

Для служебного пользования

Экз. №__

На правах рукописи

ЛОПАТИН ВЛАДИСЛАВ ВИКТОРОВИЧ

**СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ
МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

05.17.06 – Технология и переработка полимеров и композитов

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук



Москва - 2005

Работа выполнена в Федеральном Государственном унитарном предприятии «Научно-исследовательский институт резиновых и латексных изделий», 107564, Москва, ул. Краснобогатырская, 42.

Официальные оппоненты:

доктор-физ.-мат. наук, профессор, академик РАН
Хохлов Алексей Ремович

доктор хим. наук, профессор
Зубов Виталий Павлович

доктор химических наук, профессор
Заиков Геннадий Ефремович

Ведущая организация: **Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева** (г. Москва)

Защита состоится “ 18 ” апреля 2005 года в 15 часов на заседании диссертационного совета Д 212. 120. 07 в Московской государственной академии тонкой химической технологии (МИТХТ) им. М. В. Ломоносова, по адресу: 119831, г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 119571, Москва, пр-кт Вернадского, 86, МИТХТ имени М. В. Ломоносова.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московской государственной академии тонкой химической технологии имени М. В. Ломоносова (ул. Малая Пироговская, 1).

Автореферат разослан “ ___ ” _____ 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Доктор физ.-мат. наук,
профессор



В. В. Шевелев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Сополимеры на основе акриламида и его производных в медицинской практике применяют уже в течение относительно длительного периода времени. Вначале это были линейные полимеры, которые использовали для иммобилизации белковых соединений и гемосорбентов при селективном удалении из крови протеолитических ферментов. Затем стали применять гели на основе сетчатых полиакриламидов. Их получают при радикальной сополимеризации акриламида и его бифункциональных производных в водной среде. Такие гидрогели содержат очень небольшое количество полимерного компонента (3-5%) и чрезвычайно большое количество воды.

Полиакриламидные гидрогели стали применять для имплантации при лицевой пластике, пластике мягких тканей и молочной железы в 90-х годах прошлого столетия. В настоящее время гидрогели довольно широко применяют не только в пластической хирургии, но и в других областях медицинской практики, например, в ортопедии и урологии, как физиологически активные материалы. Эти материалы используют также в производстве лекарственных препаратов пролонгированного действия, как депо для хранения полупродуктов, в клеточной терапии в виде носителей для клеточной массы и в ряде других медицинских и медико-биологических направлений.

Следует отметить, что начало широкого использования полиакриламидных гидрогелей совпало с тем периодом применения синтетических полимеров в медицине, когда многие другие медицинские полимерные материалы, предназначенные для имплантации и считавшиеся ранее практически абсолютно устойчивыми и никак не взаимодействующими с тканями человеческого тела, реально оказались не в достаточной степени биоинертными. После многолетних наблюдений было установлено, что даже из твердых силиконовых имплантатов, находящихся в живом организме, происходит выделение в тканевые жидкости олигомеров и других низкомолекулярных продуктов, оставшихся там после синтеза полимера и/или образовавшихся в результате деструктивных процессов, протекающих после имплантации. При этом еще и не все эти низкомолекулярные соединения деструктируются до таких веществ, которые выводятся из организма естественным путем. Кроме того, по биологическим и химическим свойствам ранее используемые полимерные материалы, введенные в живые ткани, не обладали функциями, подобными функциям самого организма. Они были, как бы, балластом для организма, что иногда вызывало обширные тканевые реакции и даже дегенеративные явления.

По этой причине во многих исследовательских организациях были начаты разработки более совершенных полимеров для имплантации, которые и привели к созданию ряда новых медицинских материалов. В частности, нашли широкое применение медицинские полиакриламидные гидрогели, появление которых в большой степени связано с результатами, полученными в данной работе.

Медицинские материалы, используемые для имплантации, должны обладать комплексом специфических свойств. Целесообразно выделить следующие основные группы свойств, которые можно рассматривать в качестве базовых для составления медико-технических требований к имплантируемому материалу.

1) материал, находясь в организме, не должен вызывать резкого отторжения, а также сам не должен изменяться под воздействием окружающих его тканей в течение времени использования эндопротеза, то есть должен обладать **биоинертностью**.

2) имплантат должен обладать **биосовместимостью**, то есть подвергаться контролируемой биодеструкции в процессе метаболизма, причем продукты биодеструкции должны быть нетоксичными и не должны вызывать негативной тканевой реакции организма.

3) продукты биодеструкции имплантируемого материала должны в заданное время деградировать в организме до таких метаболитов, которые легко выводятся из организма через печень и почки. Назовем это **контролируемой биодegradацией**.

4) в имплантируемый материал, вокруг которого после его введения в организм образуется соединительно-тканевая капсула, возможно попадание экзо- и эндоинфекций. Гели являются хорошей питательной средой для развития микроорганизмов. И если опасность экзоинфицирования может быть существенно снижена за счет дезинфекционных и антисептических мероприятий в предоперационном и послеоперационном периодах, то против эндоинфекций такой защиты нет. Поэтому материал сам не должен допускать инфицированного воспаления. Назовем такие свойства **антисептичностью** материала.

5) материал при имплантации должен быть безопасен даже при применении его в относительно больших объемах, если это требуется для терапевтических целей. Назовем это **объемным лимитом**.

6) материал должен вводиться в организм с наименьшими травматическими последствиями, то есть должен обладать определенными тиксотропными свойствами, позволяющими осуществлять **инвазивное введение**.

Для получения полимерных материалов, удовлетворяющим всем этим требованиям, была поставлена и проведена представленная работа. Полиакриламидные гидрогели последнего поколения, полученные в данной работе, являются материалами, удовлетворяющими практически всем этим требованиям. Они обладают хорошей биосовместимостью, достаточной биоинертностью, незначительной биодеструкцией, удовлетворительным метаболизмом. Результаты работ по оценке биосовместимости, биодеструкции и метаболизма рассмотрены ниже в разделе гистологических исследований.

Необходимо, однако, отметить, что наряду с отмеченными положительными характеристиками, антисептичность полиакриламидных гидрогелей вплоть до гелей последнего поколения оставляла желать лучшего. Гели являются хорошим бульоном для развития микроорганизмов. Поэтому их

применение требует обязательного принятия определенных мер по антисептике.

Несмотря на то, что полиакриламидные гидрогели изучены достаточно детально, применение их в медицинской практике требует серьезных исследований их структуры и свойств. Дело в том, что требования, предъявляемые к материалам медицинского назначения, существенно отличаются от требований, предъявляемых к материалам технического назначения (это видно из перечня требований, описанных выше). При этом оказывается, что даже небольшие изменения в составе исходных реагентов, в технологии проведения синтеза гелей в водной среде, дальнейшего автоклавирования и стерилизации путем γ -облучения приводят к существенным изменениям их поведения в организме. Поэтому необходимо исследование тонких структурных превращений, происходящих в гидрогелях при их синтезе и переработке и сопоставление этих структурных изменений с результатами гистологических и морфологических исследований. Все это дает возможность разработать наиболее оптимальную технологию синтеза гидрогелей, применяемых в медицине, и наладить промышленное производство данных препаратов с широким внедрением их в медицинскую практику. Эти цели были поставлены в данной работе, которая проводилась на протяжении последних 15 лет в Федеральном Государственном унитарном предприятии (ФГУП) «Научно-исследовательский институт резиновых и латексных изделий» совместно с ИНЭОС РАН и рядом медицинских центров.

Целью данной работы явилось систематическое исследование влияния тонких структурных превращений в полиакриламидных гелях в процессе их синтеза и дальнейшей обработки на их поведение в организме при имплантации; разработка на этой основе оптимальной технологии синтеза гидрогелей, применяемых в медицине, а также организация промышленного производства данных препаратов с широким внедрением их в медицинскую практику.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- Проведение экспериментальных исследований структурных превращений в гелях различными физическими методами (ИК- и ЯМР-спектроскопия, компьютерный дизайн полимеров, термомеханический анализ, набухание, исследование релаксационных процессов как в статических, так и в динамических условиях, определение свободной и связанной воды в гелях, а также определение структуры воды в гелях методом ЯМР-спектроскопии).
- Сопоставление результатов анализа структуры гидрогелей, полученных по разной технологии, с поведением гидрогелей при их имплантации в организм с детальным гистологическим и клинико-морфологическим анализом.
- Изучение влияния целевых добавок (повиаргола) в реакционную среду при синтезе гидрогелей на характер возникновения воспалительных и других нежелательных процессов при имплантации гелей.

- Разработка оптимальной технологии синтеза гидрогелей и приготовления медицинских препаратов на их основе, удовлетворяющих требованиям, предъявляемым к синтетическим материалам медицинского назначения.
- Разработка нового метода для оценки кинетических параметров процесса набухания гелей.
- Разработка экспериментальных методов для сопоставительного анализа реологического поведения синовиальной жидкости и синтезируемых гидрогелей при изменении давления и температуры с целью использования их для замены этой жидкости при лечении остеохондрозов и остеопорозов.

Научная новизна работы заключается в том, что в ней

- Развито новое научное направление в области полимерных медицинских материалов, заключающееся в том, что разработан комплексный подход к анализу взаимосвязи тонких химических превращений в гидрогелях в процессе их получения и поведения в организме при эндопротезировании на длительные сроки, что дало возможность разработать систему подходов, позволяющих целенаправленно и поэтапно формировать многоуровневую структуру полиакриламидных гелей.
- Впервые исследованы тонкие химические и структурные превращения, возникающие в полиакриламидных гидрогелях в процессе их длительного 18-часового синтеза, а также в процессе их дальнейшей переработки при изготовлении изделий медицинского назначения для эндопротезирования. Показано, что на первых стадиях синтеза закладываются микроструктура гелей, а в дальнейшем, в результате конверсии двойных связей на границах микрогелей образуется полимерная сетка; размеры микрогелей не изменяются.
- Установлено, что при стерилизации медицинских изделий на основе гелей автоклавированием гели становятся низкомолекулярными, степень сшивки при этом уменьшается. При воздействии радиационного γ - или β -излучения наблюдается незначительное образование имидных и алкеновых структур, однако при этом происходит свертывание цепей в макроструктуре геля, что приводит к уменьшению межузловых расстояний и улучшению механических и ряда других свойств гелей.
- Проведенное детальное многолетнее изучение влияния микро- и макроструктур геля на его поведение в белковых тканях организма длительное время с помощью различных биоморфологических и биохимических методов позволило установить степень влияния различных структур геля на особенности такого поведения.
- Разработана система оценки взаимосвязи структурных и химических превращений гелей при их получении и введении в организм, что позволило создать приемы многостадийного построения разного уровня структур полиакриламидных гелей, которые необходимы для прогнозирования формирования комплекса свойств разнообразных медицинских материалов для различных типов применения. В результате разработанные гидрогели при введении их в организм не меняют своих свойств и обладают длительной

формоустойчивостью, не вызывают кальциноза, дистрофии и некроза в окружающих тканях; данные гели также не вызывают иммунных реакций, не мигрируют в региональные лимфоузлы и в кровяное русло, не вызывают клеточного атипизма.

- Установлено, что полиакриламидные гели со специально созданной структурой играют роль депо для ксеногенных клеток при проведении клеточной терапии для лечения заболеваний иммунного типа (онкологии, сахарного диабета, хронических аллергий и т.д.). Например, в результате клинического исследования переносимости метода ксеногенной вакцинации у людей, больных метастатической меланомой, показана принципиальная возможность полного излечения путем вакцинации при заболеваниях такого типа.

- Разработан новый метод оценки кинетических параметров набухания гидрогелей, имеющий общее значение для полимерных систем.

Практическая ценность работы:

1. Разработан новый материаловедческий подход к систематическому исследованию материалов на основе гидрогелей, предназначенных для имплантации. Систематизирована методология изучения свойств. Результаты и выводы исследования включены в методические указания по оценке гидрогелей медицинского назначения при их всесторонних исследованиях.
2. Организовано промышленное производство разнообразных гидрогелей, предназначенных для имплантации в организм человека, под торговыми марками «Формакирил», «Биофарм», «Аргиформ» и его разновидности – «DAM+», «NoltrexTM».
3. Проведено освоение полученных гидрогелей в широкой медицинской практике:
 - для пластической хирургии лица и мягких тканей;
 - в урологии при лечении стрессового недержания;
 - в ортопедии при лечении артритов и артрозов.
4. Найден принцип придания гидрогелям бактерицидных свойств путем введения тонкой дисперсии серебра (повиаргол), стабилизированной полимером (поливинилпирролидон), в результате чего гель практически не подвергается биодеструкции и не вызывает воспалительных процессов в организме; гели с такими веществами нашли наибольшее применение в урологии, ортопедии, травматологии, косметологии и др. областях медицины.
5. С положительным результатом проведена первая стадия клинических испытаний использования полиакриламидного материала «Витагель» в качестве депо при лечении онкологических заболеваний методом клеточной терапии. Получено разрешение на проведение расширенных испытаний в онкологических центрах Минздрава России.

1. Принцип формирования структур полиакриламидных гелей медицинского назначения с заранее прогнозируемыми свойствами.
2. Особенности процессов структурообразования в гидрогелях на различных стадиях их производства – синтеза, γ -облучения, стерилизации.
3. Способ придания гидрогелям для эндопротезирования бактерицидных свойств.
4. Технологии создания полиакриламидных гелей с заданными свойствами для различных областей медицины.
5. Принцип получения блок-капсулы при введении гидрогеля в ткань, используемую в качестве депо для ксеногенных клеток при применении метода клеточной терапии в лечении гормонодефицитных и онкологических заболеваний.
6. Совокупность идей, подходов и результатов, которую можно представить, как актуальное научное направление – «Физико-химия полимерных гидрогелей для эндопротезирования».

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на 4th International expert meeting on clinical dendritic cell immunotherapy (Amsterdam, the Netherlands, 2003); The 52nd Pittsburg conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (New Orleans, L A, 2001); East-Asian Symposium on Polymer for Advanced Technology (China, 1997); 2^d East-Asian Symposium on Polymer for Advanced Technology (Korea, 1999); 6^{ой} научно-практической конференции резинщиков «Сырье и материалы для резиновой промышленности, от материалов - к изделиям» (1999, Москва); 4th East-Asian Symposium on Polymer for Advanced Technology (Japan, 2003); II Международной конференции «Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов» (Москва, 1995); Международной конференции по каучуку и резине (Москва, 2004); Международной конференции (ИНЭОС РАН, Москва, 2004) “Modern trends in organoelement and polymeric chemistry”.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 49 научных работ, в том числе: 1 монография, 26 статей, все в центральной печати, 13 патентов, 9 тезисов докладов на конференциях.

Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоит в выборе цели, постановке задач и методов исследования (включая разработку экспериментальных установок), личном проведении большей части экспериментальных работ, обработке и интерпретации полученных результатов.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, 11 разделов, выводов, списка цитируемой литературы и приложений; содержит 349 страницы машинописного текста, 85 рисунков, 26

таблиц, список литературы из 422 наименований на 25 страницах; общий объем работы 374 страниц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

II. Методы исследования.

II.1. *ИК-спектроскопия.* Спектры определяли на ИК фурье-спектрометре "Magna-750 IR" фирмы Nicolet со спектральным разрешением 2 см^{-1} . Измерения проводились не на гелях, содержащих лишь малое количество полимерной сетки, а на тщательно высушенных образцах, которые использовались для приготовления таблеток с КВг или суспензии в вазелиновом масле.

II.2. *ЯМР-спектроскопия.* ЯМР-спектры ^1H и ^{13}C записаны на спектрометре AMX 400 фирмы Брукер с рабочими частотами 400.13 и 100.61 МГц соответственно. Измерение температурной зависимости ЯМР спин-решеточной релаксации протонов воды в гелях проводили на спектрометре WM-250 фирмы Брукер.

II.3. *Компьютерный дизайн полимеров.* Компьютерный дизайн полимеров осуществляли с помощью ЭВМ-программы CHEOPS, выпускаемой фирмой MillionZillion Software Company (США). ЭВМ-программа написана на основе физического подхода к количественной оценке различных физических характеристик полимеров, обобщенного в монографии А. А. Askadskii, Computational Materials Science of Polymers, Cambridge International Science Publishing, Cambridge, 2003.

