

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 66.091:615

На правах рукописи

КАЗЫБАЕВА ДИАРА СЕРИКОВНА

**Создание новых биodeградируемых материалов для доставки
лекарственных веществ**

6D072100 - Химическая технология органических веществ

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

Отечественный научный консультант
кандидат химических наук,
ассоциированный профессор
Ирмухаметова Г.С.

Зарубежный научный консультант
Professor, PhD
Vitaliy V. Khutoryanskiy
(University of Reading, United
Kingdom)

Республика Казахстан
Алматы, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	3
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Тиол-ен «клик» химия.....	11
1.2 Биодеградация.....	29
1.3 Применение полимеров в качестве деградируемых материалов	38
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	43
2.1 Характеристика исходных веществ.....	43
2.2 Приготовление растворов.....	44
2.3 Установление концентрации перекиси водорода перманганатометрическим титрованием	44
2.4 Синтез гелей.....	45
2.5 Физико-химические методы исследования синтезированных гелей.....	45
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	51
3.1 Синтез и характеристика гелей на основе пентаэритритол тетраакрилата и пентаэритритол тетракис(3-меркаптопропионат)а (ПЭТА-ПЭМП), триметиллопентаэритритол триакрилата и пентаэритритол тетракис(3-меркаптопропионат)а (ТМПТА-ПЭМП)...	51
3.1.1 Исследование биодеградационных свойств гелей ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП.....	59
3.2 Синтез и характеристика гелей на основе поли(этиленгликоль) диакрилата и пентаэритритол тетракис(3-меркаптопропионат)а (ПЭГДА-ПЭМП).....	65
3.2.1 Изучение мукоадгезивных свойств гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП	74
3.2.2 Исследование биодеградационных свойств гелей ПЭГДА-ПЭМП в растворах ИВЖ и перекиси водорода	75
3.2.3 Загрузка лекарственных веществ в гидрогели ПЭГДА-ПЭМП и изучение профилей их высвобождения	77
4 ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ	84
4.1 Описание принципиальной технологической схемы производства лекарственных форм на основе ПЭГДА-ПЭМП.....	84
4.2 Материальный баланс производства полимерных лекарственных форм на основе ПЭГДА-ПЭМП.....	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	89
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	92
ПРИЛОЖЕНИЕ А	106

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 6.38-90 Унифицированные системы документации. Система организационно-распорядительной документации. Требования к оформлению документов

ГОСТ 7.1-2003 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления

ГОСТ 7.12-93 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращения слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.32-2001 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.9-95 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 8.417-2002 Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ИК – инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием
УФ – ультрафиолетовая спектроскопия
ПЭТА – пентаэритритол тетраакрилат
ТМПТА – триметилпропантриакрилат
ПЭМП – пентаэритритол тетракис(3-меркаптопропионат)
ПЭГДА – поли(этиленгликоль) диакрилат
ИМС – исходная мономерная смесь
ИВЖ – искусственная вагинальная жидкость
ЛВ – лекарственное вещество
ЛФ – лекарственная форма
ПЭГ – поли(этиленгликоль)
ДТТ – дитиотреитол
ДРБ – доксорубицин
НГ – наногели
НК – нанокапсулы
ЯС – ядро-сшитые
ПТЛ – паклитаксел
РИФ – реактор с иммобилизованным ферментом
ТРИМ – триметилпропантриметакрилат
БАПА – бис(ангидрид аллилпропионовой кислоты)
ПМК – полимолочная кислота
ПЭГДМА – поли(этиленгликоль) диметакрилат
ДМФА – N,N' – диметилформамид
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЭСП – эстераза свиной печени
ТГА – термогравиметрический анализ
СЭМ – сканирующая электронная спектроскопия
АСМ – атомно-силовая микроскопия

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена созданию новых полимерных материалов методом тиол-ен «клик» химии, исследованию их основных физико-химических свойств, определению биodeградационных свойств и эффективности их использования в качестве гелевых лекарственных форм, разработке технологических аспектов их получения.

В работе был использован ряд современных методов исследования и анализа: ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием, Раман-, УФ-спектроскопия, термогравиметрический анализ, сканирующая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, гравиметрия, механический анализ, элементный анализ, микробиологические испытания, исследования биodeградационных и мукоадгезивных свойств гелей.

Актуальность темы исследования. В последнее время значительно возрос интерес к биodeградируемым материалам. В биомедицине биоразлагаемые полимерные материалы используются при разработке терапевтических устройств, включая временные имплантаты и трехмерные каркасы для тканевой инженерии. Дальнейшее развитие получило использование биоразлагаемых полимерных материалов для фармакологических применений, таких как средства доставки для контролируемого/продолжительного высвобождения лекарств. Биodeградируемые имплантируемые полимеры в качестве матриц для различных лекарственных средств позволяют обойти необходимость операции по удалению импланта, а также снижают вероятность возникновения хронического иммунного ответа; кроме того, многофункциональность полимерных материалов дает возможность контролировать высвобождение лекарственного вещества, используя специфические характеристики полимеров. Биodeградируемые полимеры могут быть синтезированы различными способами, но одним из наиболее современных и универсальных способов можно назвать тиол-ен «клик» реакции. Данные реакции подразумевают мягкие условия проведения синтеза, высокие выходы и по этой причине являются достаточно привлекательным синтетическим инструментом. Говоря о продолжительном высвобождении лекарств, также одним из перспективных и распространенных является применение принципа мукоадгезии при разработке лекарственных форм. Адгезия к слизистым, покрывающим эпителиальные ткани, представляет интерес для фармацевтики с точки зрения улучшения локализованной доставки лекарств. Локализация необходима для поддержания необходимой терапевтической концентрации препарата, так как при традиционных способах доставки значительные количества лекарства могут быть потеряны на пути к целевому органу. При использовании мукоадгезивных полимеров время пребывания лекарственных препаратов на слизистых оболочках может быть значительно увеличено, что обеспечивает их устойчивое высвобождение в заданном целевом месте.

Разработка новых полимерных лекарственных форм с мукоадгезивными и биodeградационными свойствами является одним из научных направлений кафедры химии и технологии органических веществ, природных соединений и полимеров КазНУ им. аль-Фараби. Ранее на кафедре были разработаны гидрогелевые материалы на основе поливинилового спирта и 4-меркаптофенилбороновой кислоты, которые способны к деградации в глутатионе. Стоит отметить разработки различных полимерных материалов биомедицинского назначения на основе 2-гидроксиэтилметакрилата и 2-гидроксиэтилакрилата, обладающих мукоадгезивными свойствами, данные материалы были апробированы в качестве букальных лекарственных форм. Также на кафедре были получены глазные и вагинальные лекарственные формы на основе хитозана и поли(2-этил-2-оксазолина), проявляющие мукоадгезивные свойства и т.д.

Настоящая работа является продолжением данных исследований и посвящена разработке новых биodeградируемых материалов с мукоадгезивными свойствами для доставки лекарственных веществ.

Цель работы:

Создание новых биodeградируемых мукоадгезивных материалов на основе пентаэритритол тетраакрилата (ПЭТА), триметилпропантриакрилата (ТМПТА), пентаэритритол тетраакис(3-меркаптопропионата) (ПЭМП) и поли(этиленгликоль) диакрилата (ПЭГДА) для применения в качестве систем по доставке лекарственных веществ.

Задачи:

1. Синтез биodeградируемых полимерных материалов на основе пентаэритритол тетраакрилата, триметилпропантриакрилата, пентаэритритол тетраакис(3-меркаптопропионата) и поли(этиленгликоль) диакрилата для доставки лекарственных веществ;
2. Исследование физико-химических и механических свойств полученных гелевых полимерных материалов;
3. Изучение полученных гелей в качестве биodeградируемых и мукоадгезивных материалов для доставки лекарственных веществ;
4. Получение гидрогелевых лекарственных форм с клиндамицин фосфатом и клотримазолом и изучение особенностей их высвобождения;
5. Оценка антибактериальных и противогрибковых свойств полученных гидрогелевых лекарственных форм;
6. Разработка технологических аспектов полученных гелевых лекарственных форм (создание принципиальной технологической схемы, расчет материального баланса производства)

Объекты исследования: гели на основе ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП.

Предмет исследования: получение и характеристика гелей, изучение их способности к биodeградации, мукоадгезии и антимицробной эффективности в качестве гелевых лекарственных форм, высвобождение лекарственных веществ из гелей.

Научная новизна и основные результаты исследования

Впервые были получены гели на основе ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП методом тиол-ен «клик» химии. Методами золь-гель анализа установлено, что процесс образования гелей зависит от состава исходной мономерной смеси (ИМС), стехиометрический состав ИМС по тиольным и акрилатным функциональным группам увеличивает выход гель-фракции.

Методами ИК-, Раман-спектроскопии и элементного анализа на содержание S определен химический состав гелей ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП. На спектрах ИК установлено наличие сложноэфирных групп в составе гелей, непрореагировавших С=С связей. На спектрах Раман-спектроскопии присутствуют пики характерные для S-S, S-N групп. Результаты элементного анализа показали, что с ростом содержания ПЭГДА в ИМС, содержание серы уменьшается в составе гелей.

Впервые исследованы термические характеристики гелей на основе ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП. Установлено, что образцы ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП демонстрируют термическую стабильность, при этом начало разложения наблюдается только при температуре выше 345–360 °С, достигая 94–95 % от общей потери веса при 500 °С.

Впервые изучены механические характеристики гидрогелей на основе ПЭГДА-ПЭМП. Для стехиометрического состава ИМС по функциональным группам наблюдалось улучшение механических свойств гелей ПЭГДА-ПЭМП. Методами сканирующей электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии изучены морфологические особенности гелей ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП. Установлено, что уменьшение пористости полученных полимерных сеток ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП и ПЭГДА-ПЭМП свойственно образцам со стехиометрическим составом ИМС по функциональным группам.

Впервые изучены биодеградиационные свойства гелей на основе ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП в растворах эстеразы свиной печени (ЭСР). Присутствие эстеразы замедляет скорость деградации полимеров. Впервые исследована биодеградируемость гелей на основе ПЭГДА-ПЭМП в растворе искусственной вагинальной жидкости (ИВЖ), установлено, что полимерные образцы не подвергаются деградации во времени в течение трех недель. Для полученных гелей ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП и ПЭГДА-ПЭМП впервые изучена их биодегградация в растворе перекиси водорода, показано, что все гели деградируют, проходя через стадию набухания в результате окислительной деструкции сульфидных связей с образованием сульфоксидных, сульфоновых и даже сульфатных групп, а также гидролитической деструкции сложноэфирных групп. Биодегградация гелей зависит от концентрации растворов перекиси водорода и состава самих гелей.

Впервые изучены мукоадгезивные свойства гелей на основе ПЭГДА-ПЭМП по отношению к слизистой поверхности вагинальных тканей овцематки. Показано, что с увеличением тиольного компонента ПЭМП улучшается мукоадгезивность полимерных материалов, что связано с образованием дисульфидных связей между SH группами цистеина слизистых тканей и сульфидными группами геля ПЭГДА-ПЭМП.

Впервые получены гидрогелевые лекарственные формы на основе ПЭГДА-ПЭМП с противомикробными препаратами клиндамицин фосфатом и клотримазолом. Изучен процесс иммобилизации лекарственных веществ (ЛВ) в гидрогелевую матрицу ПЭГДА-ПЭМП и скорость высвобождения ЛВ из нее. Установлено, что характер высвобождения клиндамицин фосфата из полимерной матрицы носит пролонгированный характер. При этом увеличение гидрофильного компонента в составе гелей ПЭГДА-ПЭМП повышает количество загруженного клиндамицин фосфата в полимерную сетку, что, вероятно, связано с образованием водородных связей между полимером и лекарственным веществом, а также водорастворимостью ЛВ. Определено, что состав гелей ПЭГДА-ПЭМП не влияет на количество загруженного и выделившегося из гелевой лекарственной формы (ЛФ) гидрофобного ЛВ клотримазола. Гели ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом демонстрируют пролонгированное высвобождение ЛВ из полимерной матрицы.

Впервые исследованы антимикробные свойства полученных ЛФ в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Установлено, что ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом обладают хорошими антимикробными свойствами, зависящими от степени загрузки лекарства в ЛФ, что связано с составом гелей. Противогрибковая активность ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом проявляется меньше по сравнению с антимикробными свойствами ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом и не зависит от состава гелей.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Взаимодействие в системах ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП сопровождается гелеобразованием в результате протекания тиол-ен «клик» реакций. Состав ИМС влияет на гелеобразование, набухающую способность и механические свойства полученных систем.

2. Стехиометрический состав ИМС по функциональным группам для систем ПЭТА-ПЭМП и ПЭГДА-ПЭМП увеличивает выход гель-фракции, улучшает механические свойства, уменьшает пористость полученных полимерных сеток.

3. Мукоадгезивные свойства гидрогелей на основе ПЭГДА-ПЭМП улучшаются в результате увеличения содержания тиольных групп в своем составе.

4. Гели на основе ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП обладают биodeградируемостью в растворах перекиси водорода и печеночной эстеразы, что может позволить их использование в качестве систем для доставки лекарственных веществ.

5. В качестве антимикробных лекарственных форм наиболее привлекательными с точки зрения эффективности является антибактериальная система ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом по сравнению с противогрибковой системой ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом. При этом ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом демонстрирует более высокую пролонгацию выделения ЛВ.

Теоретическая значимость работы

Впервые методом тиол-ен «клик» химии были получены гели на основе ПЭТА-ПЭМП, ТМПА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП и изучено влияние ИМС на выход гель-фракции, механические свойства, пористость, мукоадгезивные и биodeградационные свойства полученных полимерных материалов.

Практическая значимость исследования

Разработка эффективных систем доставки лекарственных средств имеет жизненно важное значение для медицины и здравоохранения. В данной работе показано, что полученные гели благодаря своим свойствам могут быть предложены в качестве перспективных носителей лекарственных веществ, мукоадгезивных и антимикробных ЛФ.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам

Диссертационная работа выполнялась в рамках программы грантового финансирования Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан AP08052780 «Разработка технологии получения новых вагинальных лекарственных форм на основе гидрофильных полимеров» 2020-2022 гг, программно-целевого финансирования научных исследований BR05236419 «Создание функционализированных органических веществ и материалов с широким спектром возможного высокоэффективного практического применения» 2018-2020 гг.

Апробация работы. Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на конференции «Современные технологии диагностики и мониторинга терапии в экспериментальной, клинической медицине и фармации» (Чешская республика, 2018); конференции «XVIII Международная конференция по науке и технологиям Россия-Корея-СНГ» (Россия, 2018); Международной научно-практической конференции «Современные тренды высшего образования и науки в области химической и биохимической инженерии» (Алматы, 2018); Sixth International Symposium Frontiers in Polymer Science (Budapest, Hungary, 2019); VIII International Symposium on Specialty Polymers (Almaty, 2019).

Личный вклад автора заключается в непосредственном выполнении экспериментальной части работы, участии в анализе, обобщении и интерпретации полученных экспериментальных данных.

Публикации. В результате исследований по теме диссертационной работы было опубликовано в соавторстве 9 научных работ, в том числе 1 статья в международном журнале Polymers of Advanced Technology (Q2, процентиль 75%), 1 статья в журнале Polymer Science, Part B (Q3, процентиль 37%), 1 полезная модель РК, 1 статья в журнале «Комплексное использование минерального сырья», входящего в перечень журналов, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК, а также материалы и тезисы 5 докладов на международных научных конференциях и симпозиумах.

Структура и объем диссертации. Диссертации изложена на 114 страницах машинописного текста и включает введение, 4 раздела, заключение,

9 таблиц, 43 рисунка, список использованных источников из 194 наименований и приложение.

1 АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Тиол-ен «клик» химия

Вводная часть данного аналитического обзора прежде всего должна быть посвящена так называемым тиол-ен «клик» реакциям. Термин «тиол-ен» будет использоваться для обозначения присоединения тиола к двойной связи независимо от механизма реакции. То есть в общем смысле к этому термину будут относиться как реакции радикального присоединения, так и основание/нуклеофил-опосредованные реакции тиол присоединения с активированными субстратами. Следует отметить, что термин «тиол-ен» уже начал использоваться в русскоязычной литературе [1].

Тиол-еновая реакция, известная более 100 лет [2], представляет собой простое гидротиолирование связи $C=C$ (рисунок 1).

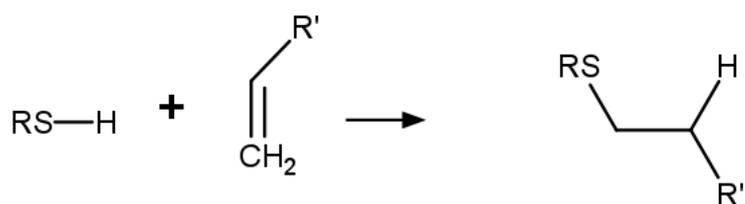


Рисунок 1 – Схема гидротиолирования связи $C=C$

Следует привести несколько причин, почему тиол-ен реакции считаются перспективным и достаточно привлекательным инструментом в органическом синтезе. Во-первых, такие реакции гидротиолирования могут протекать в различных условиях, включая радикальный путь [3], через каталитические процессы, опосредованные нуклеофилами, кислотами и основаниями [4,5], при очевидном отсутствии добавленного катализатора в высокополярных растворителях, таких как вода или диметилформамид [6], или с помощью супрамолекулярного катализа с использованием, например, β -циклодекстрина [7]. Во-вторых, роль субстрата может выполнять широкий спектр соединений с непердельными связями, включая активированные и неактивированные частицы, а также многократно замещенные олефиновые связи (рисунок 2).

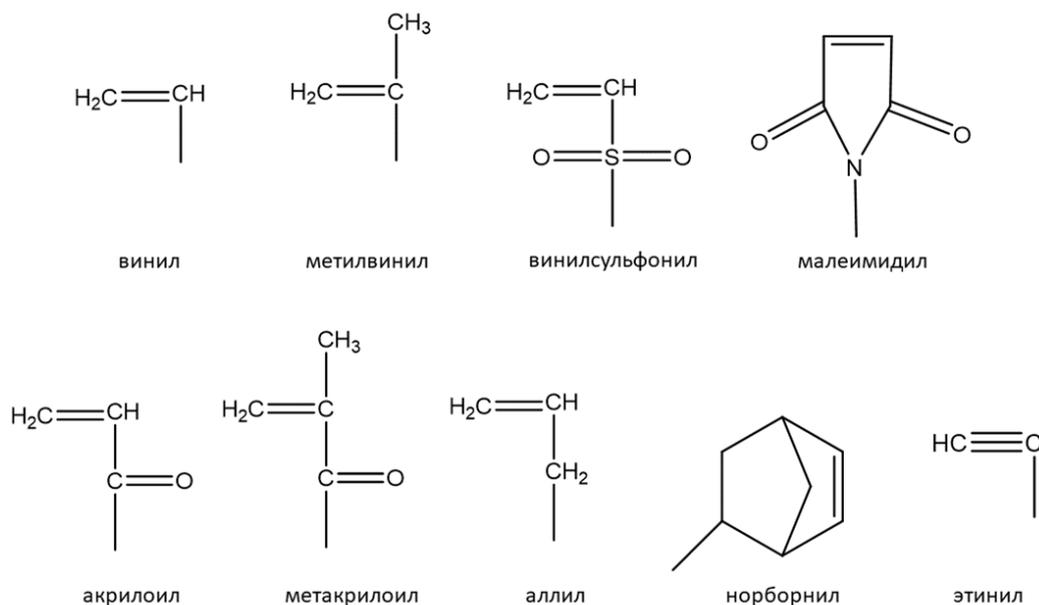


Рисунок 2 – Примеры непредельных функциональных групп, способных к «клик» реакциям с тиолами

Однако реакционная способность может значительно меняться в зависимости от механизма реакции и характера замещения по связи C=C. В-третьих, в реакции может участвовать практически любой тиол, в том числе многофункциональные соединения, хотя реакционная способность может зависеть от прочности связи S-H и механизма расщепления, т.е. гомолитический и гетеролитический разрыв. Наконец, такие реакции, как правило, очень быстрые и могут длиться всего секунды (даже при температуре и давлении окружающей среды), устойчивы к присутствию воздуха/кислорода и влаги (при условии, что концентрация кислорода не приближается к концентрации тиола), и приводят к почти количественному образованию соответствующего тиоэфира региоселективным образом.

Взаимодействие тиолов с ненасыщенными соединениями широко изучается с начала 20 века, и работы до 1940 г. были рассмотрены в обзоре Mayo и Walling [8]. Присоединение тиолов к изолированным двойным связям может происходить двумя путями: присоединение в соответствии с правилом Марковникова происходит в присутствии серы и серной кислоты, тогда как в отсутствие добавленного катализатора присоединение происходит вопреки данному правилу по свободно-радикальному механизму. Последней реакции способствуют кислород, органические пероксиды и свет, и она ингибируется гидрохиноном и пиперидином [9].

Как правило, тиол-ен реакции проводятся в радикальных условиях. В таких условиях они протекают как типичный цепной процесс со стадиями инициирования, роста и обрыва цепи (рисунок 3).

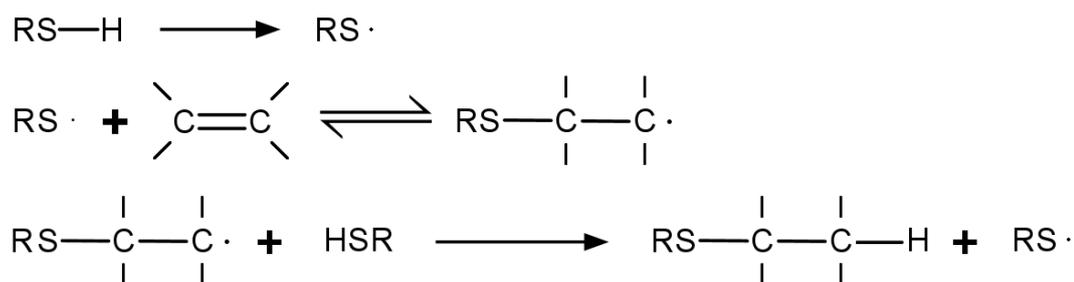


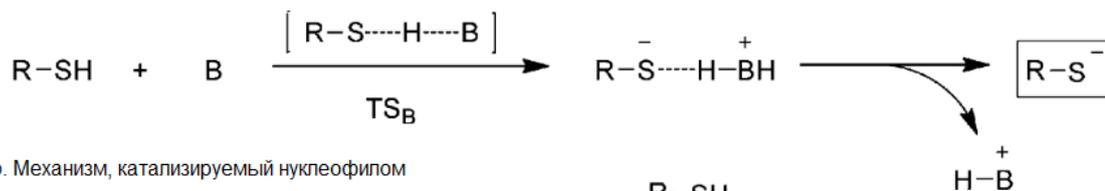
Рисунок 3 – Схема радикального механизма тиол-ен реакции [10]

Инициирование осуществляется добавлением пероксидов, азосоединений и т.д., или воздействием ультрафиолетового или другого излучения, что приводит к образованию тиильного радикала $\text{RS}\cdot$, а также других побочных продуктов [10]. Термическое расщепление связи $\text{S} - \text{H}$ также можно использовать для образования тиильных радикалов [11]. Рост цепи — это двухэтапный процесс, включающий сначала прямое присоединение тиильного радикала через связь $\text{C} = \text{C}$ с образованием промежуточного углеродно-центрированного радикала, за которым следует передача цепи на вторую молекулу тиола с получением продукта присоединения тиолена с антимарковниковской ориентацией с сопутствующим образованием нового тиильного радикала. Возможные реакции обрыва включают типичные процессы радикал-радикального присоединения [12].

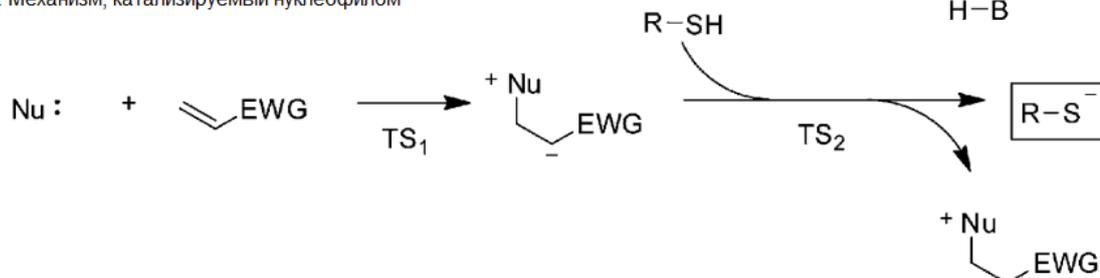
Помимо тиол-ен реакций, опосредованных радикалами, гидротиолирование может быть легко осуществлено при слабом щелочном или нуклеофильном катализе. Оно несколько менее универсальное, чем тиол-ен реакция по радикальному механизму, поскольку для эффективности необходима активация $\text{C} = \text{C}$ связи, то есть наличие электронакцепторных групп, обуславливающих дефицит электронов. Однако, учитывая большое количество коммерчески доступных активированных соединений с двойными связями, в том числе многофункциональных соединений, очевидна дальнейшая перспектива синтеза новых многообещающих материалов [13].

Как показано на рисунке 4, реакция присоединения Михаэля, катализируемая основанием, включает использование каталитических количеств основания (например, амина) для облегчения реакции между тиолом и электроно-дефицитной винильной группой с образованием продукта присоединения тиоэфира. Обычно путь реакции выглядит следующим образом: в присутствии общего основания, такого как триэтиламин, протон отделяется от тиола с образованием тиолат-аниона вместе с сопряженной кислотой. Тиолат-анион обычно является сильным нуклеофилом, инициирующим присоединение аниона через электроно-дефицитный бета-углерод соединения с двойной связью с образованием промежуточного углеродно-центрированного аниона, который, будучи сильным основанием, отнимает водород от конъюгированной кислоты и дает в виде продукта тиоэфир [14].

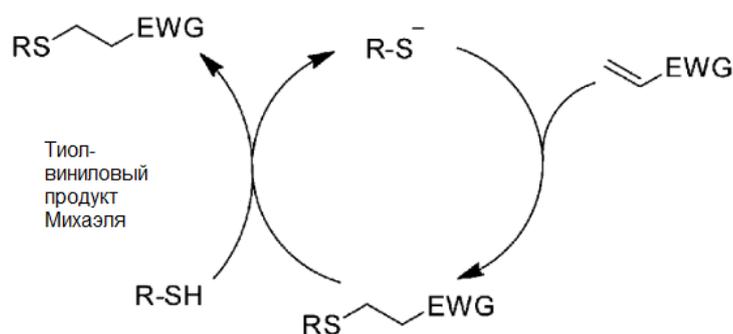
a. Механизм, катализируемый основанием



b. Механизм, катализируемый нуклеофилом



Тиол-виниловый реакционный цикл Михаэля



B – основание, EWG – электроноакцепторная группа

Рисунок 4 – Схема механизмов, катализируемых основанием (а), нуклеофилом (b). [15]

Исследования [4,16] установили, что, хотя и основание, и нуклеофил способны успешно катализировать реакцию присоединения тиол-Михаэля, фосфины способны катализировать реакцию присоединения тиол-Михаэля с метакрилатами с минимальными побочными реакциями, и, по сравнению с основанием, нуклеофильные фосфины катализируют реакцию намного быстрее и эффективнее. Было показано, что в пути, опосредованном нуклеофилами, сам нуклеофил не катализирует реакцию; вместо этого он реагирует с электроно-дефицитной связью C=C с образованием сильного основания.

В зависимости от того, какие комбинации мономеров используются в той или иной тиол-ен «клик» реакции возможно формирование различных структур. Так взаимодействие монофункциональных мономеров приводит к образованию только одиночных аддуктов, тогда как дифункциональные мономеры могут образовывать линейные полимеры. Использование мономеров с более высокой функциональностью (больше двух) ведет к формированию сшитых полимерных сеток [17]. Соответственно образование тиол-ен полимеров достижимо двумя способами: радикальная тиол-ен «клик» полимеризация мономеров и постмодификация уже существующей

полимерной цепи, так называемого макромономера, тиол-ен «клик» реакцией [18].

Первые наблюдения по полимеризации реакцией тиол-ен присоединения были опубликованы Braun и Murjahn [19], которые получили нелетучий продукт при попытке синтеза пропен-2-тиола-1. Радикальная тиол-ен полимеризация – это ступенчатый процесс, для которого желательно стехиометрическое соотношение тиольных и непредельных функциональных групп 1:1 во избежание протекания побочных реакций [20]. Радикальная полимеризация состоит из нескольких стадий: инициирования, роста цепи и обрыва, а также стадии передачи цепи, как изображено на рисунке 5.

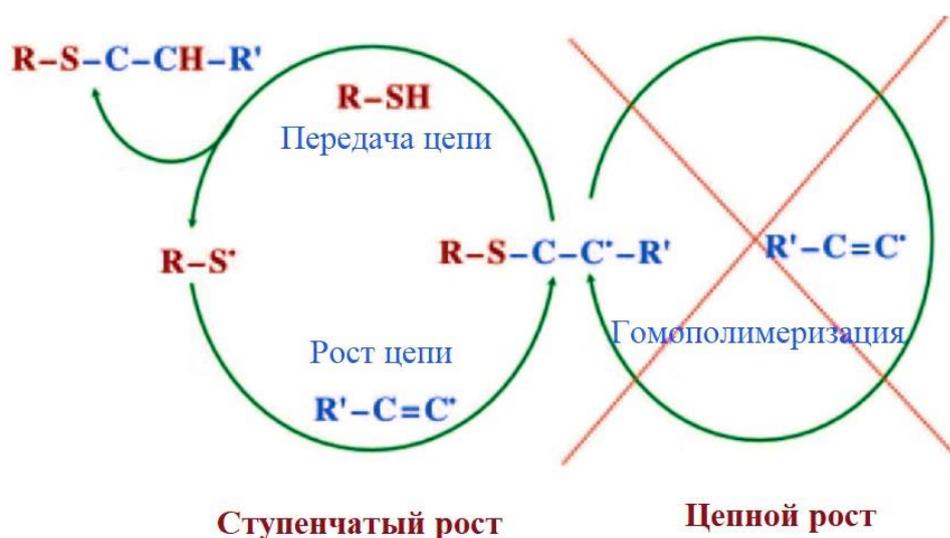


Рисунок 5 – Схема идеализированной свободнорадикальной тиол-ен полимеризации [13]

Сначала происходит образование тиольных радикалов за счет разложения тиола, которое может быть фото- или термоиницировано, с участием инициаторов или без них. Далее тиольный радикал атакует двойную связь и присоединяется к олефину. Наконец, происходит передача цепи, и неспаренный электрон от углеродно-центрированного радикала переносится на другую тиольную группу, тем самым генерируя новый тиольный радикал, что повторно запускает цикл. Обрыв цепи осуществляется путем рекомбинации радикалов [21–23].

Кинетика полимеризации относительно проста на протяжении большей части процесса полимеризации, так как молекулярная масса в данной системе растет медленно в результате прохождения стадии передачи цепи после каждой стадии роста цепи, сначала образуя димеры, тримеры и так далее, пока не будут достигнуты высокая молекулярная масса и гелеобразование. Лимитирующая стадия тиол-ен полимеризации определяется отношением кинетической константы роста цепи k_p к кинетической константе передачи цепи $k_{пц}$, то есть $k_p/k_{пц}$. Можно выделить три случая касательно данного

соотношения: (1) кинетические константы двух стадий приблизительно равны $k_{\text{ПЦ}} \approx k_{\text{Р}}$; (2) передача цепи является медленной стадией $k_{\text{ПЦ}} \ll k_{\text{Р}}$; и (3) рост цепи является медленной стадией $k_{\text{ПЦ}} \gg k_{\text{Р}}$. Когда одна из стадий реакции по своей природе медленнее и имеет более низкую кинетическую константу, то эта стадия становится лимитирующей [13]. Так, Cramer с коллегами [17] обнаружили, что передача цепи является лимитирующей стадией при идеальной ступенчатой тиол-ен реакции, где отсутствует гомополимеризация. В таком случае углеродно-центрированный радикал всегда переносится на тиольный фрагмент. Использование нескольких типов непредельных функциональных групп и / или непредельных групп, склонных к гомополимеризации (таких как акрилаты и метакрилаты), приводит к дополнительной стадии гомополимеризационного роста цепи [24]. При этом углеродно-центрированный радикал гомополимеризуется с другой непредельной функциональной группой, образуя продукт гомополимеризационного роста цепи, и другой углеродно-центрированный радикал.

