — 2007. — Vol. 41, №3. — 449-454 p.
- 296 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.
- 297 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.
- 298 Mittl R.N., Tiwari R. Suprachoroidal injection of sodium hyaluronate as an «internal» buckling procedure // Ophthalmic. Res. —1987. — Vol.19. — 255-260 p.

- 
- 299 Poole T.A., Sudarsky R.D. Suprachoroidal implantation for the treatment of retinal detachment// *Ophthalmology*. — 1986. — Vol.93. — 1408-1412 p.
- 300 Nussenblatt R.B., Palestine A.G., Chan C.C. Cyclosporine therapy for uveitis: long—term followup // *J. Ocul. Pharmacol.* 1985. — Vol. 1, № 4. — 369 – 382 p.
- 301 Шамшинова А.М., Волков В.В. Функциональные методы исследования в офтальмологии. — М.: Медицина, 1999. — 416 с.
- 302 Сидорук А.А., Чудных С.М., Кулезнева Ю.В., Штильман М.И., Артюхов А.А., Королюк Г.М., Николин О.П. Новые малоинвазивные методы лечения острого холецистита // *Хирург*. — 2014. — № 10. — 55-68 с.
- 303 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
- 304 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. — 66-75 с.
- 305 Hrouz J., Plavsky M., Navlicek I., Dusek K. Comparison of the penetration, tensile and compression moduli of elasticity of poly(n-alkyl acrylate) networks in the rubberlike state // *Collect. Czech. Chem. Commun.* — 1978. — Vol. 43. № 8. — 1999–2007 p.
- 306 Роговина Л. З., Васильев В. Г., Слонимский Г. Л. Регулярные сетки на основе  $\alpha,\omega$ -дигидроксиолигодиметилсилоксана, полученные при различных условиях разбавления // *Высокомолек. Соед. А.* — 1982. — Т. 24, № 2.— 254–260 с.
- 307 Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Теоретическая физика. Т. 7. Теория упругости.— М.: Наука, 1987. — 119–123 с.