II.4. *Релаксация напряжения и ползучесть.* Эксперименты проводились двумя способами.

а) Ползучесть образцов измеряли на модифицированных весах Каргина методом одноосного сжатия. Релаксацию напряжения измеряли на динамометре типа Поляни в режиме одноосного сжатия при постоянной деформации для всех образцов, равной 4.7 %. Эта "мгновенная" деформация задавалась со скоростью 0.0075 мм/сек.

б) Ползучесть и релаксацию напряжения также измеряли на модифицированных весах Каргина, но деформирование и нагружение осуществляли вдавливанием индентора с шарообразным наконечником с диаметром 2 мм.

II.5. *Термомеханический анализ.* Термомеханический анализ проводили на приборе Цетлина в условиях пенетрации пуансона в образец полимера диаметром 6 и высотой 2 мм. Диаметр пуансона составлял 4 мм, а нагрузка на образец была равной 100 г. Скорость роста температуры - 2 град/мин.

II.6. *Динамический механический анализ.* Вязкоупругие характеристики гелей определяли в режиме вынужденных синусоидальных колебаний на ротационном вискозиметре Хаак R-150. Круговую частоту ω варьировали в диапазоне 0,0628-62,8 рад/сек. Определяли модули накопления G' и потерь G'' , динамическую вязкость η^* и тангенс угла механических потерь $\text{tg}\delta = G''/G'$.

II.7. *Определение связанной и свободной воды.* Измерения проводились методом ДСК на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДСМ-2М в интервале температур от -150 до 50°C.

II.8. *Набухание.* Исследованные гели представляют собой низкомолекулярные системы, измерение набухания которых сопряжено с определенными методическими затруднениями, возникающими при удалении избыточной влаги традиционными методами. Поэтому равновесное набухание образцов измеряли весовым методом на электронных весах. По полученным данным строили кинетические кривые набухания в координатах $M(t)/M(\infty)$, где $M(t)$ - привес образца за время t , $M(\infty)$ - привес равновесно набухшего образца.

II.9. *Гистологические и морфологические исследования.* В общем случае образцы тканей фиксировались в нейтральном формалине или в жидкости Карнуа, заливались в парафин, а срезы окрашивались по следующим гистологическим и гистохимическим методикам: гематоксилин-эозином, пирюфуксином - по Ван-Гизону, импрегнацией серебром - по Гомори; толуидиновым синим на кислые гликозаминогликаны, PAS-реакцией на гликоген и гликопротеин, реакцией Браше на РНК, реакцией Фильгена на ДНК.

Для электронно-микроскопического исследования небольшие образцы тканей капсулы фиксировались в 2 % растворе глутаральдегида, а затем в 2 % растворе OsO_4 , потом заливались в аралдит. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм изготавливались на ультратоме LKB-IV, окрашивались толуидиновым синим и изучались в световом микроскопе. Ультратонкие срезы изготавливались на ультратоме LKB-IV и просматривались на электронном микроскопе JEM-100B.

II.10. *Определение размеров частиц по спектрам мутности.* Измерения проводили на фотоэлектрическом калориметре ФЭК-56 и на фотоэлектрическом турбидиметре ФЭТ. Средний радиус частиц дисперсной фазы рассчитывали по соотношению

$$\bar{r} = \frac{\alpha \lambda_{cp}}{2\pi\mu_1}$$

где $\lambda_{cp} = \sqrt{\lambda_{max}\lambda_{min}}$, λ_{max} и λ_{min} - длины волн на линейном участке зависимости $\lg D - \lg \lambda$, D - оптическая плотность, измеренная на нескольких длинах волн λ , α - относительный размер, μ_1 - показатель преломления дисперсионной среды.

II.11. *Высокоэффективная жидкостная хроматография.* Измерения проводили на жидкостном хроматографе "Altex Hitachi" при следующих условиях хроматографирования: разделительная колонка с неподвижной фазой Silasorb C-18, размер зерна 6 мкм, подвижная фаза - смесь ацетонитрила и воды, скорость подвижной фазы - 0.5 мл/мин, ультрафиолетовый детектор с длиной волны $\lambda = 254$ нм.

III. СТРУКТУРА И БИОИНЕРТНОСТЬ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ИЗДЕЛИЙ ИЗ НИХ ДЛЯ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИЯ.

III.1. Гистологическое исследование как тест на биоинертность и биосовместимость.

Приведена общая классификация медицинских материалов синтетического и природного происхождения. При установке любого имплантата в течение первых дней после установки образуется соединительная капсула, изолирующая его от окружающих тканей. При неблагоприятном воздействии со стороны имплантата толщина этой капсулы увеличивается, она переходит в фиброзную с образованием фиброзно-капсульной контрактуры. Происходит инфицирование имплантата вследствие накопления гибнущих клеток и нарушения миграции элементов крови. Происходит также кальцинирование фиброзной капсулы. Такая ситуация характерна при использовании силиконовых имплантатов. Поэтому необходимы гистологические и морфологические исследования в сочетании с анализом химических превращений, происходящих в самом имплантате.

III.2. Капсулярные фиброзы после маммопластики силиконовыми эндопротезами и изучение причин их возникновения.

В данном разделе описаны результаты морфологических исследований биоптатов, полученных во время повторных операций, связанных с маммопластикой силиконовыми эндопротезами. Повторные операции осуществлялись путем открытой капсулотомии с использованием нового полиакриламидного геля «Формакил». Конкретно изучались отдаленные результаты эндопротезирования молочных желез однотипными силиконовыми протезами, наполненными силиконовым гелем, а также возможность замены силиконового геля на полиакриламидный гель.

На основании проведенного исследования можно утверждать, что через оболочку силиконового протеза, наполненную силиконовым гелем, диффундируют низкомолекулярные олигомеры, что служит одной из основных причин возникновения контрактальной реакции мягких тканей. Это проявляется в возникновении капсулярных контрактур и фиброзов. Одним из путей предупреждения капсулярных контрактур и фиброзов является замена силиконового геля на созданный в данной работе и выпускаемый фирмой "Гель косметик технолоджи" (Москва) полиакриламидный гель "Формакил". Благодаря своей гидрофильности, этот материал может содержать до 98 %

воды, при этом, не теряя макроструктуры, оставаться по внешнему виду гелеобразным веществом.

В результате проведенных исследований для эндопротезирования был рекомендован "Формакрил", состоящий из 95 % воды и 5 % сополимера, со следующими свойствами: показатель преломления - 1.334 ± 1.338 , pH 7 ± 8.5 , окисляемость - 2.0. "Формакрил" при открытой капсулотомии используется в двух вариантах: в виде эндопротеза с силиконовой оболочкой и путем отсроченного введения в заранее подготовленную субмаммарную полость. Косметический эффект, полученный от использования Формакрила, объективно и субъективно оценен положительно.

IV. ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ИХ ХИМИЧЕСКИЕ, ФИЗИКО-МЕХАНИЧЕСКИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА.

В данной главе решались следующие задачи. Необходимо было добиться того, чтобы созданные неживые структуры в виде гидрогелей после их введения в живые ткани побуждали организм к регенерации на структурах геля, как на матрицах, новых живых структур, но уже из своих элементов. В отдельной серии биологических экспериментов, проведенных в ходе выполнения данной работы, было установлено, что несмотря на общую биоинертность синтезированных гелей, некоторые химические группы в полимерной сетке могут вызывать негативные явления в тканях живого организма. К таким группам относятся карбоксиамидные, имидные, гидразидные, уретановые, глутамидные и др. Исследования, проведенные в Федеральном Государственном унитарном предприятии (ФГУП) «НИИ резиновых и латексных изделий» совместно с 1-ой Московской медицинской академией им. И. М. Сеченова, показали, что тканевая реакция организма после имплантации в него полиакриламидных гелей в значительной степени зависит от качественного и количественного состава фрагментов структурной стеки полимера и химического строения групп, которые по-разному подвергаются резорбции. Особое внимание уделялось приданию материалу бактерицидных свойств, что сделано введением в композицию специальных веществ (см. ниже).

IV.1. Влияние условий каталитической полимеризации на физико-механические и биологические свойства гелей.

При проведении реакции полимеризации акриламида с N,N' -метиленбисакриламидом при мольном соотношении АА:МБАА $1 \pm 0.01-0.06$ и общем массовом соотношении исходных компонентов в растворе от 3 до 4% нами было установлено, что этот процесс более многостадийен и не так однозначен, как представляют его в ранее проведенных работах. Параллельные измерения вязкости реакционной массы и концентрации акриламида в ходе реакции показали следующее. Зависимость удельной вязкости $\eta_{уд}$ от

длительности синтеза t на начальной стадии показана на рис. 1, а кинетика исчезновения акриламида в реакционной массе – на рис. 2.

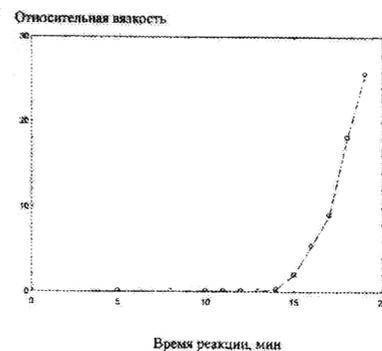


Рис. 1. Изменение относительной вязкости реакционной массы при сополимеризации АА с МБАА при соотношении 1:0,01. Реакция проводится при 70°C в присутствии персульфата аммония и массовой концентрации исходных реагентов в растворе 3,5%.



Рис. 2. Кинетика изменения мольной концентрации акриламида в реакционной массе.

Видно, что до $t = 13$ мин величина $\eta_{уд}$ остается постоянной и равной удельной вязкости исходной реакционной смеси $\eta_{уд} = 0.0612$. Это практически соответствует уравнению Эйнштейна $\eta = \eta_0(1 + 2.5\phi)$, где η – вязкость дисперсии сферических частиц, η_0 – вязкость дисперсионной среды, ϕ – объемная доля дисперсной фазы. Таким образом, при такой длительности синтеза полимер еще не образуется. Однако, конверсия акриламида достигает более 90%, а в реакционной среде образуются димеры и тримеры, о чем свидетельствует данный жидкостной хроматографии. Увеличение длительности реакции сверх 13 мин приводит к резкому возрастанию вязкости и, соответственно, к существенным отклонениям от уравнения Эйнштейна, что свидетельствует об образовании линейных полимеров (продукты реакции еще растворимы в воде). Поскольку конверсия АА в течение реакции от 13 до 20 мин практически не изменяется, можно сделать вывод, что в процессе дальнейшей полимеризации участвует не акриламид, который к этому времени уже практически прореагировал, а некие аддукты, которые образовались на начальной стадии реакции при олигомеризации. Расчеты показали, что примерно к 13 минуте продолжительности реакции в реакционной массе накапливаются именно эти аддукты акриламида, которые при взаимодействии друг с другом или с N,N' -метиленбисакриламидом образуют макрочастицы геля **линейного** строения (продукты реакции растворимы). Резкое увеличение вязкости реакционной массы, которое наблюдается от 13 до 20 мин, происходит за счет образования частиц геля разветвленного строения из-за вступления в реакцию бисакриламида. В дальнейшем происходит сшивка этих микрогелей и потеря текучести вследствие образования сетчатого полимера. Дальнейшее исследование показало, что структурные изменения в сетке геля происходят и

далее, в течение длительного времени на протяжении 18-20 часов (эти данные см. ниже).

Структура аддуктов, образующихся на начальной стадии синтеза и являющихся исходными блоками для построения будущей сетки геля, зависит от соотношения АА и МБАА. При этом изменяются и биологические свойства гелей. Для детального анализа этого положения были синтезированы 4 образца гелей на основе сополимера АА и МБАА. Готовились следующие композиции: 1) АА:МБАА (вес. части) = 100:1; 2) АА:МБАА = 100:2; 3) АА:МБАА = 100:4; 4) АА:МБАА = 100:5. Во все композиции добавляли 0.3 вес. % повияргола, что приводит к появлению бактерицидных свойств гелей. Синтез всех гелей осуществлялся при температуре $70 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 18 часов. При этом, обработка гелей γ -облучением не проводилась.

Описание кинетики набухания осуществляли с помощью уравнений:

$$\frac{M(t)}{M(\infty)} = \frac{\int_0^t T_1^*(\tau) d\tau}{\int_0^\infty T_1^*(\tau) d\tau}$$

$$\frac{M(t)}{M(\infty)} = \frac{\int_0^t T_2^*(\tau) d\tau}{\int_0^\infty T_2^*(\tau) d\tau}$$

где $M(t)$ и $M(\infty)$ - соответственно масса набухающего образца к моменту времени t и масса набухшего образца в условиях равновесия, т. е. при $t \rightarrow \infty$; $T_1^*(\tau)$ и $T_2^*(\tau)$ - переменные части ядер $T_1(\tau)$ и $T_2(\tau)$,

В этих уравнениях интегралы $\int_0^\infty T_1^*(\tau) d\tau$ и $\int_0^\infty T_2^*(\tau) d\tau$ являются постоянными величинами, зависящими от значений пар параметров k^* , β и a , γ . Эти значения вычислены и табулированы в данной работе.

Для удобства расчета кинетических параметров набухания в данной работе вычислены и табулированы значения отношений $\frac{\int_0^t T_1^*(\tau) d\tau}{\int_0^\infty T_1^*(\tau) d\tau}$ и

$\frac{\int_0^t T_2^*(\tau) d\tau}{\int_0^\infty T_2^*(\tau) d\tau}$, определенных при различных временах процесса t . С

использованием всех значений интегралов написана ЭВМ-программа, которая позволяет обрабатывать экспериментальные данные методом наименьших квадратов.

На рис. 3 показаны кинетические кривые набухания для ряда исследованных образцов гелей.

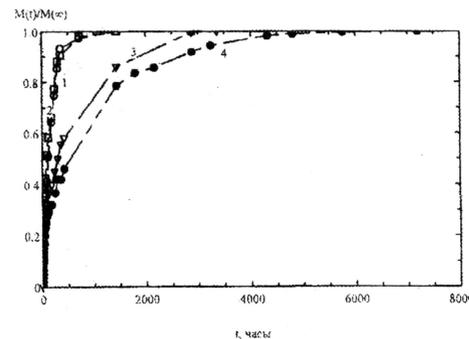


Рис. 3. Кинетические кривые набухания (зависимости $M(t)/M(\infty)$ от t). Номера на кривых соответствуют номерам образцов.

Видно, что достижение равновесия наступает за разное время: чем больше доля сшивающего агента - МБАА, тем за большее время достигается равновесное набухание. Однако расчеты, проведенные по уравнению Флори-Ренера

$$\frac{1}{M_c} = \frac{2}{M_n} - \frac{v}{V_1} \left[\ln(1 - V_{2,s}) + V_{2,s} + \chi_1 V_{2,s}^2 \right]$$

$$V_{2,r} \left[\left(\frac{V_{2,s}}{V_{2,r}} \right)^{1/3} - \frac{1}{2} \frac{V_{2,s}}{V_{2,r}} \right] \quad (1)$$

(M_n - среднечисловая молекулярная масса сшитого полимера, v - удельный объем полимера, V_1 - молярный объем растворителя, $V_{2,s}$ - объемная доля равновесно набухшего полимера, χ_1 - параметр взаимодействия полимер-растворитель, $V_{2,r}$ - объемная доля сшитого сухого полимера)

показывают, что величина M_c уменьшается только при переходе от образца 1 к образцу 2 (т. е. при увеличении доли сшивающего агента от 1 до 2 весовых частей на 100 весовых частей АА). Для образца 1 величина $M_c \approx 90700$, а для образца 2 $M_c \approx 68300$. Примерно та же величина наблюдается и для образцов 3 и 4 (4 и 5 весовых частей МБАА на 100 весовых частей АА соответственно). Таким образом, существенное увеличение концентрации сшивающего агента не приводит к изменению равновесной степени набухания, а ведет лишь к снижению скорости данного процесса. Для всех образцов гелей характерна большая дефектность сетки. Это хорошо видно из табл. 1, в которой приведены значения M_c , рассчитанные с помощью уравнения (1), а также с помощью очевидного соотношения

$$M_c = 71[\text{AA}]/2[\text{МБАА}] \quad (2),$$

справедливого для абсолютно однородной и бездефектной сетки.