Одним из важнейших факторов, влияющих на кинетику полимеризации, является химическое строение используемых мономеров. Существует большое количество различных типов непредельных функциональных групп, которые можно использовать в тиол-ен полимеризации. В работе [3] была предложена приблизительная последовательность изменения реакционной способности непредельных соединений: Норборнен > Виниловый эфир > Пропенил > Алкен \approx Этенилат > N-Виниламиды > Аллиловый эфир \sim Аллилтриазин \sim Аллилизотиоцианурат > Акрилат > Ненасыщенный сложный эфир > N-замещенный малеимид > Акрилонитрил \sim Метакрилат > Стирол > Сопряженные диены.

Реакционная способность непредельных соединений снижается с уменьшением электронной плотности углерод-углеродной двойной связи за некоторым исключением. Норборнен, метакрилат, стирол и сопряженные диены не подчиняются общей закономерности. Скорость свободнорадикального присоединения тиолов к норборнену исключительно высока, поскольку добавление тиольного радикала через двойную связь значительно снимает напряжение кольца, и последующее отщепление водорода от тиолированного водорода углеродно-центрированным радикалом происходит быстрее. Углеродно-центрированные радикалы, которые образуются при взаимодействии тиольного радикала с углерод-углеродной связью метакрилата, стирола или сопряженного диена, очень стабильны и образуют радикалы (метакриловые, бензильные или аллильные), которые по своей сути имеют низкие константы скорости отщепления водорода. Также стоит отметить, что несопряженные диены в отличие от сопряженных диенов участвуют в тиол-ен реакциях достаточно быстро в соответствии с точным положением непредельной связи.

Функциональные группы тиолов в свою очередь менее разнообразны по сравнению с непредельными соединениями, что могут вступать в тиол-ен полимеризацию; наиболее распространенными тиолами являются

алкилтиолы, тиолпропионаты, тиолгликолаты и тиолфенолы [24]. В работе [25] было изучено влияние степени замещенности тиолов на кинетику тиол-ен полимеризации. В целом увеличение замещения тиола не влияет на кинетическую скорость тиол-ен реакции при типичных условиях полимеризации, и для наблюдения значительного различия в скорости реакции требуются ухудшенные условия инициирования. Так первичный тиол реагировал наиболее быстро, за ним следуют вторичные, а затем третичные тиолы, что объясняется стерическими эффектами от увеличения замещения.

В работе [26] было рассмотрено влияние растворителя на кинетику тиол-ен полимеризации. Проведенные исследования показали, что полярность растворителя незначительно влияет на константу скорости роста цепи, тогда как значения константы скорости передачи цепи больше зависят от растворителя и могут быть увеличены при использовании неполярных растворителей.

В отличие от традиционной радикальной полимеризации, кислород не является ингибитором в случае тиол-ен полимеризации. В присутствии кислорода происходят дополнительные реакции передачи цепи, кислород включается в растущие полимерные цепи в виде пероксил-радикала, который участвует в стадии передачи цепи на тиол, образуя тиольный радикал [27].

Таким образом, мы рассмотрели кинетические особенности тиол-ен полимеризации, которая используется для получения тиол-ен полимеров. Далее немного остановимся на основных аспектах использования макромономеров в тиол-ен реакциях. С помощью тиол-ен «клик» реакций можно получать макромолекулярные системы сложной архитектуры, например гребнеобразные, звездообразные, дендритные полимеры [28].

В работе [29] функционализированные гребнеобразные полимеры получают введением тиольных функциональных групп в реакционноспособную основную цепь, а именно тиоглюкозы в цепь с непредельными группами. Звездообразные полимеры можно получать с помощью двух подходов: сначала-ядро и сначала-лучи. Последний позволяет намного легче достигать этой цели. Сначала получают тиол-функциональный полимер, который затем можно легко «прикрепить» к многолучевому ядру, несущему реакционноспособные непредельные группы [30]. Тиол-ен реакцию можно использовать и для синтеза циклических полимеров [31]. Двумя основными типами синтетических методологий циклизации являются следующие: реакции с замыканием цикла и полимеризация с расширением цикла. В работе [32] α , ω -малеимида-функциональные стереорегулярные поли(лактиды) были успешно циклизованы с использованием бифункциональных тиолов, что является примером реакции с замыканием цикла. Подобные реакции следует эффективно проводить при более низких концентрациях, поскольку при увеличении молекулярной массы побочные реакции ступенчатого роста будут преобладать над реакциями циклизации. В то же время полимеризация с расширением кольца позволяет получать определенные типы полимеров в концентрированном состоянии без осложнений в виде узлов или связанных колец. Для полимеризации с

расширением цикла мономер вставляется в циклический инициатор с образованием более крупного кольца. Тиол-ен реакции также можно применять для синтеза дендритных полимеров, использование тиол-ен реакций для получения дендримеров описано в следующей главе.

Коо и другие [33] исследовали условия и ограничения полимер-полимерной конъюгации с помощью радикальных тиол-ен реакций. Несмотря на высокую скорость реакции и эффективность радикальных тиол-ен реакций в высоких концентрациях, сложности возникают при проведении этой реакции в условиях разбавления, которые часто необходимы для полимер-полимерной конъюгации, поскольку полимеры характеризуются ограниченной растворимостью [34]. Были выявлены следующие закономерности: конъюгация полимера с аналогом небольшой молекулы происходит успешно, даже если для достижения высокой эффективности конъюгации необходимо использовать избыток низкомолекулярного соединения, при этом конъюгация полимера с молекулой более высокой молекулярной массы менее эффективна; полимер-полимерная конъюгация зачастую не удается, если исходные материалы используются в эквимольных соотношениях (или близких к ним). Эффективность тиол-ен взаимодействия между двумя макромолекулами снижается из-за конкурирующих реакций бимолекулярного обрыва. Если скорость обрыва близка или превышает скорости инициирования, роста и передачи цепи, конверсия будет строго ограничена, и образование побочных продуктов может быть значительным. Соответственно эффективность конъюгации и степень образования побочного продукта зависят от инициатора, неопределенной группы и тиолсодержащего компонента [35].

Тиол-ен «клик» химия имеет обширную область применения, включая, но не ограничиваясь, получением биосовместимых сетчатых материалов [36], синтезом блок сополимеров [35], созданием деградируемых материалов [37], синтезом дендримеров [38], созданием новых гомогенных [39] и гибридных сетевых структур [40], функционализированных микросфер [41] и наночастиц [42], хроматографией [43], нанопечатью и литографией [44], жидкие кристаллы [45], оптические [46] и голографические материалы [47], гликополимерный синтезом [29], иммобилизацией белков [48], стабилизацией/функционализацией капсул и многослойных систем [49].

Биомедицина

Методом тиол-ен «клик» химии возможно получать как гидрогели, так различные микро- и наногели [50,51]. Однако даже если макромасштабные гидрогели можно вводить и отверждать *in situ* [52,53], их применение все еще ограничено в значительной степени из-за пониженной проницаемости биологически значимых макромолекул. Эти недостатки можно преодолеть используя микро- или наночастицы гидрогеля или микро- и наногели [54]. Авторы [55] синтезировали фотодеградируемые микрочастицы со средним диаметром 22 мкм методом обратной суспензионной полимеризации. Сшивание этих фотодеградируемых микрогелей было достигнуто посредством реакции сопряжения Михаэля между полиэтиленгликоль тетратиолом и фотолабильным ПЭГ-диакрилатом. TGF- β 1 загружали в

микросферы и высвобождали со светом в линию клеток-репортеров, чтобы продемонстрировать, что захваченный и высвобожденный белок оставался биоактивным. В работе [56] тиол-ен фото-клик реакцией были получены микрогели на основе ПЭГ через три различные системы двухфазной суспензионной полимеризации жидкость-жидкость. В одной из систем были использованы гексан в качестве органической фазы и 1% Спан-80/Твин-80 (1:3) в качестве поверхностно-активных веществ. Водный преполномерный раствор состоял из 10 масс% макромера ПЭГ-тетра-нонборнен (ПЭГ4НБ), сшивающего агента дитиотреитол (ДТТ) в стехиометрическом соотношении к нонборненовым группам и фотоинициатора Эозин-У. Обратную суспензию вода-в-масле готовили путем встряхивания двухфазной системы, а сшивание геля происходило под воздействием видимого света в течение 30 секунд, что изображено схематично на рисунке 6.

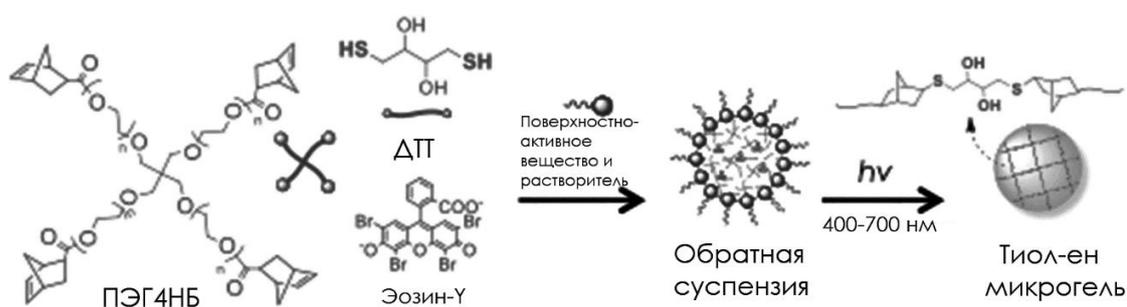


Рисунок 6 – Схема обратной суспензии и иницируемой видимым светом тиол-ен реакции для образования микрогелей [56]

Были сформированы полидисперсные тиол-ен микрогели (10–130 мкм) со средним диаметром 70 ± 3 мкм. Также в данной работе были успешно получены двуслойные микрогели, которые являются достаточно перспективными материалами в области биомедицины.

В последние годы множество полимерных наноносителей, таких как наногели, наночастицы, нанокапсулы, дендримеры и полимерные мицеллы, широко исследуются в качестве потенциальных систем доставки лекарств [57]. В работе [58] были получены рН-чувствительные наногели с ортосложноэфирными связями на основе диакриламида сложного ортоэфира, пентаэритритол тетра(3-меркаптопропионата) и метоксилполиэтиленгликоль акрилата. Показано, что размер наногелей можно регулировать на уровне 100–200 нм с относительно узким распределением. Доксорубицин (ДРБ) загружали в наногели (НГ) и эффективность загрузки лекарственного средства составила до 73,7%. В результате исследования высвобождения лекарственного средства *in vitro* было установлено, что высвобождение ДРБ из наногелей до 75,9% происходит за 24 часа при рН 5,0 из-за гидролиза ортоэфира. Исследования подтвердили, что загруженные доксорубицином наногели (НГ/ДРБ) могут легко усваиваться двумерными клетками, что приводит к повышению противоопухолевой эффективности раковых клеток. Для дальнейшей оценки

противоопухолевого эффекта НГ/ДРБ *in vitro* использовали трехмерные (3D) сфероиды многоклеточной опухоли. В сравнении со свободным доксорубицином НГ/ДРБ продемонстрировал повышенное проникновение и ингибирование роста многоклеточных опухолей в трехмерных сфероидах.

В работе [59] тиол-ен сополимеризацией пентаэритритолтетра(3-меркаптопропионата), полиэтиленгликоль диакрилата, метоксилполиэтиленгликоль акрилата и N-акрилоил-3-аминофенилбороновой кислоты в одном реакторе был получен новый чувствительный к глюкозе наногель. Высокая чувствительность к глюкозе проявляется благодаря присутствию фенилбороновой кислоты. О глюкозочувствительности материалов на основе фенилбороновой кислоты упоминается также во множестве других источников [60–62]. В глюкозочувствительный наногель были загружены Ализарин красный С и инсулин. Профили высвобождения *in vitro* показали, что высвобождение лекарственного средства из наногеля может быть вызвано присутствием глюкозы. Увеличение количества глюкозы в среде приводит к повышению и ускорению высвобождения лекарственного средства. Кроме того, с помощью пробы метилтиазолилтетразолия *in vitro*, пробы лактатдегидрогеназы и гемолизного теста была продемонстрирована биосовместимость наногеля. Из чего следует, что данный наногель может иметь отличную перспективу для саморегулируемого высвобождения лекарственного средства.

Storha и др. [42] описали синтез тиолированных и акриловых функциональных наночастиц из пентаэритритолтетраакрилат(3-меркаптопропионата) и пентаэритритолтетраакрилата методом тиол-ен «клик» химии как попытку получить тиолированные нано-носители со способностью к набуханию в органических растворителях для их последующей загрузки физиологически-активными веществами. Этот синтез был предпринят как альтернатива ранее полученным тиолированным кремний-содержащим наночастицам на основе 3-меркаптопропилтриметоксисилана [63–65]. В работе Storha с соавторами [45] было установлено, что реакции в среде диметилформамида приводили к образованию макроскопических прозрачных гелей или наночастиц в зависимости от общей концентрации и соотношения тетраиола к тетраакрилату. При этом наночастицы преимущественно образовывались при более низких концентрациях и менее стехиометрических соотношениях реагентов. Частицы, несущие избыточные тиольные группы и ранее флуоресцентно-меченные посредством тиол-ен «клик» реакции с флуоресцеин-5-малеимидом, были использованы как потенциальные мукоадгезивные носители. Тиолированные наночастицы были мукоадгезивными аналогично тиол-содержащим полимерам, которые широко применяются при разработке новых лекарственных форм для трансмукозальной доставки лекарств [66].

В работе Khutoryanskiy и Tirelli [67] тиол-ен «клик» реакция была использована в ходе синтеза наночастиц, чувствительных к окислению (рисунок 7).

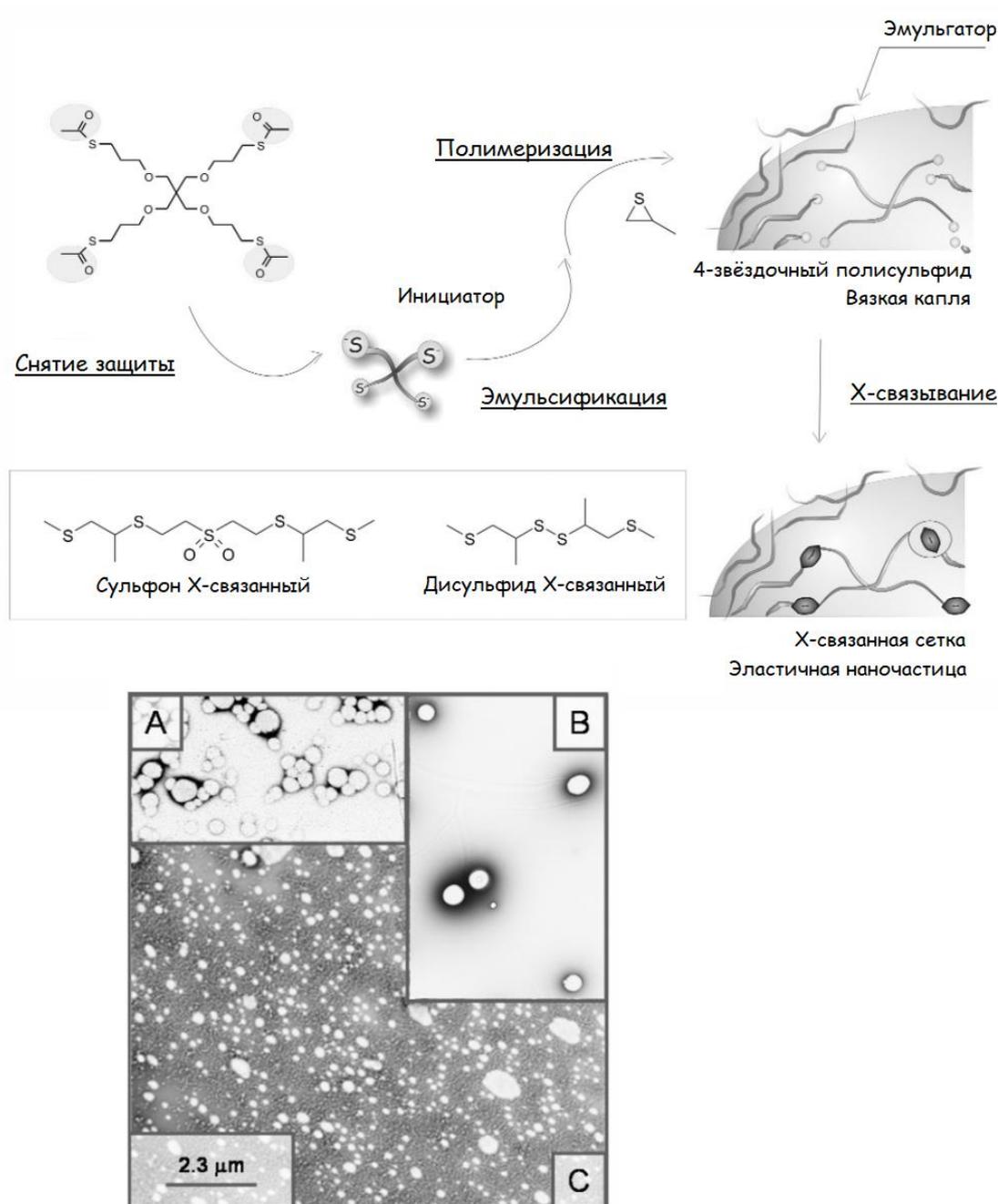


Рисунок 7 – Схема метода получения сшитых наночастиц полипропиленсульфида. Сшивки основаны на сульфонах (частицы А), 50:50 сульфонах/ дисульфидах (частицы В) или дисульфидах (частицы С) [67]

Такие наночастицы были получены эмульсионной полимеризацией пропилен сульфида с раскрытием цикла при использовании тетрафункционального инициатора. Данная полимеризация приводила к образованию поли(пропилен сульфида) с активными тиолат ионами на конце растущих цепей. Полимеризация терминировалась путем введения дивинилсульфона, что приводило к сшиванию образующихся крестообразных макромолекул и формированию эластичных наночастиц. Данные наночастицы проявляли гидрофобную природу в водных дисперсиях, но при их контакте с окислителями (например, перекись водорода), преобразовывались в

гидрофильные частицы. Авторами обсуждаются возможности применения таких наночастиц для доставки лекарств при лечении воспалительных процессов.

В работах Mansfield и др. [68,69] тиол-ен реакции использовались для получения флуоресцентно-меченых наночастиц, а также для их функционализации коротко-цепными поли(2-оксазолинами). Тиолированные наночастицы на основе 3-меркаптопропилтриметоксисилана метили флуоресцеин-О-метакрилатом и Alexa 546 с концевым малеимидом или BODIPY TMR C5 малеимидом. Флуоресцентный краситель прикреплялся к наночастицам посредством тиол-ен «клик» реакции. Модификация поверхности наночастиц поли(2-оксазолинами) осуществлялась посредством взаимодействия тиолов с поли(2-оксазолинами), содержащими непрелдельную (алкин) концевую группу.

Метод тиол-ен «клик» химии широко используется в синтезе различных видов частиц. Авторы [70] сообщают о «клик» синтезе биоразлагаемых наночастиц и нанокапсул (НК) посредством УФ-индуцированного тиол-ен сшивания полимеров-прекурсоров на основе полилактида в прозрачных миниэмульсиях. В работе [71] показано, что резорцинарен тиол кавитанд может образовывать полые полимерные нанокапсулы разной толщины и жесткости с различными алкенами реакцией тиол-ен «клик» химии. Также стоит отметить потенциал данного синтеза нанокапсул для применения в качестве нанореакторов и в наномедицине. Авторы [72] синтезировали НК сшитого полимера с цвиттер-ионными внешними оболочками УФ-индуцированной тиол-ен «клик» реакцией между дитиольным сшивающим агентом и гидрофобным аллил-функционализированным блоком сополимера в периферийной области наноскопических масляных нанокапель в миниэмульсии. Полученные нанокапсулы имели средний гидродинамический диаметр 136 нм. Поглощение НК раковыми клетками MIA PaCa-2 было показано в исследовании *in vitro*. *In vivo* исследование продемонстрировало, что НК имеют более длительное время циркуляции по сравнению с маленькими молекулами красителей, что способствует их накоплению в опухолях для визуализации раковых опухолей. Нанокапсулы обладают такими важными биомедицинскими характеристиками как биоразлагаемость, биосовместимость и высокая коллоидная стабильность, что делает их достаточно привлекательными материалами для диагностики рака.

В работе [73] полиаллильные карбосилановые дендримеры третьего поколения были модифицированы объемными тиолами фотоиницируемым тиол-ен присоединением, таким образом было показано, что гидротиолирование применимо для сборки и получения дендримеров следующих поколений. В работе [38] стратегия дивергентного роста в комбинации с тиол-ен «клик» химией (рисунок 8) и традиционных реакций этерификации были использованы для получения дендримеров четвертого поколения.

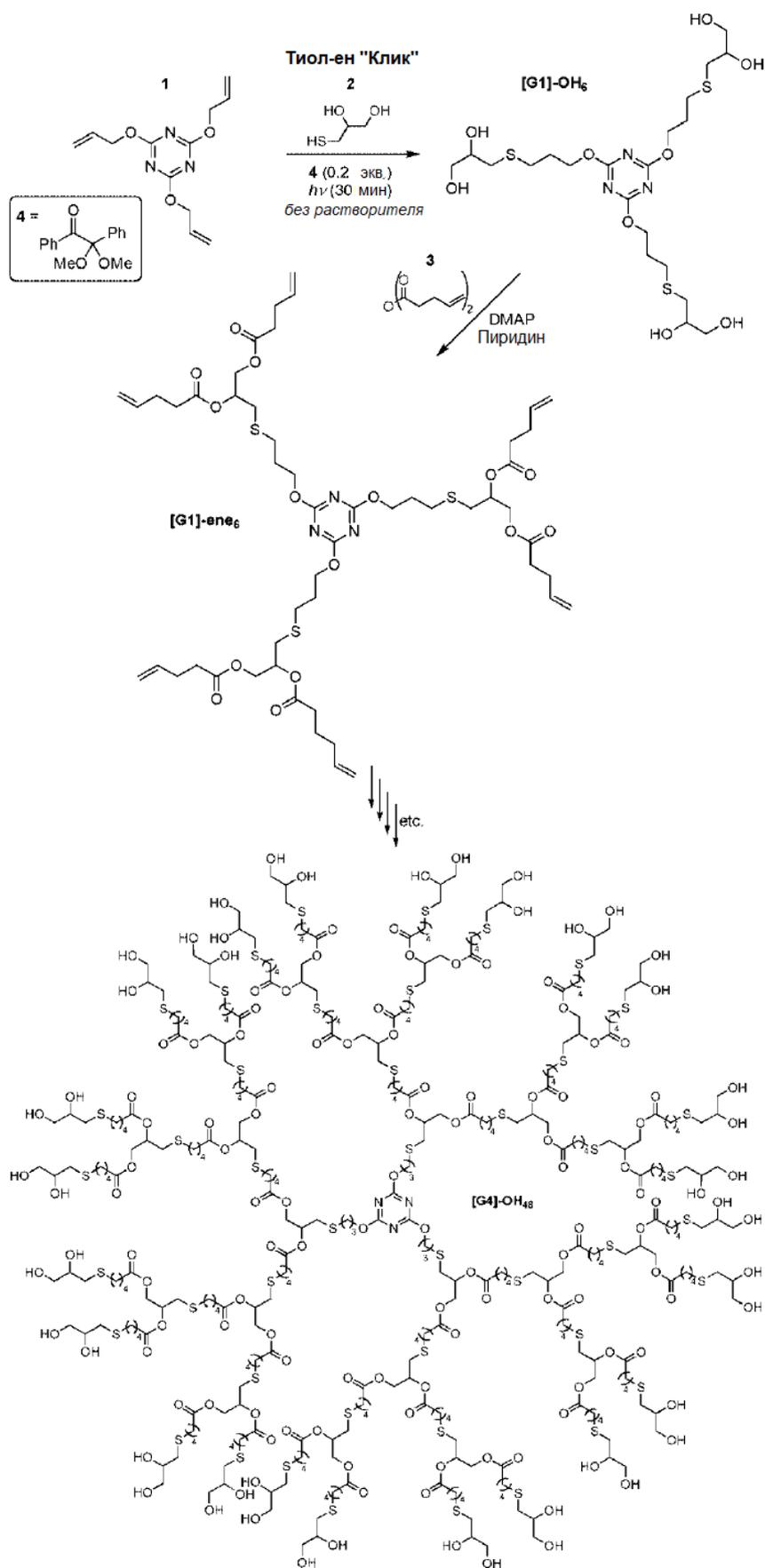


Рисунок 8 – Схема синтеза дендримера с использованием тиол-ен «клик» химии [38]

Отсутствие растворителя, комнатная температура, облучение УФ-светом были основными условиями тиол-ен «клик» реакции. Дендримеры были впоследствии функционализированы фрагментами тиогликолевой кислоты, 4-(пирен-1-ил)-бутил-2-меркаптоацетата и 9-флуоренилметоксикарбонил цистеина посредством тиол-ен «клик» реакций. Авторы [74] предложили ускоренный синтез серии дендримеров пятого поколения на основе 2,2-бис(гидроксиметил)пропионовой кислоты комбинацией тиол-ен «клик» реакций и реакций этерификации с использованием библиотеки сменных модульных мономеров AB₂/CD₂ всего за пять стадий, исключив необходимость в выполнении стадий защиты/снятия защиты. В работе [75] также была разработана эффективная стратегия ортогонального связывания для получения многофункциональных дендримеров с использованием углеводных строительных блоков, основанная на сочетании тиол-ен и SN₂ реакций. В исследованиях поверхностного плазмонного резонанса дендример, покрытый β-D-галактопиранозидом, проявлял нМ связывающую аффинность с бактериальным лектином, экстрагированным из *Pseudomonas aeruginosa*.

В работе [76] статистические и блок-сополимеры на основе поли(2-гидроксиэтилметакрилата) и поли[олиго-(этиленгликоль) метилэфирметакрилата] были модифицированы пент-4-еновым ангидридом для получения полимеров с боковой винильной группой. Последующая конъюгация с цис-диамминдихлороплатиной (II) приводит к образованию полимеров с подвешенными платино-содержащими физиологически-активными веществами. Гидрофобность препарата придала блок-сополимерам амфифильный характер, что привело к образованию мицелл. Авторы [77] синтезировали ряд биоразлагаемых полиэфиров с несколькими боковыми меркапто-группами поликонденсацией в расплаве диола полиэтиленгликоля, 1,4-бутандиола и меркаптоянтарной кислоты в присутствии трифторметансульфоната скандия [Sc(OTf)₃] в качестве катализатора. Затем сшиванием *in situ* блоков гидрофобного полиэфира с помощью тиол-ен «клик» химии в водной среде были получены ядро-сшитые (ЯС) мицеллы, нагруженные паклитакселом (ПТЛ). В качестве сшивающего агента был использован 2,2'-дитиодиэтанолдиакрилат. Эти мицеллы ЯС-SS, нагруженные ПТЛ, проявляли поведение, реагирующее на присутствие веществ с восстанавливающими свойствами, такими как дитиотреитол. Мицеллы ЯС-SS, нагруженные ПТЛ, стабильны в крови, эффективно поглощаются опухолевыми клетками за счет эффекта повышенной проницаемости и удерживания, быстро высвобождают противоопухолевые препараты в ответ на высокую концентрацию глутатиона в опухолевых клетках и, наконец, убивают опухолевые клетки, что делает их перспективным кандидатом на роль биоразлагаемого и биосовместимого наноносителя для противоопухолевой химиотерапии.

Стоит отметить, что недеградируемые тиол-ен «клик» полимеры находят перспективные биомедицинские применения в качестве стоматологических реставрационных композитов, благодаря некоторым характеристикам, таким как быстрая скорость полимеризации, высокая конверсия функциональных

групп и снижение усадочного напряжения при полимеризации [78,79]. В работе [80] олигомеры, функционализированные тиолами, были образованы посредством реакций присоединения Михаэля с использованием синтезированных мономеров тетра(2-меркаптоэтил) силана и дивинилсульфона. Затем полученные олигомеры фотополимеризовали с эквимольным количеством двойных связей триметилпропандиаллилового эфира. Тиол-ен стоматологические смолы без эфиров показали улучшенные механические характеристики, ограниченный потенциал поглощения воды/выщелачивания/разложения и низкое напряжение усадки при полимеризации.

Протеомика и функционализация белков

Принципы тиол-ен «клик» химии широко используются в изучении белков [81]. Одним из перспективных направлений в этой области является создание ферментных реакторов [82–84], которые имеют большой потенциал в наблюдении за перевариванием белков в реальном времени, экспресс-анализе и характеристике белков. Авторы [84] получили реактор с иммобилизованным ферментом (РИФ) на основе органического монолита триметилпропантриметакрилата (ТРИМ) тиол-ен «клик» реакцией. Поскольку скелет ТРИМ имеет особую поверхность, содержащую множество остаточных двойных связей после полимеризации, он может связать фермент реакцией со свободными тиольными группами трипсина при комнатной температуре. Переваривание стандартного белка бычьего сывороточного альбумина было использовано для оценки эффективности РИФ и сравнивалось с методом переваривания в растворе. Степень охвата последовательности бычьего сывороточного альбумина при использовании РИФ в течение 5 мин составила 79,41%, что было аналогично расщеплению в растворе в течение 12 часов (82,7%). Оценка применимости РИФ в сложных образцах была осуществлена путем переваривания экстрактов сырого протеина из яичного белка и печени мыши. При этом было идентифицировано 28 (104 пептида) и 843 (3916 пептидов) белков, соответственно. В работе [85] монолитные колонки на основе тетраметоксисилана и винилтриметоксисилана, функционализированные октадецилом, были адаптированы для протеомного анализа с использованием капиллярной жидкостной хроматографии и масс спектрометрии с LC–MS/MS. Функционализация монолитных колонок была проведена тиол-ен «клик» реакцией винильных групп с 1-октадекантиолом, 3-меркапто-1-пропансульфонатом натрия и 2,2-α-(этилендиокси)диэтанттиол/винилфосфоновой кислотой, соответственно. Было обнаружено, что полученная монолитная колонка 37 см в длину и 75 мм в диаметре может идентифицировать 3918 уникальных пептидов и 1067 уникальных белков в триптическом переваривании белков из клеток HeLa.

Функционализация самих белков также может быть осуществлена с помощью тиол-ен «клик» реакций [86], а именно ПЭГилирование некоторых белков за счет взаимодействия их тиольных групп с малеимидами [87], гликозилирование белков с образованием гликопротеинов [88,89], полимер-

протеин конъюгация [90,91] и т.д. Все эти реакции являются частными примерами образования сополимеров, например в работе [92] один из полимеров был винил-терминирован, а второй имел свободные SH-группы, тогда как в работе [93] бисмалеимид, 1,8-бис-малеимидодиэтиленгликоль, был использован для соединения RAFT-полимеризованного термочувствительного поли (N-изопропилакриламида) и овальбумина двумя последовательными тиол-ен реакциями.

Распознавание и разделение веществ

Хроматография — это наиболее широко используемый метод разделения в химических лабораториях, он используется для анализа, выделения и очистки соединений. В создании хроматографических и экстракционных материалов [43] часто применяются методы тиол-ен «клик» химии, а именно для приготовления монолитных колонок [94,95], стационарных фаз [96–99], сорбентов [100,101]. Например, в работе [97] тиол-ен «клик» реакции были применены в иммобилизации полиакриламида на алкенил-модифицированном диоксиде кремния для получения новой стационарной фазы для гидрофильной жидкостной хроматографии. Ряд типичных полярных соединений использовался для оценки ее хроматографических характеристик, а нуклеозиды и олигосахариды были выбраны для изучения потенциального применения при разделении полярных соединений.

Фталаты — это сложные эфиры, образованные фталевой кислотой и спиртами с различной структурой углеродной цепи, которые широко используются в пластмассовых изделиях. Проникновение данных соединений из упаковочных материалов в пищу или воду вызывает нарушения эндокринной системы и неблагоприятные последствия для здоровья человека и обусловлено тем, что между фталатами и пластификаторами существуют не химические, а физические связи. Поскольку существуют жесткие требования касательно концентрации фталатов, возникла необходимость в быстром, надежном и недорогом аналитическом методе для мониторинга фталатов в образцах пищевых продуктов. В исследовании [100] новый адсорбент на основе аптамера для определения фталатов был приготовлен «однореакторным» методом и тиол-ен «клик» реакцией между тиольной группой аптамера и двойной связью мономера, что привело к успешной иммобилизации аптамера на полимерной подложке. Аптамер проявил хорошую групповую селективность по сложноэфирным и бензоильным группам, поэтому адсорбент на основе аптамера продемонстрировал хорошие характеристики для распознавания фталатов с извлечением 66,10-108,90%; так его применяли для очистки образцов питьевой воды и сока от фталатов.