Видно, что величины M_c , найденные по равновесной степени набухания, во много раз выше величин M_c , рассчитанных по соотношению (2). Это свидетельствует о существенной неоднородности полученных сеток.

Таблица 1. Кинетические параметры процесса набухания и характеристики исследованных сеток.

| Об-разец | M_c , расчет по формуле (2) | M_c , расчет по формуле (1) | Коэффи-циенты корреля-ции r_1/r_2 | a | γ | Скорость изменения привеса массы за время t $v \times 10^3$, час ⁻¹ | | |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|--------|----------|--|--------------|---------------|
| | | | | | | $t=0.5$ часа | $t=15$ часов | $t=360$ часов |
| 1 | 7700 | 90700 | 0.781/0.993 | 0.0598 | 0.3 | 24.6 | 7.2 | 0.67 |
| 2 | 3850 | 68300 | 0.842/0.991 | 0.252 | 0.1 | 25.6 | 8.4 | 0.50 |
| 3 | 1920 | 67000 | 0.837/0.978 | 0.0198 | 0.4 | 16.1 | 4.3 | 0.72 |
| 4 | 1540 | 67000 | 0.805/0.980 | 0.0378 | 0.3 | 8.4 | 2.9 | 0.63 |

Результаты аппроксимации кинетических кривых набухания представлены в таблице 1. Коэффициенты корреляции r при использовании ядра $T_2(\tau)$ близки к 1. В то же время эти коэффициенты существенно ниже единицы при использовании ядра $T_1(\tau)$. С рассматриваемых позиций это свидетельствует о том, что кинетика процесса набухания данных гелей лимитируется скоростью диффузии кинетических единиц – релаксаторов и нерелаксаторов.

Скорость набухания в различные промежутки времени t определялась из соотношения

$$v = d \left[\frac{M(t)}{M(\infty)} \right] / dt = T_2^*(\tau) \int_0^{\infty} T_2^*(\tau) d\tau \quad (3)$$

где $T_2^*(\tau)$ - значения переменных частей ядра $T_2(\tau)$.

Полученные по этому соотношению скорости процесса набухания для всех образцов приведены в таблице 1 при разных длительностях процесса t . Видно, что скорость набухания зависит от концентрации сшивающего агента и от длительности процесса. При одинаковых небольших временах наблюдения (0.5 и 15 часов) скорость существенно снижается при переходе от образца 1 к образцам 3 и 4. Однако для образца 2 эта скорость при длительностях процесса 0.5 и 15 минут (т. е. на начальном участке процесса), незначительно выше, хотя данный образец содержит в 2 раза больше сшивающего агента, чем образец 1. Объяснить это можно только неоднородностью сетки, которая согласно многочисленным литературным данным имеет двухфазную структуру. На первой стадии гелеобразования формируются микрогели, содержащие непрочереагировавшие группы МБАА. В дальнейшем эти микрогели объединяются в химическую сетку за счет конверсии этих групп. Такая сетка является напряженной, и на начальных стадиях процесса набухания в результате разрыва межмолекулярных (водородных) связей происходит быстрое набухание. Однако при больших длительностях процесса скорость набухания изменяется адекватно увеличению концентрации сшивающего агента.

Таким образом, проведенное исследование показало, что анализируемые сетки, судя по величинам M_c , имеют близкую структуру при изменении концентрации сшивающего агента от 2 до 5 вес. %. Однако судя по скорости набухания их структура различается. Что касается метода оценки кинетических параметров процесса набухания, то нам представляется, что предложенный в данной работе способ аппроксимации кинетических кривых имеет общее значение и применим как для твердых полимеров, так и для гелей, содержащих большое количество растворителя.

Результаты гистологических исследований полученных гидрогелей показали следующее. Синтезированные образцы полиакриламидных гидрогелей вводились 30 белым лабораторным крысам линии VISTAR путем инъекций подкожно в межлопаточную область в количестве 0.5 мл. Через 3, 7, 14, 21, 30 и 90 суток животных выводили из опыта. Область имплантации изучалась визуально (макроскопически). Затем гель с окружающей тканью фиксировался в нейтральном 10% формалине и заливался в парафин. Далее изготавливались срезы толщиной 4 мм, которые окрашивались гематоксилином и эозином. После этого срезы изучались на микроскопе. Исследования показали, что через 3 суток все образцы геля оставались прозрачными и имели такую же вязкость, как до имплантации, причем соединительно-тканная капсула вокруг геля не образовывалась.

Образец 1 (слабая степень сшивки) вызывал негативную тканевую реакцию и образование рыхлой фиброзной капсулы. В то же время, через 7 суток макрофагические образцы гелей 2-4 сохраняют первоначальную прозрачность, вокруг геля образуется тонкая фиброзная капсула, клеточная инфильтрация в ней отсутствует. Вокруг образца 1 через 7 суток после имплантации капсула вокруг геля состояла из незрелой грануляционной ткани, в которой выявлялась воспалительная реакция в виде отека лимфоцитарной индиляции. К 30-м суткам имплантат представлял пеналистые конгломераты, перемежающиеся макрофагами, вокруг образовывалась соединительная капсула.

У образцов геля 2-3 к 30-м суткам капсула остается тонкой. Гель по-прежнему не прорастает соединительной тканью. У образца 4 к 14-м суткам материал уже не представляет собой гомогенной массы, он разделен на фрагменты и тонкие тяжи, между которыми видны проникающие в гель клеточные элементы. К 30-м суткам гель распадается на фрагменты.

Таким образом, наиболее близкими по тканевым реакциям к гелям, синтезированным с применением γ -облучения, являются содержащие повияргол образцы 2-3, полученные в данной работе без γ -облучения. Это свидетельствует о том, что для получения гидрогелей медицинского назначения можно обойтись и без γ -облучения, но с целью их стерилизации следует вводить повияргол в реакционную среду.

IV.2. Изучение влияния условий проведения сополимеризации акриламида и N,N'-метиленабисакриламида на физико-механические и биохимические свойства после гелеобразования.

В предыдущем разделе было отмечено, что в процессе полимеризации после гелеобразования и потери текучести реакционной массы состояние геля с течением времени изменяется. После гелеобразования, которое происходит в течение продолжительности реакции от 20 до 30 минут, дальнейшее проведение синтеза до 2-х часов приводит к образованию гидрогелей, обладающих значительным модулем упругости. Увеличение длительности синтеза до 5-6 часов еще больше увеличивает модуль упругости и снижает податливость. Однако, дальнейшее увеличение длительности приводит к разжижению, а затем к 18-часам вновь к росту модуля упругости. Все это потребовало проведение детального исследования.

Для исследования использовались два типа гелей, полученных при соотношении АА:МБАА = 100:1 и 100:1.5. Реакцию проводили при 70° С. Были проведены 2 серии экспериментов. В первой серии измерялись кривые релаксации напряжения и ползучести и проводилась их аппроксимация с помощью уравнения Больцмана, а во второй серии производились измерения набухания гелей вплоть до равновесия. В результате проведения обеих серий экспериментов были оценены параметры полимерной сетки.

Для аппроксимации кривых релаксации напряжения и ползучести использовались ядра релаксации, основанные на описании производства энтропии в ходе релаксационных процессов (детально этот подход изложен в монографии А. А. Askadskii, Computational Materials Science of Polymers, Cambridge International Science Publishing, Cambridge, 2003).

$$T(\tau) = \frac{S_0}{k_B m} \left[\frac{1}{\alpha \ln \alpha + (1-\alpha) \ln(1-\alpha)} - \frac{1}{\ln 0,5} \right] \quad (4)$$

где k_B – константа Больцмана, m^* – общее число кинетических единиц (в нашем случае релаксаторов и нерелаксаторов в единице объема), S_0 – начальная энтропия системы, α – доля релаксаторов от общего числа кинетических

$$\text{единиц, } m = m^* \int_0^{\infty} T^*(\tau) d\tau.$$

Изменение α со временем τ может быть обусловлено двумя причинами: взаимодействием релаксаторов и переходом их в нерелаксаторы; диффузией кинетических единиц. Релаксаторами могут быть различные атомные группы, повторяющиеся звенья, более крупные фрагменты макромолекул и их сегменты. К релаксаторам относятся также отдельные элементы свободного (в данном случае – «пустого») объема, т.е. микрополости, концентраторы напряжения и т.д. Эти микрополости могут, взаимодействуя друг с другом, сливаться, перестраиваться и диффундировать в полимерном материале в процессе релаксации или ползучести, образуя такую структуру, которая способствует снижению релаксирующего напряжения.

Если лимитирующей стадией релаксации напряжения или ползучести является скорость взаимодействия релаксаторов, то

$$\alpha = \frac{1}{(1 + k^* \tau / \beta)^\beta} \quad (5)$$

где $k^* = k^{n-1}$; $\beta = \frac{1}{n-1}$; n – порядок реакции взаимодействия, k – константа скорости реакции.

Подстановка (5) в (4) дает ядро релаксации $T_1(\tau)$.

Если лимитирующей стадией является скорость диффузии кинетических единиц, то величина α определяется из соотношения

$$\alpha = 1 - a \tau^{b/2} \quad (6)$$

где $0 < a < 1$; a – константа. Подстановка (6) в (4) дает ядро релаксации $T_2(\tau)$.

По уравнению Больцмана определялись величины равновесного модуля упругости, нужные для оценки среднего расстояния между узлами сетки M_c . Оценку величин M_c проводили с помощью уравнения

$$M_c = \frac{3RT\rho\Phi_2^{1/3}(V_u/V_f)^{2/3}}{E} \quad (7)$$

где R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, ρ – плотность полимера, Φ_2 – объемная доля полимера в геле, V_u – объем системы до полимеризации, V_f – объем системы после полимеризации, E – модуль упругости геля.

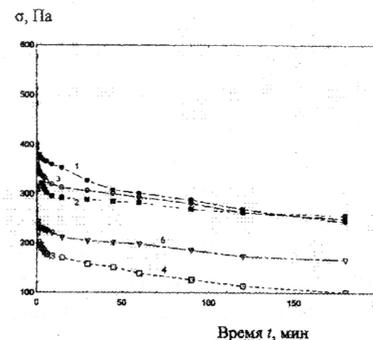


Рис. 4. Кривые релаксации напряжения для образцов с соотношением компонентов АА:МБАА = 100:1. 1 - время синтеза 5 ч; 2 - время синтеза 6 ч; 3 - время синтеза 7 ч; 4 - время синтеза 9 ч; 5 - время синтеза 18 ч. При этом использовали значения как неравновесного модуля упругости E_s , полученного из кривых сжатия, так и равновесного модуля E_∞ . В качестве примера на рис. 4 показаны кривые релаксации напряжения для гелей, полученных при соотношении компонентов АА:МБАА = 100:1.

По результатам расчета равновесного напряжения σ_∞ и соответствующего равновесного модуля E_∞ были оценены величины усредненного молекулярного веса M_c линейных цепей сетки между узлами. Эти данные сопоставлены с величинами M_c , рассчитанными на основании равновесной степени набухания.

Из табл. 2 видно, что структура сетки гелей и их свойства зависят как от продолжительности синтеза, так и от количества сшивающего агента.

Таблица 2. Величины модулей упругости, равновесных степеней набухания и параметров сетки полиакриламидных гидрогелей. Биофарм, АА:МБАА=100:1

| Образец | E , КПа | E_{∞} , КПа | M_{∞} / M_0 , % | M_c , опреде- лено по неравно- весному модулю E . | M_c , опреде- лено по равно- весному модулю E_{∞} . | M_c , опреде- лено по равно- весной степени набухания |
|------------------------------------|--------------|-----------------------|---------------------------|---|--|---|
| Длительность синтеза: 2 часа | 12.255 | 3.630 | 345 | 21400 | 72100 | 184500 |
| 5 часов | 10.894 | 3.950 | 334 | 24000 | 66200 | 166900 |
| 6 часов | 10.213 | 5.808 | 328 | 24600 | 45100 | 155900 |
| 7 часов | 12.212 | 1.263 | 501 | 21400 | 207200 | 550700 |
| 9 часов | 6.568 | 0.638 | 396 | 39800 | 409800 | 285900 |
| 18 часов | 6.672 | 2.836 | 392 | 39200 | 92300 | 277600 |

При малом количестве сшивающего агента степень сшивки минимальна при 9-ти часовом синтезе, а при большем его количестве она максимальная при том же времени синтеза. Обращает на себя внимание тот факт, что величины M_c , рассчитанные на основании равновесного модуля упругости и равновесной степени набухания, существенно различаются между собой, и таким образом, для более объективной оценки следует использовать оба метода. Сложная зависимость M_c от длительности синтеза (образование максимума и минимума) объясняется тем конкуренцией между образованием химических узлов сшивки и физических узлов, вызванных образованием водородных связей. Сначала, при увеличении длительности синтеза образование сетки химических связей оказывает наибольшее влияние на структуру и свойства геля, повышая его модуль упругости, а затем дальнейший химический процесс сшивания приводит к уменьшению количества эффективных узлов сетки, образованных водородными связями. Это приводит к снижению модуля упругости. При длительном синтезе (18 часов) происходит сшивание микрогелевых частиц, что вновь приводит к росту модуля упругости. Все эти особенности поведения гидрогелей необходимо учитывать при их использовании в медицинской практике.

IV.3. Влияние физических и физико-химических воздействий на структуру полиакриламидных гелей.

Для изучения влияния различных факторов на структуру геля в процессе его переработки исследовано 4 образца водонабухающего сополимера акриламида (АА) с N,N'-метиленбисакриламидом (МБАА) в соотношении 1/0.01. Сополимеры получены радикальной сополимеризацией в присутствии персульфата аммония. Гели содержали 95.5% воды и 4.5% полимерной сетки.

Образец IV/1 получен на первой стадии процесса, где происходит сополимеризация АА и МБАА при температуре до 90°C в водной среде. Образец IV/2 был получен путем γ -облучения образца IV/1 до дозы 1 Мрад.

При изучении гистологии образца IV/2 установлено, что гель не вызывает асептического воспаления; тканевая реакция слабо выражена. Через 2 месяца вокруг геля образуется тонкая капсула из соединительной ткани, которая в дальнейшем не перерождается в фиброзные фрагменты, что обычно происходит при применении других полимеров.

Образец IV/3 получен после стерилизации исходного сополимера при 120°C и давлении 1.2 атм. в течение 40 минут, при этом рН геля меняется в сторону щелочной среды от рН 3.5-4 до рН 5-8 в зависимости от продолжительности автоклавирования. При изучении на животных обработанный гель быстро набухал и резорбировался. Поэтому для придания ему большей плотности и меньшей набухаемости был получен образец IV/4 при повторном γ -облучении. После этого гель становится более плотным и плохо набухает в водной среде. При изучении на животных дает очень хорошую тканевую реакцию. Из изложенного следует, что обычно применяемые для стерилизации медицинских материалов воздействия оказывают различное влияние на изменения структуры и свойства полиакриламидных гелей. γ -Облучение положительно отражается на биологических свойствах, обработка, подобная автоклавированию, напротив, отрицательно.

В связи с этим в данной работе проведен анализ химических превращений полимерной сетки гидрогелей на основе сополимера АА и МБАА на разных стадиях их получения и последующей обработки. В первую очередь измерены ИК-спектры всех 4-х образцов, которые практически идентичны. В спектрах наблюдается широкое очень интенсивное поглощение со сложным контуром в области 3400 - 3100 см⁻¹, принадлежащее валентным колебаниям NH-групп. Сложный контур полосы связан с сильными межмолекулярными водородными связями, образование которых неизбежно в твердом состоянии. В связи с этим по виду спектров в области валентных колебаний NH-групп не представляется возможным выяснить, имеются ли различия в химическом строении изученных полимеров.

Рассмотрим теперь результаты термомеханических исследований всех четырех образцов. Термомеханический анализ был нужен для того, чтобы выявить изменения в температуре стеклования самих полимерных сеток, являющихся основой данных гидрогелей. Известно, что температура стеклования является характеристикой, чувствительной к любым изменениям химического строения полимерных сеток. Поэтому для термомеханических исследований использовались сухие пробы, изготовленные из тщательно высушенных гелей.

Термомеханические кривые всех 4-х образцов представлены на рис. 5.

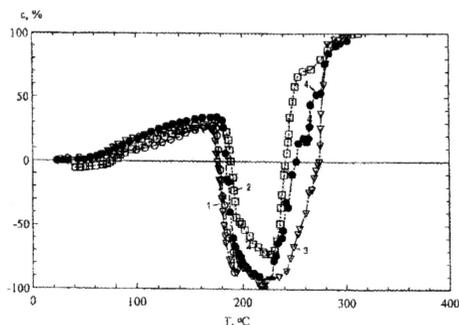
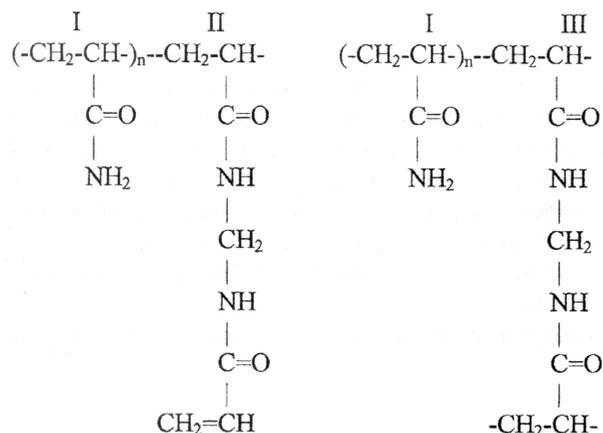


Рис.5. Термомеханические кривые для образцов IV/1 (1), IV/2 (2), IV/3 (3) и IV/4 (4).

Из этих данных следует, что при нагревании образцы начинают размягчаться при температуре около 100°C, но при температуре вблизи 170°C резко проявляется "отрицательная" деформация, свидетельствующая о том, что образцы быстро увеличивают свой объем. Это связано с тем, что при сушке гелей в материале возникают большие внутренние напряжения, которые при температуре стеклования снимаются и образец вспучивается. После снятия внутренних напряжений деформация образцов быстро возрастает и достигает 100% при 280-300°C. Из рисунка 5 также видно, что температура стеклования образцов IV/2 и IV/4 несколько увеличивается по сравнению с температурой стеклования исходного образца IV/1.

Для анализа причин изменения химического строения полимерной сетки при γ -облучении были проведены следующие эксперименты и расчеты. Были рассчитаны физические характеристики полиакриламида и сеток на его основе. На начальной стадии процесса сополимеризации AA с МБАА последний встраивается одним концом в линейную цепь полиакриламида согласно следующей схеме



Соотношение для расчета зависимости температуры стеклования линейного полимера от молярной доли α (МБАА) получено в следующем виде:

$$T_g = \frac{64.3 + 77.7\alpha}{0.15273 + 0.15597\alpha + 0.06\alpha(1-\alpha)} \quad (8)$$

Расчеты, проведенные по соотношению (8), показывают, что с увеличением молярной доли МБАА α температура стеклования проходит через минимум, который появляется при малых долях α . Это означает, что на ранних стадиях сополимеризации, когда образуется еще линейная структура, температура стеклования не повышается, а понижается. На следующей стадии образуется полимерная сетка в результате того, что свободный конец МБАА встраивается в соседнюю цепь, образуя узел сшивки. Для такой трехкомпонентной системы уравнение для расчета температуры стеклования принимает вид

$$T_g = \frac{64.3 + 69.7\alpha + 8\alpha\beta}{0.15273 + 0.04517\alpha + 0.1108\alpha\beta + 0.06\alpha(1-\alpha + \alpha\beta - \alpha\beta^2)} \quad (9)$$

где α – молярная доля МБАА, β – доля МБАА, образующего звенья линейного полимера (структура II), $(1-\beta)$ – доля МБАА, образующего полимерную сетку (структура III):

Расчеты, проведенные по формуле (9) при разных значениях β , показывают, что с уменьшением β (т.е., с уменьшением доли МБАА, образующего звенья линейного полимера, или с увеличением степени сшивки) минимум на зависимости T_g от α исчезает, а сама зависимость становится все более крутой. Таким образом, для того, чтобы температура стеклования повысилась на несколько градусов, прежде всего необходимо повысить долю МБАА, образующего сетку. В эксперименте температура стеклования при переходе от образца IV/1 к образцу IV/2 повышается на 9-10 град. Такое повышение T_g может быть связано только с образованием дополнительной сетки поперечных связей, и как показывают имеющиеся экспериментальные данные, это происходит за счет образования имидных групп. Анализ влияния частоты такой сетки на температуру стеклования показал, что зависимость T_g от n (n – число повторяющихся звеньев полиакриламида между узлами сетки) описывается соотношением

$$T_g = \frac{52.5 + 64.3n}{152.7n - 63.06} \times 10^3 \quad (10)$$

Если узлы отсутствуют (т.е. $n \rightarrow \infty$), то по соотношению (10) получаем расчетную температуру стеклования линейного полиакриламида $T_g = 421\text{K}$.

Если температура стеклования повышается на 10 град, то согласно выражению (10) величина $n = 76$. Это означает, что степень сшивки за счет образования имидных групп повышается на 1.3 %, что связано с дополнительным γ -облучением.

Для более детального анализа структуры сеток, подвергнутых γ -облучению, изучены их спектры ЯМР ^1H и ^{13}C . ПМР спектр исходного полиакриламида в D₂O (рис. 6) содержит две группы уширенных сигналов при 1.5 и 2.0 м.д. с соотношением интегральных интенсивностей 2:1, относящихся к CH₂- и CH- фрагментам полимера.

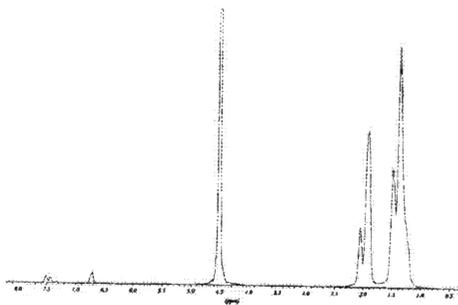


Рис. 6. ПМР - спектр исходного геля на основе полиакриламида в D₂O

Уширение сигналов, по-видимому, связано со стерическим напряжением в полимере, вследствие чего эти фрагменты оказываются в несколько разном магнитном окружении из-за анизотропных эффектов соседних групп. В спектре ПМР также видны уширенные сигналы значительно меньшей интенсивности при 6.7 и 7.4 м.д., которые могут принадлежать олефиновым протонам исходного мономера, а также продуктам полимеризации. Содержание этих протонов не превышает 3%.

Спектр ЯМР ¹³C исходного полиакриламида в D₂O (рис. 7), для отнесения сигналов снятый в режиме J-модулированного спинового эха, содержит набор сигналов ¹³C СН₂-групп при 36-38 м.д., набор сигналов ¹³C СН-групп при 43.5-44.3 м.д. и уширенный сигнал при 182 м.д., относящийся к ядрам карбонильных углеродов полимера.

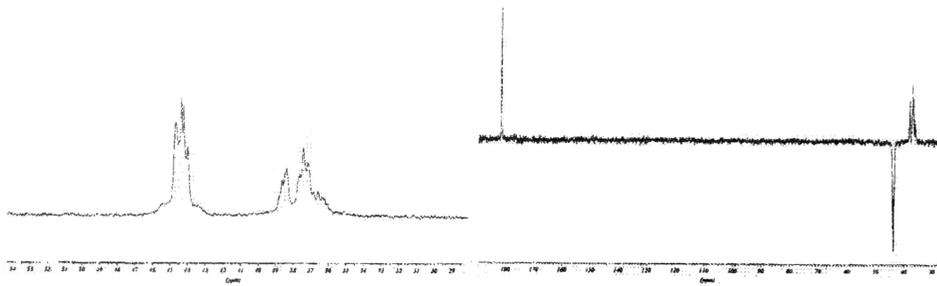


Рис. 7. Спектр ЯМР ¹³C исходного геля на основе полиакриламида в D₂O, снятый в режиме J-модулированного спинового эха

Поскольку в результате кратковременного γ-облучения изменения в спектрах практически отсутствуют, было проведено более длительное облучение, которое позволило выявить изменения в структуре изучаемых полимеров. После 2-х часового облучения спектры ЯМР заметно изменились, что может свидетельствовать о наличии структурных изменений при облучении. На рис. 8 показан спектр ЯМР ¹³C длительно облученного образца,

записанный в обычном режиме. Видно, что в основании группы сигналов ядер углеродов СН-группы при 44 м.д. появляются широкие плечи, наличие которых свидетельствуют о появлении новых СН-групп в другом структурном окружении по сравнению с исходным полимером.

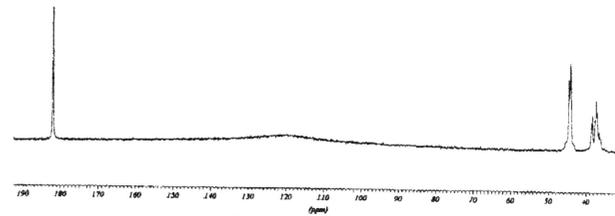
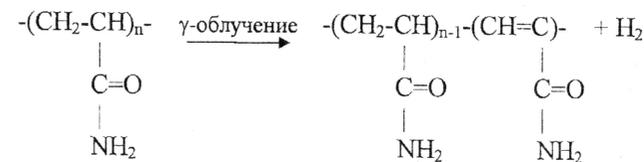


Рис. 8. Спектр ЯМР ¹³C геля после длительного γ-облучения

В спектре также наблюдается очень широкий сигнал с центром примерно при 120 м.д. Найдено, что появление этого сигнала обусловлено частичным содержанием алкеновых структур, образующихся при длительном γ-облучении:



Таким образом, эксперименты и расчеты показывают, что в результате γ-облучения происходит образование дополнительной сетки поперечных связей в очень небольшой концентрации и структур, содержащих >C=C< связи. Казалось бы, эти структурные изменения полимера незначительны. Однако они приводят к заметным изменениям поведения полимерных гелей данного типа в белковых тканях. Это показывают результаты морфологических и гистологических исследований. Тканевая реакция на гель, полученный после γ-облучения, значительно лучше, чем до него. Если принять, что образование дополнительных сшивок происходит за счет раскрытия двойных связей на границах микрогелевых структур, то это должно привести к существенному уплотнению микрочастиц геля в его структуре. Это предположение подтверждается при изучении кривых релаксации напряжения и ползучести гелей, полученных с γ-облучением и без него.

Результат оценки величин M_c разными методами приведен на рис. 9. К двум часам протекания реакции гель уплотняется настолько, что его можно подвергать различным физико-механическим испытаниям (ползучести, релаксации напряжения, набуханию и т. д.), на основании которых производится анализ структуры сетки. На второй стадии реакции с 2 до 18 часов сначала идет уплотнение геля, затем его разжижение, а потом снова уплотнение.

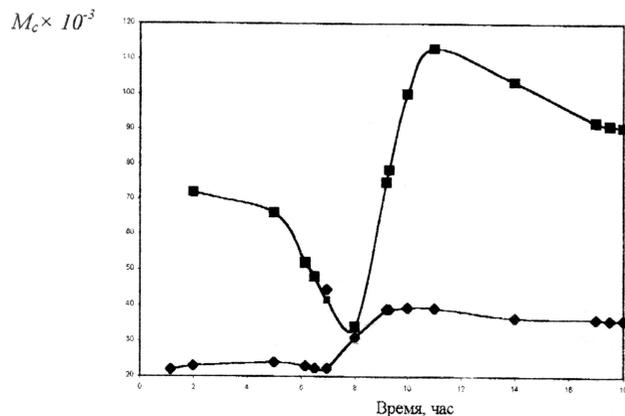


Рис. 9. Зависимость изменения средней молекулярной массы цепей между узлами сетки M_c от времени полимеризации. Условия проведения реакции полимеризации $t = 70^\circ\text{C}$; массовое соотношение AA : МБАА 100 : 1

1 - M_c , рассчитанная по равносному модулю упругости E_{00} ;
 2 - M_c , рассчитанная по неравновесному модулю упругости E .

Этому соответствует изменение величин M_c в ходе процесса. В начале второй стадии синтеза (2 часа) гель плотный, величина M_c мала. Гель остается таким в течение 4-5 часового синтеза. Затем идет резкое увеличение величины M_c , гель разжижается. Затем величина M_c проходит через максимум и медленно уменьшается в течение времени реакции до 18 часов, а затем остается неизменной. При этом, размеры частиц геля, измеренные методом спектров мутности, практически не изменяются (рис. 10).

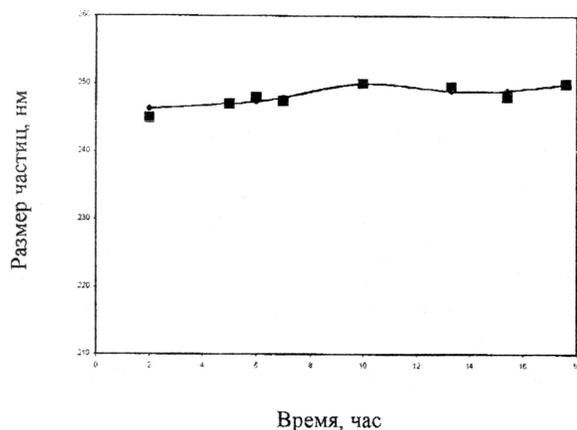


Рис. 10. Изменение размера частиц в течение полимеризации при $t = 70^\circ\text{C}$ и соотношении AA и МБАА, равном 100 : 1.

Такое поведение геля можно объяснить следующим образом. После гелеобразования продолжается образование химических связей между микрочастицами геля, что приводит их к некоторому сближению и образованию дополнительных водородных связей. В результате этого микрочастицы уплотняются, но в результате дальнейшего образования

химических связей в структуре образуется определенное напряжение, что вызывает разрыв части водородных связей и разжижение геля. Дальнейшее же образование химических связей приводит к постепенному уплотнению упаковки микрочастиц геля. Таким образом, на второй стадии гелеобразования происходит только изменение макроструктуры, размеры микрогелей остаются неизменными, теми, которые образовались на 1-й стадии реакции.

В дальнейшем, основываясь на полученных данных и принципах построения микро- и макроструктуры полиакриламидных гелей, в зависимости от целей и задач их применения в медицине, были разработаны технологические процессы изготовления медицинских препаратов на их основе и запущена технологическая линия производства. Этот материал рассматривается в следующих главах.

V. ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ И БИОИНЕРТНОСТИ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ ПУТЕМ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО И МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ТКАНЕВОЙ РЕАКЦИИ ПРИ ИХ ИМПЛАНТАЦИИ.

Основываясь на принципах формирования структуры полиакриламидных гидрогелей, нами были разработаны и выпущены гели первого поколения для пластики лица и мягких тканей под торговыми марками «Формакирил» и «Биофарм». В данной главе рассмотрены результаты гистологических и морфологических исследований тканевой реакции на эти гели. Тканевая реакция, изученная в динамике от 3 суток до 1 года при экспериментально-морфологическом исследовании на 60 крысах и 10 собаках с использованием гистохимических методов, а также на биопсийном клиническом материале, свидетельствует о высокой биосовместимости геля «Формакирил». В ранние сроки воспалительная реакция и отеки были минимальными, фибробластическая реакция очень слабой, соединительно-тканная капсула в поздние сроки очень тонкой. Резорбция геля макрофагами выявлена только вблизи капсулы; также отмечено незначительное прорастание геля соединительно-тканными тяжами. Основной массив геля оставался гомогенным и клетки в него не проникали. Таким образом, гель «Формакирил» обладает высокой формоустойчивостью, вязкостью и упругостью, не подвергается усадке, не растворяется и не набухает в тканевой жидкости в организме, проницаем для воды, ионов и кислорода, устойчив к воздействию ферментов. При длительной имплантации он не меняет своих свойств, не вызывает кальциноза, дистрофии или некроза в окружающих тканях, а также иммунных реакций, не мигрирует в региональные лимфоузлы и в кровяное русло, не вызывает клеточного атипизма.