Материалы для обнаружения других веществ, в том числе и ионов металлов [102,103], также можно синтезировать с использованием тиол-ен «клик» химии. Загрязнение природных вод тяжелыми металлами остается нерешенной экологической проблемой, требующей развития технологий очистки. В статье [104] предложена разработка новой биогубки для адсорбции тяжелых металлов. Биогубка представлена альгинатной биополимерной сеткой, инкапсулированной восстановленным оксидом графена,

модифицированным наночастицами оксида железа, и ковалентно присоединенными молекулами мультитиола (пентаэритритолтетраakisмеркаптопропионата) с использованием фотоинициированной тиол-ен «клик» химии. Графеновая биогубка с SH-функционализацией превзошла коммерческие и опубликованные в литературе адсорбенты в высококонкурентных исследованиях селективности с использованием сосуществующих ионов тяжелых металлов (Cu, Co, Pb и Cd) - морская вода, продемонстрировав высокую адсорбционную способность по Pb (II): 101,01 мг/г и Cd (II): 102,99 мг/г. Работа [105] сообщает о тиол-ен «клик» синтезе нового магнитного мезопористого композита диоксид кремния/хитозан для селективного улавливания Hg (II) и высокой каталитической активности отработанного Hg (II) адсорбента.

Очистка выбросов

Быстрая и эффективная ликвидация утечки или выбросов органических соединений, таких как нефть и другие масла, является одной из приоритетных экологических проблем, так как подобные загрязнения наносят серьезный урон экосистемам и безопасности людей. В последнее время использование трехмерных (3D) пористых материалов, обладающих супергидрофобностью и высокой пористостью, рассматривается как потенциально эффективный метод удаления нефти. Благодаря сродству к маслу и водоотталкивающим свойствам эти специальные трехмерные материалы могут избирательно поглощать масла из воды. В работе [106] для удаления масел были получены супергидрофобные меламиновые губки с использованием тиол-ен «клик» химии. Получение материала состояло из двух стадий: формирование слоя тиольных групп реакцией меркаптосиланов со вторичными аминогруппами на поверхности меламиновой губки и дальнейшее взаимодействие этих групп с длинноцепочечными метакрилатами для придания супергидрофобности. Контактный угол смачивания водой для полученных губок составил 152,8°, что обуславливает их отличные водоотталкивающие свойства. Кроме того, меламиновые губки могли не только абсорбировать различные органические соединения с абсорбционной способностью в 72-160 раз больше собственного веса, но также избирательно и непрерывно удалять масло из воды. После 16-кратного повторного использования путем сорбции/отжима губка все еще сохраняла высокую впитывающую способность. Подобные губки также были получены на основе целлюлозы и полиуретана в работах [107,108].

В последнее время мембранная технология привлекает к себе особенный интерес при очистке нефтесодержащих сточных вод. Причиной стали их высокая эффективность разделения, низкое энергопотребление и экономичные производственные процессы. В частности, мембранные технологии открывают путь к эффективному отделению эмульсий от воды. Несмотря на эти преимущества мембранной технологии, используемые полимерные мембраны имеют некоторые недостатки. Например, они легко загрязняются или даже забиваются масляными веществами в процессе фильтрации, что приводит к значительному сокращению срока службы этих мембран. Одним из эффективных путей улучшения противообрастающих

свойств мембраны является гидрофильная модификация. В работе [109] описывается высокогидрофильная полиакрилонитрильная (ПАН) мембрана, успешно разработанная с помощью тиол-ен «клик» химии. Эффективность разделения ПЭГирированной мембраны для нескольких видов эмульсий «масло в воде» достигает 99,9%, что свидетельствует об отличных характеристиках разделения. А в работе [110] полиакрилонитрильная мембрана была модифицирована цвиттер-ионным поли(сульфобеттаинметакрилат)ом с помощью тиол-ен «клик» химии (рисунок 9).

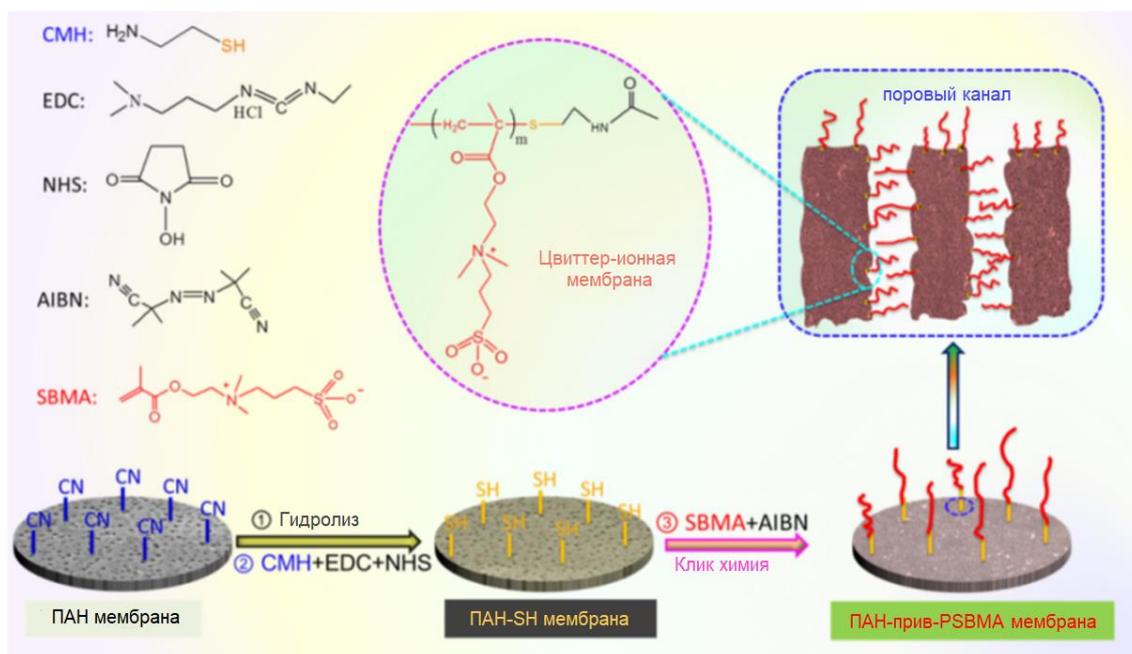


Рисунок 9 – Схема построения цвиттер-ионной ПАН мембраны с помощью тиол-ен «клик» химии [110]

Чтобы изготовить мембрану, первичную мембрану из ПАН сначала гидролизовали, а затем подвергли реакции амидирования, чтобы создать тиолированную поверхность. После этого цвиттер-ионный поли(сульфобеттаинметакрилат) был привит на тиолированную поверхность посредством тиол-ен «клик» реакции. Измерения контактного угла смачивания чистой воды и маслянистых соединений подтвердили, что полученной цвиттер-ионной структуре была характерна супергидрофильность, подводная суперолеофобность и устойчивость к масляному загрязнению мембраны. Цвиттер-ионная мембрана продемонстрировала высокую эффективность разделения с удалением более 99,4% масла при разделении некоторых эмульсий типа «масло в воде». Многоцикловая фильтрация была использована для исследования противообрастающей способности мембран из цвиттер-ионного полиакрилонитрила.

Получение супергидрофобных покрытий

Супергидрофобные материалы могут быть представлены не только в виде губок и мембран, также супергидрофобные покрытия можно наносить на

различные поверхности. В последние годы очень популярным стало изготовление супергидрофобных поверхностей, то есть нанесение супергидрофобных покрытий на стекло, бумагу, дерево, металл и ткани. В работах [111,112] были получены супергидрофобные хлопчатобумажные ткани с использованием тиол-ен «клик» химии. Chen и др. провели реакцию между винилтриметоксисиланом и меркаптаном в ультрафиолетовом свете с образованием гидрофобного реагента и его дальнейшего гидролиза в соответствующих условиях [112]. Супергидрофобность достигается обезвоживанием гидролизованного продукта и конденсацией с помощью хлопчатобумажной ткани при высоких температурах. Контактный угол смачивания данных поверхностей водой составлял 159° , а угол скольжения - $7,2^\circ$.

Создание адгезивных материалов

Помимо использования тиол-ен «клик» химии для создания и модификации материалов, такие реакции могут обеспечивать усиленную способность полимеров к адгезии по отношению к биологическим поверхностям. Так, в ряде работ последних лет была показана усиленная адгезивность полимеров функционализированных акрилоильными [113–115], метакрилоильными [116,117] и малеимидными [118–121] группами, по отношению к слизистым поверхностям человека и животных. Данная способность обусловлена возможностью образования ковалентных связей между материалами, содержащими непредельные группы и муцинами, содержащими тиольные группы и присутствующими на поверхности слизистых мембран. Важно отметить, что такие «клик» реакции происходят довольно быстро при физиологических условиях. Это дает возможность использования полимеров и коллоидных частиц с поверхностными непредельными группами в качестве био- и мукоадгезивных носителей лекарственных веществ.

1.2 Биодegradация

Использование полимерных материалов в медицинских устройствах и в целом фармацевтике нашло большое распространение в последние годы.

В последние два десятилетия двадцатого века произошел переход парадигмы от биостабильных биоматериалов к биодegradируемым (гидролитически и ферментативно разлагающимся) биоматериалам для медицинских и смежных применений. Текущая тенденция предсказывает, что в ближайшие пару лет большинство постоянных протезов, используемых для временных терапевтических применений, будут заменены биоразлагаемыми устройствами, которые могут помочь организму восстановить поврежденные ткани [122].

Биодegradируемые имплантируемые полимеры для тканевой инженерии и высвобождения лекарственных средств предоставляют возможность избежать постоянного и хронического иммунного ответа и избежать операции по удалению импланта; кроме того, универсальность полимерных материалов позволяет формировать специфические характеристики биодegradации для

контроля высвобождения лекарственного средства, для разработки рассасывающихся устройств, а также для улучшения интеграции клеток.

Биодеградация - это термин, используемый для описания процесса деструкции материала природой; однако в случае биоматериалов медицинского назначения биодеградация фокусируется на биологических процессах внутри организма, которые вызывают постепенное разрушение материала [123].

Можно отметить ряд групп материалов, которые должны быть устойчивы к биодеградации в биологической среде или, наоборот, распадаться в ней с той или иной скоростью.

А. Объекты, которые длительное время должны быть устойчивы в условиях функционирования в контакте с агрессивной биологической средой (поверхности, устойчивые к биоповреждению, антиобрастающие покрытия, имплантаты с длительными сроками пребывания в организме).

Б. Объекты, функционирующие в течение длительного времени, но по возможности быстро распадающиеся в биологической среде после использования.

В. Объекты, распадающиеся с контролируемой скоростью [124].

При этом положительная или отрицательная роль биодеструкции в биосовместимости изделий медицинского назначения на длительных сроках имплантации определяется областью применения имплантата.

Для изделий, предназначенных для замены жизненно важных органов или функций организма, например, протезы кровеносных сосудов и клапанов сердца, кардиостимуляторы, искусственное сердце и т. д., процесс биодеградации приводит к потере функциональных свойств имплантата. Материалы для таких имплантатов должны быть устойчивы к процессам биодеградации.

Противоположные требования предъявляются к материалам (изделиям), предназначенным для временного функционирования в организме (полимерные носители лекарственных веществ, шовные нити, некоторые виды пластики мягких тканей). В этом случае биосовместимые материалы (изделия) должны обладать контролируемой биодеструкцией с образованием и удалением из организма биологически безопасных продуктов распада и постепенным замещением их естественными тканями [125].

Для того, чтобы понять какими же должны быть биодеградируемые материалы, остановимся на основных свойствах, которые они должны проявлять:

- материал не должен вызывать устойчивый воспалительный или токсический отклик при имплантации в организм;
- материал должен иметь приемлемый срок годности;
- время деградации материала должно соответствовать процессу заживления или регенерации;
- материал должен иметь соответствующие механические свойства для указанного применения, а изменение механических свойств при деградации должно быть совместимо с процессом заживления или регенерации;

- продукты деградации должны быть нетоксичными и способны усваиваться и очищаться от тела;

- материал должен иметь соответствующую проницаемость и технологичность для предполагаемого применения [126].

Биоразлагаемые полимеры представляют собой растущую отрасль. Огромное количество биodeградируемых полимеров (например, целлюлоза, хитин, крахмал, полигидроксиалканоаты, полилактид, поликапролактон, коллаген и другие полипептиды) синтезируются или образуются в естественной среде во время циклов роста организмов. Определены некоторые микроорганизмы и ферменты, способные разрушать такие полимеры [127].

Существуют разные классификации биodeградируемых полимеров, здесь будет приведена классификация полимеров в зависимости от их происхождения (рисунок 10). Природные биоразлагаемые полимеры включают полисахариды (крахмал, целлюлоза и т.д.), белки (желатин, шерсть, шелк, и т.д.), липидные жиры (жиры и масла), сложные полиэфиры, полученные с помощью растений или микроорганизмов (полигидроксиалканоаты), сложные полиэфиры, полученные из биомономеров (полимолочная кислота), а также несколько различных полимеров, таких как натуральные каучуки и композиты. Другие типы - невозобновляемые, синтетические, биodeградируемые пластмассы, которые основаны на нефти, такие как полибутиленсукцинат и поликапролактон. Другими полимерами, которые подвергаются биоразложению, однако не входящими ни в одну категорию, являются полиангидриды и поливиниловый спирт [128].

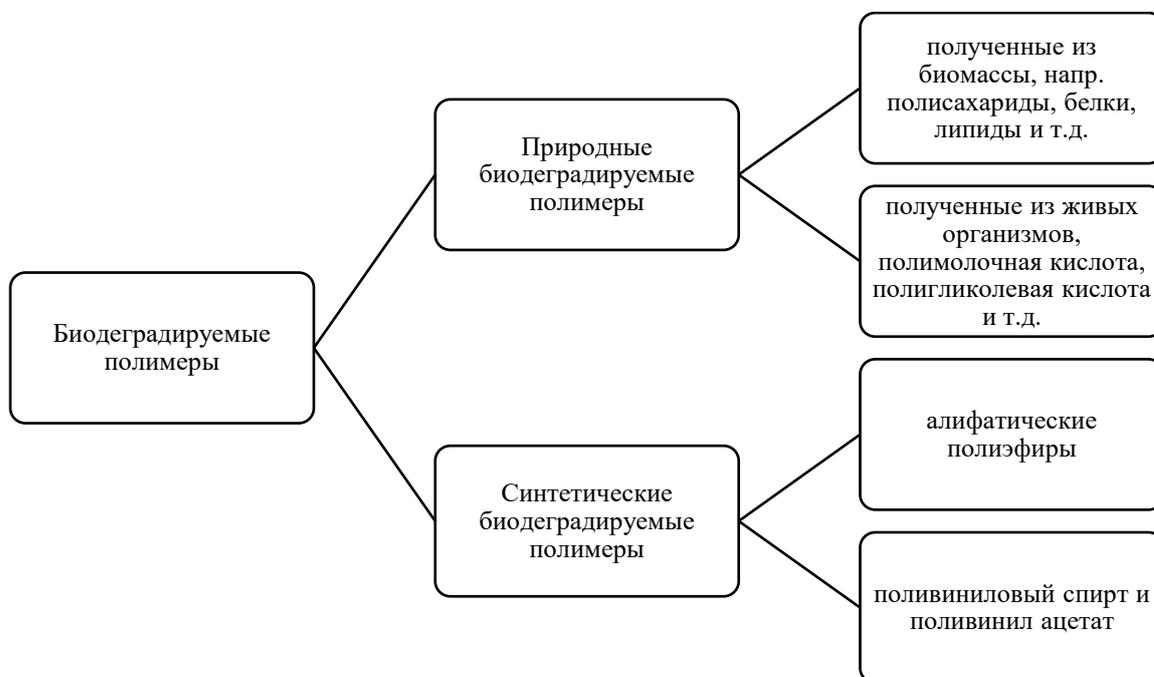


Рисунок 10 – Классификация биodeградируемых полимеров [128]

Основные направления применения биodeградируемых полимеров в медицине можно условно разделить на три категории: системы доставки лекарств, ранозаживляющие средства и лечебные продукты, а также хирургические имплантационные устройства. Доставку лекарств в человеческом организме можно легко контролировать с помощью биоразлагаемых капсул. При заживлении ран доступны рассасывающиеся нетканые материалы для замены тканей, а также простые швы, скобы, зажимы или сетки. В связи с этими применениями стоит упомянуть также использование биodeградируемых материалов в качестве биорезонансных каркасов для тканевой инженерии [129].

Полимерные биоматериалы в общем можно классифицировать на две категории: гидролитически разлагаемые полимеры и ферментативно разлагающиеся полимеры, принимая во внимание тип деградации для соответствующих полимеров. Рассмотрим подробнее первую категорию полимеров.

Гидролитически разлагаемые полимеры представляют собой полимеры, которые имеют гидролитически лабильные химические связи в своем строении. Классы соединений, восприимчивые к гидролизу, включают сложные эфиры, ортоэфиры, ангидриды, органические карбонаты, уретаны, амиды, мочевины и т.п (рисунок 11) [130].

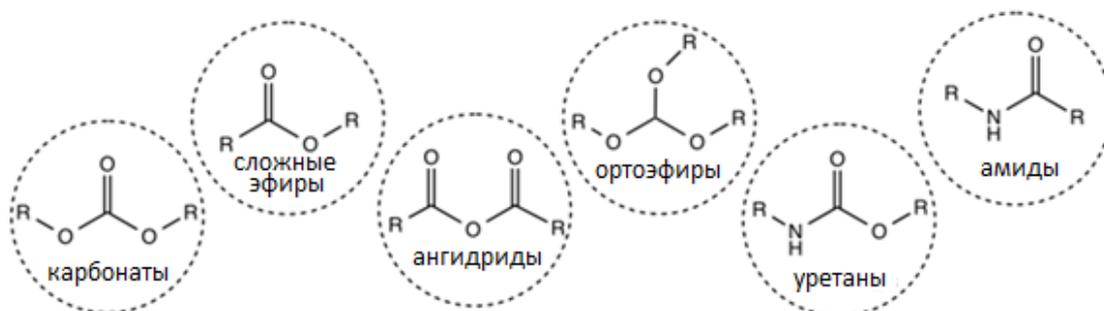


Рисунок 11 – Гидролизуемые классы соединений

Гидролиз функциональных групп происходит в соответствии с известными схемами (рисунок 12):

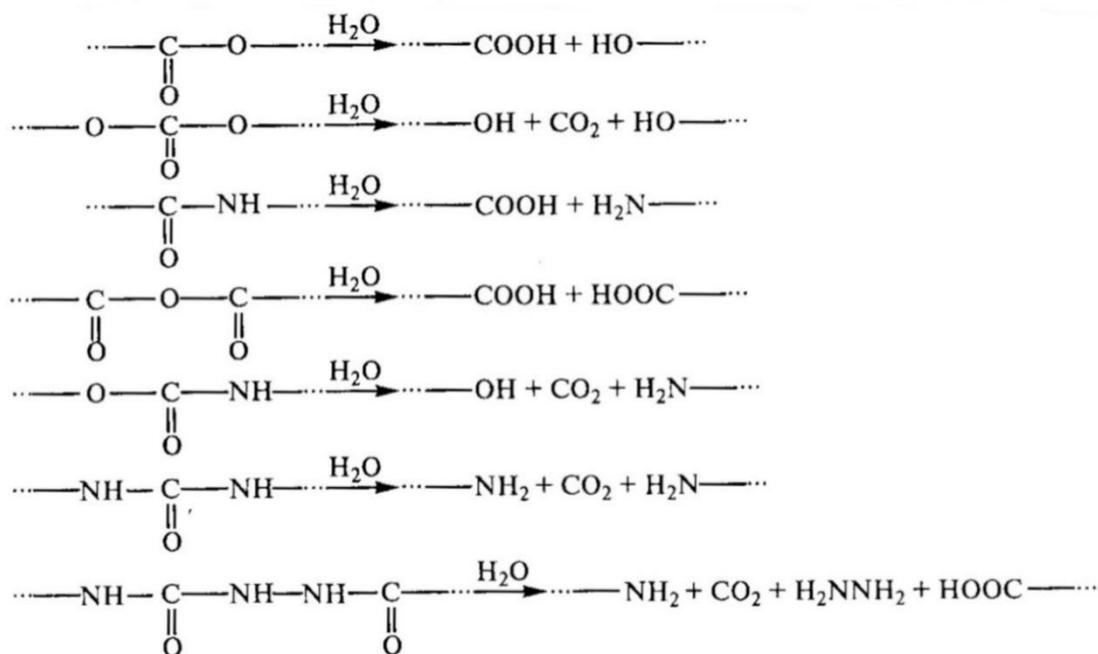


Рисунок 12 – Схемы гидролиза функциональных групп [131]

На гидролитическую деструкцию биоматериалов влияют состав окружающей среды, ее температура и pH, а также свойства самого материала [132], которые приведены в таблице 1:

Таблица 1 – Свойства материалов, влияющие на биodeградацию

Химический состав и особенности строения	длина полимерной цепочки, наличие боковых цепей, доступность химически нестойких связей, образование в предшествующей фазе групп, влияющих на последующие превращения (электрически заряженные группы, продукты деструкции), молекулярная масса, различные добавки, лекарственные препараты, антиоксиданты и т.д.
Физическая структура	пористость, степень кристалличности, надмолекулярная структура, поверхностные дефекты, технологические дефекты

Механизм гидролитической деструкции проходит через четыре этапа, как показано на рисунке 13:

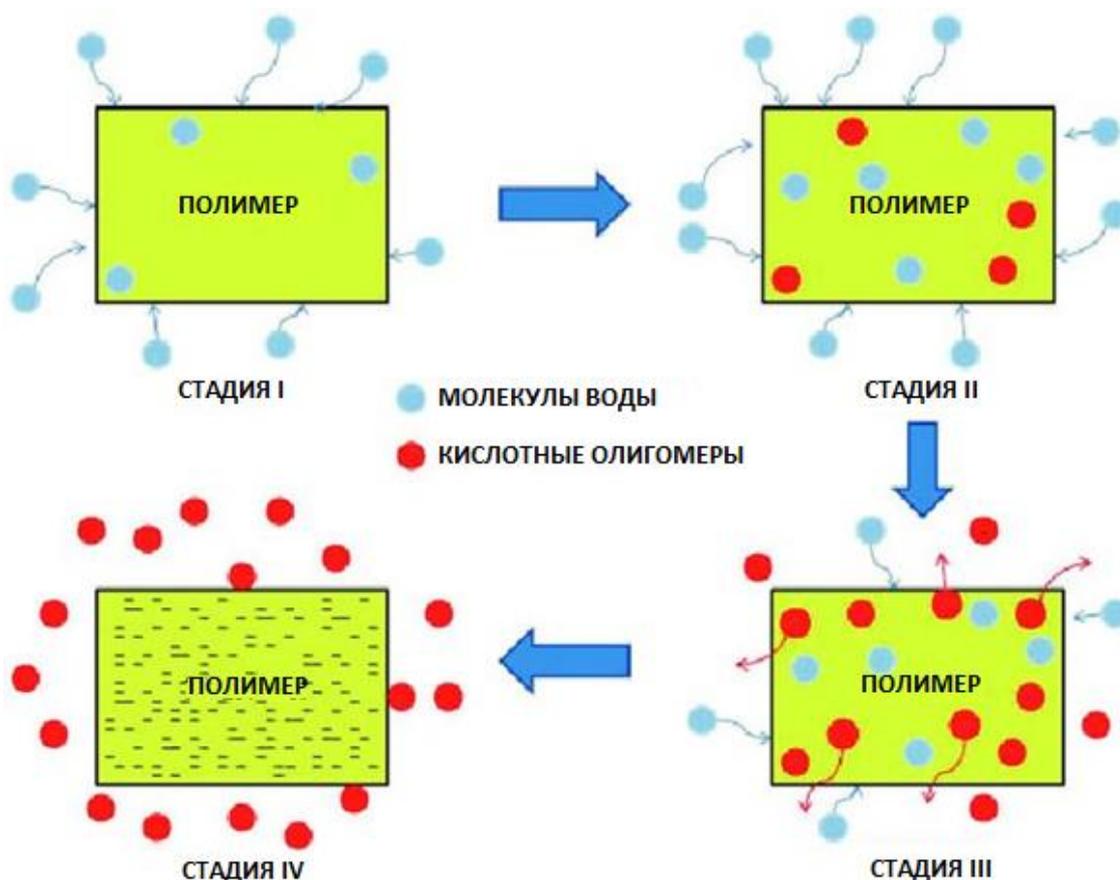


Рисунок 13 – Схема механизма гидролитической деструкции [133]

Первая стадия – это диффузия воды, она проникает в полимерную матрицу и разрушает межмолекулярные взаимодействия, что приводит к релаксации и уменьшению температуры стеклования, за ней следует вторая стадия, в которой олигомеры с кислотными концевыми группами автокатализуют реакцию гидролиза, в гидратированных областях полимера начинается разрушение ковалентных связей в структуре полимера, что приводит к снижению молекулярной массы. На третьей стадии молекулярная масса снижается до тех пор, пока не достигает значения, при котором целостность полимера дольше не может сохраняться, и олигомеры начинают диффундировать из полимера. На четвертой стадии происходит растворение полимера, полимер продолжает терять массу, и фрагменты далее расщепляются до молекулярных, растворимых в среде [133].

Помимо механизма гидролитической деструкции можно выделить механизмы окислительной и ферментативной деструкции [134].

Воспалительная реакция клеток, таких как лейкоциты и макрофаги, производит активные формы кислорода, такие как оксид азота, пероксид водорода, или супероксид. Эти формы вызывают деградацию полимеров [135]. Некоторые биополимеры, такие как полиэтилен, полиэфир и полиуретаны, более подходят для окислительной деградации, поскольку их структура может легко генерировать свободные радикалы. Этот вид деградации идет по общему механизму, показанному на рисунке 14: (1) инициирование свободных

радикалов, генерируемых воспалительными клетками, или тепловыми, фотохимическими и радиационными процессами; (2) пролиферация свободных радикалов серией реакций с кислородом; (3) полученные свободные радикалы реагируют с полимером и переносятся в разные области полимерной цепи; и, наконец, (4) расщепление полимерной цепи на свободнорадикальных участках образует более короткие сегменты [136].

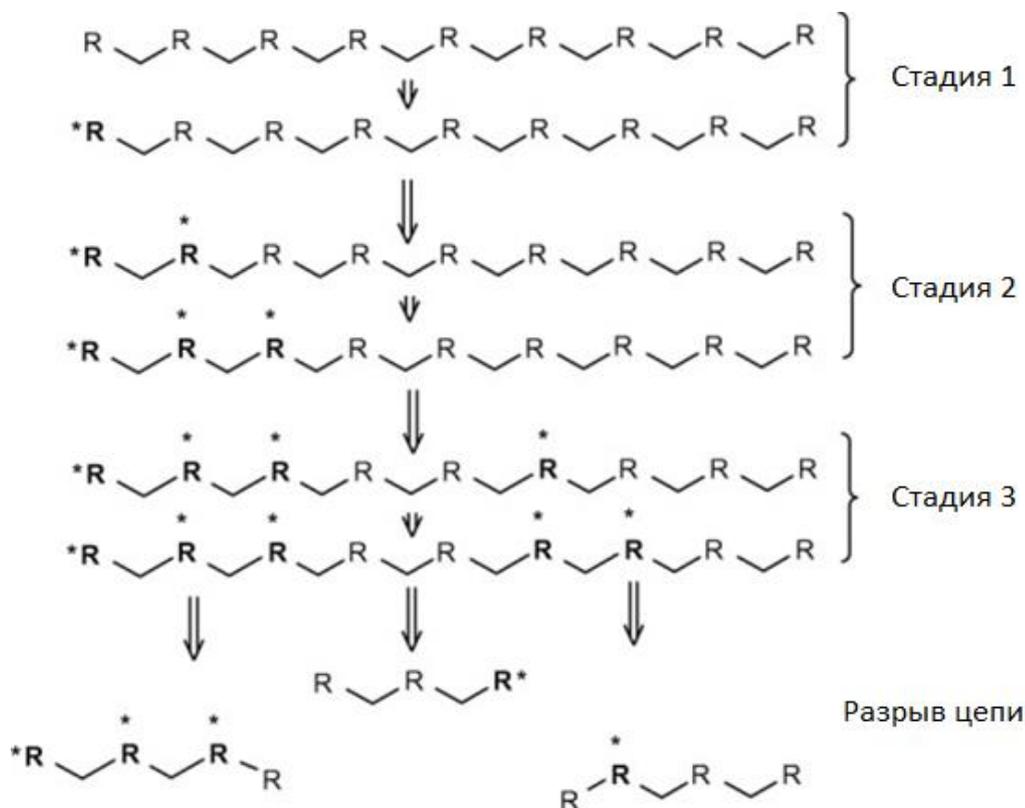


Рисунок 14- Схема общего механизма реакции окисления

С другой стороны, ферментативная деградация включает гидролиз, катализируемый ферментами, известными как гидролазы, такие как протеазы, гликозидазы и фосфатазы. Этот механизм ограничивается эрозией поверхности: полимеры теряют материал с поверхности, поскольку ферменты не могут проникать в полимер. На ферментативную деградацию влияют такие факторы, как взаимодействие с полимерной цепью (диффузия или адсорбция фермента), физико-химические свойства субстратов (молекулярная масса, площадь поверхности), свойства фермента, условия окружающей среды (рН, температура) и наличие активаторов или ингибиторов в среде [137].

Тесты деградации *in vitro* биodeградируемых полимеров в простых стареющих средах обычно проводятся для прогнозирования эффективности таких полимеров в клинической ситуации. Принимая во внимание сложность жидкостей организма, обычно обнаруживают разные результаты, когда одни и те же материалы изучаются как *in vitro*, так и *in vivo*. Тем не менее результаты *in vitro* могут представлять собой полезный подход для прогнозирования

скорости деградации биоматериалов, а также руководство для планирования исследований *in vivo* [138].

Большинство исследований по деградации, описанных в литературе, проводят путем инкубации материала в растворе фосфатного буфера. Таким образом, ожидается, что произойдет только деградация при нормальном гидролизе. Ноорег и его коллеги [139] обнаружили, что как фосфатный буфер, так и искусственная жидкость организма являются подходящими буферами для инкубации для точного моделирования деградации *in vivo* полимеров, полученных из тирозина. Небуферизованные растворы (вода, изотонические солевые растворы) также использовались во многих исследованиях деградации, но эти тесты игнорировали буферную емкость биологических жидкостей. Кроме того, многие из тестов на деградацию не предполагают возобновления среды деградации, и, опять же, такие протоколы испытаний не позволяют уносить продукты деградации потоком жидкости, присущие условиям *in vivo* [140].

Другой важной проблемой является отношение массы/объема, используемое в тестах на деградацию. В литературе сообщалось о разных соотношениях массы и объема, и это может повлиять на кинетику деградации биоматериалов. Известно, например, что суставная хрящевая ткань довольно бессосудистая, [141], что означает низкий уровень окружающих жидкостей.

Большое разнообразие условий, используемых в различных исследованиях деградации, не позволяет проводить прямых сравнений, и целесообразно использовать стандартизированные методы для характеристики характеристик разложения биоматериалов. Стандарты ИСО 10993-9 и 10993-13 содержат рекомендации по общим требованиям для разработки тестов для оценки деградации биоматериалов и для идентификации и количественного определения продуктов разложения из полимеров соответственно. В этих стандартах также упоминается, что из-за широкого спектра полимерных материалов, используемых в биомедицинских применениях, испытания на деградацию следует проводить в условиях, которые тесно имитируют среду, в которой материал будет использоваться, и что условия должны отражать предполагаемые функции материала.

В принципе, биодеградация полимерного материала может протекать (рисунок 15):

- в поверхностном слое – внешней диффузионно-кинетической области, т.е. в слое, диффузионно доступном для жидкой окружающей среды. При этом свойства материала, в том числе молекулярная масса полимера, за пределами этой области не изменяются до разрушения внешнего слоя. Такой процесс приводит к биоэрозии поверхности объекта, т.е. появлению на ней неровностей, впадин и т.д.;

- в объеме полимерного изделия, когда скорость проникновения жидкой биологической среды в массу изделия превышает скорость распада полимера, например, при высокой набухаемости изделия в биологической среде, когда проникновение факторов, способствующих биотрансформации, в том числе ферментов, облегчено.

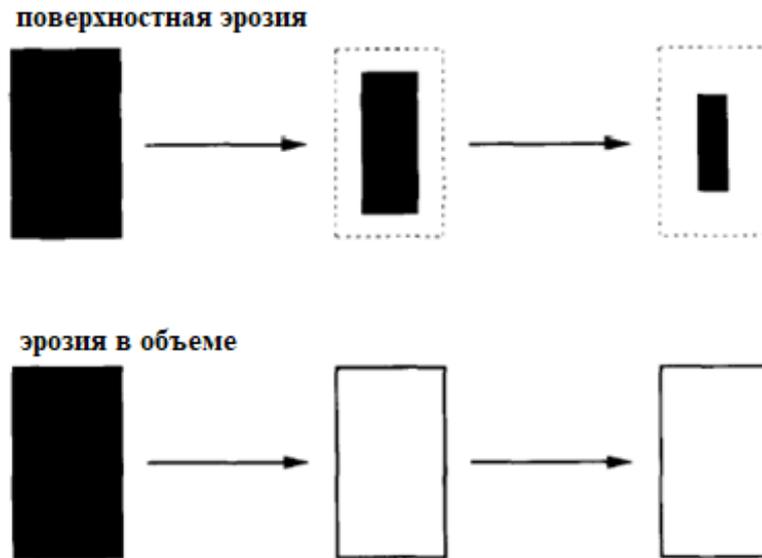


Рисунок 15 – Схема поверхностной биодegradации и биодegradации в объеме [142]

На практике эти два механизма представляют крайние случаи. Для большинства биоразлагаемых полимеров имеют место оба механизма, но относительная степень поверхностной или объемной эрозии радикально зависит от химической структуры основной цепи полимера [143].

К поверхностной эрозии склонны материалы, состоящие из функциональных групп с коротким периодом полураспада при гидролизе. Примерами полимеров, подвергающихся поверхностной эрозии, являются поли(ангидриды) и поли(ортоэфир). Оба этих класса биоразлагаемых полимеров обладают высоколабильными группами, обеспечивающими быстрый гидролиз полимерных цепей, сталкивающихся с молекулами воды. Водопроницаемость замедляется за счет дизайна полимеров с гидрофобными мономерными звеньями. При идеальной поверхностной эрозии скорость эрозии прямо пропорциональна площади внешней поверхности. Эрозия происходит с постоянной скоростью в любой момент эрозии. Поверхностная эрозия может привести к высвобождению лекарств нулевого порядка при условии, что диффузионное высвобождение ограничено, а общая форма остается постоянной [144,145].

Однако для полимеров, разрушающихся в объеме, таких как поли(d,l-молочная кислота) и поли(d,l-молочная-со-гликолевая кислота), все сложнее, поскольку они не имеют постоянной скорости эрозии [146]. Объемная эрозия менее предсказуема, чем поверхностная, и не защищает лекарственные вещества от окружающей среды, что является большим недостатком для контролируемой доставки лекарств. [143]

1.3 Применение полимеров в качестве деградируемых материалов

В последнее время большое внимание уделяется контролю над гидролитическими и биodeградационными свойствами полимерных материалов. Множество гидролитически разлагаемых гидрогелей являются продуктами как цепной, так и ступенчатой полимеризации. Однако, известно, что гидрогели, полученные цепной фотополимеризацией образуют плотные гидрофобные полиакрилатные цепи [147], что приводит к неоднородности сетки и высокомолекулярным продуктам разложения [148–150]. С другой стороны, образование гидрогелей ступенчатой полимеризацией Михаэля часто требует длительного времени гелеобразования, что приводит к образованию высокой степени дефектов сетки. Было обнаружено, что высокофункциональные макромеры (например, ПЭГ-акрилат с 8 ответвлениями) с концентрацией (например, >50 мас.%) необходимы для достижения «идеальной» сетчатой структуры [151]. Поэтому тиол-ен «клик» реакции являются отличной альтернативой вышеуказанным способам получения гидролитически разлагаемых гидрогелей. Ступенчатые тиол-ен фотоклик-реакции не ингибируются кислородом [13], что приводит к более высокой скорости гелеобразования по сравнению с цепной фотополимеризацией [152].

Группа Bowman осуществила первичные исследования в направлении деградации тиол-еновых полимеров. Reddy, Bowman и Anseth [153] изучали, в частности, разлагаемые тиол-акрилатные фотополимеры. Они представляют собой новый класс биоматериалов, особенностью которых является быстрая полимеризация в физиологических условиях при воздействии ультрафиолетового света, в присутствии фотоинициаторов или без них, и на глубине более 10 см. Эти материалы формируются *in situ*, и однородность их химического состава обеспечивает высокую степень контроля над конечными свойствами материала. В работе [37] был получен биodeградируемый гель на основе циклического ацетального мономера с реагирующей диаллильной группой и многофункциональных тиолов также методом тиол-ен фотополимеризации. Vandenberg с соавторами занимались синтезом биodeградируемых линейных поли(β -тиоэфиров) ступенчатой тиол-ен полимеризацией из простых дитиолов и диакрилатов [154,155]. Авторы [156] получали дифункциональные деградируемые 2-оксазолины тиол-ен реакцией димеркаптоацетата гликоля или 2,2'- (этилендиокси) диэтантиола и 2-бут-3'-енил-2-оксазолина или 2-дец-9'-енил-2-оксазолина. Наиболее вероятно, что деградация полимеров в упомянутых выше работах происходит за счет гидролиза сложноэфирных связей, как это было показано в работах [122,157].

Наша группа получила деградируемые гели на основе пентаэритритолтетраakis(3-меркаптопропионата) (ПЭМП) с пентаэритритолтетраакрилатом (ПЭТА) и триметилпропантриакрилатом посредством тиол-ен «клик» реакции [158]. Биodeградация этих материалов изучалась в различных условиях *in vitro*. Было установлено, что гели подвергаются очень медленной гидролитической деградации, и этот процесс не ускоряется в присутствии эстеразы. Окислительная деградация этих

материалов протекает более интенсивно и в некоторых случаях приводит к полному распаду полимерной сетки на мелкие частицы.

Деградация полимеров может быть использована в создании материалов биомедицинского назначения для доставки малых лекарственных молекул [159], а также белковых молекул [160]. Гидрогели ПЭГ, полученные в результате тиол-ен «клик» реакций, создают подходящие условия для устойчивой и локализованной доставки биоактивных малых молекул, например, глюкокортикоидов [161]. Для подтверждения концепции синтетический глюкокортикоид дексаметазон был присоединен к N-концу пептида, разлагаемого матричной металлопротеиназой, который затем легко сополимеризовался в каркасы геля ПЭГ с помощью механизма тиол-ен полимеризации. Конъюгированный дексаметазон был локально изолирован до высвобождения путем расщепления пептидного линкера, инициированного секретлируемыми клетками матричной металлопротеиназы, и был доступен только для поглощения локальными совместно инкапсулированными клетками. В работе [162] гидрогели на основе полиэтиленгликоля, сшитые с бычьим сывороточным альбумином, чувствительным к нейтрофильной эластазе человека, были получены путем тиол-ен фотополимеризации. Данные гидрогели показали способность к разложению при распознавании клеточного ответа на участках воспаления. Авторы продемонстрировали, что синтезированный гидрогель можно использовать в качестве платформы для доставки белковых лекарств, и, возможно он также подходит для контролируемого высвобождения многих других гидрофильных лекарств, чтобы избежать их денатурации из-за гидрофобного взаимодействия в организме. Бычий сывороточный альбумин поместили в полимерную матрицу данного материала, и он выборочно высвобождался при воздействии нейтрофильной эластазы человека.

Следует уделить внимание еще одному биомедицинскому применению тиол-ен «клик» химии, такому как создание материалов для культивирования клеток [163]. Разработка имитаторов внеклеточного матрикса приобрела популярность как способ создания легко настраиваемых материалов, которые напоминают естественную среду вокруг клеток [164]. В работе [165] сополимерные прекурсоры гидрогеля на основе метоксиполиэтиленгликоль акрилата, Цис-Арг-Гли-Асп-Сер, 5-норборнен-2-метиламина были синтезированы с использованием комбинации RAFT-полимеризации и постполимеризационного аминолита и тиол-ен «клик» реакций. Прекурсор был сшит в видимом свете тиол-ен «клик» реакцией с использованием эозина-У в качестве катализатора, как более щадящей методикой фотосшивки по отношению к клеткам, чем УФ. Наконец, применение этих гидрогелей в 3D-культурах клеток было продемонстрировано с использованием клеток аденокарциномы протоков поджелудочной железы. Такие платформы очень удобны для изучения роста, морфогенеза, лекарственной устойчивости и экспрессии маркеров раковых стволовых клеток в клетках аденокарциномы протоков поджелудочной железы в 3D-культурах клеток, как в работе [166]. Авторы синтезировали десмоплазий-имитирующие гидрогели, т.е.

гидрофильные полимерные материалы, способные имитировать опухолевые ниши, путем сшивания полиэтиленгликоля-тетра-норборнена с пептидным субстратом с бис-цистеиновыми концевыми группами посредством тиол-ен полимеризации. Пептидный сшивающий агент обладает высокой специфичностью в отношении матричной металлопротеиназы мембранного типа 1.

В работах [152,167,168] стратегия тиол-ен «клик» реакций применяется для получения гидрогелей, используемых в инкапсулировании клеток. Гидрогели обеспечивают трехмерные каркасы с эластичностью, подобной тканям, и высокой проницаемостью для культивирования терапевтически важных клеток или тканей. Авторы [168] получили гидрогели на основе метакрилированной гиалуроновой кислоты и мульти-тиол-функционализированного цвиттер-ионного сополимера на основе поли(карбоксиветан метакрилата) и N,N'-бис(акрилоил)цистамина в физиологических условиях без присутствия какого-либо медного катализатора и УФ-излучения. Благодаря превосходным противоположающимся свойствам цвиттер-ионного компонента, гидрогели продемонстрировали устойчивость к адсорбции белков и антиклеточную адгезию. Результаты также свидетельствуют о регулируемой деградации полученных гидрогелей. Наиболее важно то, что полученный материал был биосовместим с мезенхимальными стволовыми клетками человека с отсутствием цитотоксичности и мог поддерживать клеточную метаболическую активность, когда клетки были инкапсулированы внутри гелевой сетки. В работе [169] были получены гидрогелевые каркасы для тканевой инженерии на основе функционализированного полиэтиленгликоля, бис(ангидрида аллилпропионовой кислоты) (БАПА), 3-меркаптопропионовой кислоты и п-толуолсульфоновой кислоты (рисунок 16).

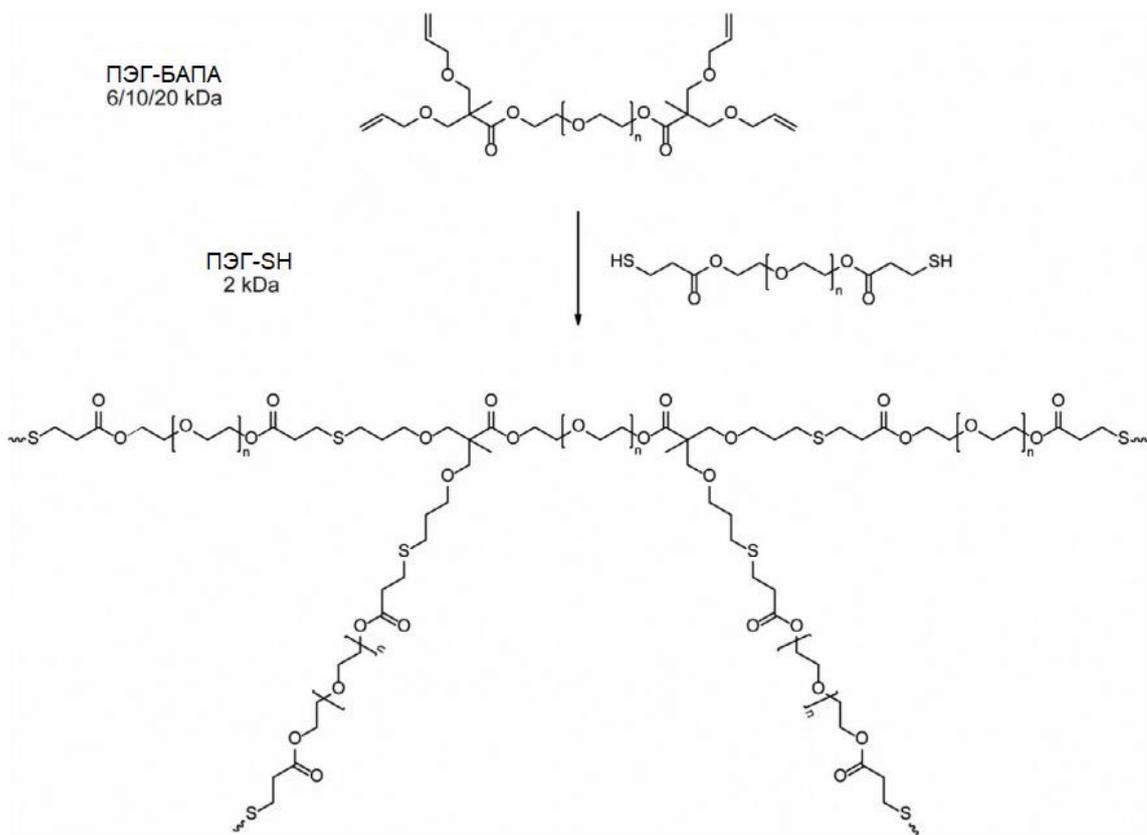


Рисунок 16 – Формирование сетки МодПЭГ (модульный, разлагаемый ПЭГ) посредством сшивания ПЭГ-БАПА и ПЭГ-SH [169]

В набухшем состоянии гидрогели по содержанию воды аналогичны мягким тканям; их каркасы постепенно деградируют в результате гидролиза в течение нескольких дней или недель.

В работах [153,162] было продемонстрировано, что тиолсодержащие мономеры повышают скорость деградации некоторых гидрогелей на основе ПЭГ, ПЭГ-ПМК, ПЭГ-Нонборнен. На данный момент тиол-ен деградационные процессы хорошо изучены и рассматриваются как процессы разложения псевдопервого порядка за счет гидролитического разложения сложноэфирной связи [159].

Burke, Major и другие исследовали взаимодействие некоторых меркаптопропианоатов и меркаптоацетатов с ПЭГДМА [170]. Было обнаружено, что тиольные мономеры на основе меркаптоацетатов не полимеризовались в присутствии ПЭГДМА, тогда как реакции с меркаптопропионатами были более успешными. В качестве тиольного компонента использовали дипентаэритритол гекса(3-меркаптопропионат), который улучшил биodeградируемость ПЭГДМА. Сравнение проводилось с нетиолированными гелями ПЭГДМА, которые авторы синтезировали в [171].

Kharkar и коллеги описали получение мультимодовых деградируемых ПЭГ гидрогелей присоединением Михаэля и обменными реакциями за счет внедрения избранных тиоэфирсукцинимидных сшивок. Деградация данных гидрогелей осуществляется за счет: i) разрушения клик связей и тиол-

обменных реакций в присутствии глутатиона и ii) гидролиза эфирной связи. Для этого макромеры ПЭГ с несколькими ответвлениями функционализировали различными меркаптокислотами и затем проводили реакцию с функционализированным малеимидом ПЭГ, получая гидрогели, которые разлагаются по гидролитическим или гидролитически-тиольным механизмам обмена. Деградацию гидрогеля контролировали в физиологических средах глутатиона с помощью колебательной реометрии и измерений объемного набухания для оценки кинетики дегградации [172].

Стоит также отметить, что некоторые работы [173–176] посвящены получению биodeградируемых эластомеров методом тиол-ен «клик» химии. Например авторы [175] сообщают о синтезе эластомеров путем 5-минутного УФ-облучения тиол-ен реакционных систем на основе трипентеноата глицерина или его комбинации с 4-пентенил-4-пентеноатом с тщательно подобранным рядом ди- или тритиолов. Данные материалы могут применяться в качестве платформ для инженерии мягких тканей, а также потенциально в регенеративной медицине и фармакологических тестированиях.

Таким образом, тиол-ен «клик» химия в последние годы получила повсеместное распространение в разнообразных областях науки, медицины и техники. Значительный вклад был внесен в создание материалов биомедицинского назначения, чему была посвящена большая часть данного аналитического обзора. В частности, данный метод широко используется для синтеза биodeградируемых материалов для инкапсулирования и культивирования клеток, доставки малых лекарственных молекул и белковых молекул, инженерии мягких тканей. Помимо этого, тиол-ен «клик» химия является отличным инструментом для синтеза материалов специализированного назначения. Так, с помощью тиол-ен «клик» реакций получают хроматографические и экстракционные материалы, супергидрофобные материалы для ликвидации выбросов органических соединений. Исследования с использованием тиол-ен «клик» химии продолжают набирать обороты, а значит впереди будет еще множество разработок, раскрывающих многообразие прикладных возможностей.

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Характеристика исходных веществ

Пентаэритритол тетраакрилат (ПЭТА) производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) был использован без предварительной очистки.

Триметилпропан триакрилат (ТМПА) производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) был использован без предварительной очистки.

Пентаэритритол тетраакис(3-меркаптопропионат) (ПЭМП) производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) был использован без предварительной очистки.

Поли(этиленгликоль) диакрилат (ПЭГДА) производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) был использован без предварительной очистки.

N,N-Диметилформамид (ДМФА) Sigma-Aldrich, Inc. (США) был использован без предварительной очистки.

Эстераза свиной печени производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) была использована без предварительной очистки.

Клотримазол производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) был использован без предварительной очистки.

Клиндамицин фосфат производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) был использован без предварительной очистки.

Диализная целлюлозная мембрана, с размером пор 12-14 кДа производства Sigma-Aldrich, Inc. (США).

Глицерин, 84-88% аналитический раствор марки «х.ч.» производства фирмы «РеактивСнаб» (Казахстан) использовали без предварительной очистки.

Глюкоза производства фирмы «РеактивСнаб» (Казахстан) использовали без предварительной очистки.

Бычий сывороточный альбумин производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) был использован без предварительной очистки.

Молочная кислота производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) была использована без предварительной очистки.

Мочевина производства Sigma-Aldrich, Inc. (США) была использована без предварительной очистки.

Перекись водорода в виде 30%-ного водного раствора производства фирмы Fisher Scientific (Великобритания) использовали без предварительной очистки.

Этанол, ацетон, хлороформ марки «х.ч.» использовали без предварительной очистки.

Серная кислота производства фирмы Fisher Scientific (Германия) в виде 1М водного раствора использовали без предварительной очистки.

Перманганат калия производства фирмы Titripur (Германия) в виде 0,05М водного раствора использовали без предварительной очистки.

Соляная кислота в виде 1М водного раствора использовали без предварительной очистки.

Натрия хлорид производства фирмы «РеактивСнаб» (Казахстан) использовали без предварительной очистки.

Калия гидроксид производства фирмы «РеактивСнаб» (Казахстан) использовали без предварительной очистки.

Кальция гидроксид, полученный гашением оксида кальция, использовали без предварительной очистки.

Гидрофосфат натрия, дигидрофосфат натрия производства фирмы «РеактивСнаб» (Казахстан) использовали без предварительной очистки.

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду.

2.2 Приготовление растворов

Фосфатно-солевой буфер готовили растворением 21,8 г Na_2HPO_4 , 6,4 г NaH_2PO_4 , 180 г NaCl в 1 л деионизированной воды. Перед использованием его разбавляли 1:20 деионизированной водой и при необходимости регулировали pH.

Растворы перекиси водорода разных концентраций были приготовлены разбавлением 30% раствора деионизированной водой. Точные концентрации полученных растворов были определены перманганатометрическим титрованием.

Раствор искусственной вагинальной жидкости готовили по методике, описанной в литературе [177]: NaCl (3,51 г), KOH (1,40 г), $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (0,222 г), бычий сывороточный альбумин (0,018 г), молочная кислота (2,0 г), уксусная кислота (1,0), глицерин (0,160 г), мочевины (0,4 г), глюкоза (5,0). Взвешенные навески указанных веществ растворили в дистиллированной воде в колбе объемом 1 литр при комнатной температуре, затем полученный раствор довели до pH 4,2, используя 1М HCl .

2.3 Установление концентрации перекиси водорода перманганатометрическим титрованием

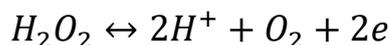
Для установления точных концентраций растворов перекиси водорода использовали перманганатометрию. Раствор перекиси водорода неизвестной концентрации в мерной колбе на 25 мл довели водой до метки и тщательно перемешали. В колбу для титрования отобрали пипеткой аликвотную долю анализируемого раствора объемом 2 мл, добавили 2 мл 1М раствора серной кислоты и титровали раствором 0,05М перманганата калия до появления устойчивой розовой окраски. Титрование проводили не менее 5 раз до получения воспроизводимых результатов.

Масса перекиси водорода $m_i(\text{H}_2\text{O}_2)$ в анализируемом растворе для каждого титрования была рассчитана по формуле для прямого титрования определяемого вещества:

$$m_i(\text{H}_2\text{O}_2) = \frac{c\left(\frac{1}{5} \text{KMnO}_4\right) \cdot V_i(\text{KMnO}_4)}{V_a(\text{H}_2\text{O}_2)} \cdot M\left(\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}_2\right) \cdot V_f(\text{H}_2\text{O}_2)$$

где $c\left(\frac{1}{5}KMnO_4\right)$ – молярная эквивалентная концентрация перманганата калия; $V_i(KMnO_4)$ – объем перманганата калия, использованного для титрования; $V_a(H_2O_2)$ – аликвотный объем анализируемого раствора; $M\left(\frac{1}{2}H_2O_2\right)$ – молярная масса эквивалента и $V_f(H_2O_2)$ – объем мерной колбы.

Молярная масса эквивалента перекиси водорода была определена, исходя из полуреакции:



Массовая доля перекиси водорода была вычислена следующим образом:

$$w(H_2O_2) = \frac{m_i}{m_{нач}} \cdot 100\%$$

где m_i – масса перекиси водорода и $m_{нач}$ – масса начального образца.

2.4 Синтез гелей

Образцы полимеров с различным соотношением и концентрацией исходной смеси мономеров синтезировали в присутствии N,N-диметилформамида (ДМФА) по методике [42]. Исходная мономерная смесь (ИМС) была основана на пентаэритритол тетраакрилате (ПЭТА) или триметилпропана триакрилате (ТМПТА), или поли(этиленгликоль) диакрилат (ПЭГДА) в качестве соединений с неперекрещиваемыми связями и пентаэритритол тетраакрилат (ПЭТА) в качестве тиолсодержащего соединения. Для систем на основе ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП концентрация ИМС в растворителе составила 30 мас.%. Для системы ПЭГДА-ПЭМП концентрация ИМС в растворителе составила 50 мас.%. Синтез проводили в стеклянных флаконах с закрытой крышкой при 30 °С в течение одного часа при постоянном перемешивании на шейкере, что приводило к получению прозрачных хрупких гелей. Синтезированные гели промывали в ДМФА в течение одного часа, а затем три раза в ацетоне в течение шести часов для удаления непрореагировавших мономеров. После промывки в органических растворителях образцы гелей в течение трех дней промывали в дистиллированной воде и сушили в лиофильной сушке для дальнейшей характеристики.

2.5 Физико-химические методы исследования синтезированных гелей

Золь-гель анализ

Для определения выхода гель- и золь- фракций был использован золь-гель анализ. Выход гель-фракции был рассчитан по формуле:

$$\Gamma\% = \frac{m_{сух.отм}}{m_{ИМС}} \times 100\%$$

где $m_{сух.отм}$ и $m_{ИМС}$ – массы сухих отмытых образцов и смеси мономеров соответственно.

$$3\% = 100\% - \Gamma\%$$

Степень набухания

Способность сшитых полимеров к набуханию была оценена измерением массы образцов до и после погружения в различные растворители при комнатной температуре. Отмытые от непрореагировавших мономеров и высушенные образцы были помещены в растворитель и выдерживались при комнатной температуре несколько дней до достижения постоянной массы. Измерения были проведены в воде, этаноле и хлороформе. Образцы взвешивались каждые два дня после удаления избытка растворителя фильтровальной бумагой с поверхности образца. Равновесная степень набухания (α) была рассчитана по формуле:

$$\alpha = \frac{m_{\text{наб}} - m_{\text{сух}}}{m_{\text{сух}}}$$

где $m_{\text{наб}}$ и $m_{\text{сух}}$ – массы набухших и сухих образцов гелей, соответственно.

Значения степени набухания были определены как усредненные значения трех параллельных опытов.

ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием и Раман спектроскопия

ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием для гелей ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП была выполнена на приборе PE Spectrum 100 FTIR spectrometer (Perkin-Elmer, США) в области $650\text{--}4200\text{ см}^{-1}$. Раман спектры для гелей ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП были записаны с помощью прибора Nicolet NXR 9650 FT Raman spectrometer (Thermo Scientific, Великобритания).

Химический состав синтезированных гелей ПЭГДА-ПЭМП был исследован на ИК Фурье-спектрометре Carry 660 Agilent (США).

Термогравиметрический анализ

Термогравиметрический анализ образцов ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП был осуществлен с использованием Q50 TGA analyser (TA Instruments, Великобритания). Полимерные образцы нагревали с 25 до 600 °С со скоростью нагрева 10 °С мин⁻¹ и потоком азота 50 мл·мин⁻¹. Масса образцов была примерно 5 мг каждый.

Сканирующая электронная микроскопия

Морфология и структура образцов гелей ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП была охарактеризована с использованием прибора FEI Quanta 600 FEG Environmental Scanning Electron Microscope instrument (FEI UK Ltd., Великобритания) при ускоряющем напряжении 20 кВ. Изображения были сняты с поверхности и поперечного сечения образцов. Образцы гелей, высушенных в лиофильной сушке для СЭМ, предварительно покрывали золотым напылением.

Атомно-силовая микроскопия

Морфология поверхности образцов гелей ПЭГДА-ПЭМП, предварительно высушенных в лиофильной сушке, была охарактеризована с использованием комбинированной системы атомно-силовой микроскопии и Рамановской спектроскопии Solver Spectrum (NT-MDT).

Анализ адгезивных свойств гелей ПЭГДА-ПЭМП изучали с использованием Texture Analyser XT Plus (Stable Micro Systems Ltd., Великобритания) в Институте полимерных материалов и технологий, Алматы. Образцы высушенных гелей диаметром 10 мм были прикреплены к зонду с помощью двусторонней клейкой ленты (рисунок 17). При постановке эксперимента в качестве слизистой ткани были использованы биологические объекты свежесрезанной половой системы (влагалище) овцематки. Подготовленная овечья ткань влагалища фиксировалась неподвижно с помощью специального держателя. Перед началом каждого испытания биоматериал увлажнялся искусственной вагинальной жидкостью. Во время испытаний на адгезию каждый образец геля приводили в контакт с тканями в течение 30 с., а затем отрывали зонд со скоростью 0,05 см/с до полного отрыва от поверхности ткани. Для каждого образца измерения проводились в трех параллельных опытах. Данные, полученные в результате эксперимента, были использованы для расчета адгезивных свойств гелей: максимальная сила адгезии и общая работа адгезии.

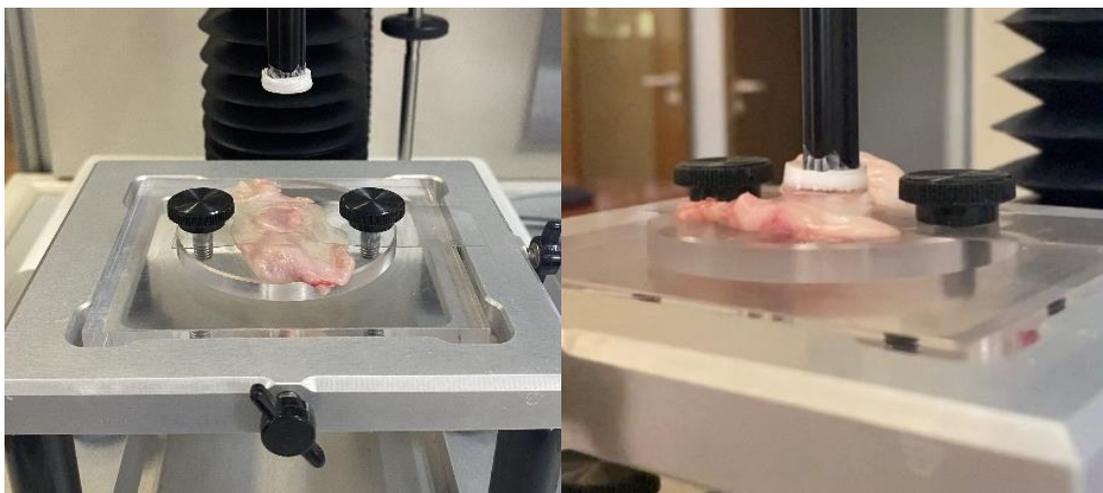


Рисунок 17 – Установка для анализа адгезивных свойств

Изучение биodeградируемости

Способность к биodeградации была изучена в различных средах, таких как фосфатный буфер (pH=7.4) с и без добавления эстеразы свиной печени, в растворах искусственной вагинальной жидкости и в растворах перекиси водорода различных концентраций. Сухие образцы известной массы опускали в 10 мл разных деградационных растворов на несколько недель с постоянным перемешиванием при температуре 37°C. Образцы взвешивались каждый день после осторожного удаления излишков жидкости фильтровальной бумагой.

Механический анализ

В работе была исследована механическая прочность синтезированных гелей на основе ПЭГДА-ПЭМП в режиме сжатия на приборе TA.XTplus Stable Micro Systems при комнатной температуре и максимальной нагрузке в 500 Н.

Модуль упругости был рассчитан как тангенс угла наклона начального прямолинейного участка кривой деформации геля, подчиняющегося закону Гука.

Элементный анализ

Элементный анализ образцов ПЭГДА-ПЭМП был осуществлен на приборе Элементар Vario Micro Cub.

Загрузка лекарством и исследование профилей высвобождения лекарственного вещества из гелей

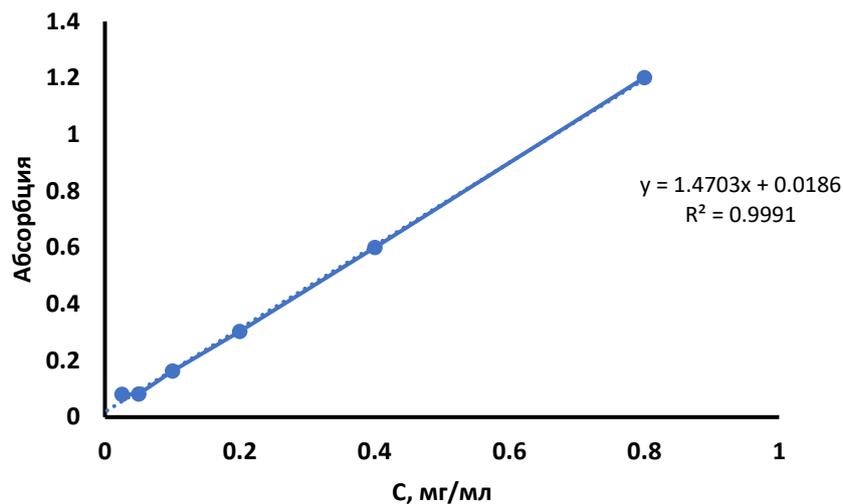
Для испытания гелей ПЭГДА-ПЭМП в качестве лекарственных форм были получены образцы, загруженные лекарственными веществами клотримазол и клиндамицин фосфат. Загрузка ЛВ происходила методом насыщения, то есть сухие образцы гелей погружали в соответствующие растворы лекарств для достижения равновесной степени набухания на 96 часов. Для этого были приготовлены водный раствор клиндамицин фосфата концентрацией 100 мг/мл и спиртовой раствор (96%) клотримазола 50 мг/мл, поскольку данное лекарственное вещество практически не растворимо в воде, но ограниченно растворяется в этиловом спирте. Растворы ЛВ после насыщения образцов гелей были высушены в сушильном шкафу при температуре 90 °С для определения массы незагруженного лекарственного вещества. Степень насыщения ЛВ (СН) рассчитывалась по формуле:

$$СН = \frac{m_{зл}}{m_{сг}}$$

где $m_{зл}$ – масса загруженного лекарства, $m_{сг}$ – масса сухого геля.

Исследование профилей высвобождения лекарственного вещества в раствор ИВЖ из загруженных гелей было проведено методом прямой диффузии через целлюлозную мембрану при 37 °С и перемешивании. Через определенные промежутки времени производился отбор проб соответствующих растворов (sink conditions). Количество лекарственного вещества, высвобождаемого в каждом временном интервале, определяли по значениям оптической плотности растворов при длинах волн 217 нм (для клиндамицин фосфата) и 270 нм (для клотримазола) с использованием УФ-спектрофотометра Specord 200 Plus (Analytic Jena, Германия). Концентрацию высвобожденного лекарственного вещества определяли с помощью калибровочных графиков зависимости оптической плотности от концентрации ЛВ (Рисунок 18).