Отмечено, что высокая биоинертность не означает полной биосовместимости геля. Макрофагальная реакция, вызванная имплантатом, хотя и выражена слабо, была пролонгированной. Макрофаги очень медленно резорбируют гель в краевых участках (вблизи капсулы), где обнаруживаются их небольшие скопления. Очень важен способ резорбции. При разрушении

поперечных швов активной формой кислорода, продуцируемой макрофагами, образуется линейный полимер, а при его деструкции появляются и низкомолекулярные продукты, фагоцитируемые макрофагами. Нейтрофильные лейкоциты также продуцируют АФК, но они скапливаются в большом количестве только при инфицировании геля или тканей. Поэтому принципиально важна полная стерильность геля и операционного поля. Характерно, что глубокой инвазии в гель макро- и микрофагов не наблюдается, с чем связана его длительная устойчивость в тканях. Сетчатая структура геля препятствует клеточной инвазии, но в периферических слоях макрофаги постепенно проделывают «каналы», по которым двигаются и фибробласты; так формируется соединительно-тканые тяжи, которые в прикапсульных слоях делят гель на фрагменты, в которых структура его разрушается АФК (там наблюдается просветление, мелкоячеистая вакуолизация и «фибриллизация» геля), а затем фагоцитируется клетками. Пустые ячейки после лизиса геля еще долго остаются в закапсульной зоне.

В данной главе изложены также результаты гистологического изучения тканевой реакции на имплантацию полиакриламидных гелей «Биофарм» и его разновидностей - гелей «Космогель» и «Лик», полученных в процессе выполнения данной работы. «Космогель» в количестве 0,7 мл вводился подкожно 15 крысам. Животные выводились из опыта на 7, 14 и 30 сутки (по 5 животных на срок). Гистологическое изучение тканевой реакции на имплантацию геля «Космогель» в эксперименте на крысах свидетельствует о том, что имплантат не вызывает выраженной местной токсической реакции. Однако, по сравнению с другими образцами полиакриламидных гелей, в частности гелем «Формакирил», имеется более выраженная асептическая воспалительная реакция окружающих тканей, которая поддерживается до конца эксперимента. Значительно сильнее выражены также макрофагальная и гигантоклеточная резорбция геля на периферии имплантата. По-видимому, это связано с меньшей стабильностью геля, который уже к семидневному сроку фрагментируется и подвергается инфильтрации макрофагами, нейтрофилами и фибрином. К месячному сроку отмечается заметное (до 50% объема) прорастание геля соединительно-ткаными тяжами. Вследствие перманентной краевой резорбции геля четкая соединительно-тканная капсула вокруг имплантата не формируется.

VI. ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЕ ГЕЛИ С БАКТЕРИЦИДНЫМИ СВОЙСТВАМИ И ОСОБЕННОСТИ ИХ СТРОЕНИЯ

Полиакриламидные гидрогели могут быть хорошей питательной средой для роста бактерий. Поскольку в организме всегда присутствует так называемая эндогенная (внутренняя) инфекция, существует высокая вероятность попадания бактерий в этот «питательный бульон». В результате этого в зоне капсулообразования может образовываться активная форма кислорода, содержащегося в радикале, которая разрушает связи C-N (рис. VI-1). Для защиты от заражения в данной работе в гель введены добавки в виде

тонкодисперсного серебра, стабилизированного поливинилпирролидоном. Такие гели выпускаются под торговой маркой «Аргиформ».

В настоящее время гидрогели медицинского назначения «Биофарм» (не содержащий бактерицидной добавки) и «Аргиформ» наиболее активно выпускаются и применяются в медицинской практике. На основе базового материала «Аргиформ» разработаны гидрогели нового поколения, нашедшие серьезное практическое применение в течение 4-5 последних лет в достаточно больших объемах. Помимо отличия гелей «Биофарм» и «Аргиформ» по их антисептическому действию, они существенно различаются по механическим релаксационным свойствам, по структуре сетки, по количеству связанной и свободной воды и т. д.

Исследование структуры и свойств гелей «Биофарм» и «Аргиформ» проводилось методами определения свободной и связанной воды (ДСК), динамического механического анализа, измерения температурной зависимости ЯМР спин-решеточной релаксации протонов воды в гелях, релаксации напряжения и ползучести.

Гель «Биофарм» обнаруживает пониженную способность к релаксации напряжения и ползучести. Гель, содержащий повидон и подвергнутый дополнительному γ -облучению («Аргиформ»), показывает более высокую скорость релаксации напряжения и ползучести по сравнению с гелем «Биофарм».

Среднюю молекулярную массу цепей между узлами шивки M_c рассчитывали по уравнению (7), в которое подставляли как величины неравновесного модуля, так и равновесного E_{∞} , определяемого путем аппроксимации кривых релаксации напряжения. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Величины усредненных молекулярных масс между узлами шивки, величина $M_c = 9140$, рассчитанная по уравнению (2).

| Гель | Модуль высокоэластичности E , найденный из кривых сжатия, Па | Равновесный модуль высокоэластичности E_{∞} , рассчитанный из кривых релаксации напряжения, Па | Величина M_c , рассчитанная на основе неравновесного модуля высокоэластичности E | Величина M_c , рассчитанная на основе равновесного модуля высокоэластичности E_{∞} | Доля связанной воды в геле, % |
|-----------------------------------|--|---|--|---|-------------------------------|
| Биофарм (с γ -облучением) | 15420 | 11520 | 17000 | 22700 | 14 |
| Аргиформ (с γ -облучением) | 9740 | 4450 | 26800 | 58700 | 11 |
| Биофарм | 13730 | 9425 | 19000 | 27700 | |
| Аргиформ | 12150 | 4040 | 21500 | 64600 | |

Для образцов гелей «Биофарм» величины E_{∞} выше, чем для образцов гелей «Аргиформ». Причина уменьшения как мгновенного модуля E_0 , так и равновесного модуля E_{∞} связана с тем, что введение повидона в реакционную среду при получении гелей приводит к образованию более дефектной сетки. Кроме этого, количество связанной воды для геля, содержащего ионы серебра,

меньше, чем для геля того же состава, не содержащего повияргола (см. табл. 3). Это наблюдение согласуется с теоретическими представлениями о влиянии ионов на количество связанной и свободной воды в гелях.

Результаты динамического механического анализа гидрогелей показывают что гель «Биофарм» обладает примерно таким же модулем накопления G' , как и «Аргиформ», и только в области больших частот ω наблюдается расхождение в величинах G' . Примерно такая же картина наблюдается и на частотной зависимости модуля потерь G'' . Гель «Аргиформ» обладает большой величиной тангенса угла механических потерь $\text{tg}\delta$, равной примерно 0.2, а «Биофарм» обладает сравнительно небольшой величиной $\text{tg}\delta$, равной 0.1. Однако с ростом частоты ω фактор механических потерь $\text{tg}\delta$ снижается для геля «Аргиформ», а для геля «Биофарм» - слабо возрастает. Начиная с круговой частоты ω , равной ~ 10 рад/сек, фактор механических потерь для геля «Аргиформ» резко возрастает, в то время, как для геля «Биофарм» такое резкое возрастание наблюдается при $\omega \approx 400$ рад/сек. По динамической вязкости η^* оба гидрогеля примерно одинаковы.

Результаты ЯМР-анализа структуры воды в исследуемых гелях показали, что при 27°C скорость релаксации связанной воды в геле «Биофарм» равна $(1/T_1)_{\text{связ}} = 0.78 \text{ c}^{-1}$, а для геля «Аргиформ» $(1/T_1)_{\text{связ}} = 1.45 \text{ c}^{-1}$. Увеличение скорости спин-решеточной релаксации для «Аргиформа» согласуется с данными по величинам равновесного модуля, из которых следует образование более дефектной сетки геля при введении повияргола в реакцию массу.

При морфологических исследованиях сравнивали поведение имплантированных гидрогелей, не содержащих серебра («Биофарм»), с гелем, содержащим серебро («Аргиформ»). Было найдено, что основной массив геля «Аргиформ», имплантированного подкожно инъекционным способом, не подвергается биодеструкции. Лишь периферические части геля, находящиеся около образующейся соединительно-тканной капсулы, подвергаются лизису и резорбции макрофагальными клетками. На поздних сроках наблюдается незначительно выраженное прорастание геля соединительно-тканными клетками в узком пространстве около капсулы. При этом продукты биодеструкции геля не приводят к дистрофическим изменениям в тканях, т. е. не вызывают токсикологического воздействия. Несмотря на то, что ионы серебра находятся в геле в слабо связанном состоянии, в условиях *in-vivo* серебро остается в имплантате длительное время, что препятствует воспалительным процессам в организме. Наличие же большей податливости и более редкой сетки в гидрогеле «Аргиформ» по сравнению с гелем «Биофарм» позволяет успешно имплантировать его в организм путем инъекции через тонкую иглу, т. е. создает условие атравматичности.

VII. ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ НА ИХ СТАБИЛЬНОСТЬ И СПОСОБНОСТЬ К БИОДЕСТРУКЦИИ ПРИ ЭНДОПРОТЕЗИРОВАНИИ

При создании биоинертных и биосовместимых материалов важнейшая задача – определение времени стабильного нахождения материала в организме и времени его деструкции с последующей эвакуацией продуктов деструкции из организма. В данной работе такие исследования проделаны *in vitro* и *in vivo*. Для ускоренного анализа процесса биодеструкции были использованы гидрогели, обладающие меньшей степенью сшивки, чем стандартный образец. Один из образцов получен при соотношении АА:МБАА 100:0.5 и содержании сухого остатка 3.2 масс. %. Второй образец получен при соотношении компонентов 100:1 и содержании сухого остатка 2.2 масс. %. Образцы были обработаны γ -облучением или синтезированы с добавлением ионов серебра. Определяли продукты деструкции после длительного (24 суток) кипячения образцов в воде, а также оценивали кинетику экстрагирования повияргола методом атомной адсорбционной спектрофотометрии или титрованием. Наибольшее количество повияргола (74%) экстрагируется в течение первых суток; в дальнейшем скорость экстрагирования замедляется. Для гелей, не содержащих повияргола, в качестве продуктов биодеструкции образуются фрагменты линейного растворимого полимера с молекулярной массой около 300 000, а дальнейшая гидролитическая биодеструкция в различных средах приводит к их разрушению до фрагментов с молекулярным весом 30 000 – 50 000. Такие полимеры согласно проведенным исследованиям легко выводятся из организма через почки.

Проведено детальное исследование влияния полиакриламидных гелей на биологические жидкости и в первую очередь на кровь человека. Обнаружена высокая жизнеспособность лейкоцитов крови *in vitro* при различной концентрации полиакриламидного геля. Для биологической оценки кинетики биодеструкции гелей были использованы крысы линии VISTAR. Гель со сниженной степенью сшивки по сравнению со стандартным образцом в значительно меньшей степени сохраняет гомогенность. В нем имеются мелкие и крупные вакуоли, причем не только в пристеночном слое, но и в центральном участке. Имеются также многочисленные другие отличия, в частности, увеличенное количество нейтрофильных лейкоцитов в капсуле. На 30-е сутки такой слабо-сшитый гель ни у одного животного на месте имплантации обнаружен не был. При гистологическом изучении в жировой клетчатке на месте введения геля остается лишь незначительная инфильтрация, видны единичные гигантские клетки. Включения геля отсутствуют. По сравнению с этим основная масса стандартного геля «Аргиформ», который имплантирован подкожно путем инъекции, не подвергается деградации. Только его краевые (периферические) слои вблизи образующейся соединительно-тканной капсулы подвергаются лизису и резорбции макрофагальными клетками, а на поздних сроках – незначительно выраженному прорастанию соединительно-тканными клетками в узком пространстве капсулы.

Биодеградация образца геля «Аргиформ» со сниженной степенью сшивки («жидкий» гель) протекает значительно интенсивнее. Уже через 7 суток в имплантате возникают области просветления, вакуолизации, фибриллизации, а также макрофагальной инфильтрации и резорбции геля. К 14 суткам гель в основном резорбируется и остаются лишь отдельные небольшие его фрагменты. Через 30 суток после имплантации гель на месте введения не обнаруживается. Отсутствие дистрофических изменений в тканях свидетельствует о том, что продукты биодеградации геля не вызывают токсикологического воздействия.

Проведенные эксперименты с различным содержанием сухого остатка, соотношением реагентов и дозой облучения показали, что для всех образцов геля с содержанием сухого остатка менее 3%, независимо от дозы γ -облучения, происходит достаточно быстрая резорбция геля. Для гелей с содержанием сухого остатка более 3%, при соотношении АА:МБАА менее 100:1, влияние γ -облучения на формирование макроструктуры и на кинетику рассасывания более значительно (рис. 11).

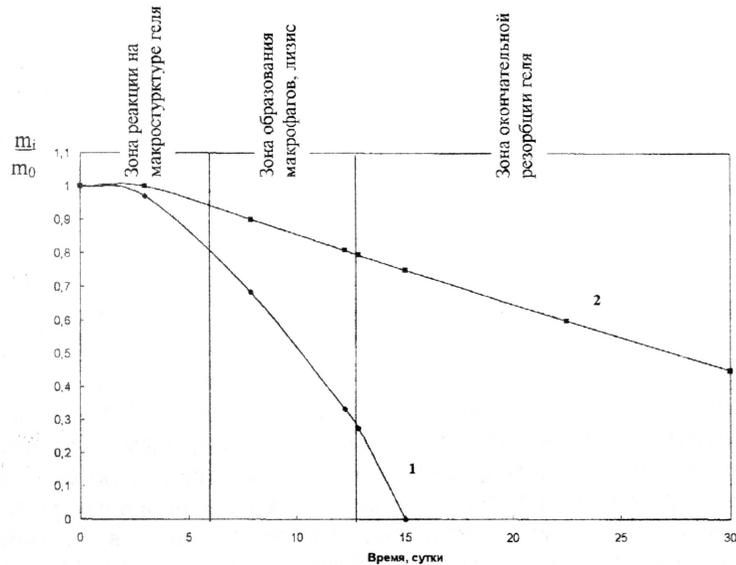


Рис. 11. Потеря массы полимера при биодеградации в зависимости от строения полимера.
1-сополимер АА:МБА, 100:1,0, содержание сухого остатка 3,2% масс.
2-сополимер АА:МБА, 100:1,0, содержание сухого остатка 2,2% масс.

При использовании стандартных образцов геля длительные наблюдения за пациентами показали, что при отсутствии воспалительных процессов гель может долгое время находиться без видимой резорбции. В качестве примера представим снимки УЗИ, сделанные пациентке Н... 25.11.2003 г., гель вводили 10.11.1999 г. в область правой и левой щеки в количестве 1-2 мл фрагментарно, подкожно. Гель находится в тканях без изменения, сосудистый рисунок не изменен, резорбция не наблюдается. Для полиакриламидных гелей,

выпускаемых под торговой маркой «Формакирил», существуют еще более длительные наблюдения их нахождения в организме без видимой биодеградации.

Таким образом, изменяя условия синтеза и технологические условия стадий получения полиакриламидных имплантатов, тем самым, изменяя микро- и макроструктуру геля, можно добиться различного, заранее спланированного времени нахождения имплантата в организме в зависимости от области применения его в медицине. Это было использовано при создании различных эндопротезов на основе полиакриламидных гелей.

VIII. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕЛЕОБРАЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ЛИЦЕВОЙ ПЛАСТИКИ, ПЛАСТИКИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ И МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

В московские клиники пластической хирургии ежегодно обращаются за помощью, требующей применения препаратов на основе специальных гелей, около двухсот тысяч человек. В настоящее время во многих видах хирургического лечения активно развивается использование методов имплантации путем инъекций. Они позволяют проводить практически бескровные операции при минимальном обезболивании. Гели для пластики лица должны обладать высокой пластичностью для того, чтобы их легко можно было вводить подкожно через тонкие иглы. Для пластики мягких тканей (икроножных мышц, голени, провала грудины при синдроме Поланда) необходимо использовать более плотный гель, от которого не требуется высокой текучести, поскольку он может вводиться через толстые иглы. От этого геля требуется более высокая формоустойчивость (из-за введения больших объемов) и стабильность.

В результате проведенных исследований налажен промышленный выпуск целого ряда композиционных полиакриламидных гелей медицинского назначения. К ним относятся:

Композиция «Формакирил». Ее производит ФГУП «НИИ резиновых и латексных изделий» в Москве. Она разрешена к применению Минздравом РФ также в 1995 г. В 1999 г. она получила в Италии европейский сертификат и разрешена к применению в Европе.

Гель «Космогель», аналог геля «Формакирил», воспроизведен в Москве, разрешен к применению Минздравом РФ в 1999 г.

В настоящее время в объединении ФГУП «НИИР» на основании проведенного комплекса исследований в данной работе создано новое поколение гелей, обладающих бактерицидными свойствами. Один из таких гелей «Аргиформ» прошел все циклы необходимых санитарно-химических, токсикологических и клинических испытаний. Были выполнены и тщательные гистологические исследования. В 2000 г. препарат «Аргиформ» был разрешен Минздравом РФ для практического применения в медучреждениях. В настоящее время он выпускается в стерильных одноразовых шприцах в виде трех торговых марок.

В данном разделе диссертации описаны результаты морфологических исследований биоптатов, полученных во время повторных операций, связанных

с маммопластикой силиконовыми эндопротезами. Повторные операции осуществлялись путем открытой капсулотомии с использованием нового полиакриламидного геля «Формакирил». Конкретно изучались отдаленные результаты эндопротезирования молочных желез однотипными силиконовыми протезами, наполненными силиконовым гелем, а также возможность замены силиконового геля на полиакриламидный гель.

Постановка данной задачи связана с тем, что через оболочку силиконового протеза, наполненную силиконовым гелем, диффундируют низкомолекулярные олигомеры, что служит одной из основных причин возникновения контрактальной реакции мягких тканей. Это проявляется в возникновении капсулярных контрактур и фиброзов. Одним из путей предупреждения капсулярных контрактур и фиброзов является замена силиконового геля на созданный в данной работе и выпускаемый фирмой "Гель косметик технологий" (Москва) полиакриламидный гель "Формакирил". В результате проведенных исследований для эндопротезирования был рекомендован "Формакирил", состоящий из 95 % воды и 5 % сополимера, со следующими свойствами: показатель преломления - 1.334 ± 1.338 , pH $7 \div 8.5$, окисляемость - 2.0. "Формакирил" при открытой капсулотомии используется в двух вариантах: в виде эндопротеза с силиконовой оболочкой и путем отсроченного введения в заранее подготовленную субмаммарную полость. Косметический эффект, полученный от использования Формакирила, объективно и субъективно оценен положительно.

Основная задача заключалась в создании эндопротеза молочной железы, который не вызывает образования фиброзной ткани даже при диффузии наполнителя через оболочку, и не требует срочного проведения операции по удалению протеза в случае его повреждения. В результате в ходе выполнения данной работы разработаны эндопротезы молочной железы, содержащие эластичную оболочку и наполнитель, который выполнен в виде геля на основе сополимера акриламида и N,N'-метилденбисакриламида в массовом соотношении 100:0.5-5.0, содержащего слабо щелочную воду, при следующем соотношении компонентов, мас. %: сополимера 4.0-8.0, воды 92.0-96.0, имеющего pH 6.9-8.5, уровень перманганатной окисляемости не выше 1,0 мгО/л, уровень бромлируемости не выше 3.0 мгВг/л. Оболочка эндопротеза может быть выполнена из силиконового каучука, коллагена или поливинилового спирта.

Были проведены санитарно-химические испытания гелеобразного наполнителя в Научно-исследовательском институте резиновых и латексных изделий (НИИР), токсикологические и патоморфологические исследования в Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова и во Всероссийском научно-исследовательском институте испытаний мед. техники (ВНИИИМТ) по программе, разработанной ВНИИИМТ. Испытаниями установлено, что такой материал не вызывает тканевой реакции, не вызывает сенсibilизации организма, не является мутагенным, не вызывает дистрофических и некротических изменений, и рекомендован для эндопротезирования.

К настоящему времени уже выполнено более 300 операций маммопластики с использованием предлагаемых эндопротезов. Больных наблюдали в течение 6-12 месяцев. Фиброзных образований не обнаружено. Предлагаемые эндопротезы за счет плотности наполнителя, близкой к плотности молочной железы, позволяют обеспечивать хороший косметический эффект. Кроме того, за счет биологической интактности наполнителя предлагаемые эндопротезы не вызывают фиброзов и не требуют проведения срочной операции в случае повреждения оболочки эндопротеза при травме.

В настоящее время гель «Формакирил» эффективно используется для корригирующей контурной пластики мягких тканей лица, конечностей и других частей тела, в качестве эспандеров для дермотензии, тампонирования полостей и т. д. Тканевая реакция на имплантацию «Формакирила» минимальна: воспалительная реакция в ранние сроки очень мала, фибробластическая реакция слабо выражена, капсула в поздние сроки остается тонкой. Резорбция геля макрофагами и прорастание его соединительной тканью происходит медленно и только в прикапсульном слое. Высокая биосовместимость геля «Формакирил» позволяет вводить реципиенту относительно большой его объем.

Получение предлагаемого материала и клинический эффект демонстрируется на ряде примеров конкретного выполнения и лечения (введение геля вместо силиконового протеза, использование для пластики икроножной мышцы и т. д.). Приведенные примеры подтверждают возможность получения гелеобразного материала и его использования для пластики мягких тканей.

IX. ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ В ОРТОПЕДИИ

Проблемы, решаемые в ортопедии с помощью имплантатов, можно подразделить на две основные категории. Первая – это болезни, связанные с потерей подвижности суставов (артриты, артрозы) и вторая – нарушение целостности костного скелета при травмах. Решением проблем, связанных с потерей подвижности суставов, с помощью гелей начали заниматься в последние 15 лет. Потеря подвижности суставов связана с изменением химического состава синовиальной жидкости, находящейся в нем.

IX.1. Свойства синовиальной жидкости человека и возможности ее замены гидрогелем

Для того, чтобы понять, каким образом предпочтительно строить структуру гидрогеля, предназначенного для использования в качестве эндопротеза суставной жидкости, необходимо было изучить поведение реальной суставной жидкости в модельных условиях, приближенным к условиям ее работы в суставах. Поэтому в первую очередь было проведено исследование физико-механических свойств суставной жидкости (СЖ) человека. Известно, что указанный биологический объект работает в экстремальных условиях: больших нагрузках, деформациях и скоростях изменения деформаций. По существу, сустав представляет собой пример упруго-гидродинамического контакта

(УГДК), созданного природой, в котором развиваются значительные контактные и гидродинамические давления. При изменении давления такие свойства СЖ, как сжимаемость, плотность, вязкость и др., изменяются. Для анализа механического поведения суставной жидкости желательнее воссоздать реальные условия эксплуатации СЖ в суставе человека, что сделано с помощью разработанной новой системы Микро-РVT.

Установка позволяет определять барические зависимости сжимаемости для образцов суставной жидкости и температурные зависимости изотермической сжимаемости. Найдено, что для суставной жидкости характерна температурная стабильность сжимаемости (при давлении 100 МПа температурная зависимость сжимаемости суставной жидкости практически отсутствует).

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что для суставной жидкости характерна температурная стабильность физико-механических свойств и высокая лабильность: быстрое реагирование реологических свойств на величину приложенной нагрузки. Вместе с тем пространственные структуры на основе гиалуроновой кислоты остаются стабильными для суставной жидкости только при температурах жизнедеятельности человеческого организма вплоть до давлений 160 МПа, обеспечивая тем самым надежную работу суставов при высоких нагрузках.

Проведено сравнение механического поведения синовиальной жидкости с поведением полиакриламидных гидрогелей в тех же условиях эксперимента. На рис. 12 показаны зависимости относительного объема от давления (барические зависимости) для синовиальной жидкости и для геля "Аргиформ". Видна практически полная аналогия в изменении относительного объема синовиальной жидкости человека и геля "Аргиформ"

как при температуре 34°C (рис. 12, а), так и при температуре человеческого тела 37°C (рис. 12, б). Это создает предпосылки для успешного применения геля "Аргиформ" в качестве заменителя синовиальной жидкости, учитывая также, что именно этот гель обладает наилучшей способностью препятствовать воспалительным процессам.

IX. 2. Изучение биологических и биохимических свойств полиакриламидного геля в качестве хондропротектора синовиальной жидкости

В этом разделе рассмотрены результаты анализа суставных тканей скакательного сустава кролика после внутрисуставного введения геля «Аргиформ», а затем проанализировано механическое поведение суставной жидкости человека и проведено сравнение его с механическими свойствами гидрогеля.

Для того чтобы вызвать максимальную реакцию суставных тканей на введение геля, в полость сустава намеренно вводилось максимальное количество геля «Аргиформ». Учитывая, что объем скакательного сустава кролика приблизительно в 20 раз меньше коленного сустава человека, вводимый объем геля (1мл) соответствует около 20 мл у человека, т. е. во много раз больше, чем предполагаемое количество вводимого геля в клинике.

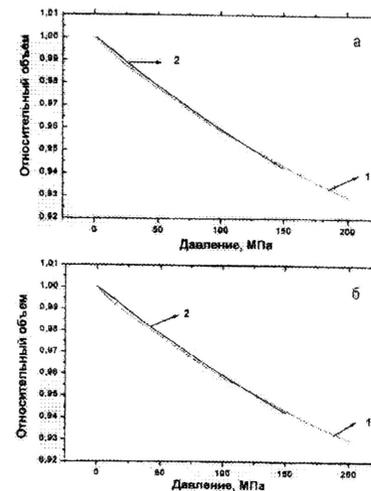


Рис. 12. Зависимость относительного объема от давления при температуре 34°C (а) и 37°C (б)
1- «Аргиформ»; 2- синовиальная жидкость.

По данным микроскопического изучения гель образовывал единую субстанцию с синовиальной жидкостью сустава. Начиная с 7 суток, содержание геля в суставной полости постепенно уменьшалось и к 1 месяцу макроскопически оставалось минимальным. Цитологически через 1-3 суток после введения гель сохранял гомогенность, но с 7 суток в нем усиливается вакуолизация и фибрилизация, что свидетельствует о его частном лизисе. Этот процесс усиливается к 14 суткам и завершается к 1-3 месяцам.

Резорбция геля в основном осуществляется синовиоцитами. В норме синовиоциты (кроющие клетки синовиальной оболочки) состоят из двух популяций: А-клетки макрофагального генеза и В-клетки фибробластического генеза. По данным цитологического исследования фагоцитоз геля начинается уже на 1 сутки, усиливается на 3-14 сутки и осуществляется в основном А-клетками, выселяющимися в полость сустава, и в значительно меньшей степени макрофагами гематогенного происхождения (из моноцитов крови).

После введения геля общее число клеток в мазках значительно возрастает: в интактных суставах в среднем 2.5 в поле зрения, через 1-3 суток – 16.6 и 18.4 клетки соответственно. Этот рост идет преимущественно за счет фагоцитирующих синовиоцитов. К 7 и 14 суткам количество клеток уменьшается (8.5 и 6.5 соответственно), а к 1-месяцам нормализуется, что связано с завершением фагоцитоза геля.

Нейтрофильные лейкоциты в мазке, в норме составляющие 0.7 % всех клеток синовиальной жидкости, через 1 и 3 суток после введения геля составляют соответственно 3.3 и 3.1 % клеток. Это говорит о том, что асептическая воспалительная реакция синовиальной оболочки выражена очень слабо и быстро нивелируется: через 14 суток нейтрофилы составляют 1.3 %, а через 1 месяц – 0.9 %.

Гистологическое и гистохимическое исследование подтверждает и дополняет цитологические данные. Через 1-3 суток в синовиальной оболочке не

обнаруживается заметных воспалительных изменений. Отсутствует отек и сосудистая реакция, характерная для синовита. Нейтрофильная инфильтрация минимальна. Тканевая реакция на введение геля заключается в очаговой гиперплазии синовиоцитов, в основном за счет макрофагальных А-клеток, участвующих в фагоцитозе геля.

На 3 сутки формируются небольшие участки утолщения слоя синовиоцитов (кроющего слоя), которые увеличиваются в объеме к 7 суткам. В этих участках происходит резорбция геля, образуются пенные клетки. Однако воспалительная реакция не усиливается.

В последующие сроки (от 10 суток до 3-х месяцев) у большинства животных структура синовиальной оболочки постепенно полностью нормализуется, но у отдельных животных выявляются участки гиперплазии слоя синовиоцитов с резорбцией там геля. Через 6 месяцев у одного животного выявлялись небольшие участки фиброза поверхностного слоя синовиальной оболочки.

Следует отметить, что гистохимическое исследование во все сроки наблюдения не выявило изменений содержания РНК и синтеза кислых гликозаминогликан в синовиоцитах, что свидетельствует о полной сохранности их биосинтетической функции. Суставной хрящ во все сроки наблюдения по структурным и гистохимическим особенностям не имел никаких отличий от хряща интактных суставов. Учитывая, что питание хрящевой ткани частично осуществляется через диффузию веществ из синовиальной жидкости, отсутствие дистрофических изменений в хряще свидетельствует о том, что введение геля в суставную полость не отражается на ее метаболизме.

Таким образом, внутрисуставное введение геля «Аргиформ» даже в большом объеме не приводит к развитию воспалительного процесса в синовиальной оболочке (синовите) и дистрофического процесса в хрящевой ткани. Тканевая реакция на введение геля в сустав минимальна и сводится в основном к гиперплазии и выселению в суставную полость синовиоцитов типа А (макрофагального генеза), осуществляющих постепенную резорбцию геля. С синовиальной оболочкой гель, по-видимому, образует комплексное соединение, которое не ухудшает метаболизм суставных тканей.

В последние годы нами в Научном центре «Биоформ», в сотрудничестве с учеными Московского областного научно-исследовательского клинического института им. М. С. Владимирского (МОНКИ), проводилась разработка нового препарата для замещения синовиальной жидкости. В результате более чем четырехлетних исследований был создан препарат Noltrex™, предназначенный для лечения остеоартроза. Этот препарат является разновидностью геля «Аргиформ». Синтетическое происхождение и матричная структура Noltrex™ кардинально отличает его от всех препаратов, восстанавливающих вязкость синовиальной жидкости, существующих сегодня. Благодаря уникальным свойствам лежащего в основе Noltrex™ сетчатого полиакриламидного полимера, не являющегося естественным метаболитом, срок клинического результата по сравнению с другими препаратами увеличился более чем в 5 раз. Noltrex™ доказал свою эффективность в 90% наблюдений. За 4 года исследований было произведено более 2000

внутрисуставных инъекций препарата в различных странах мира и получено множество благодарностей как от докторов, так и от пациентов.

На сегодняшний день ведущие мировые производители проявили интерес к российской разработке и готовы начать производство данного препарата по лицензии Научного центра «Биоформ» за рубежом. В настоящее время Noltrex™ проходит регистрацию в европейском сертификационном центре на соответствие мировым стандартам. Выход Noltrex™ на европейский рынок произошел в первом полугодии 2004 года.

При введении Noltrex™ на первом этапе, в результате увеличения вязкости синовиальной жидкости, происходит физическое разведение соприкасающихся и трущихся поверхностей сустава, пораженного остеоартрозом. Уменьшаются боли, улучшается подвижность сустава. На втором этапе, за счет уникальных гидрофильных свойств, Noltrex™ как губка вбирает в себя суставную жидкость и воду из хряща и субхондральной кости, обеспечивая декомпрессию болевых окончаний. На третьем этапе биохимические фрагменты суставной жидкости – ферменты воспаления и протеолиза – адсорбируются и фиксируются на строго ориентированных активных центрах полимера. Одновременно с этим происходит миграция ионов серебра в поверхности сустава, в результате чего происходит подавление эндогенной инфекции. В процессе взаимодействия Noltrex™ с синовиальной жидкостью происходит полное замещение водного состава Noltrex™ в своей матрице на суставную жидкость, которая удерживается молекулярной сеткой полимера.