А.



Б.

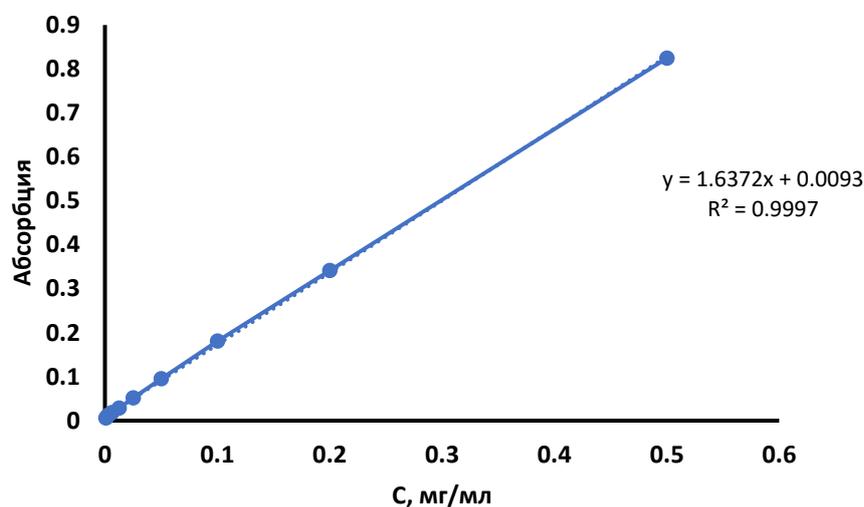


Рисунок 18 – Калибровочная кривая зависимости оптической плотности (А) раствора ИВЖ от концентрации клиндамицин фосфата и (Б) раствора ИВЖ-этиловый спирт 50-50 об.% от концентрации клотримазола

*Исследование антимикробной и противогрибковой активности гелей ПЭГДА-ПЭМП, наполненных клотримазолом и клиндамицин фосфатом проводили диффузионным методом в отношении музейных штаммов микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р, *Candida albicans* ATCC 10231 в лаборатории микробиологии АО «Научный центр противоинфекционных препаратов».*

Чашки с агаром Мюллера-Хинтона (для тестирования в отношении бактерий) и чашки с агаром Сабуро (для тестирования в отношении грибов) инокулировали 1,5-2 мл исследуемой суспензии микроорганизмов. Для засева использовали стерильные ватные тампоны, их погружали в суспензию микроорганизма, затем слегка отжав о стенки пробирки, штриховали в трех направлениях, поворачивая чашку на 60°. На поверхность инокулированных

чашек помещали тестируемые гели (экспериментальные и опытные) в виде цилиндров диаметром 6 мм. Инкубацию посевов проводили в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течении 18-24 ч при тестировании в отношении бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P и при температуре $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течении 48-72 ч при тестировании в отношении грибов *Candida albicans* ATCC 10231. Контрольные растворы клотримазола и клиндамицин фосфата тестировали луночным методом. Для этого, в толще засеянного тест-штаммами микроорганизмов агара делали лунки диаметром 6 мм. В полученные лунки добавляли растворы антибиотиков в объеме 200 мкл. Учет результатов проводили путем измерения диаметра угнетения роста культуры вокруг цилиндров или лунок с помощью линейки. Полученные результаты рассчитаны как средние значения трех параллельных измерений.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Синтез и характеристика гелей на основе пентаэритритол тетраакрилата и пентаэритритол тетраакис(3-меркаптопропионат)а (ПЭТА-ПЭМП), триметиллолпентаэритритол триакрилата и пентаэритритол тетраакис(3-меркаптопропионат)а (ТМПТА-ПЭМП)

Тиол-ен «клик» синтез является достаточно привлекательным инструментом для получения различных полимерных материалов, так как позволяет получать высокие выходы полимеров и подразумевает мягкие условия проведения синтеза. В работе [42] авторы исследовали получение линейных полимеров, наночастиц на основе пентаэритритол тетраакрилата и пентаэритритол тетраакис(3-меркаптопропионат)а, и упоминалось, что данная система способна к образованию сшитых структур, но они не были подробно исследованы.

В данной работе методом тиол-ен «клик» полимеризации были синтезированы гели на основе ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП (таблица 2), промотируемой использованием диметилформамида как растворителя. Предполагалось, что варьирование количества функциональных акрилатных групп, позволит нам получать гели с различными характеристиками.

Таблица 2 – Составы исходных мономерных смесей синтезированных гелей в ДМФА

С _{имс} , %	ПЭТА-ПЭМП	ТМПТА-ПЭМП
30	3:1 моль/моль	3:1 моль/моль
30	1:1 моль/моль	1:1 моль/моль

Обзор литературы по синтезам, основанным на принципах тиол-ен «клик» химии показывает, что проведение реакций в растворителях с высокой диэлектрической проницаемостью, таких как ДМФА, приводит к спонтанной диссоциации тиолов в тиолат анионы [178,179]. Технически можно сказать, что эти реакции проводятся без использования органического катализатора, однако в данном случае сам растворитель промотирует образование тиолат анионов, которые являются активными частицами, инициирующими анионную цепную реакцию [180]. Авторы [181] сообщают об успешных синтезах в таких условиях, т.е. в отсутствие катализатора и в среде сильнополярного растворителя. На рисунке 4 литературного обзора представлен анионный механизм, который характерен для реакций, промотируемых основаниями, нуклеофилами и растворителями с высокой диэлектрической проницаемостью.

На рисунке 19 представлены схемы реакций, описывающих образование сшитых сеток в системах ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП за счет новых ковалентных тиоэфирных связей. Полученные образцы гелей были прозрачные и эластичные.

или при использовании избытка ПЭТА или ТМПТА к ПЭМП (3:1 моль/моль). Смеси ПЭТА или ТМПТА с ПЭМП, содержащие избыток ПЭМП (1:3), не образовывали гелей. Это согласуется с данными, представленными в [20], в которой сообщалось, что образование гелей наблюдается только при определенных соотношениях компонентов и концентрациях мономеров в диметилформамиде.

При погружении образцов гелей ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП в воду они теряли прозрачность и становились белыми (рисунок 20). Изменение прозрачности, возможно, связано с гидрофобной природой полученных сеток, которые могут хорошо набухать в диметилформамиде и сжиматься в воде.



Рисунок 20 – Внешний вид гелей на основе ПЭТА-ПЭМП 3:1
(А – после синтеза, Б – после промывания в воде)

Результаты золь-гель анализа гелей ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП с разными соотношениями исходной мономерной смеси (ИМС) показали, что наибольший выход гель фракции наблюдается у образцов гелей с составом ИМС 1:1 моль/моль (рисунок 21). Это может быть обусловлено тем, что при данном составе ИМС на каждые четыре -SH группы одной молекулы ПЭМП приходится четыре двойных связи одной молекулы ПЭТА или ТМПТА. Результаты расчета золь-гель фракции показали аналогичную зависимость, что с ростом содержания ПЭТА и ТМПТА в составе гелей золь-фракция увеличивается.

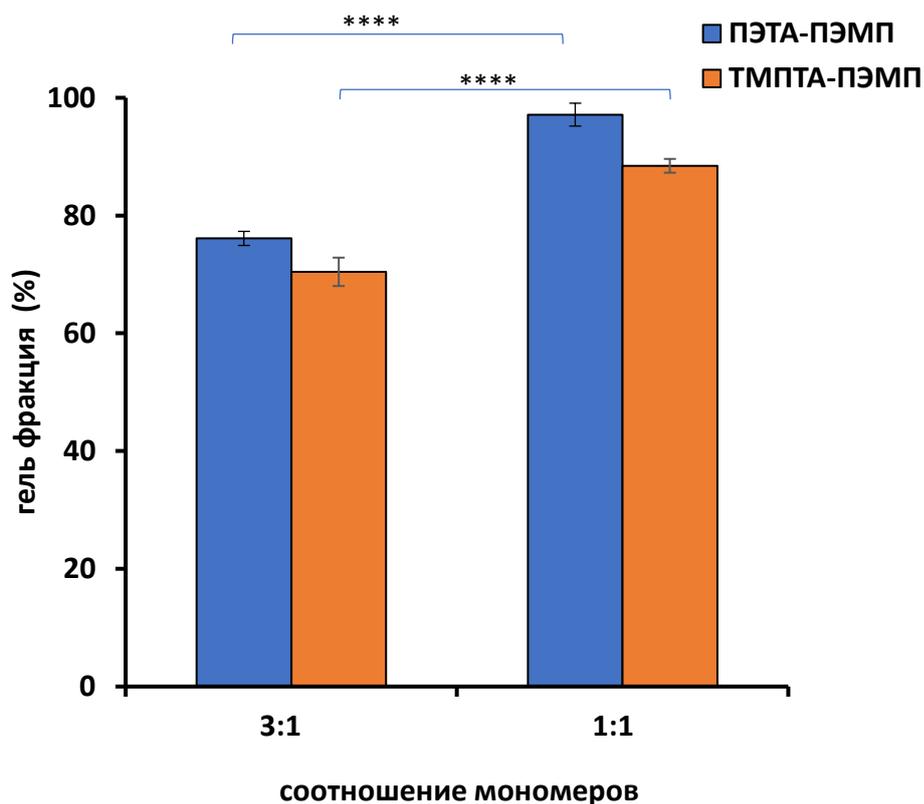


Рисунок 21 – Зависимость выхода гель-фракции образцов ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП от состава ИМС.

Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения ($n = 5$).

Статистически значимые различия приведены ниже:

**** - $p < 0.0001$.

В работе была оценена набухающая способность образцов в воде, этаноле и хлороформе. После достижения образцами гелей постоянной массы в растворителях в течение 4х дней, была рассчитана их равновесная степень набухания. Полученные результаты представлены в таблице 3. Измерение α для образцов в хлороформе оказалось невозможным, поскольку после их погружения в данный растворитель все гели распадались на мелкие куски за пару часов.

Таблица 3 – Равновесная степень набухания (α) образцов гелей в воде и этаноле

Состав гелей (моль:моль)	α (г/г)	
	в воде	в этаноле
ПЭТА-ПЭМП (3:1)	0.020 ± 0.005	0.070 ± 0.005
ПЭТА-ПЭМП (1:1)	0.031 ± 0.005	0.032 ± 0.013
ТМПТА-ПЭМП (3:1)	0.065 ± 0.023	0.087 ± 0.026
ТМПТА-ПЭМП (1:1)	0.016 ± 0.011	0.041 ± 0.010

Образцы, помещенные в воду и этанол сохранили свою форму и показали слабую способность к набуханию. К примеру, образец ПЭТА-ПЭМП (1:1) абсорбировал только 0.031 ± 0.005 г воды на 1 г сухого полимера. Близкие по величине степени набухания гелей были отмечены для всех образцов как в воде, так и в этаноле, однако набухание в этаноле в некоторых случаях было выше. Это показывает, что природа полученных материалов гидрофобна подобно гелям на основе сополимеров молочной и гликолевой кислоты [182]. Гидрофобный характер данных материалов также был подтвержден набуханием и последующим распадом этих гелей в хлороформе.

С помощью метода ИК-спектроскопии был изучен химический состав полученных гелей. ИК-спектры для образцов ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП показали сильную полосу поглощения при $1721\text{--}1726\text{ см}^{-1}$, обусловленную валентными колебаниями $\text{C}=\text{O}$ ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$) (рисунок 22). Образцы с соотношением 1:1 моль/моль также имеют слабый пик при 1286 см^{-1} , обусловленный деформационными колебаниями $\text{C}-\text{H}$ (крутильные и веерные колебания $-\text{CH}_2-$), который слабо выражен для образцов с преобладающим содержанием акрилового компонента. Полоса при 1634 см^{-1} для образцов с молярным соотношением 3:1 указывает на наличие непрореагировавшей двойной связи $\text{C}=\text{C}$, сопряженной с $\text{C}=\text{O}$.

Для подтверждения наличия тиольных групп использовали Раман-спектроскопию, поскольку спектры, полученные данным методом, имеют очень четкие полосы, характерные для этих SH -групп. Раман-спектры, записанные для образцов ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП, приготовленных с соотношением 1:1 моль/моль, показали сильные полосы при 2574 см^{-1} из-за валентных колебаний $\text{S}-\text{H}$ (ν_{SH}), 673 см^{-1} из-за связей $\text{C}-\text{S}$ ($\nu_{\text{C-S}}$) и 538 см^{-1} за счет связей $\text{S}-\text{S}$ ($\nu_{\text{S-S}}$). Раман-спектры гелей ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП, приготовленных с избытком ПЭТА и ТМПТА, не показали каких-либо полос, характерных для SH -групп, но была обнаружена интенсивная полоса поглощения, отвечающая за валентные колебания $\text{C}=\text{C}$, при 1637 см^{-1} . Все образцы гелей ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП показали полосы при 2929 см^{-1} для валентных колебаний $\text{C}-\text{H}$ (ν_{CH}), 1729 см^{-1} для $\nu_{\text{C}=\text{O}}$, 1417 см^{-1} и 1282 см^{-1} для ν_{CH_2} , 938 см^{-1} за счет $\nu_{\text{C}-\text{O}-\text{C}}$, что согласуется с результатами ИК-спектроскопии, а также подтверждает предложенную схему клик-реакции, приводящую к образованию полимерных структур, представленных на рисунке 20.

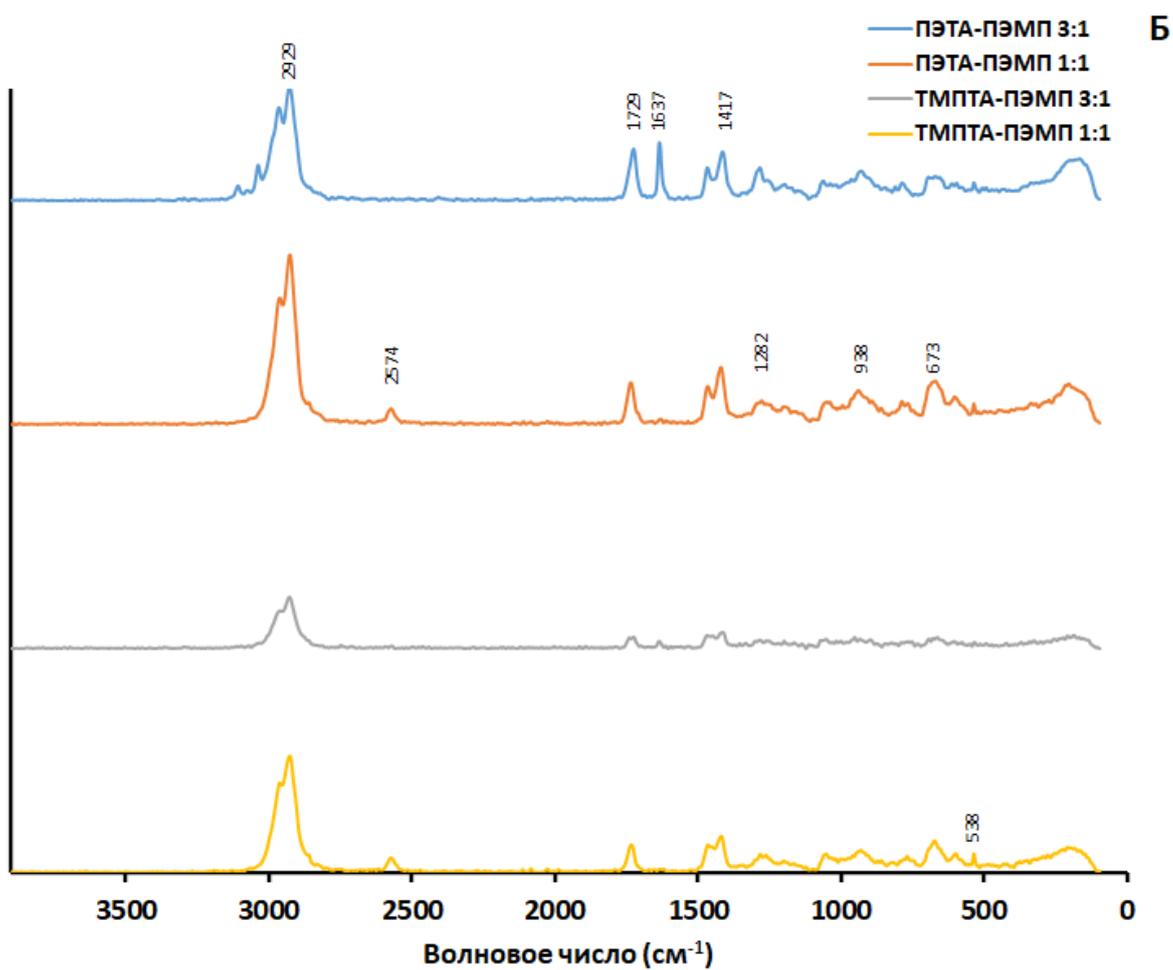
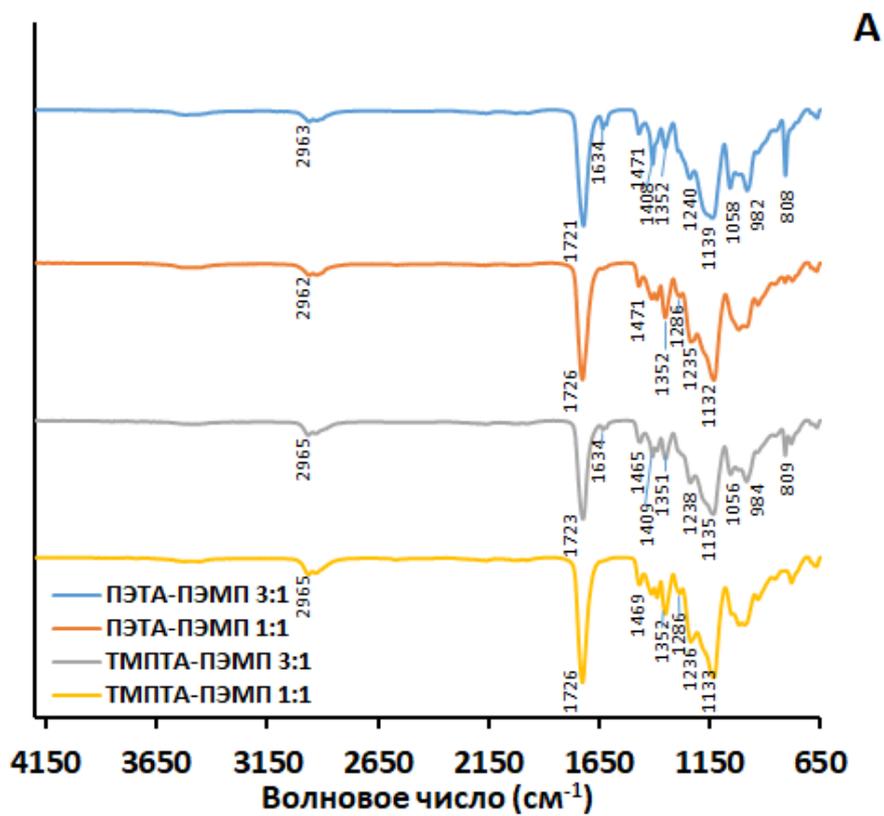


Рисунок 22 – ИК (А) и Раман (Б) спектры синтезированных гелей

В работе методом ТГА была определена термическая стабильность гелей (рисунок 23). Установлено, что образцы ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП демонстрируют превосходную термическую стабильность, при этом начало разложения наблюдается только при температуре выше 345–360 °С, достигая 94–95 % от общей потери веса при 500 °С. Профили термического разложения всех четырех образцов очень похожи. Образцы с избытком ПЭТА или ТМПТА (3:1 моль/моль) демонстрируют несколько более высокую термическую стабильность.

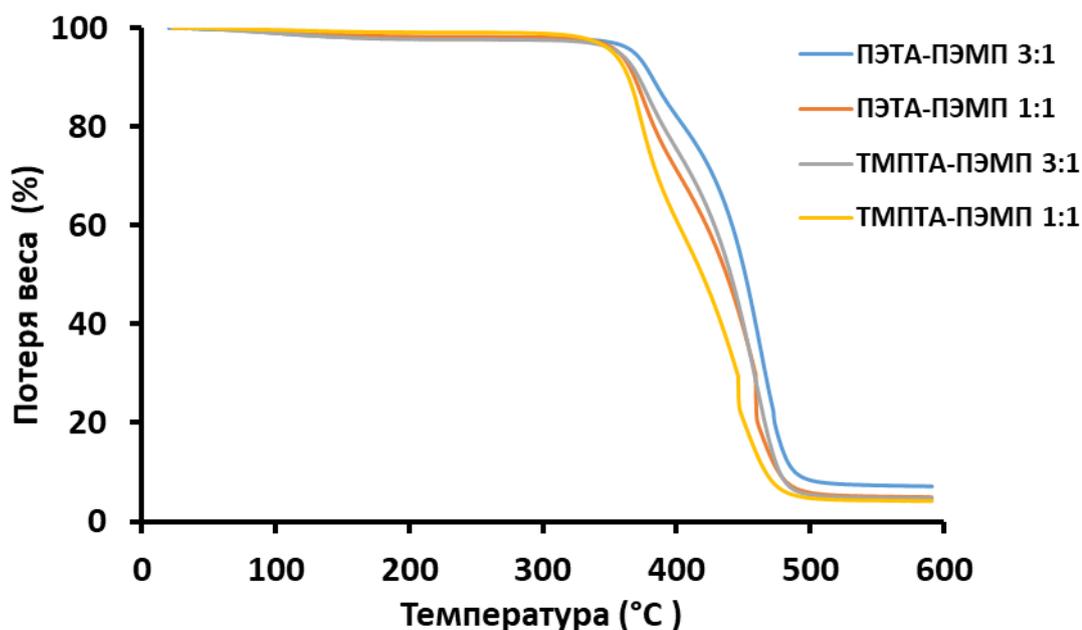


Рисунок 23 – Кривые термогравиметрического анализа синтезированных образцов гелей

Морфологию поперечных сечений и поверхностей полученных полимеров изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рисунок 24). Сравнение образцов ПЭТА-ПЭМП 1:1 и ТМПТА-ПЭМП 1:1 при большом увеличении (2000×) показало, что ПЭТА-содержащие гели не имеют каких-либо существенных особенностей как на поверхности, так и в поперечном сечении. Напротив, изображения поперечных сечений образцов ТМПТА-ПЭМП показывают, что материал ТМПТА-ПЭМП 3:1 является пористым по сравнению с ТМПТА-ПЭМП 1:1, что также отражено в результатах по изучению биodeградационного профиля гелей. Размер пор на поверхности ТМПТА-ПЭМП 3:1 составляет около 2 мкм. Более пористая структура гелей ТМПТА-ПЭМП 3:1 вероятно обусловлена наличием лишь трех функциональных акрилатных групп, что может сказываться на плотности сшивания гелей. Сравнение гелей ПЭТА-ПЭМП 3:1 и ПЭТА-ПЭМП 1:1 показывают аналогичное увеличение пористости с увеличением акрилатного компонента, однако не столь выраженное как в случае с ТМПТА-ПЭМП.

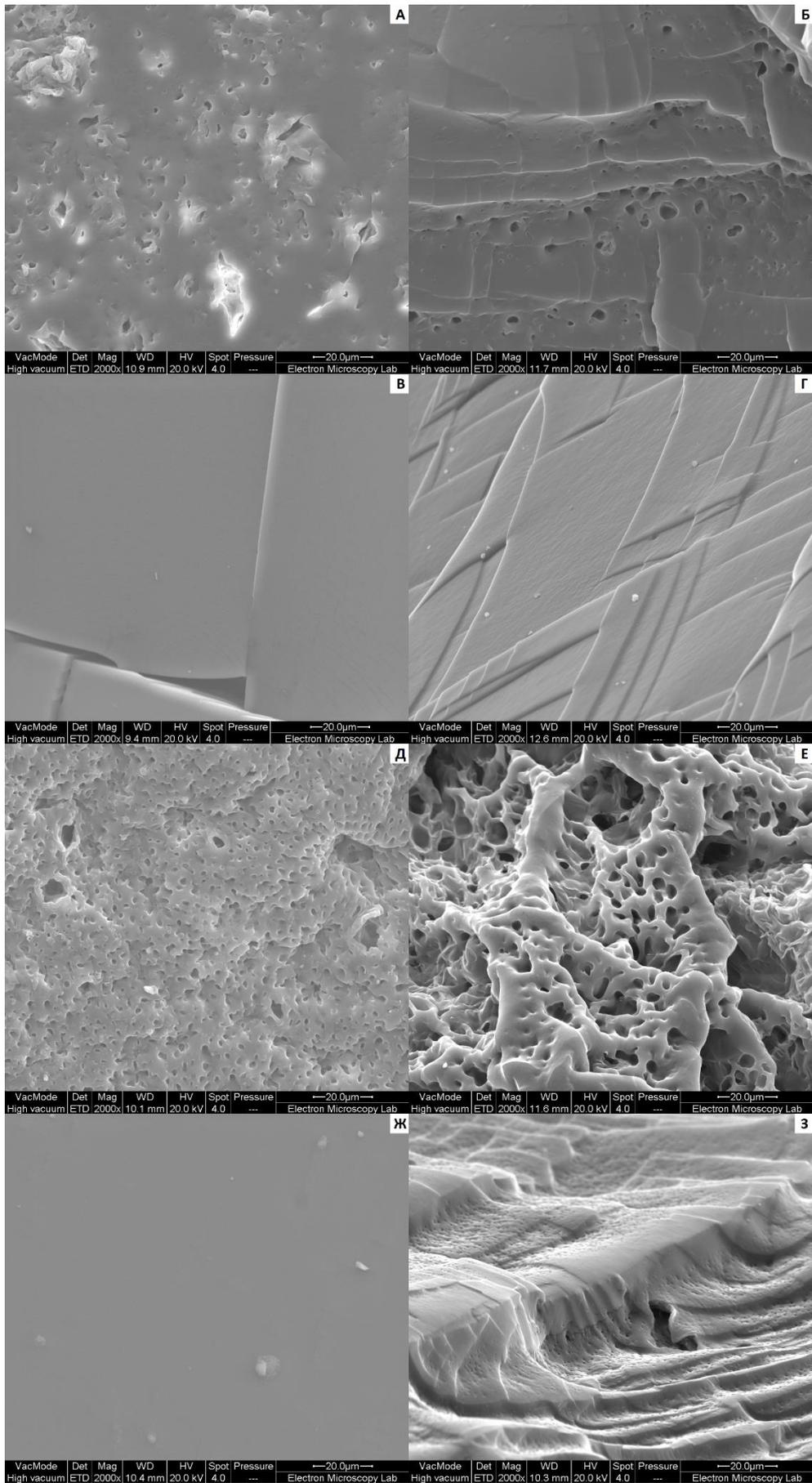


Рисунок 24 – Микрофотографии СЭМ образцов ПЭТА-ПЭМП (3:1 моль/моль) (А), (Б); ПЭТА-ПЭМП (1:1 моль/моль) (В), (Г); ТМПТА-ПЭМП

(3:1 моль/моль) (Д), (Е); ТМПТА-ПЭМП (1:1 моль/моль) (Ж), (З)
изображения поверхности (А, В, Д, Ж) и поперечного сечения (Б, Г, Е, З).

Таким образом, для гелей ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП были изучены различные физико-химические характеристики, в том числе выход гель-фракции, степень набухания, химический состав, термическая стабильность и особенности поверхности.

3.1.1 Исследование биodeградационных свойств гелей ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП

Принимая во внимание структуру сеток и природу химических связей, присутствующих в этих материалах, можно предположить, что они могут подвергаться биodeградации несколькими путями. Во-первых, наличие сложноэфирных связей может означать, что эти материалы могут разлагаться гидролитически, и этому может способствовать или не способствовать присутствие фермента (например, эстеразы). Во-вторых, наличие связей $-CH_2-S-CH_2-$ указывает на возможность окислительной деградации, которая может превратить эти гидрофобные группы в более гидрофильные сульфоксиды и сульфоны. В-третьих, полученные спектральные данные указывают на присутствие в образцах дисульфидных мостиков ($-S-S-$), которые образовались в результате окисления тиольных групп, присутствующих в ПЭМП. Эти группы также могут подвергаться деградации в присутствии восстановителей.

Деградацию сеток в водной среде оценивали гравиметрически. Когда образцы теряют вес, это означает, что они подвергаются деградации и распадаются или растворяются. Увеличение массы образца может свидетельствовать о том, что образец становится более гидрофильным и подвергается набуханию. На рисунках 25-26 показаны профили деградации образцов в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с эстеразой свиной печени (ЭСР) и без нее, а также в растворах, содержащих перекись водорода. В ФСБ все образцы демонстрируют начальную деградацию с потерей веса приблизительно 3-5% в течение первых 7 дней. Затем деградация замедляется, а масса образца либо остается постоянной, либо даже несколько увеличивается. Увеличение массы образцов для ТМПТА-ПЭМП 3:1 ЭСР может быть связано с их частичным набуханием из-за более пористой структуры, наблюдаемой с помощью СЭМ, а также в результате деградации некоторых связей и появления более гидрофильных участков из-за присутствия карбоксильных групп. Интересно было наблюдать, что деградация образцов в присутствии эстеразы протекает медленнее, чем в отсутствие фермента. Это может быть связано с плотно сшитой и гидрофобной природой сеток и неспособностью молекул фермента приближаться к сложноэфирным связям и эффективно их расщеплять. Кроме того, гидрофобность образцов может привести к отложению на их поверхности молекул ферментов и их частичной иммобилизации и инактивации.

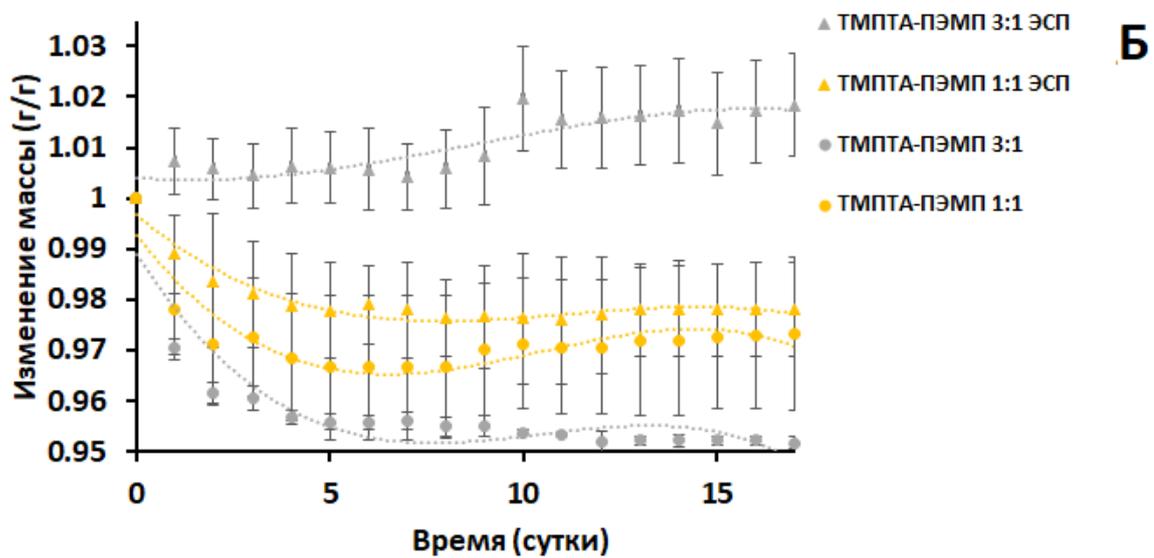
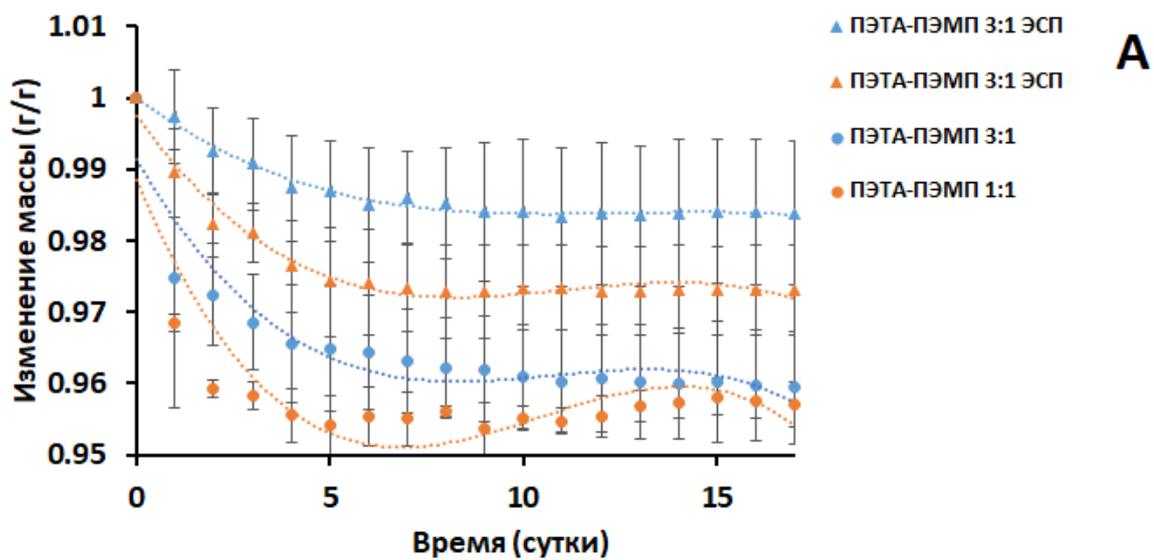
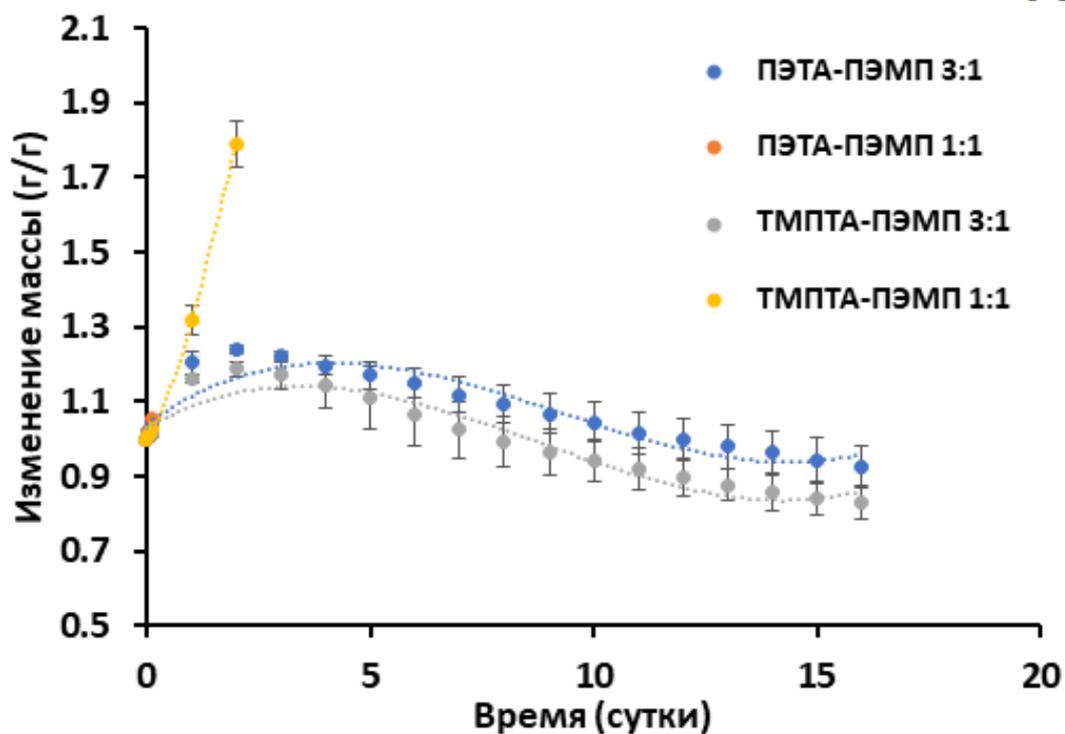
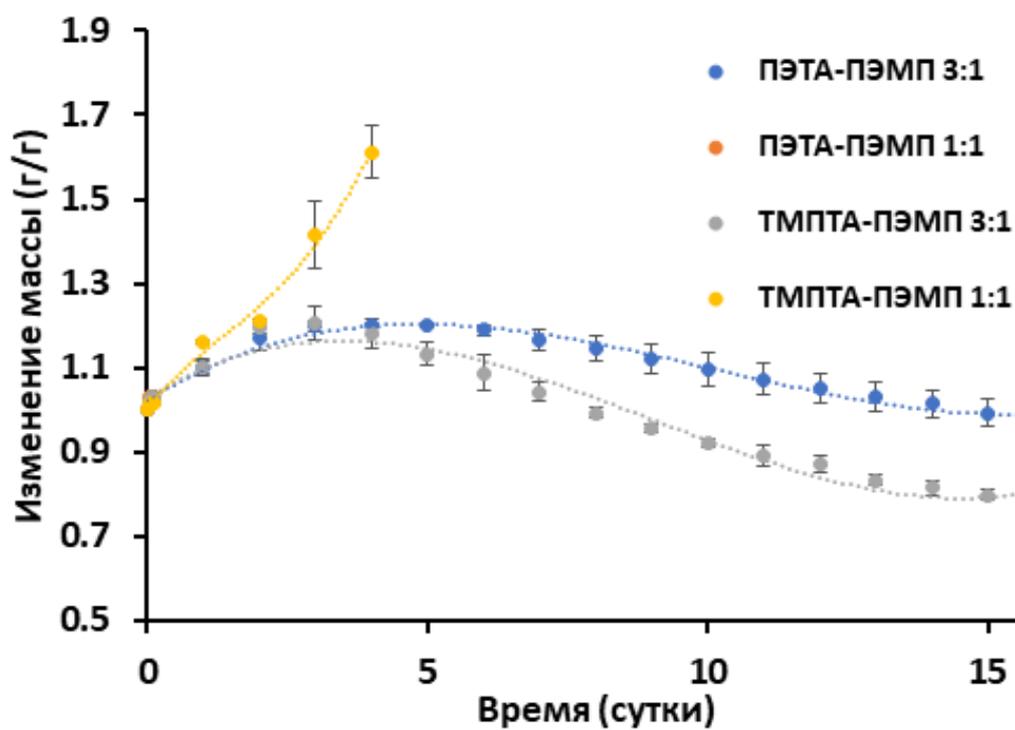


Рисунок 25 – Исследования биodeгpaдиpуeмoсти oбpaзцoв ПЭТА-ПЭМП (А) и ТМПА-ПЭМП (Б) в ФСБ в пpисутствии и oтсутствии ЭСП

А**Б**

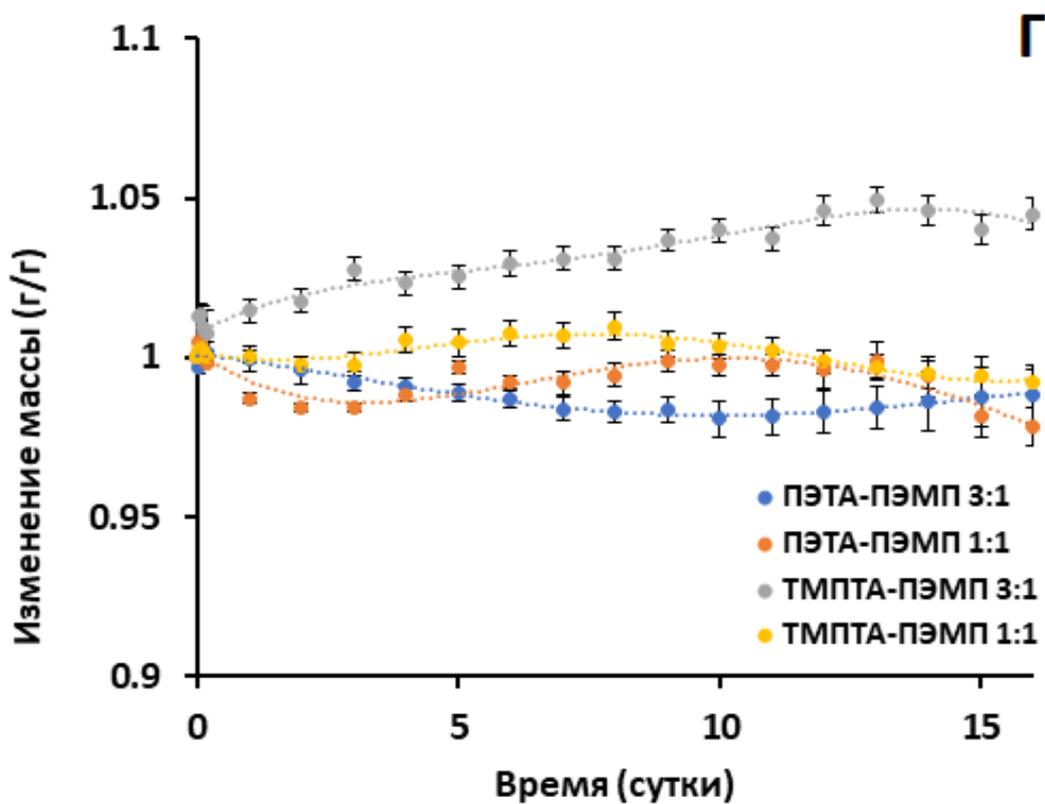
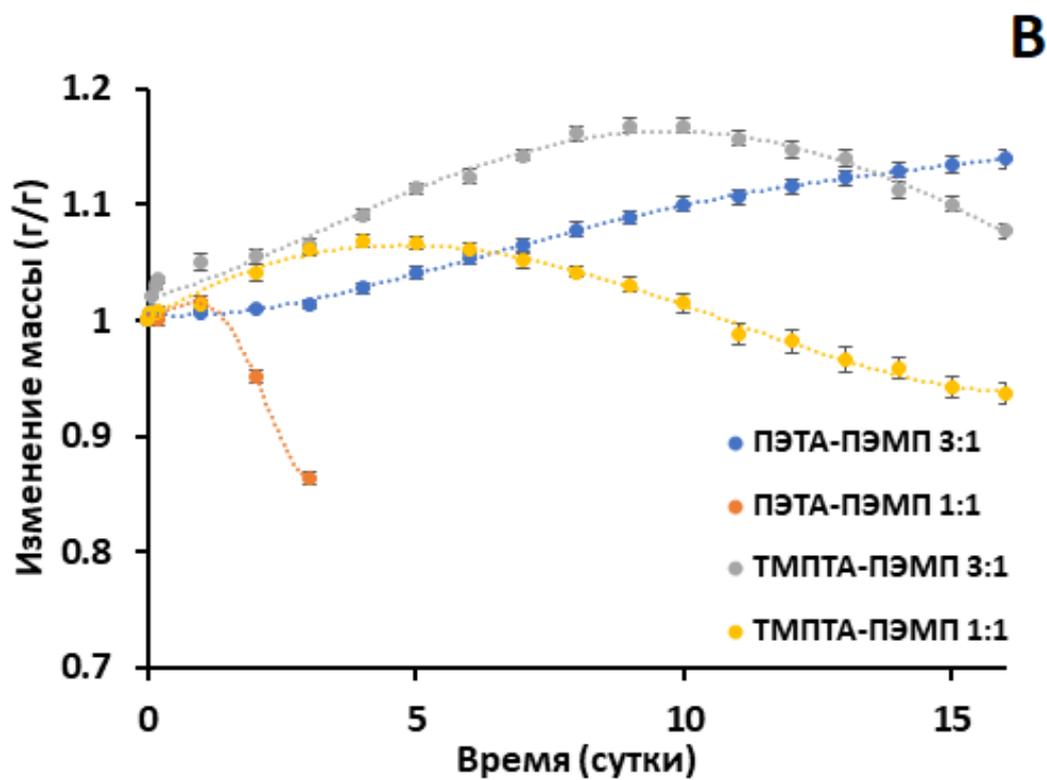


Рисунок 26 – Исследования биodeградируемости образцов в 1,825% (А), 0,9183% (Б), 0,1726% (В), 0,0194% (Г) растворах H₂O₂.

Известно [183], что воспаление в организме человека сопровождается выделением активных форм кислорода, таких как перекись водорода. Это препятствует распространению инфекции и служит сигналом для привлечения лейкоцитов. Деградация данных образцов в присутствии перекиси водорода протекает более интенсивно по сравнению с гидролитической деструкцией в ФСБ (рисунок 26). Сначала образцы набухают, затем после начального набухания наблюдается уменьшение массы, что говорит о их деградации. Образцы ПЭТА-ПЭМП 1:1, ТМПТА-ПЭМП 1:1 (рисунок 26 А и Б) быстро распадаются на более мелкие части в первые минуты эксперимента, для которых невозможно продолжить гравиметрические измерения. В растворе перекиси с концентрацией 1,825% распад образца ТМПТА-ПЭМП 1:1 наступает после третьего дня измерений, тогда как образец ПЭТА-ПЭМП распадается в первый же день. Образцы ПЭТА-ПЭМП 3:1, ТМПТА-ПЭМП 3:1 демонстрируют более постепенные профили деградации: после начального набухания в течение первых двух дней их масса начинает снижаться. Видно, что в образцах с соотношением 1:1 больше доля HS- и $-CH_2-S-CH_2-$, которые подвергаются окислению, что в итоге приводит к их распаду. Образцы с соотношением 3:1 имеют в своей структуре избыток акрилатных групп и меньше связей, склонных к окислительному расщеплению, что приводит к их более постепенной деградации.

Исследование влияния концентрации перекиси водорода на биодеградацию представлено на рисунке 26. Уменьшение концентрации растворов перекиси водорода замедляет биодеградацию образцов ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП. Образец ПЭТА-ПЭМП 3:1 демонстрировал уменьшение массы после двух дней набухания в растворах 1,825% перекиси водорода, при уменьшении концентрации перекиси стадия набухания происходила дольше – 4 дня для 0,9183% раствора H_2O_2 , для 0,1726% раствора H_2O_2 в течение 16 дней уменьшения массы образцов не наблюдалось. Для образца ПЭТА-ПЭМП 1:1, который распадался в первый же день экспериментов в 1,825% и 0,9183% растворах перекиси водорода, в растворе 0,1726% перекиси водорода наблюдается набухание в первые два дня эксперимента и полная деградация на четвертый день. Для образца ТМПТА-ПЭМП 3:1 в 1,825% растворе H_2O_2 начало уменьшения массы геля происходит на третий день, тогда как в 0,9183% растворе это происходит на четвертый день. Характер деградации в растворе с меньшей концентрацией окислителя не изменяется, также в первые дни наблюдается значительное набухание образцов, затем постепенное снижение массы вплоть до растворения некоторых образцов. Начало уменьшения массы геля в 0,1726% растворе происходит на десятый день, а для более разбавленной концентрации 0,0194% уменьшения массы не наблюдается течение 17 дней.

Чтобы лучше понять механизмы деградации, поверхности некоторых выбранных образцов (ТМПТА-ПЭМП 3:1), подвергшихся воздействию деградационной среды, были исследованы с помощью сканирующей электронной микроскопии (рисунок 27).

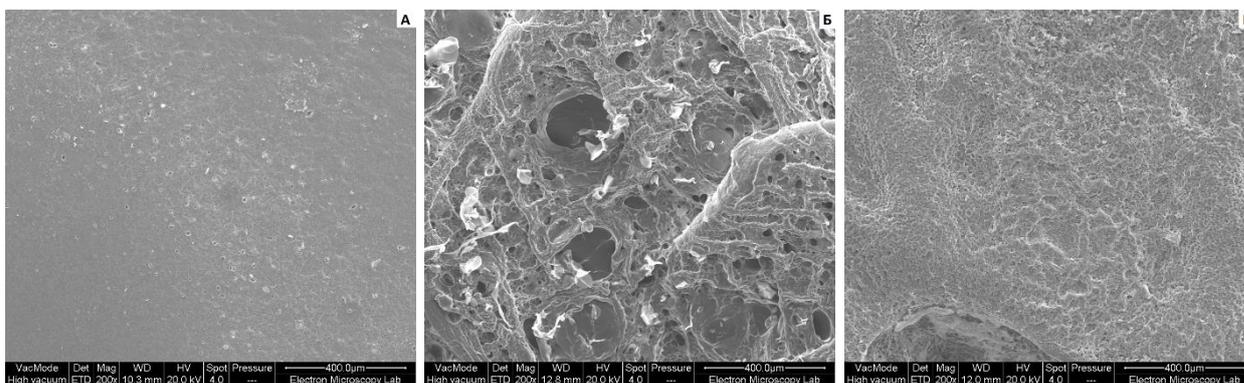


Рисунок 27 – СЭМ фотографии образца ТМПТА-ПЭМП 3:1 с поверхностью: (А) до биодegradации, (Б) после биодegradации в течение 16 дней в 1,825% H_2O_2 ; (В) после биодegradации в течение 17 дней в ФСБ с ЭСП

На рисунке 27 отчетливо видно, что поверхность образцов до какой-либо дегradации характеризуется наличием пор очень малого размера. Разложение в растворах H_2O_2 приводит к образованию полидисперсной системы пор с наличием как мелких, так и более крупных популяций. Это согласуется с гравиметрическими измерениями, которые показали, что в процессе дегradации образцы претерпевают начальное набухание. В результате поверхность гелей становится более гидрофильной, шероховатой и пористой. Последующее уменьшение массы образца свидетельствует о его постепенной дегradации и распаде на более мелкие части. Это также подтверждается визуально, и особенно этот распад становится более очевидным для образцов 1:1. Поверхность образца, дегradировавшего в ФСБ, содержащем эстеразу, также имеет некоторые изменения и наблюдается образование только мелких пор. Это объясняет, почему гидролитическая дегradация этих образцов гораздо менее выражена по сравнению с окислительным процессом. Образование мелких пор не позволяет молекулам фермента проникнуть в объем образца, что делает этот тип дегradации очень медленным и малоэффективным. Кроме того, эстераза может осаждаться на поверхности образцов и препятствовать дальнейшему проникновению вглубь образца.

Механизм окислительной дегradации этих сеток был дополнительно изучен с помощью ИК-спектроскопии (рисунок 28). Воздействие на образцы растворов перекиси водорода приводит к четким спектральным изменениям и появлению нескольких новых полос. Одна из этих новых полос, наблюдаемая при $1047\text{--}1050\text{ см}^{-1}$, отвечает за сульфоксидные группы ($-SO-$); она действительно перекрывается с полосами валентных колебаний $-C-O-$ ($1047\text{--}1050\text{ см}^{-1}$), но спектры ясно показывают сдвиги в этой области. Еще одна очень отчетливая новая полоса при 1116 см^{-1} может быть обусловлена либо валентными колебаниями $S=O$, либо даже деформационными $H-O-S$ [184]. Полученные спектральные данные указывают на то, что механизм окислительной дегradации сеток ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП связан с окислением сульфидных связей с образованием сульфоксидных, сульфоновых и даже сульфатных групп.

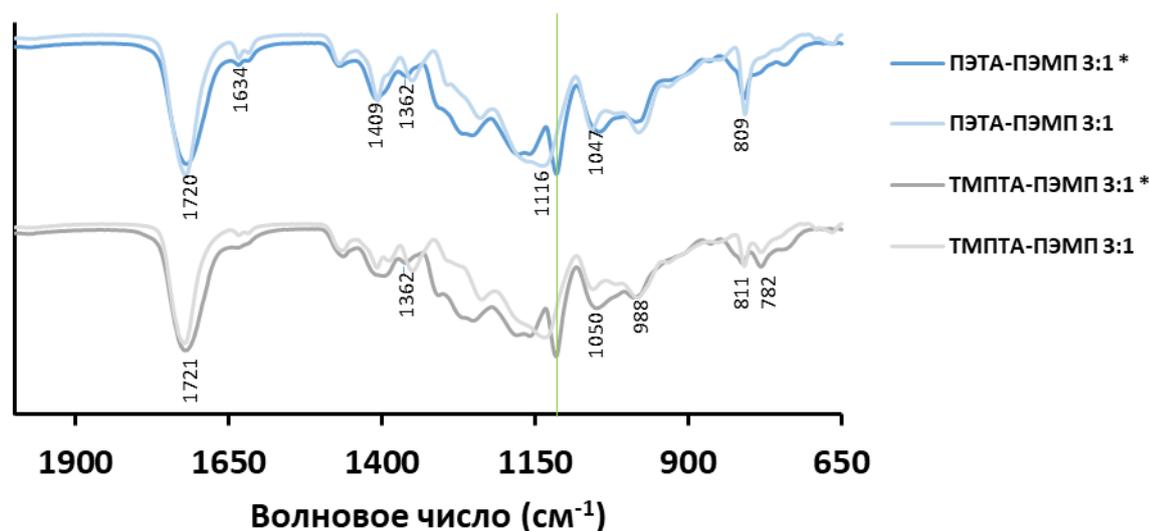


Рисунок 28 – ИК-спектры ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП образцов до и после биодegradации* в 1,825% растворе H_2O_2

Таким образом, гели ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП демонстрируют более высокие биодegradационные свойства в растворах перекиси водорода по сравнению с растворами фосфатно-солевого буфера в присутствии эстеразы и в ее отсутствие. Увеличение концентрации перекиси водорода приводит к увеличению скорости биодegradации.

3.2 Синтез и характеристика гелей на основе поли(этиленгликоль) диакрилата и пентаэритритол тетраакис(3-меркаптопропионат)а (ПЭГДА-ПЭМП)

В предыдущей главе были описаны синтез и характеристика гелей на основе ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП, обладающие слабой набухающей способностью в водных растворах, что применимо для имплантационных материалов биомедицинского назначения. Однако гелевые материалы с гидрофильными свойствами могут применяться в качестве систем для различной доставки лекарственных веществ, пероральная, трансдермальная, через слизистые оболочки и т.д. [185]. Для улучшения гидрофильности гелей на основе ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП акрилатный компонент заменили на ПЭГДА. ПЭГДА является гидрофильным, водорастворимым, биосовместимым, нетоксичным полимером, подвергающимся медленной дegradации. Такие характеристики позволяют широко использовать ПЭГДА для доставки лекарственных веществ, тканевой инженерии и в биосенсорах [186].

В работе методом тиол-ен «клик» полимеризации были синтезированы гели на основе поли(этиленгликоль) диакрилат (ПЭГДА) и пентаэритритол тетраакис(3-меркаптопропионат) (ПЭМП) с различным соотношением компонентов в исходной мономерной смеси [ПЭГДА:ПЭМП] = [3:1], [2:1] и [1:1] моль/моль в присутствии растворителя диметилформамид (ДМФА) и

различным соотношением мономеров к растворителю. На рисунке 29 приведена схема синтеза гелей ПЭГДА-ПЭМП.

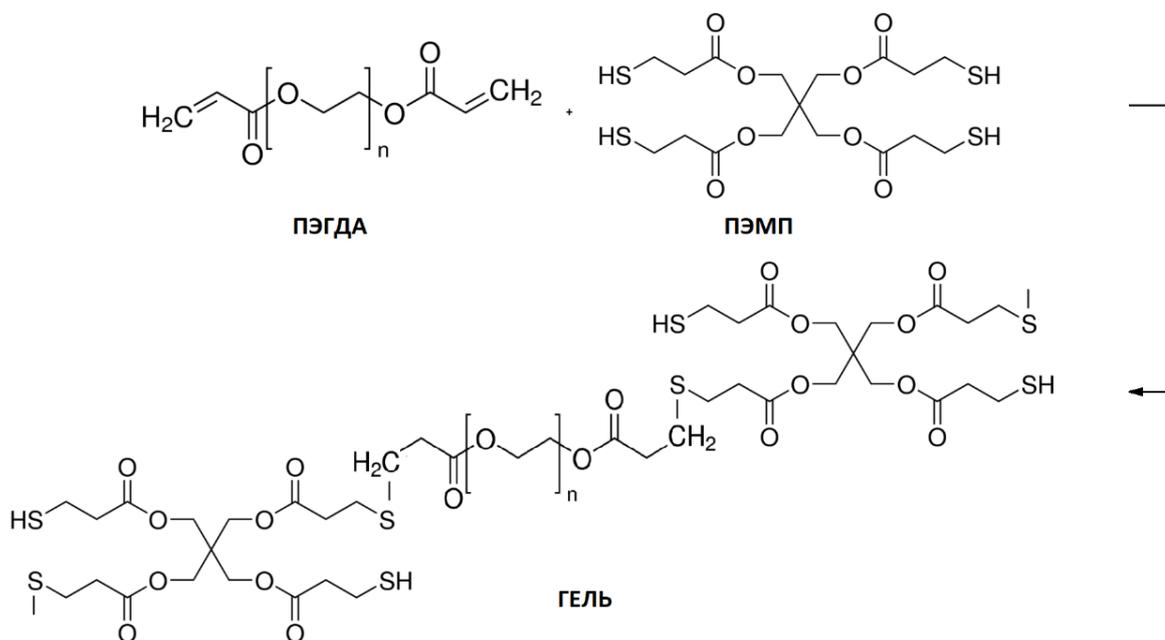
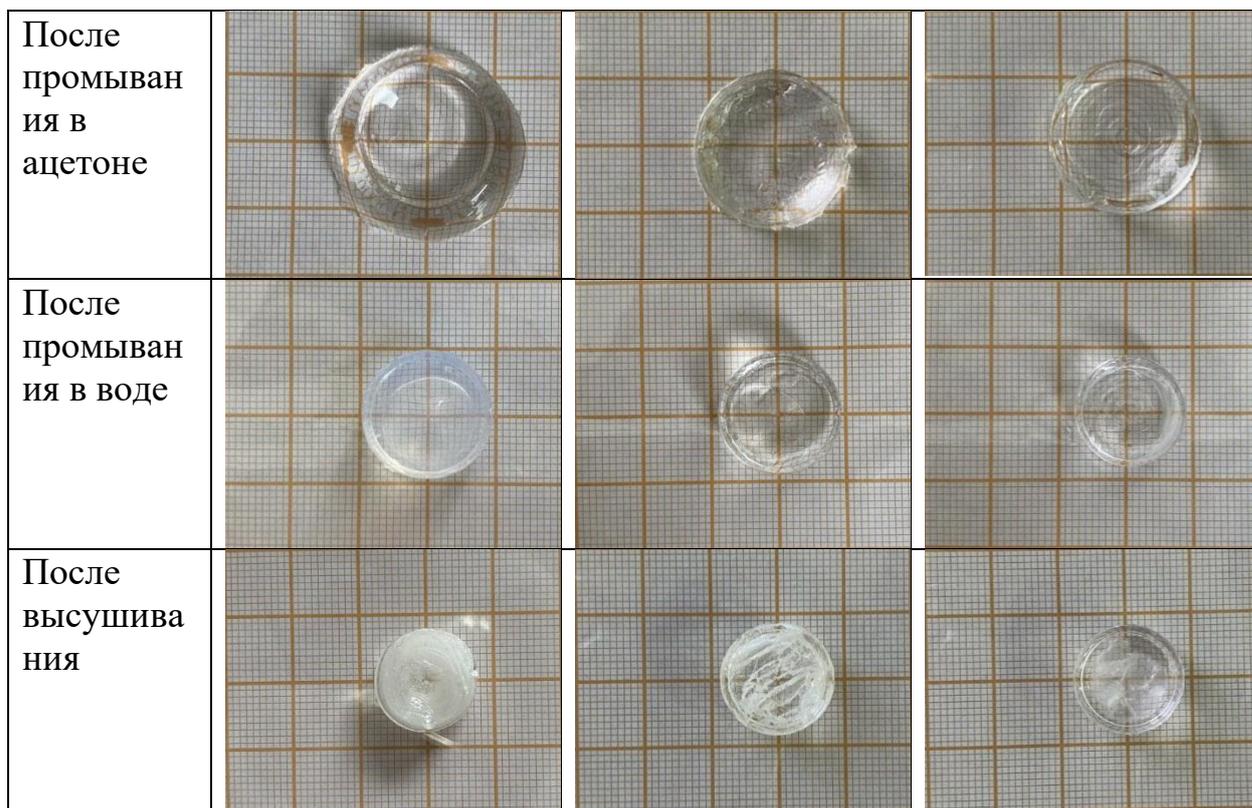


Рисунок 29 – Схема синтеза гелей ПЭГДА-ПЭМП

Синтезированные гели на основе ПЭГДА и ПЭМП были прозрачными, но сжимались и становились беловатыми в воде, что показано на таблице 4. Данное поведение гелей объясняется гидрофобностью, которая обусловлена наличием алкильных и тиольных фрагментов, которые ухудшают способность к набуханию в воде.

Таблица 4 – Внешний вид гелей ПЭГДА-ПЭМП при соотношении ИМС к растворителю 50 мас.%

	ПЭГДА-ПЭМП 3:1	ПЭГДА-ПЭМП 2:1	ПЭГДА-ПЭМП 1:1
После синтеза			
После промывания в ДМФА			



Результаты золь-гель анализа гелей ПЭГДА-ПЭМП разных соотношений исходной мономерной смеси (ИМС) показали, что наибольший выход гель фракции наблюдается у образца геля с составом ИМС 2:1 моль/моль (рисунок 30). Это может быть обусловлено тем, что при данном составе ИМС на каждые четыре -SH группы одной молекулы ПЭМП приходится четыре двойных связи двух молекул ПЭГДА, что является оптимальным для тиол-ен реакции. При таком соотношении компонентов наблюдается образование максимального количества сшивок между функциональными группами ПЭГДА и ПЭМП. При соотношении мономеров ПЭГДА и ПЭМП в ИМС 3:1 моль/моль выход гель фракции значительно уменьшается. Вероятно, при таком соотношении количество двойных связей в два раза больше количества -SH групп в ИМС, что в результате приводит к снижению количества прореагировавших функциональных групп молекул мономеров.

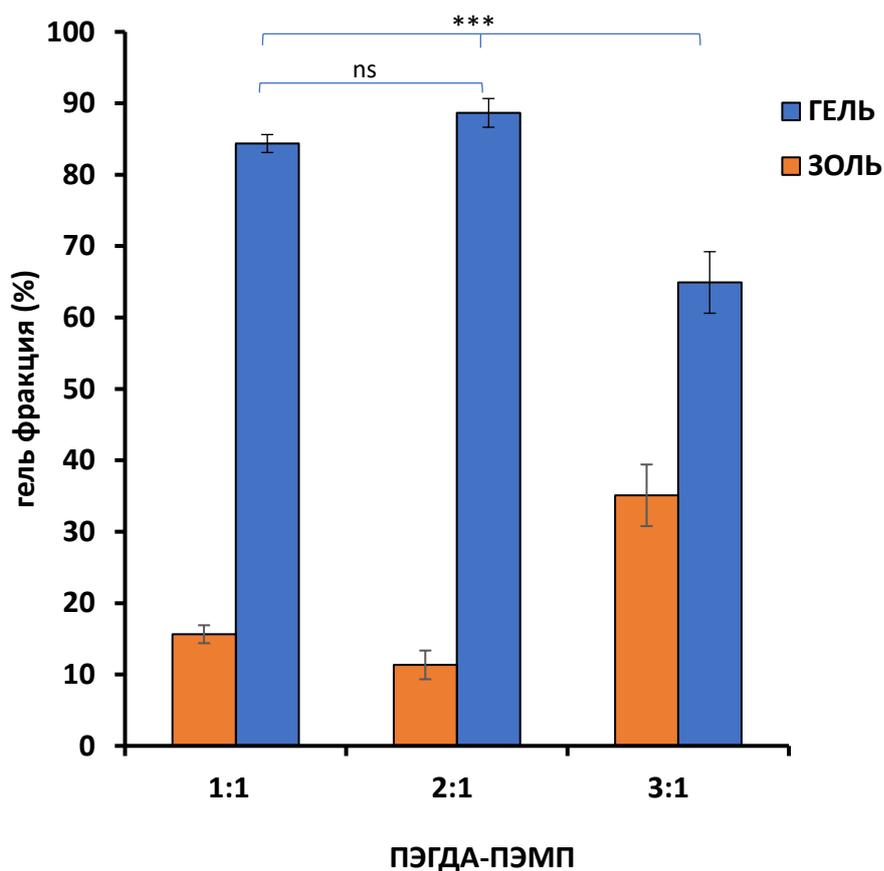


Рисунок 30 – Зависимость выхода золь и гель фракции геля ПЭГДА-ПЭМП от состава ИМС при соотношении ИМС к растворителю 50 мас. %. Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения ($n = 3$). Статистически значимые различия приведены ниже:
 *** - $p < 0.001$; ns - не имеет значения.