IX.3. Протезы костной ткани на основе полиакриламидных гелей.

Одним из перспективных направлений в создании эндопротезов костной ткани является получение материалов, обеспечивающих ее регенерацию. С этой целью в работе был синтезирован сетчатый полимер с размером частиц микроструктуры 280-300 нм, который получали сополимеризацией АА:МБАА в соотношении 100:0.8. Для создания композиции использовали мелкодисперсный гидроксиапатит с размером частиц 200-250 нм.

Для специального синтеза наполненных полиакриламидных гелей были разработаны особые методы катализа. В результате стало возможным проводить реакцию сополимеризации в течение 12-16 минут при 50-70°C. Реакция происходит без расслаивания при введении в реакционную массу до 0.3 % гидроксиапатита. Полученный таким образом полиакриламидный гель после проведения разнообразных физико-химических, санитарно-химических, токсикологических и других исследований был испытан на животных. В места переломов подопытным животным инъекционным путем вводили наполненный гель. Пробы живых тканей у животных для морфологических и гистологических исследований отбирали через каждые две недели. Морфологические исследования показали, что через два месяца происходит полная регенерация костной ткани и гель исчезает (при естественной регенерации костной ткани процесс длится не менее 6 месяцев). Таким образом, создан оригинальный терапевтический метод лечения переломов и травм путем атравматического инвазивного введения гелеобразного композита.

X. ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В УРОЛОГИИ

Одной из причин физического и морального дискомфорта у людей пожилого возраста является непроизвольное мочеиспускание. В последнее время урологами были освоены в клинической практике атравматические методики лечения этого недуга с помощью инъекций гидрогелей. В данном разделе описан разработанный нами и серийно производимый в виде водного геля новый материал с торговой маркой «DAM+». Изложены основные параметры технологии его производства. Применение «DAM+» позволило врачам с надежным результатом избавлять женщин от недержания мочи. Разработаны методики с использованием инъекций гелей этой композиции для лечения недержания мочи у мужчин и методики ликвидации детского рефлюкса, т. е. обратного тока мочи в почки.

Метод лечения основан на увеличении объема мягких тканей в области уретры путем инъекций. После инъекции геля внутрь ткани объем ее увеличивается, что приводит к смыканию просвета уретры. Для фиксации и закрепления терапевтического эффекта гель должен быть подобран так, чтобы он длительное время оставался в той области, куда он был введен.

Материал в виде геля для лечения недержания мочи инъекционным методом должен обладать рядом особых свойств, важнейшие из которых следующие: стерильность, нетоксичность, бактерицидность, биологическая инертность, минимальная реакция с окружающими тканями, фиксированная вязкость, физическая и химическая стабильность, полное отсутствие фиброобразования в окружающих тканях и другие. В ФГУП НИИР на основе полифункциональной полимерной композиции «Аргиформ» нами разработана и освоена в производстве композиция, практически полностью удовлетворяющая всем указанным выше требованиям, предъявляемым к вязким препаратам для инъекционного лечения непроизвольного мочеиспускания. Эта новая композиция включает полиакриламидный гель, добавки других компонентов и содержит ионы серебра. Урологическую композицию в специальной выпускной форме поставляют в медицинские учреждения и распространяют на рынке медицинских изделий под торговой маркой «DAM+». Материал сертифицирован Ростестом Госсанэпиднадзора (сертификат № 42/2000-2358). Во избежание дестерилизации материал выпускают только в одноразовой упаковке. Индивидуальная упаковка – шприцы с иглами, она выполнена согласно рекомендациям и стандартам ИСО.

Медицинские испытания DAM+ проведены в медучреждениях Москвы и Санкт-Петербурга. В Москве в клинике кафедры урологии Московского медико-стоматологического университета в период с января 2001 по январь 2002 года сделаны инъекции 35 женщинам. В 82,8 % случаев наступило полное излечение, в 14,2 % - частичное. Только у одной пациентки вернулись симптомы недержания мочи. Ни в одном случае не было отмечено миграции или резорбции геля. В 2002 году разрешено использование DAM+ в медицинских учреждениях.

XI. ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЕ ГЕЛИ В КАЧЕСТВЕ ДЕПО ДЛЯ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК В ОРГАНИЗМЕ ПРИ ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ РАЗЛИЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Методика ксенотрансплантации известна сравнительно давно. Суть этого метода, на примере лечения раковых опухолей, можно представить следующим образом. Иммунная система организма больного человека не распознает свои раковые клетки, которые по существу уже являются чужеродными, и поэтому не борется с ними. При введении чужих раковых клеток (ксенотрансплантация) организм сразу же распознает их и начинает уничтожать. Однако после того как организм уничтожит чужие клетки, он перестает распознавать свои. Многократное повторение этой операции приводит к сбою иммунной защиты организма и прогрессированию болезни.

Для того, чтобы этот метод стал дееспособным, необходимо создать некую капсулу, сохраняющую жизнедеятельность чужеродных клеток в организме. До настоящего момента этого сделать не удавалось. Сложность заключается в том, что в эту капсулу должны поступать с тканевой жидкостью питательные вещества для жизнедеятельности клеток, а из нее уходить продукты их жизнедеятельности.

В результате проведенной работы удалось создать определенную структуру геля, позволяющую сформировать вокруг себя тонкую тканевую капсулу, не разрешающую иммунной системе организма уничтожать чужеродные клетки. При этом, вещества, необходимые для их жизнедеятельности, легко проникают внутрь «блок-капсулы». Гистологические исследования показали, что она представляет собой двухслойную оболочку из белковой ткани и макроструктуры геля. Создание такой капсулы позволило успешно начать работу по клеточной терапии таких заболеваний как андрология (мужское бесплодие), иммунология (иммунотерапия), онкология (вакцинация и терапия), эндокринология (лечение сахарного диабета I типа). На сегодняшний день исследования по применению полиакриламидного геля для создания блок-капсулы в качестве полуприродного барьера для иммунной защиты клеток проводятся во всех указанных выше областях. Наибольшие успехи достигнуты в области лечения онкологических заболеваний. Полиакриламидный гель разрешен Минздравом России для проведения расширенных испытаний в онкологических клиниках.

XI.1. Экспериментальная апробация нового подхода к иммунотерапии рака

В данном разделе описано влияние опухолевых ксенотрансплантатов человека, инкубированных в полиакриламидный гель (ПААГ), на рост перевивного опухолевого штамма мышей – меланомы B16. В качестве ксенотрансплантатов в экспериментах использовали клетки меланомы человека (первичные и перевивные клеточные культуры).

В каждой серии экспериментов было сформировано по 3 группы животных: 1 группа (1-ый контроль) – животные + опухолевый штамм; 2 группа (2-ой контроль) – животные + ПААГ + опухолевый штамм; 3 группа (опытная) – мыши + ПААГ с ксенотрансплантатами опухолевых клеток человека + опухолевый штамм мышей. Каждая группа включала 5-15 голов мышей. В работе придерживались следующей схемы опыта (табл. 4): мышам группы 2 и 3 подкожно вводили ПААГ в объеме 0.5 мл в область грудной клетки слева. Через 6-8 недель после формирования соединительнотканной капсулы вокруг геля животным опытной группы 3 подсаживали в ПААГ клетки меланомы человека из первичных и перевивных культур. Через 6-8 недель после этой процедуры мышам всех групп (1-3) перевивали контрлатерально опухолевый штамм мышей В16.

Противоопухолевую эффективность гетеротрансплантатов оценивали по:

- кинетическим показателям роста перевивных опухолей мышей (В16) в опытных и контрольных группах;
- торможению роста опухолей (ТРО, %), вычисляемого по формуле:

$$(V_{\text{конт}} - V_{\text{оп}}) / V_{\text{конт}}$$

(V – объем опухолей в мм³);

- средней продолжительности жизни (СПЖ, сутки);

- увеличению средней продолжительности жизни (УСПЖ, %), которую рассчитывали по формуле:

$$(СПЖ_{\text{оп}} - СПЖ_{\text{конт}}) / СПЖ_{\text{конт}}$$

Таблица 4. Схема экспериментов по исследованию влияния клеток меланомы человека, инкапсулированных в ПААГ, на рост перевивного опухолевого штамма мышей меланомы В16.

| Этапы проведения экспериментов Группы животных | I (0 нед.) | II (6 нед.) | III (12 нед.) | IV (13-19 нед.) |
|---|------------|---------------------|---|---|
| | | Введение ПААГ мышам | Ксенотрансплантация в ПААГ опухолевых клеток человека (2 млн. кл./мышь) | Прививка мышам опухолевого штамма (1 млн. кл./мышь) |
| 1 | - | - | + | + |
| 2 | + | - | + | + |
| 3 | + | + | + | + |

Проведено 3 серии экспериментов с ксенотрансплантатами меланомы кожи человека, из них 2 – с использованием первичных культур опухолевых клеток (операционный материал), 1 – перевивной клеточной линии меланомы человека SKML-28. Работа проведена на 135 мышах-самках линии BDF₁ и 30 мышах-самках линии C₅₇Bl. Показано, что сам ПААГ несколько тормозит развитие вышеперечисленных опухолевых штаммов. Клетки меланомы человека (первичные и перевивные), помещенные в ПААГ, вызывают биологически значимое торможение роста меланомы В16. При этом, величина ТРО несколько выше, а противоопухолевый эффект более продолжителен в случае использования в качестве ксенотрансплантата первичной культуры клеток меланомы человека.

XI.2. Результаты клинического исследования переносимости метода ксеногенной вакцинации у больных метастатической меланомой

В данном разделе описаны результаты оценки переносимости ксеногенной противоопухолевой вакцинации у больных с метастатической меланомой. Испытываемыми средствами являлись полиакриламидный гель (ПААГ) производства ООО “Витагель” и культуры клеток меланомы мыши В-16 (ПКММ В-16) производства ЗАО “Русские биотехнологии”, представляющие собой стерильно приготовленную взвесь живых опухолевых клеток меланомы В-16 в концентрации 50 млн клеток в 1 мл среды. Общий объем препарата для одного введения составлял 2 мл.

В испытаниях был включен 21 пациент с гистологически верифицированным диагнозом меланома 4-й стадии. На первом этапе больным под контролем УЗИ производилось подкожное введение полиакриламидного геля в объеме 5 мл в окологлобаторную область спины. Перед введением геля на УЗИ оценивали толщину подкожно-жировой клетчатки, которая составила от 5 до 20 мм. Гель вводили под контролем УЗИ в центр толщи подкожно-жировой клетчатки под местной анестезией 2% раствором лидокаина 2,0. После введения геля ультразвуковая картина представляла собой гипоэхогенное образование округло-овальной формы размером от 25×12 мм до 35×20 мм. Состояние созданного депо оценивали через 14 дней после введения геля. Ультразвуковая картина созданного депо имела два варианта строения: 1-й у пациентов с подкожно-жировой клетчаткой, не превышающей 5мм, эхографическая картина сформированного депо представляла гиперэхогенную полость толщиной 4-5 мм, без четких контуров и выраженной капсулы. 2-й вариант отмечен у пациентов с толщиной подкожно-жировой клетчатки до 20 мм. Созданное депо выглядело как образование удлиненно-овоидной формы гиперэхогенной структуры с четко сформированной капсулой толщиной не более 0,5 мм. После предварительной оценки формирования капсулы в месте инъекции геля выполнялось введение препарата ПКММ В-16 на 21-28 сутки под контролем УЗИ через шприц в объеме 2 мл. После введения в депо вакцины оно сохраняло свою форму и размеры, а введенный препарат выглядел как бесформенное гипоэхогенное образование без четких контуров размерами 15-17×6-8 мм, не выходящее за пределы созданного депо. У ряда пациентов оценивали сформированное депо через три недели после вакцинации, при этом отмечалось незначительное увеличение размеров созданного депо с уплотнением структуры. Данный вид лечения проводился больному однократно. Токсико-аллергических и воспалительных реакций на введение полиакриламидного геля (ПААГ) не отмечено.

Оценивая результаты проведенного клинического исследования переносимости метода ксеногенной вакцинации, следует отметить отсутствие тяжелых местных и общих токсических реакций после вакцинации в сроки от 1 до 8 мес. Результативность профилактической направленности метода ксеногенной вакцинации по времени безрецидивного течения и выживаемости оценить пока затруднительно, однако следует отметить стабилизацию процесса

и отсутствие признаков дальнейшей генерализации при малых сроках наблюдения у 90% больных, однако у 10% больных отмечено дальнейшее прогрессирование процесса, приведшее к гибели пациентов. Таким образом, отмеченные выше положительные результаты дают основание для продолжения исследований по данной тематике с целью определения противоопухолевой эффективности метода у больных с меланомой.

XI.3. Применение полиакриламидных гелей в качестве депо для ксеногенных клеток при лечении инсулино-зависимого диабета I-го типа

Для формирования блок-капсулы в теле крыс был выбран полиакриламидный гель, полученный сополимеризацией АА:МБАА в соотношении 100:1.5, доза облучения после синтеза составляла 0.2 Мрад. После введения животным в течение 2-х месяцев вокруг геля формировалась блок-капсула. Предварительно эти животные подвергались действию стрептозоцина для разрушения у них поджелудочной железы. В гелево-тканную капсулу вводили β -клетки, полученные из поджелудочной железы здоровых кроликов. В течение времени проведения эксперимента у животных регулярно проверяли содержание инсулина в крови. Установлено, что уже на 30-е сутки у животных с β -клетками в блок-капсуле наблюдается резкий рост содержания инсулина в крови (рис. 13).

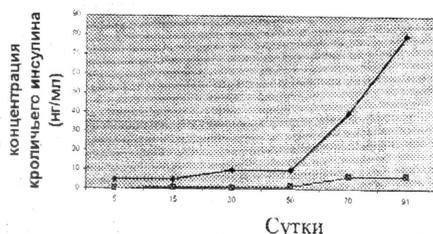


Рис. 13 Уровень кроличьего инсулина в сыворотке крыс после инъекции

Таким образом, подтверждено, что полиакриламидные гели, полученные определенным образом, могут быть успешно использованы в качестве депо для ксеногенных клеток. Несомненно, что исследования по формированию блок-капсул на основе полиакриламидных гелей различной структуры для ксенотерапии должны продолжаться и развиваться.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных комплексных физико-химических исследований, включающих спектральные, термомеханические, хроматографические, кинетические и компьютерное моделирование, изучены структурные превращения молекулярных сеток сополимеров акриламида и N,N' -метиленбисакриламида в зависимости от условий их получения, что дало возможность разработать систему подходов и приемов, позволяющих

целенаправленно и постадийно формировать многоуровневую структуру полиакриламидных гелей.

2. Установлено, что микроструктура полиакриламидных гелей формируется на начальной стадии полимеризации до гелеобразования, а размеры образующихся микрочастиц зависят от условий проведения этой стадии. Формирование макроструктуры происходит на второй стадии, после потери текучести реакционной массы за счет перераспределения водородных и химических связей между микрочастицами геля. Выявлены закономерности процесса формирования структуры и свойств полимера на всех стадиях его получения и переработки, включая отмывку, расфасовку, стерилизацию и другие технологические стадии.

3. Изучена кинетика набухания полученных полиакриламидных гелей медицинского назначения и показано, что при увеличении доли сшивающего агента от 1 до 2 вес. % размер межузловых фрагментов сначала возрастает, но при росте доли сшивающего агента от 2 до 5 вес. % расстояние между узлами сшивки остается примерно постоянным и изменяется лишь скорость набухания, которая оценена с помощью предложенного математического аппарата. Количество свободной и связанной воды при этом также практически не меняется.

4. Создана автоматизированная установка для анализа поведения жидкостей при изменении давления и температуры. Измерения показали практически полную аналогию в изменении относительного объема синовиальной жидкости человека и геля "Аргиформ". Разработан гель NoltrexTM (разновидность Аргиформа), широко применяемый в медицинской практике в качестве заменителя синовиальной жидкости при лечении артрозов и артритов.