В работе была исследована набухающая способность полученных гелей ПЭГДА-ПЭМП в дистиллированной воде и этаноле. На рисунке 31 представлены данные зависимости степени набухания гелей ПЭГДА-ПЭМП в дистиллированной воде при разных соотношениях мономеров к растворителю. С увеличением содержания ПЭГДА набухающая способность гелей увеличивается, так как повышается гидрофильность гелей. В свою очередь увеличение содержания $-SH$ групп в структуре геля, обуславливает образование дополнительных дисульфидных мостиков и повышение плотности полимерной сетки.

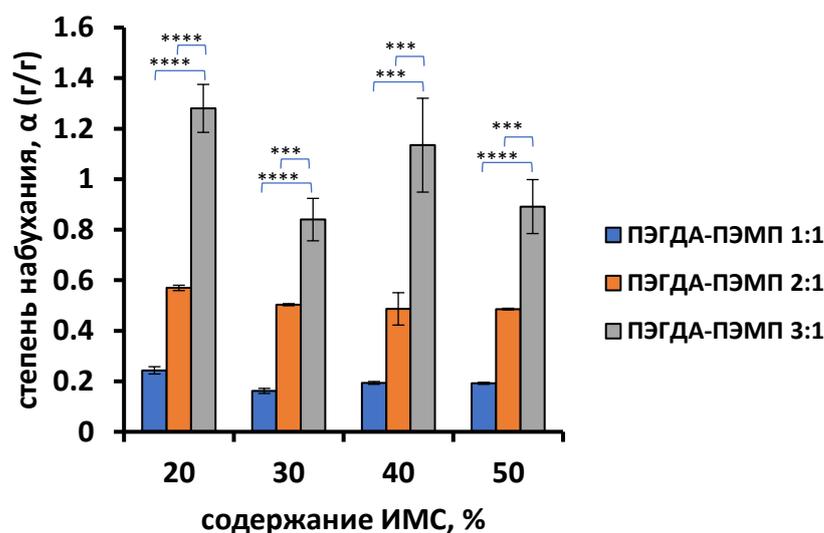


Рисунок 31 – Зависимость степени набухания гелей ПЭГДА-ПЭМП в дистиллированной воде при разных соотношениях мономеров к растворителю. Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения ($n = 3$). Статистически значимые различия приведены ниже:
 **** - $p < 0.0001$; *** - $p < 0.001$.

На рисунке 32 приведено сравнение степени набухания гелей ПЭГДА-ПЭМП с соотношением ИМС к растворителю 50 мас. % в дистиллированной воде и этаноле. Как видно из рисунка гидрогели лучше набухают в воде, чем в этаноле. С увеличением содержания ПЭГДА наблюдается рост набухающей способности, при этом гидрогель с наибольшим содержанием гидрофильного компонента набухает лучше в воде. А состав 1:1 лучше набухает в этаноле.

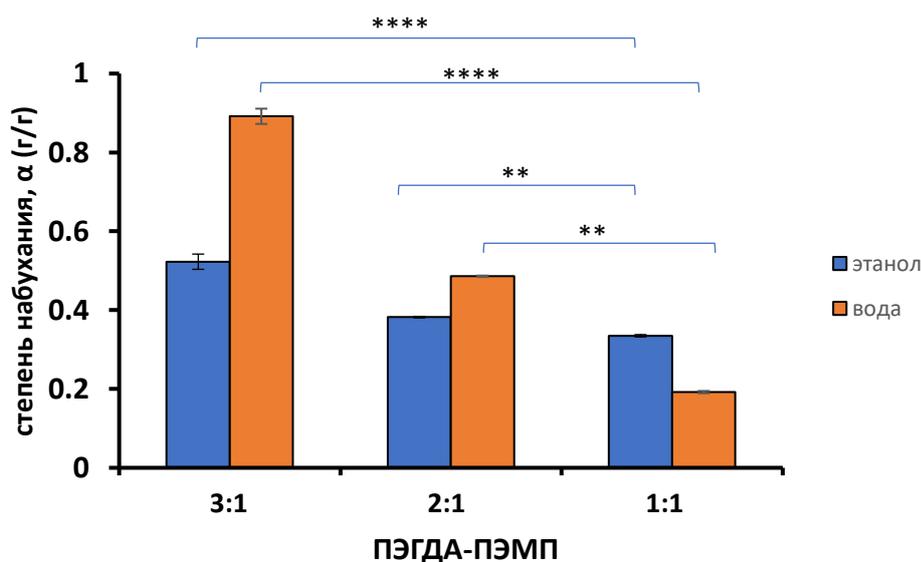


Рисунок 32 – Зависимость степени набухания гелей ПЭГДА-ПЭМП с соотношением ИМС к растворителю 50 мас. % в дистиллированной воде и этаноле. Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения ($n = 3$). Статистически значимые различия приведены ниже:
 **** - $p < 0.0001$; ** - $p < 0.01$.

Химический состав синтезированных гелей ПЭГДА-ПЭМП был исследован методом ИК-спектроскопии. ИК-спектры сухих образцов гелей ПЭГДА-ПЭМП различного состава представлены на рисунке 33. На всех трех представленных спектрах имеется высокий пик в области 1740-1730 см^{-1} , что соответствует колебаниям $\text{C}=\text{O}$ группы. Более широкий пик в области 1140-1143 см^{-1} свидетельствует о присутствии $\text{C}-\text{O}$ колебаний сложноэфирной группы в составе полученных гелей. Также стоит обратить внимание на пик в области 1640-1630 см^{-1} для состава 3:1 моль/моль, который подтверждает наличие непрореагировавших $\text{C}=\text{C}$ связей, сопряженных с $\text{C}=\text{O}$. В то же время для составов 2:1 и 1:1 моль/моль таких характеристических полос в данной области не наблюдается, что может быть подтверждением, что все двойные связи прореагировали с SH -группами.

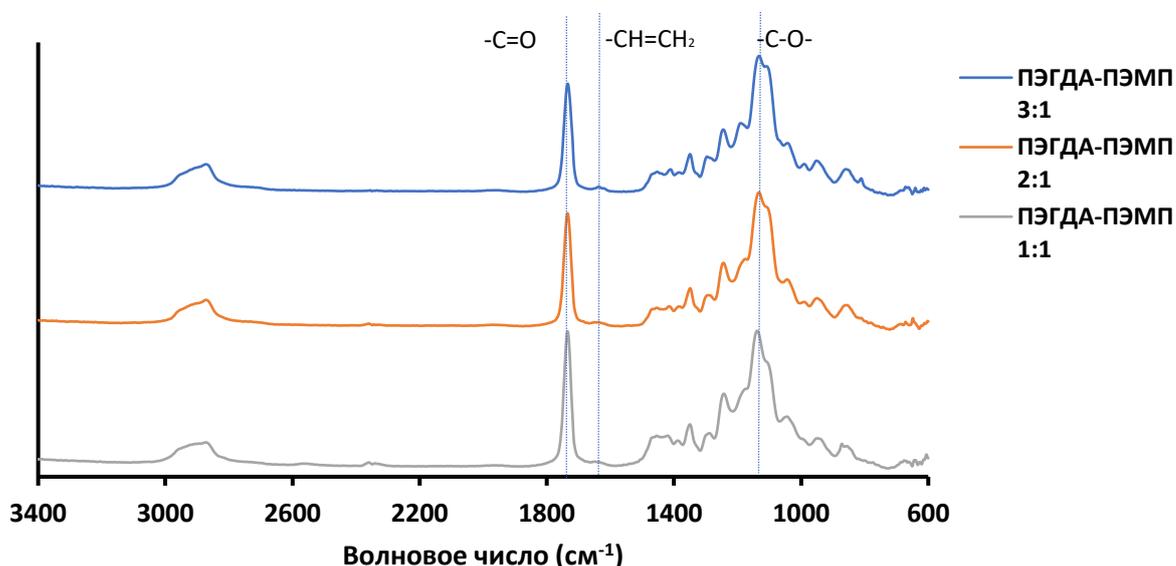


Рисунок 33 – ИК-спектры гелей ПЭГДА-ПЭМП различного состава ИМС с соотношением ИМС к растворителю 50 мас. %

Химический состав гелей ПЭГДА-ПЭМП также был изучен с помощью элементного анализатора Elementar Vario Micro Cube (таблица 5). Анализ подтвердил наличие серы в образцах, при этом, с увеличением содержания ПЭГДА к ПЭМП в исходной мономерной смеси количество серы в образцах уменьшается. Например, для соотношения ПЭГДА-ПЭМП 3:1 в ИМС процентное содержание серы составило $6,53 \pm 0,53$, тогда как для 2:1 и 1:1 процентное содержание серы составило $7,48 \pm 0,87$ и $8,19 \pm 2,36$, соответственно. По данным элементного анализа на S был рассчитан состав гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП, значения которого очень близки содержанию мономеров в ИМС.

Таблица 5 – Результаты элементного анализа гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП

Состав ИМС ПЭГДА- ПЭМП, моль/моль	Элементный состав гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП, %				Масса S, мг	Состав гидрогелей ПЭГДА- ПЭМП, моль/моль
	C	N	H	S		
1:1	48,34±0,84	0,00	7,50±0,26	8,19±2,36	0,2800	1,3:1
2:1	49,24±1,22	0,00	7,87±0,38	7,48±0,87	0,1745	2,3:1
3:1	50,28±0,67	0,00	7,92±0,37	6,53±0,53	0,1567	2,7:1

Изучение механических характеристик гелей позволяет сделать выводы о механической прочности гелей. На рисунке 34 представлены кривые деформации гелей ПЭГДА-ПЭМП различного состава. Установлено, что все образцы гелей являются достаточно прочными и упругими, и не подвергаются полной механической деструкции. Наблюдается лишь значительные обратимые деформации гелей. Также на рисунке видно заметное влияние соотношения мономеров в ИМС на прочность получаемых гидрогелей.

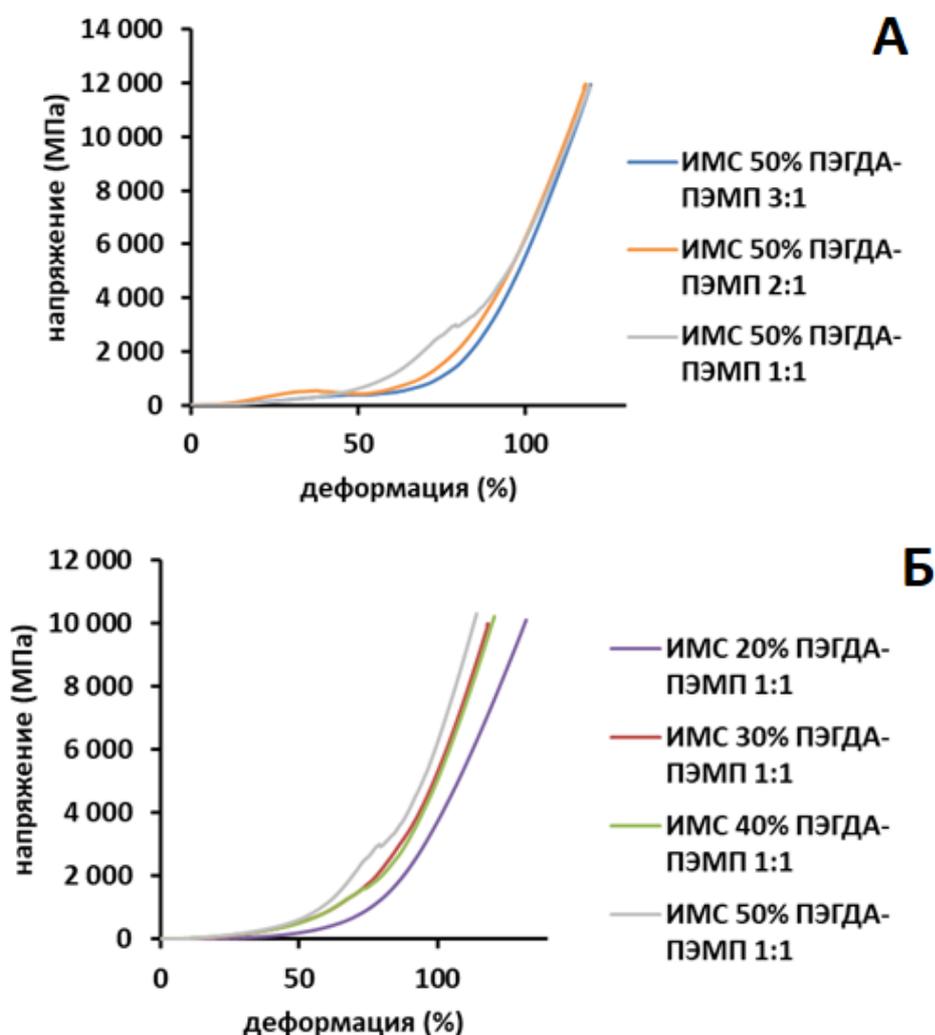


Рисунок 34 – Механические кривые гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП (А) влияние состава ИМС, (Б) влияние соотношения ИМС к растворителю

По данным механического анализа был рассчитан модуль упругости для образцов гидрогелей, представленных на рисунке 35. Установлено, что увеличение концентрации мономеров по отношению к растворителю ДМФА способствует увеличению модуля упругости. При варьировании состава ИМС, установлено, что образцы со стехиометрическим соотношением функциональных групп мономеров ПЭГДА и ПЭМП (состав 2:1 моль/моль) показывают наибольшее значение модуля упругости. Вероятно, это обусловлено увеличением степени сшивания полученной сетки. Аналогичное поведение наблюдалось при исследовании золь-гель анализа.

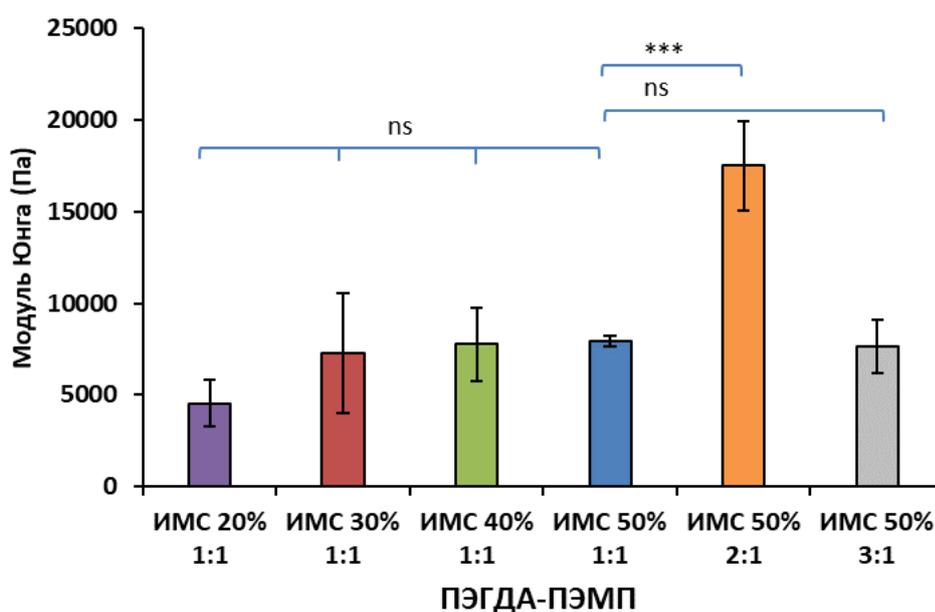


Рисунок 35 – Значения модуля Юнга для различных составов гелей ПЭГДА-ПЭМП. Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения ($n = 3$). Статистически значимые различия приведены ниже:

*** - $p < 0.001$; ns - не имеет значения

Морфология поверхности образцов гидрогелей на основе ПЭГДА-ПЭМП была охарактеризована методом атомно-силовой микроскопии. Микрофотографии получены на участке образца $99.946 \text{ мкм} \times \text{мкм}$ и представлены на рисунке 36. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) — это метод, позволяющий визуализировать практически любой тип поверхности, включая полимеры, керамику, композиты, стекло и биологические образцы. Числовые параметры результатов АСМ образцов ПЭГДА-ПЭМП представлены в таблице 6. Основным параметром оценки поверхности является шероховатость R_{av} , значение которой повышается с увеличением содержания ПЭГДА, с 0.744 нм до 5.287 нм . Как видно из рисунка 36 структура поверхности образца с соотношением мономеров ПЭГДА-ПЭМП 2:1 более плотная по сравнению с образцом 3:1, что может свидетельствовать о большей степени сшивания геля ПЭГДА-ПЭМП 2:1. Полученные

результаты коррелируют с данными золь-гель и механического анализа, которые говорят об образовании более плотной сетки для образца ПЭГДА-ПЭМП 2:1.

Таблица 6 – Числовые параметры результатов АСМ анализа гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП

	ПЭГДА-ПЭМП 3:1	ПЭГДА-ПЭМП 2:1
Sampling area	99.946 μm^2	99.946 μm^2
Peak-to-peak	75.021 nm	34.553 nm
Root mean square, RMS	6.906 nm	1.132 nm
Roughness average	5.287 nm	0.744 nm

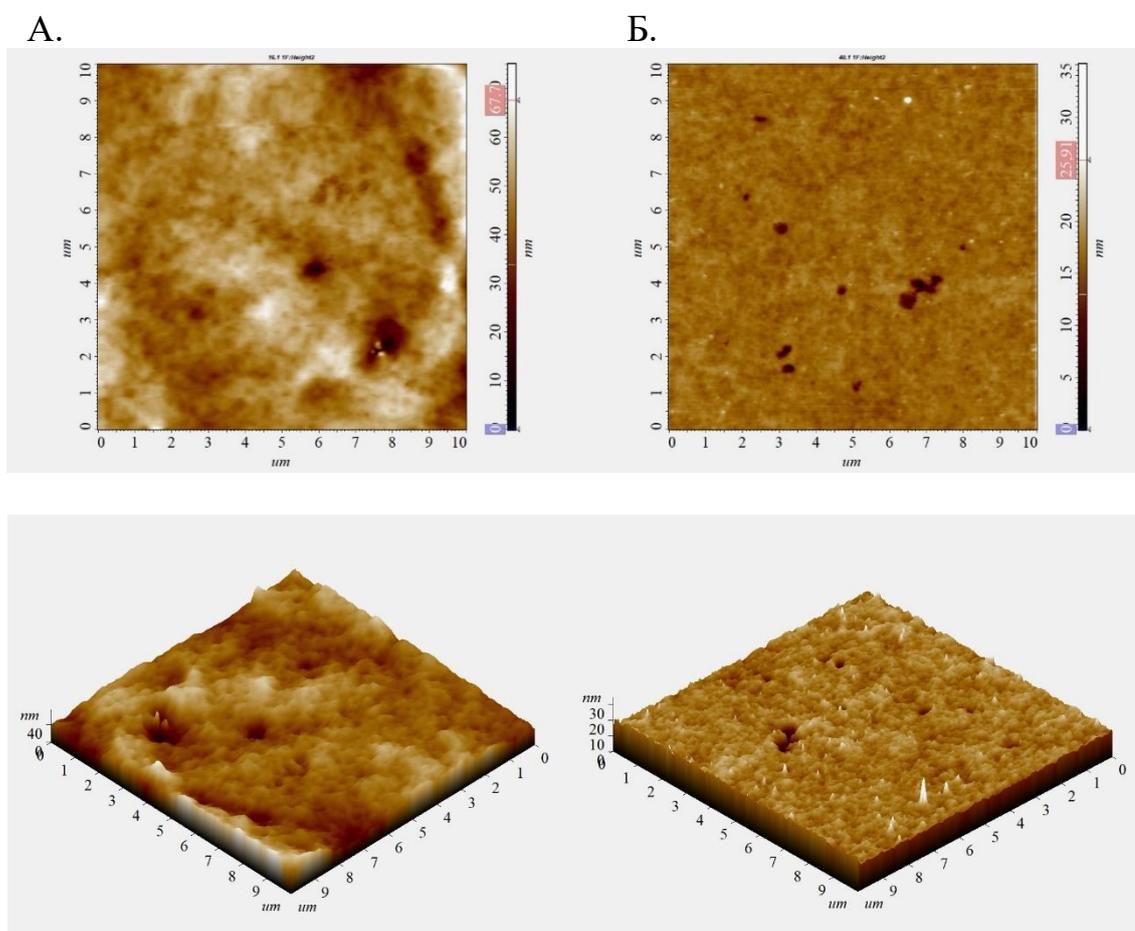


Рисунок 36 – АСМ изображения образцов гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП 3:1 (А), ПЭГДА-ПЭМП 2:1 (Б) с соотношением ИМС к растворителю 50 мас. %

Таким образом, для гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП были изучены различные физико-химические характеристики, в том числе выход гель-фракции, степень набухания, химический состав, механические свойства и особенности поверхности.

3.2.1 Изучение мукоадгезивных свойств гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП

Методы оценки мукоадгезивных свойств полимеров можно разделить на *in vitro* и *in vivo*. Эксперименты *in vivo* являются более достоверными методами для определения удерживания лекарственной формы в биологической среде живых организмов, другими словами, для исследования биодоступности. При этом они не дают информацию о силе мукоадгезии, силе отрыва и являются более сложными в исполнении и получении данных. Тесты *in vitro* считаются более удобными методами оценки мукоадгезивных свойств полимерных гелей. Эти методы позволяют оценивать мукоадгезивность без использования живых организмов [187]. Разработано множество *in vitro* методов [188], к одним из наиболее распространенных относят механический метод, метод потока и реологический метод. Механический метод основан на измерении силы, необходимой для разрыва связей между полимером и слизистой тканью. Метод потока подразумевает собой смыв полимеров соответствующей искусственной жидкостью при постоянной скорости потока, при этом время пребывания мукоадгезивного полимера на поверхности слизистой ткани определяют визуально или флуорометрически. Реологический метод основан на сравнительных измерениях вязкости полимера, муцина и их смеси с помощью вискозиметра или реометра [189].

Для образцов гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП были изучены мукоадгезивные свойства методом измерения силы отрыва на механическом анализаторе текстуры, поскольку этот способ является более универсальным и позволяет получить достаточно достоверные данные [190]. При постановке эксперимента в качестве слизистой ткани были использованы биологические объекты свежесрезанной половой системы (влагалище) овцематки. В настоящей работе были определены максимальная сила отрыва и общая работа адгезии гелей, как площадь под кривой в координатах измерения сила-расстояние, полученной в процессе отрыва образцов ПЭГДА-ПЭМП с разным соотношением мономеров в ИМС от слизистой оболочки биологической ткани влагалища (рисунок 37). Сила адгезии, зарегистрированная для гелей ПЭГДА-ПЭМП состава 3:1, 2:1, 1:1 моль/моль составила: $0,13 \pm 0,01$ Н, $0,17 \pm 0,02$ Н, $0,24 \pm 0,04$ Н, соответственно. Работа по адгезии для данных гелей показала значение $0,022 \pm 0,007$ Н·сек, $0,022 \pm 0,004$ Н·сек, $0,057 \pm 0,009$ Н·сек, соответственно. При увеличении содержания ПЭМП в образцах гидрогелей наблюдается увеличение силы мукоадгезии и работы адгезии этих образцов на слизистой ткани влагалища овцематки, что обусловлено присутствием непрореагировавших SH групп в составе этих образцов. Свободные SH группы образуют дисульфидные связи с тиольными группами муцина слизистых тканей и тем самым способствуют лучшему сцеплению гидрогелей с мукозой. Об этом свидетельствуют многочисленные исследования, посвященные мукоадгезии [66].

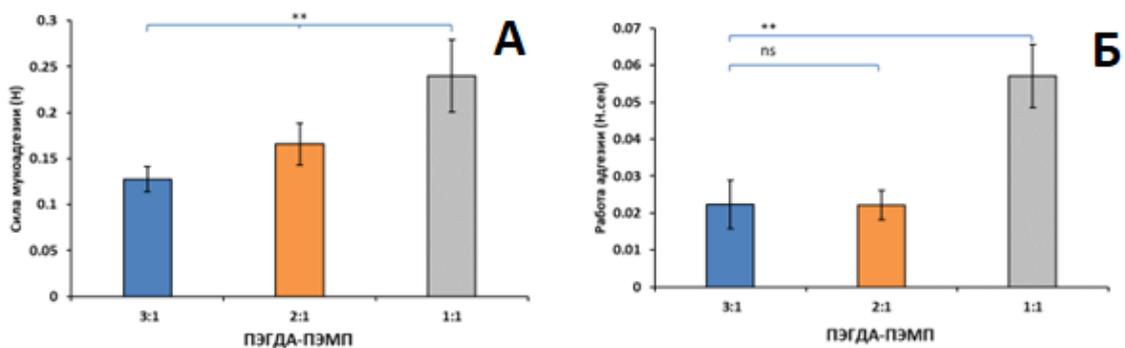


Рисунок 37 – Сила мукоадгезии (А) и работа адгезии (Б) для образцов ПЭГДА-ПЭМП с соотношением ИМС к растворителю 50 мас. %. Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения ($n = 3$). Статистически значимые различия приведены ниже:
 ** - $p < 0.01$; ns - не имеет значения

3.2.2 Исследование биodeградационных свойств гелей ПЭГДА-ПЭМП в растворах ИВЖ и перекиси водорода

Деградацию образцов ПЭГДА-ПЭМП оценивали гравиметрическим методом. Биodeградацию гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП исследовали в растворе ИВЖ (рисунок 38 А) и растворах перекиси водорода (рисунок 38 Б).

Наблюдения проводились в течение 21 суток и из полученных данных на рисунке 39 видно, что в растворе ИВЖ в течение первых 3-х суток наблюдается небольшое увеличение массы для всех образцов гидрогелей, что свидетельствует об их набухании. При этом наибольшая степень набухания наблюдается у более гидрофильных полимеров ПЭГДА-ПЭМП 3:1. Измерения последующих дней показывают, что масса полимерных образцов практически не меняется, на основании чего можно сделать вывод, что гидрогели не подвергаются деградациии в присутствии ИВЖ в течение исследуемого периода.

Результаты исследования деградациии образцов ПЭГДА-ПЭМП трех составов в присутствии перекиси водорода представлены на рисунке 38. Для образцов с преобладанием гидрофильного компонента ПЭГДА-ПЭМП 3:1 наблюдается продолжительное набухание, заметное уменьшение массы происходит с 17 дня. Снижение массы гидрогелей может означать их деградацию. Для состава ПЭГДА-ПЭМП 2:1 после небольшой стадии набухания наблюдается постепенное уменьшение массы на пятый день наблюдений, тогда как для состава ПЭГДА-ПЭМП 1:1 после заметного набухания на 4 день происходит резкое уменьшение массы, приводящее к полной деградациии образца на седьмые сутки. Вероятно, это обусловлено тем, что гидрогели с соотношением 1:1 имеют большую долю групп HS- и $-CH_2-S-CH_2-$, которые могут подвергаться окислению под действием перекиси водорода, что в итоге приводит к их быстрому разрушению. Образцы с соотношением ПЭГДА-ПЭМП 2:1 и 3:1 из-за соотношения акрилатных и тиольных групп имеют в структуре меньше связей, склонных к

окислительному расщеплению, что приводит к их более постепенной биодegradации.

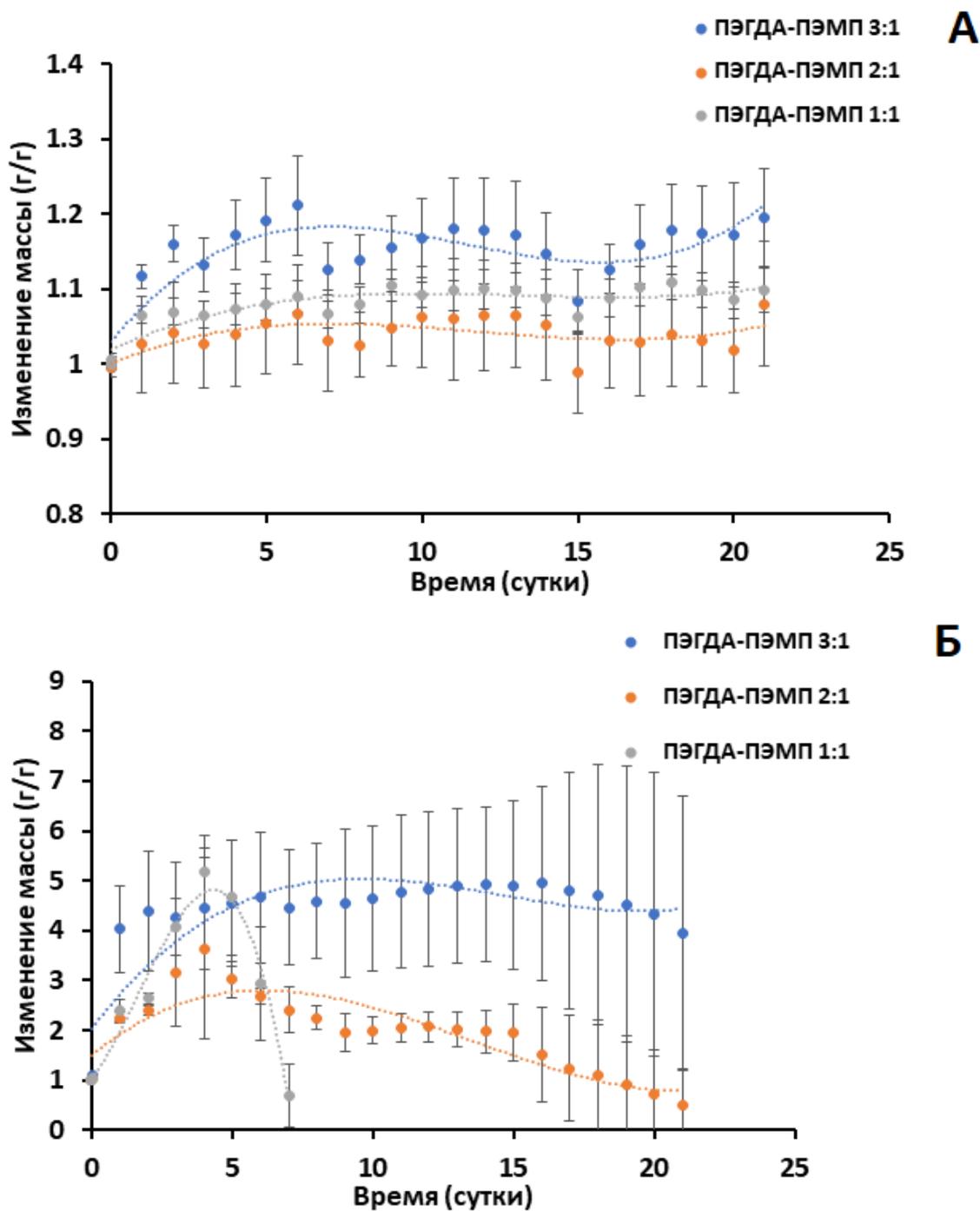


Рисунок 38 – Исследования биодegradации образцов ПЭГДА-ПЭМП с соотношением ИМС к растворителю 50 мас. % в растворе ИВЖ (А) и в 1.825% растворе H_2O_2 (Б).

Таким образом гидрогели ПЭГДА-ПЭМП проявляют биодegradационные свойства в растворе перекиси водорода, увеличение содержания ПЭМП в составе гидрогелей приводит к более быстрому разложению образцов.

Исследования биодegradации гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП в ИВЖ показало, что они не подвергаются деградации в течение исследуемого времени.

3.2.3 Загрузка лекарственных веществ в гидрогели ПЭГДА-ПЭМП и изучение профилей их высвобождения

Мукоадгезивные материалы часто находят применение в вагинальной доставке лекарственных веществ [191], в особенности в качестве носителей ЛВ с пролонгированным высвобождением. Полученные гидрогелевые материалы на основе ПЭГДА-ПЭМП могут быть использованы как матрицы для доставки различных ЛВ, в том числе антибиотиков и противогрибковых препаратов. В качестве модельных лекарств в гидрогели ПЭГДА-ПЭМП были загружены клиндамицин фосфат и клотримазол, которые очень часто применяются для лечения гинекологических заболеваний.

На рисунке 39 изображены данные по загрузке клиндамицин фосфата и клотримазола в гидрогелевые материалы на основе ПЭГДА-ПЭМП. Лекарственные препараты были загружены методом насыщения. Количество загруженного лекарства оценивалось гравиметрически. Как видно из графика при загрузке клотримазола (рисунок 39 А) наибольшее его содержание определялось для гидрогеля ПЭГДА-ПЭМП с составом ИМС 2:1 по сравнению с другими составами, однако содержание загруженного клотримазола не зависит от состава гидрогелей. При загрузке клиндамицин фосфата (рисунок 39 Б) наблюдается другая картина, более высокие концентрации загруженного лекарства отмечаются для состава с наибольшим содержанием ПЭГДА в исходной мономерной смеси. Поскольку ПЭГДА является в данной мономерной смеси гидрофильным компонентом, увеличение его содержания в составе ИМС приводит к увеличению гидрофильных свойств полученного гидрогелевого материала, что в свою очередь увеличивает количество загруженного лекарства. Кроме того, такое поведение может быть обусловлено образованием большего числа водородных связей между полимерной матрицей и лекарством. Многие исследования описывают положительное влияние водородных связей на загрузку лекарственных препаратов [192].