5. Изучены механические релаксационные свойства полиакриламидных гидрогелей, применяемых в медицине, и показано, что в результате первичного γ -облучения исходных гелей квазиравновесный модуль высокоэластичности повышается, а квазиравновесная податливость снижается; при дальнейшей обработке в автоклаве при 120°C наблюдается обратная картина. Повторное γ -облучение гелей после автоклавирования, необходимого для их стерилизации, вновь приводит к заметному увеличению модуля и снижению податливости.

6. Проведено детальное сравнительное исследование структуры и свойств гелей «Биофарм» и «Аргиформ» методами ЯМР-спектроскопии, ДСК, измерениями набухания, релаксации напряжения и ползучести. Показано, что «Аргиформ» обладает повышенной способностью к релаксации напряжения и ползучести, а также к набуханию по сравнению с гелем «Биофарм», обладает более редкой и дефектной сеткой химических связей. В области температур 10-20°C в гелях наблюдается безактивационный переход, связанный с изменением структуры воды. Основной массив геля «Аргиформ» практически не подвергается биодеструкции и не вызывает воспалительных явлений в организме.

7. Дан математический аппарат для описания кинетики набухания, основанный на рассмотрении данного процесса как релаксационного, сопровождающегося

изменением коэффициента диффузии во времени. С помощью данного аппарата найдены кинетические параметры процесса набухания гелей.

8. В результате гистологических и морфологических исследований гелей при их имплантации выявлены закономерности влияния строения микро- и макроструктуры гелей на тканевую реакцию, что позволило получить гидрогели, которые при введении в организм обладают длительной формоустойчивостью, не вызывают кальциноза, дистрофии и фибриллизации тканей, а также негативных иммунных реакций.

9. Разработанные методы подхода к формированию структуры геля позволили строго и целенаправленно программировать и формировать биологическое поведение материала в организме и, что особенно важно, прогнозировать время его биодеструкции с последующим метаболизмом фрагментов биодеструктированного полимера из организма по определенной биохимической схеме. Установлено, что гели с более частой сеткой (соотношение акриламида и N,N'-метиленабисакриламида от 100:1 до 100:4) могут находиться в организме не менее 5 лет без видимой биодеструкции. После этого срока при биодеструкции образуются микрочастицы гелей, которые легко выводятся из организма естественным путем через почки.

10. Организовано промышленное производство гидрогелей медицинского назначения под торговыми марками «Биофарм», «Формакирил», «Аргиформ», «Космогель», «Лик» «NoltrexTM», «ДАМ+», «Витагель», предназначенных для пластики мягких тканей, применения в урологии, для замены синовиальной жидкости в суставах, для реконструкции костных тканей и т. д.

11. Показана возможность применения полиакриламидных гелей со специально созданной структурой в качестве депо для ксеногенных клеток при проведении клеточной терапии во время заболеваний иммунного типа (онкологии, сахарного диабета, андрологии и т. д.). Результаты клинического исследования переносимости метода ксеногенной вакцинации у людей, больных метастатической меланомой, показали, что при введении геля «Витагель» процесс роста опухоли стабилизируется и отсутствуют признаки дальнейшей генерализации у 90 % больных. Получено разрешение Минздрава РФ на проведение расширенных испытаний в данной области.

ПРИЛОЖЕНИЯ

В приложении представлено 30 документов содержащих протоколы медицинских испытаний, разрешения Минздрава РФ на их использование, гигиенические и квалификационные сертификаты, лицензии и технические условия на их производство и регистрационное удостоверение на их применение.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Лопатин В. В. Полиакриламидные материалы для эндопротезирования и их место в ряду материалов медицинского назначения. // *Анналы*

пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. 2000. № 3. С. 57 - 60.

2. Лопатин В. В., Аскадский А. А. Полиакриламидные гидрогели в медицине. Изд-во «Научный мир». Москва. 2004. 261 С.
3. Неробеев А. И., Лопатин В. В. Инъекционные имплантаты для увеличения объема мягких тканей – реальность и перспективы (материалы для дискуссии) // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*, 2003, № 1. С. 41-46.
4. Лопатин В. В. Полиакриламидные материалы для эндопротезирования и их место в ряду материалов медицинского назначения. // *Клиническая лаборатория и диагностика*. 2000. № 12. С. 57-60.
5. Шехтер А. Б., Лопатин В. В., Чочия С. Л., Матиашвили Г. Г. Инъекционный полиакриламидный гидрогель «Формакирил» и тканевая реакция на его имплантации. // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 1997. № 2. С. 11-21.
6. Лопатин В. В., Шехтер А. Б. К статье Н. И. Острецовой, А. А. Адамяна, А.А. Копыльцова, В. В. Николаевой-Федоровой «Полиакриламидные гидрогели, их безопасность и эффективность (обзор)». // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2003. № 4. С. 65-67.
7. Лукомский Г. И., Эль-Саид А. К., Лопатин В. В., Чочия С. Л., Матиашвили Г. Г. «Формакирил» для пластики молочных желез и лечения капсулярных фиброзов. // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 1997. № 2. С. 30-35.
8. Лукомский Г. И., Шехтер А. Б., Эль-Саид А. К., Лопатин В. В., Миронова О. А., Чочия С. Л. Капсулярные фиброзы и их лечения после маммопластики силиконовыми эндопротезами. // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 1997. № 1. С. 75-87.
9. Шехтер А. Б., Лопатин В. В., Чочия С. Л., Матиашвили Г. Г. Тканевая реакция при имплантации полиакриламидного гидрогеля, в книге «Реконструктивно-восстановительная хирургия молочной железы, Москва. 1996. С. 121-128.
10. Лукомский Г. И., Шехтер А. Б., Лопатин В. В., Эль-Саид А. К., Миронова О. А. Поиск путей профилактики капсулярной контрактуры после пластики молочных желез силиконовыми протезами. // *Биосовместимость*. 1994. Т. 2. № 3. С. 125-135.
11. Берестнев В. А. Лопатин В. В., Берестнев А. В. Полиакриламидные гели для внутреннего протезирования. // *Ремедиум*. 2002. № 10. С. 75-78.
12. Берестнев В. А. Лопатин В. В., Берестнев А. В. Полиакриламидные гели для применения в урологии. // *Ремедиум*. 2003. № 9. С. 71-72.
13. Гербова Л. В., Лопатин В. В. Медицинские полимерные материалы для эндопротезирования. // *Каучук и резина*. 1997. № 6. С. 33.
14. Островский Н. В., Долгов Б. В., Жарков Д. А., Бугаева И. О., Лопатин В. В. Коррекция пузырно-мочеточникового рефлюкса у детей субуретральной

- инъекцией полиакриламидного геля «Формакрил». // *Анналы хирургии*. 2000. № 6. С. 68.
15. Лопатин В. В. «Формакрил» - новый биополимер для медицины, применяемый в эндопротезировании. // *Журнал «Д. Е. Kmatologia»*. 2000. № 1. Р. 10-11.
 16. Лопатин В. В., Берестнев В. А., Шехтер А. Б., Аникей А. Г., Берестнев В. А. Полиакриламидные гели и их деструкция. // *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии*. 2004. № 2. С. 38 - 47.
 17. Лопатин В. В., Аскадский А. А., Васильев В. Г., Курская Е. А. Влияние условий получения на релаксационные свойства полиакриламидных гелей. // *Высокомолек. соедин.* 2004. Сер. А. Т. 46. № 7. С. 1217.
 18. Lopatin V. V., Askadskii A. A. Influence of the Preparation Mode on Structure and Properties of Gels Based on Poly(acrylamide). // *Russian Polymer News*. 2003. V. 8. № 3. P. 47-53.
 19. Lopatin V. V., Askadskii A. A., Peregudov A. S. Spectral Analysis of Water Gels Based on Poly(acrylamide). // *Russian Polymer News*. 2003. V. 8. № 4. P. 8-14.
 20. Чибураев В. И., Двоскин Я. Г., Сомов Л. П., Лопатин В. В., Кузнецова Е. А. Методические указания по санитарно-гигиенической оценке резиновых и латексных изделий медицинского назначения. Минздрав России. Москва. 2001. утверждено 14 мая 2001.
 21. Чибураев В. И., Двоскин Я. Г., Сомов Л. П., Выборнова М. С., Брагина И. В., Беликова И. Г., Игнатушенко Л. И., Лопатин В. В., Кузнецова Е. А. Методические указания по санитарно-гигиенической оценке резиновых и латексных изделий медицинского назначения. Минздрав России. Москва. 2001. утверждено 14 мая 2001.
 22. Лопатин В. В., Гербова Л. В., Саминский А. А. Изделия медицинского назначения. В книге «Справочник резинщика», 2005.
 23. Лопатин В. В., Аскадский А. А., Перегудов А. С., Берестнев В. А., Шехтер А. Б. Структура и свойства полиакриламидных гелей, применяемых в медицине. // *Высокомолек. соедин.* 2004. Сер. А. Т. 46. № 12. С. 2079.
 24. Lopatin V. V., Askadskii A. A., Peregudov A. S., Vasil'ev V. G. Structure and Relaxation Properties Medical-Purposed Polyacrylamide Gels. // *J. of Appl. Polym. Sci.*, 2005, in press.
 25. Лопатин В. В., Белоненко В. Н., Зар В. В., Аскадский А. А. Сравнительное исследование механического поведения суставной жидкости человека и полиакриламидных гидрогелей в зависимости от давления. // *Пластические массы*. 2004. № 7. С. 43-46.
 26. Лопатин В. В., Аскадский А. А., Берестнев В. А., Васильев В. Г., Бабушкина Т. А., Климова Т. П. Сравнительное исследование свойств полиакриламидных гидрогелей «Биофарм» и «Аргиформ», применяемых в медицине. // *Пластические массы*. 2004. № 9. С. 35-39.
 27. Лопатин В. В. Полифункциональный биосовместимый гидрогель и способ его получения. // Пат. 22050346 МКИ⁷ AGIL 27/52, AGIP 41/00. Бюлл. 3 15, 27.05.03.
 28. Лопатин В. В., Матиашвили Г. Г. Способ получения гелеобразного материала для пластики мягких тканей. // Пат. 2127129, МКИ⁶ AGIL 27/00, CO8F 220/56. Бюлл. № 7, 10.03.99.
 29. Matiashvili G., Lopatin V. Biocompatible hydrogel and method of its production. Пат. WO 0149336, МКИ⁷ AGIL 27/52, AGIL 31/14, AGIL 27/16, AGIL 31/04.
 30. Лопатин В. В., Берестнев В.А. Полифункциональный биосовместимый гидрогель и способ его получения. // *Международная публикация WO 03/026711*, МКИ⁷ AGIL 27/16, AGIL 27/52.
 31. Лопатин В. В., Чочия С. Л. Эндопротез молочной железы. // Пат. 2127095, МКИ⁶ AGIF 2/12, AGIL 27/00, Бюлл. № 7, 10.03.99.
 32. Лопатин В. В., Полифункциональный биосовместимый гидрогель и способ его получения. // *Международная заявка № PCT/PU 02/00164*. 10.04.02. МПК⁷ AGIL 21/04, AGIL 27/16, AGIK 47/32, CO8F 220/54.
 33. Severin S. E., Gukasova A. V., Lopatin V. V., Moskaleva E. Lu., Sviridova I. K., Sergeeva N. S. Induction of melanoma – specific CTL by implantation of xenogenic tumor cells into an artificial tissue capsule. // 4th International expert meeting on clinical dendritic cell immunotherapy. Amsterdam. The Netherlands. 2003. P. A 19.
 34. Kusnetsov V. V., Vilatova E. A., Lopatin V. V., Kusnetsova E. A. Determination of Acrylamide in Polyacrylamide gels. // The 52nd Pittsburg conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy. New Orlean. L. A. 2001. Abstract book № 1648P.
 35. Berestnev V.A., Guerbova L.V., Lopatin V.V. Polymer Materials for Implation // *Annals of East-Asian Symposium on Polymer for Advanced Technology*. 1997. China. P. 22.
 36. Lopatin V.V., Berestnev V.A. Application of Polyacrylamide Gels for Medical Purpose // *Annals of 2-nd East-Asian Symposium on Polymer for Advanced Technology*. 1999. Korea. P. 6.
 37. Альтцигер В. С., Берестнев В. А., Гербова Л. В., Лопатин В. В. Новые экономичные, энергосберегающие, экологически чистые материалы и технологии – главный фактор научно-технического прогресса в промышленности по производству полимерной обуви, медицинских и латексных изделий. // Тезисы докладов на 6^{ой} научно-практической конференции резинщиков «Сырье и материалы для резиновой промышленности, от материалов - к изделиям». 1999. Москва. НИИШП. С. 1-4.
 38. Lopatin V.V., Anikey A.G., Berestnev V.A. New Investigations in polyacrylamide Gels for Medical Purpose // *Program and Abstracts of 4th East-Asian Symposium on Polymer for Advanced Technology*. 2003. Japan. P. 37.
 39. Лукомский Г. И., Шехтер А. Б., Эль-Саид А. Х., Лопатин В. В., Миронова О. Ю. Лечение капсулярных контрактур после эндопротезирования молочных желез силиконовыми эндопротезами. // II Международная конференция «Современные подходы к разработке эффективных

- перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов». Москва. 21-22.11.95 г. Материалы конференции. М.: 1995. С. 221-222.
40. Лопатин В. В., Берестнев В. А., Аникей А. Г., Берестнев А. В. Полиакриламидные гели в медицине для имплантации. // Международная конференция по каучуку и резине. 2004. Москва, 149.
 41. Askadskii A. A., Matveev Yu. I., Goleneva L. M., Lopatin V. V., Kurskaya E. A., Luchkina L. V., Kiseleva T. I., Bychko K. A., Kazantseva V. V. The approach for calculation of the properties of polymers and preparation of gradient-modulus polymeric materials. // International Conference Dedicated to 50th Anniversary of A. N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds (INEOS) Russian Academy of Sciences "Modern trends in organoelement and polymer chemistry". Moscow. May 30-June 4. 2004. P. 017. Book of Abstracts.
 42. Лопатин В. В., Аскадский А. А., Васильев В. Г. Набухание полиакриламидных гелей медицинского назначения. // Высокомолек. соедин. 2005. Сер. А. Т. 47. № 7. С. (в печати).
 43. Аскадский А. А., Курская Е. А., Лопатин В. В. «Композиция для получения градиентных гидрогелевых полимерных материалов и способ их получения» Положительное решение от 04.03.2005 г. по заявке на патент РФ, поданной 02.07.2004 г.
 44. Чернявская Н. А., Егоров Б. Н., Лопатин В. В. «Резиновая смесь на основе винилсодержащего силиконового каучука». Патент РФ 2208023 29.12.2000 МПК⁷CO8L 83/07, 83/05.
 45. Lopatin V. Polyfunctional Biocompatible Hydrogel and Method for the Production Thereof. Publication info: AU2002323848 A1 – 2003 – 10 – 20. Австралия.
 46. Lopatin V. Polyfunctional Biocompatible Hydrogel and Method for the Production Thereof. Publication info: CA2452442 A1 – 2003 – 10 – 16. Канада.
 47. Lopatin V. Polyfunctional Biocompatible Hydrogel and Method for the Production Thereof. Publication info: WO03084573 A1 – 2003 – 10 – 16. Международная.
 48. Lopatin V. Polyfunctional Biocompatible Hydrogel and Method for its obtaining. Publication info: RU2236872 C1 – 2004 – 09 – 27. Россия.
 49. Lopatin V., Berestnev V. Polyfunctional Biocompatible Hydrogel and Method for the Production Thereof. Publication info: EP1498142 A1 – 2005 – 01 – 19. Европа.

Подписано в печать 3.03.2005 г. Формат 60x90, 1/16.
Объем 3,25 п.л. Тираж 70 экз. Заказ № 102

Отпечатано в ООО "Фирма Блок"
107140, г. Москва, ул. Краснопрудная, вл.13. т. 264-30-73
www.blok01centre.narod.ru

Изготовление брошюр, авторефератов, печать и переплет диссертаций.