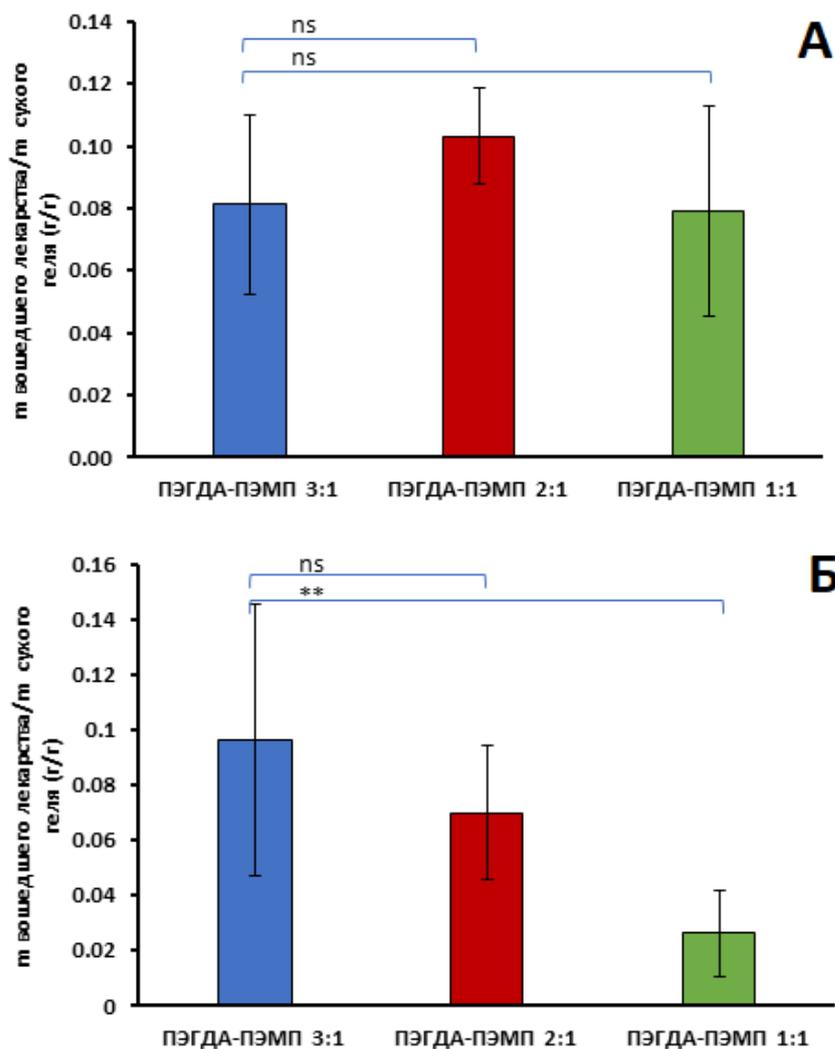


Рисунок 39 – Загрузка лекарственных веществ (А – клотримазол, Б – клиндамицин фосфат) в гели ПЭГДА-ПЭМП с соотношением ИМС к растворителю 50 мас. %. Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения ($n = 6$). Статистически значимые различия приведены ниже:

** - $p < 0.01$; * - $p < 0.1$; ns - не имеет значения

В работе было исследовано высвобождение загруженного клотримазола из образцов гидрогелей на основе ПЭГДА-ПЭМП с целью изучения возможности их использования в качестве лекарственной формы (рисунок 40 А).

Как видно из рисунка 40 А образцы ПЭГДА-ПЭМП, загруженные клотримазолом, демонстрируют пролонгированное выделение ЛВ. В течение 4 часов количество высвобожденного лекарства из гелей ПЭГДА-ПЭМП не превысило 20%, тогда как количество лекарства, выделившегося из контрольного образца (раствора ЛВ) за этот период времени, составило около 70%. Состав гелей ПЭГДА-ПЭМП не влияет на степень высвобождения лекарственного вещества.

В работе было изучено высвобождение загруженного клиндамицин фосфата из гелей на основе ПЭГДА-ПЭМП для оценки возможности

применения данной полимерной матрицы в качестве лекарственной формы (рисунок 40 Б). Увеличение содержания гидрофильного компонента ПЭГДА приводит к увеличению выделения ЛВ. Для состава с максимальным содержанием ПЭГДА характерно быстрое высвобождение лекарства в первые 10 минут, почти половина загруженного клиндамицин фосфата выделилась за это время. Также стоит отметить, что практически все загруженное лекарство выделяется через 1 час. Гидрогели ПЭГДА-ПЭМП 2:1, 1:1 демонстрируют пролонгированное выделение ЛВ, причем, количество высвобожденного лекарства не превышает $43,75 \pm 1,75\%$ и $32,33 \pm 18,23\%$ за 215 минут, тогда как количество лекарства, выделившегося из контрольного образца (раствора ЛВ) за 175 минут, составило $90,46 \pm 8,83\%$.

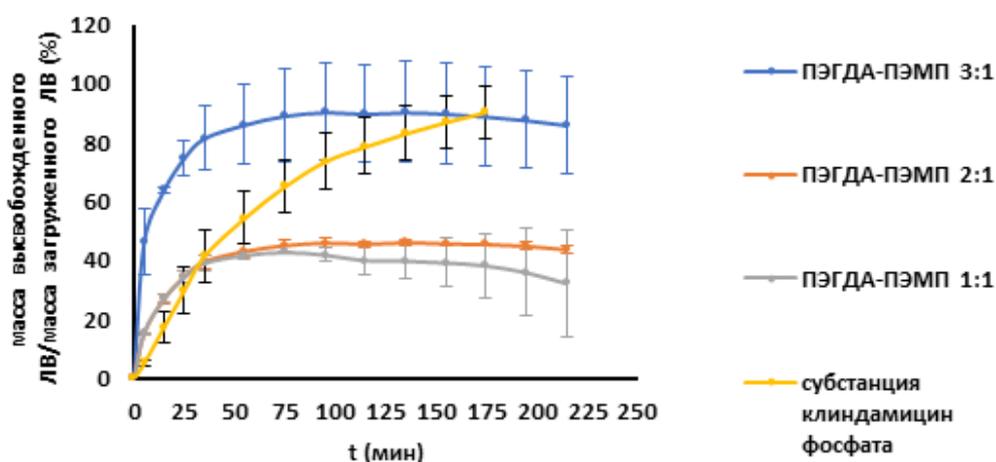
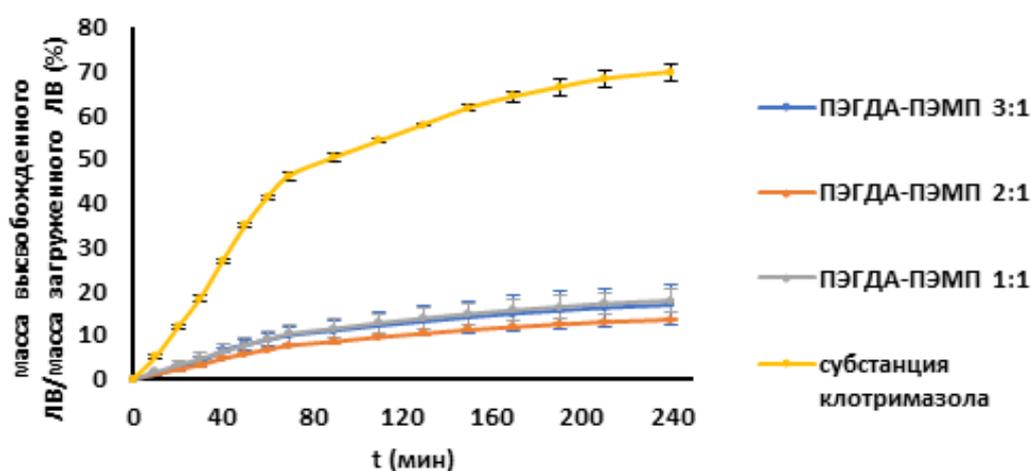


Рисунок 40 – Кумулятивные профили высвобождения лекарственных препаратов (А – клотримазол, Б – клиндамицин фосфат) из гелей ПЭГДА-ПЭМП с соотношением ИМС к растворителю 50 мас. %. Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения.

Таким образом, гидрогелевые матрицы ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом демонстрирует более высокую пролонгацию выделения ЛВ по сравнению с ПЭГДА-ПЭМП, загруженные клиндамицин фосфатом. Образец ПЭГДА-

ПЭМП 3:1 высвобождает практически весь загруженный клиндамицин фосфат за 1 час, тогда как количество высвобожденного клотримазола из гидрогеля с подобным соотношением ИМС достигает $16,86 \pm 4,53\%$ в течение 4 часов.

3.2.4 Изучение антимикробной активности гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП

Бактериальный вагиноз является одной из наиболее часто встречающихся генитальных инфекций, связанной с аномальными выделениями из влагалища у женщин репродуктивного возраста, и составляет треть всех вагинальных инфекций. Для лечения применяют местную антибактериальную терапию, достаточно эффективным в лечении бактериального вагиноза показал себя клиндамицин фосфат [193].

Исследование антимикробной активности проводили в лаборатории микробиологии АО «Научный центр противoinфекционных препаратов» и представлены в виде отчета в Приложении А. Результаты антимикробной активности контрольных и экспериментальных образцов гелей ПЭГДА-ПЭМП и раствора клиндамицин фосфата, полученные диффузионным методом в отношении тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, представлены на рисунке 41.

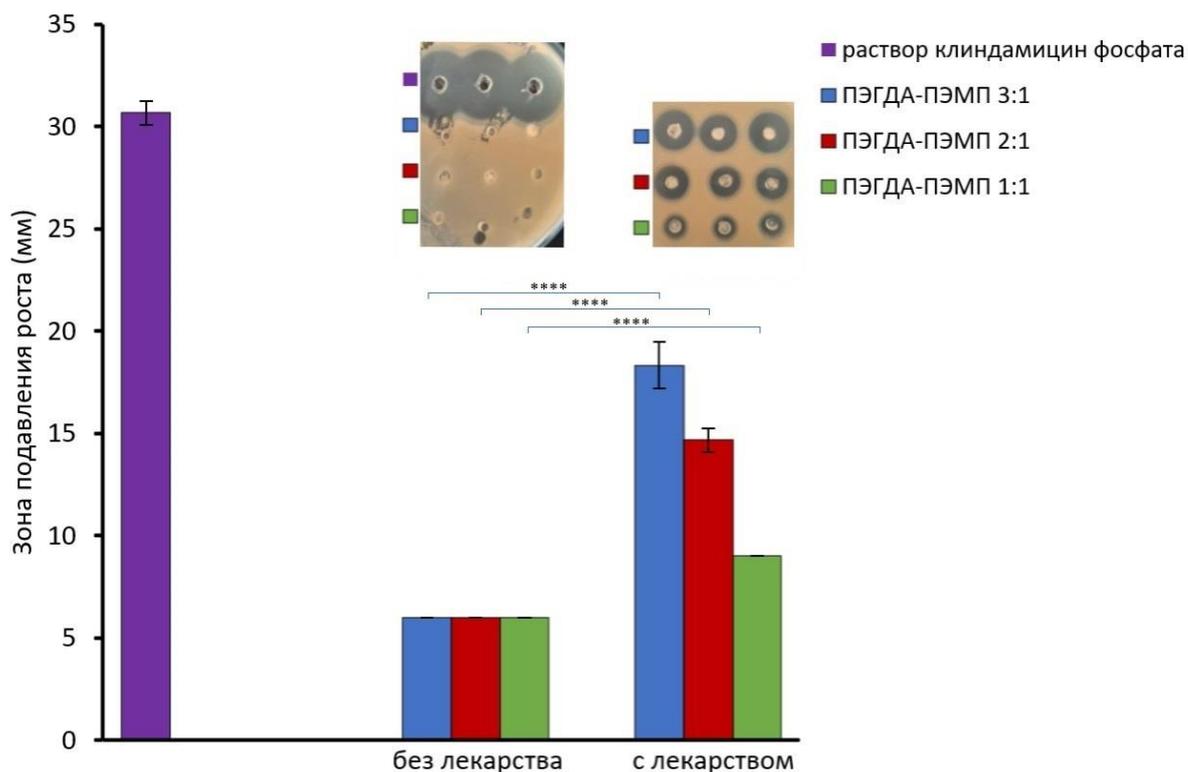


Рисунок 41 – Результаты антимикробной активности образцов ПЭГДА-ПЭМП в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P. Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения ($n = 3$). Статистически значимые различия приведены ниже:

**** - $p < 0.0001$

Из данных, представленных на рисунке 41, видно, что контрольный образец раствора клиндамицин фосфата подавляет рост тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, зона подавления роста составляет $30,67 \pm 0,58$ мм. Образцы полимерных гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП без лекарственного вещества не обладают бактерицидной активностью, зоны задержки роста в отношении тестируемого штамма составили $6,0 \pm 0,00$ мм, что соответствует диаметру цилиндров.

Зона подавления роста тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P под действием экспериментального образца - гидрогель ПЭГДА-ПЭМП 3:1 с клиндамицин фосфатом составила $18,33 \pm 1,15$ мм; гидрогель ПЭГДА-ПЭМП 2:1 с клиндамицин фосфатом задерживает рост тест-штамма на $14,67 \pm 0,58$ мм; гидрогель ПЭГДА-ПЭМП 1:1 с клиндамицин фосфатом подавляет рост тестируемого штамма с зоной подавления роста $9,0 \pm 0,00$ мм.

Отмечено, что зона подавления роста тест-штамма золотистого стафилококка имеет прямую зависимость от соотношения компонентов полимера ПЭГДА-ПЭМП: соотношение 3:1 - $18,33 \pm 1,15$ мм, соотношение 2:1 - $14,67 \pm 0,58$ мм, соотношение 1:1 - $9,0 \pm 0,00$ мм. Вероятно, увеличение антимикробной эффективности связано с большим содержанием лекарственного вещества в лекарственной форме в результате увеличения количества гидрофильного компонента в гелях ПЭГДА-ПЭМП.

Одной из достаточно распространенных проблем с вульвовагинальным трактом можно назвать заболевания, вызванные *Candida albicans*. Для лечения данной микотической инфекции применяют чувствительный к ней клотримазол. Данный препарат зарекомендовал себя эффективным локально и не имеет сильных побочных эффектов [194].

Результаты антимикробной активности гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП и раствора клотримазола в отношении *Candida albicans* ATCC 10231 представлены на рисунке 42.

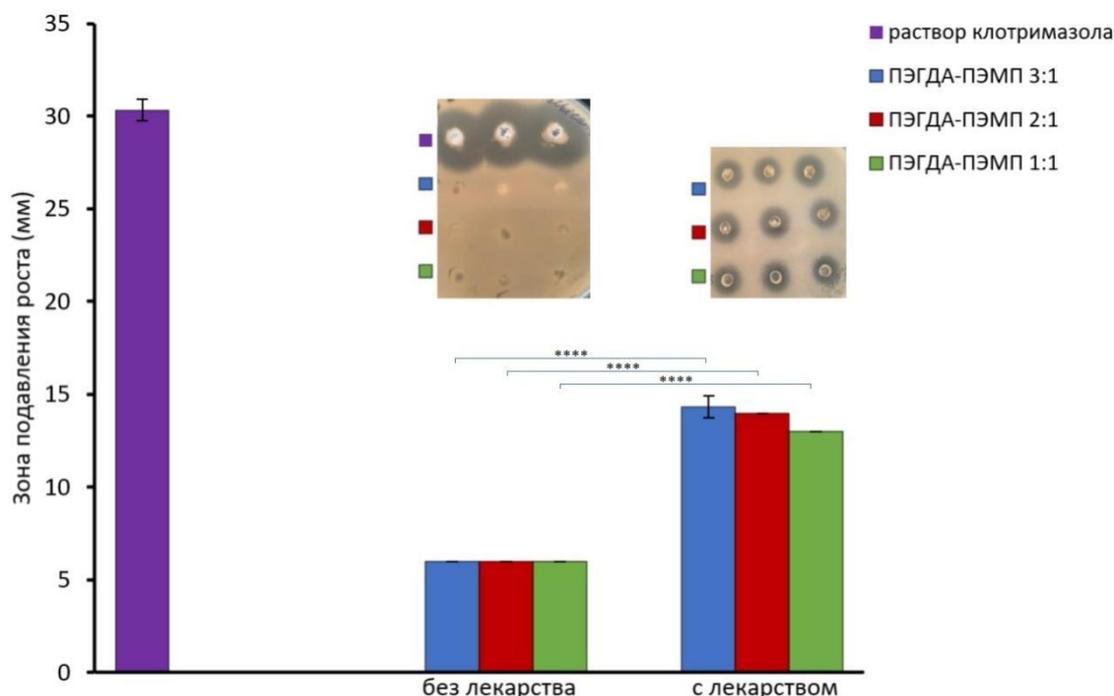


Рисунок 42 – Результаты антимикробной активности гелей ПЭГДА-ПЭМП в отношении *Candida albicans* ATCC 10231. Данные выражены в виде среднего \pm стандартного отклонения (n = 3). Статистически значимые различия

приведены ниже:

**** - $p < 0.0001$

Из данных, представленных на рисунке 42, видно, что образец раствора клотримазола подавляет рост тест-штамма *Candida albicans* ATCC 10231, зона подавления роста тест-штамма составляет $30,33 \pm 0,58$ мм. Образцы полимеров - гель ПЭГДА-ПЭМП 3:1, гель ПЭГДА-ПЭМП 2:1 и гель ПЭГДА-ПЭМП 1:1 не обладают фунгицидной активностью – зоны задержки роста в отношении тестируемого штамма *Candida albicans* ATCC 10231 составили $6,0 \pm 0,00$ мм, что соответствует диаметру цилиндров.

Зона подавления роста тест-штамма *Candida albicans* ATCC 10231 под действием экспериментального образца - гель ПЭГДА-ПЭМП 3:1 с клотримазолом составила $14,33 \pm 0,58$ мм; гель ПЭГДА-ПЭМП 2:1 с клотримазолом задерживает рост тест-штамма на $14,0 \pm 0,00$ мм; гель ПЭГДА-ПЭМП 1:1 с клотримазолом подавляет рост тестируемого штамма на $13,0 \pm 0,00$ мм.

Установлено, что зона подавления роста тест-штамма *Candida albicans* ATCC 10231 имеет незначительную зависимость от соотношения компонентов полимера: соотношение 3:1 - $14,33 \pm 0,58$ мм, соотношение 2:1 - $14,0 \pm 0,00$ мм, соотношение 1:1 - $13,0 \pm 0,00$ мм.

На основании полученных результатов о загрузке и выделении лекарственных веществ из гидрогелей и анализа их антимикробной активности можно сделать вывод, что наиболее эффективной лекарственной формой с точки зрения количества загруженного ЛВ и проявленного действия

в отношении микроорганизмов *Staphylococcus aureus* является образец ПЭГДА-ПЭМП 3:1. Также установлено, что в качестве противогрибкового препарата в отношении микроорганизмов *Candida albicans* исследуемые системы менее эффективны по сравнению с антимикробными, но их эффективность лежит в пределах необходимого лечебного эффекта.

4 ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

4.1 Описание принципиальной технологической схемы производства лекарственных форм на основе ПЭГДА-ПЭМП

Для опытного производства лекарственных форм на основе ПЭГДА-ПЭМП была разработана принципиальная технологическая схема, представленная на рисунке 43.

В блок смешения (1) поступают исходные мономеры ПЭГДА, ПЭМП, а также ДМФА в качестве растворителя, где перемешиваются в течение 10 минут, затем исходная мономерная смесь направляется в блок (2). В блоке (2) находятся отливочные формы из бутылкаучука, в которых непосредственно происходит синтез гидрогелей при температуре 30°C. Далее синтезированные гидрогели погружаются в промывочную ванну 3 с ДМФА на 1 час для удаления непрореагировавших мономеров, отработанный растворитель при этом отправляется на очистку в блок (4), после очищенный растворитель заново возвращается для промывки следующей партии гидрогелей. После промывки в ДМФА, гели отмываются в ванне (5) с ацетоном для удаления остатков ДМФА. Ацетон сменяется в ванне 3 раза в течение 6 часов, использованный растворитель очищается в блоке (6) и обратно возвращается в ванну 5. Далее гели направляются в промывочную ванну 7, где промываются водой, при 8 разовой смене воды в течении 2 суток. Для получения лекарственных форм отмывые гели поступают в блок (8), где высушиваются в вакуумном сушильном шкафу при температуре 23°C до постоянной массы. Далее высушенные гидрогели направляются в ванну (10), куда подается водный раствор клиндамицин фосфата, приготовленный в смесителе (9). Приготовление лекарственных форм происходит методом насыщения, для определения количества лекарства, вошедшего в лекарственные формы, не вошедший в гидрогель раствор направляется в блок (11) на анализ для определения количества клиндамицин фосфата. Аналогично осуществляется загрузка клотримазола в лекарственные формы, где в качестве растворителя используется 50 об.% водный раствор этанола. Готовые гидрогелевые лекарственные формы упаковываются в блоке (12) и направляются на склад для хранения.

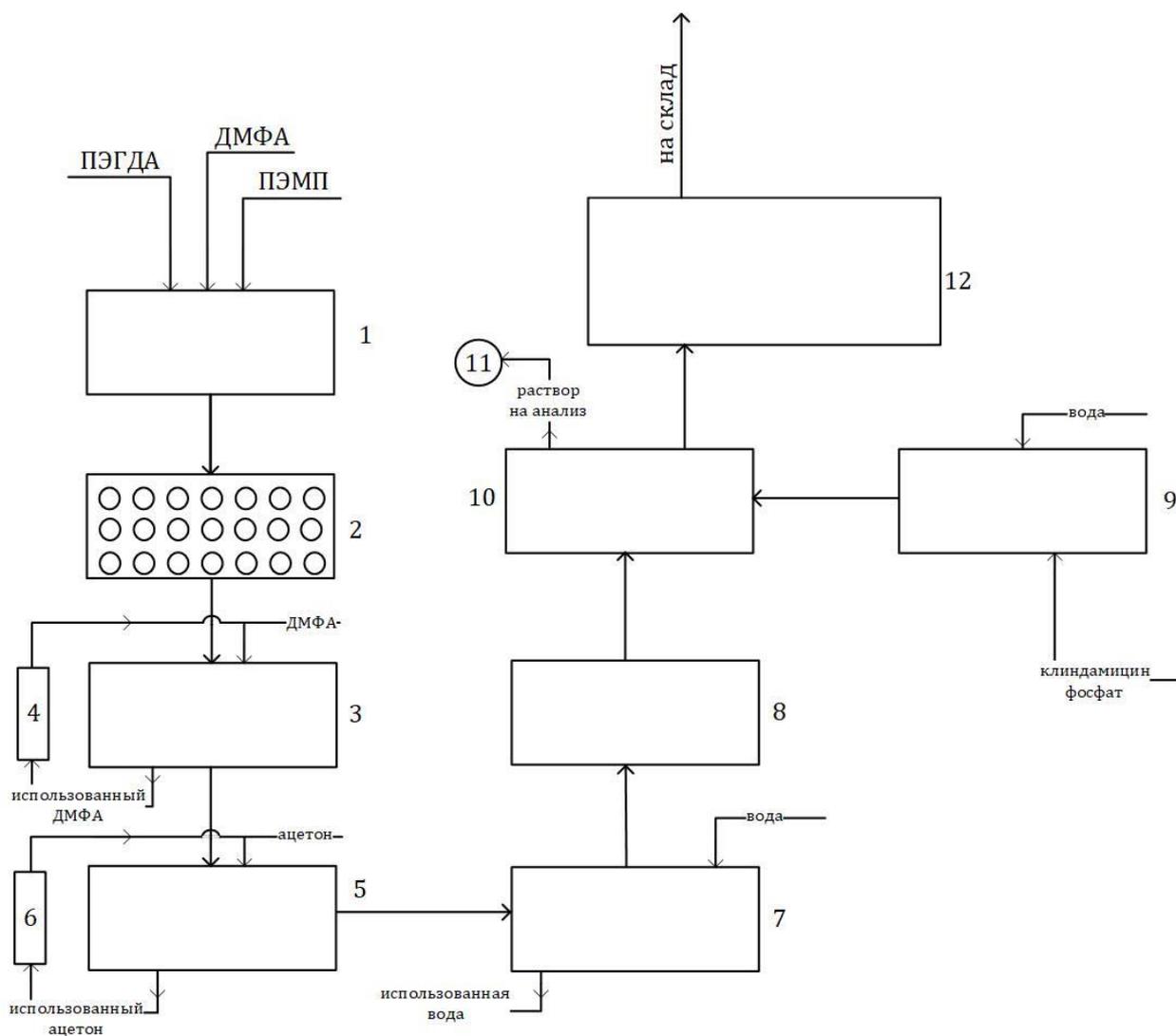


Рисунок 43 – Принципиальная технологическая схема производства полимерных лекарственных форм на основе ПЭГДА-ПЭМП.

4.2 Материальный баланс производства полимерных лекарственных форм на основе ПЭГДА-ПЭМП

Для количественной оценки производственных процессов, а именно стадии синтеза полимеров, рассчитан материальный баланс получения гидрогелей на основе ПЭГДА-ПЭМП с разными соотношениями компонентов исходной мономерной смеси. В таблице 7 представлены составы ИМС для получения гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП различных соотношений.

Таблица 7 – Составы исходной мономерной смеси для получения гидрогеля ПЭГДА-ПЭМП. Расчет произведен на 1000 кг ИМС

А. ПЭГДА-ПЭМП (3:1 моль/моль)

Компонент	Количество	Функциональное назначение
ПЭГДА	389,60 кг	Исходный компонент мономерной смеси
ПЭМП	110,40 кг	
ДМФА	500,00 кг	Растворитель
Итого	1000,00 кг	

Б. ПЭГДА-ПЭМП (2:1 моль/моль)

Компонент	Количество	Функциональное назначение
ПЭГДА	350,93 кг	Исходный компонент мономерной смеси
ПЭМП	149,06 кг	
ДМФА	500,00 кг	Растворитель
Итого	1000,00 кг	

В. ПЭГДА-ПЭМП (1:1 моль/моль)

Компонент	Количество	Функциональное назначение
ПЭГДА	270,27 кг	Исходный компонент мономерной смеси
ПЭМП	229,73 кг	
ДМФА	500,00 кг	Растворитель
Итого	1000,00 кг	

Расчет материального баланса ведется на 1000 кг ИМС, на основании результатов золь-гель анализа.

Уравнение материального баланса:

$$G_1 = G_2 + G_3,$$

где G_1 – масса исходных веществ

G_2 – масса готового продукта

G_3 – масса материальных потерь

Выход готового продукта рассчитывался по формуле:

$$\eta = \frac{m_{\text{сух.отм}}}{m_{\text{синт}}} \times 100\%$$

где $m_{\text{сух.отм}}$ и $m_{\text{синт}}$ – массы сухих отмытых образцов и смеси мономеров без растворителя соответственно.

Для состава ПЭГДА-ПЭМП 3:1 при синтезе на 2,5 г ИМС:

$$\eta = \frac{0,7529}{1,25} \times 100\% = 60,232\%$$

$$\eta = \frac{0,8591}{1,25} \times 100\% = 68,728\%$$

$$\eta = \frac{0,8219}{1,25} \times 100\% = 65,752\%$$

Среднее значение η составило 64,904%, тогда как потери составили 100% - 64,904% = 35,096%.

При пересчете на 500,00 кг ИМС без растворителя масса готового продукта составляет:

$$G_2 = \frac{500,00 * \eta}{100\%} = \frac{500,00 * 64,904\%}{100\%} = 324,52 \text{ кг}$$

$$G_3 = G_1 - G_2 = 500,00 - 324,52 = 175,48 \text{ кг}$$

Для состава ПЭГДА-ПЭМП 2:1 при синтезе на 2,5 г ИМС:

$$\eta = \frac{1,0969}{1,25} \times 100\% = 87,752\%$$

$$\eta = \frac{1,1370}{1,25} \times 100\% = 90,960\%$$

$$\eta = \frac{1,0907}{1,25} \times 100\% = 87,256\%$$

Среднее значение η составило 88,656%, тогда как потери составили 100% - 88,660% = 11,344%.

При пересчете на 500,00 кг ИМС без растворителя масса готового продукта составляет:

$$G_2 = \frac{500,00 * \eta}{100\%} = \frac{500,00 * 88,656\%}{100\%} = 443,28 \text{ кг}$$

$$G_3 = G_1 - G_2 = 500,00 - 443,28 = 56,72 \text{ кг}$$

Для состава ПЭГДА-ПЭМП 1:1 при синтезе на 2,5 г ИМС:

$$\eta = \frac{1,0402}{1,25} \times 100\% = 83,216\%$$

$$\eta = \frac{1,0713}{1,25} \times 100\% = 85,704\%$$

$$\eta = \frac{1,0520}{1,25} \times 100\% = 84,160\%$$

Среднее значение η составило 84,360%, тогда как потери составили 100% - 84,360% = 15,640%.

При пересчете на 500,00 кг ИМС без растворителя масса готового продукта составляет:

$$G_2 = \frac{500,00 * \eta}{100\%} = \frac{500,00 * 84,360\%}{100\%} = 421,80 \text{ кг}$$

$$G_3 = G_1 - G_2 = 500,00 - 421,80 = 78,20 \text{ кг}$$

Для удобства результаты расчетов выхода гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП приведены в таблице 8.

Таблица 8 – Сводная таблица значений выхода и потерь на стадии синтеза гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП

	Выход, %		Потери, %	
	кг	%	кг	%
ПЭГДА- ПЭМП 3:1	324,52	64,904%	175,48	35,096%
ПЭГДА- ПЭМП 2:1	443,28	88,656%	56,72	11,344%
ПЭГДА- ПЭМП 1:1	421,80	84,360%	78,20	15,640%

В таблице 9 представлен материальный баланс синтеза гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП с различными соотношениями мономеров в ИМС.

Таблица 9 – Материальный баланс стадии синтеза гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП

Приход (кг)		Расход (кг)	
ПЭГДА	389,60	Продукт	324,52
ПЭМП	110,40	Потери мономеров	175,48
ДМФА	500,00	Рециркулят	495,00
		Потери растворителя	5,00
Итого:	1000,00	Итого:	1000,00

Приход (кг)		Расход (кг)	
ПЭГДА	350,93	Продукт	443,28
ПЭМП	149,07	Потери мономеров	56,72
ДМФА	500,00	Рециркулят	495,00
		Потери растворителя	5,00
Итого:	1000,00	Итого:	1000,00

Приход (кг)		Расход (кг)	
ПЭГДА	270,27	Продукт	421,80
ПЭМП	229,73	Потери мономеров	78,20
ДМФА	500,00	Рециркулят	495,00
		Потери растворителя	5,00
Итого:	1000,00	Итого:	1000,00

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты научных исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Реакцией тиол-ен «клик» химии были получены гели на основе ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП. Обнаружено, что состав ИМС влияет на гелеобразование, набухающую способность и механические свойства полученных систем. Гели ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП продемонстрировали ограниченную набухающую способность в воде, поэтому для придания им гидрофильности качестве акрилатного компонента был использован ПЭГДА. Стехиометрический состав ИМС по функциональным группам для систем ПЭТА-ПЭМП и ПЭГДА-ПЭМП увеличивает выход гель-фракции. Химический состав полученных гелей подтверждён методами ИК-, Раман-спектроскопии и элементного анализа на S.

2. Впервые исследованы термические характеристики гелей на основе ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, механические характеристики гелей на основе ПЭГДА-ПЭМП, а также их морфологические особенности. Показано, что образцы ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП демонстрируют термическую стабильность, при этом начало разложения наблюдается только при температуре выше 345–360 °С, достигая 94–95 % от общей потери веса при 500 °С. Установлено, что улучшение механических свойств гелей ПЭГДА-ПЭМП характерно для стехиометрического состава ИМС по функциональным группам. Методами СЭМ и АСМ установлено, что уменьшение пористости полученных полимерных сеток ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП и ПЭГДА-ПЭМП свойственно образцам со стехиометрическим составом ИМС по функциональным группам.

3. Впервые исследованы биodeградационные свойства гелей на основе ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП. Биodeградационные свойства гелей на основе ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП были исследованы в ФСБ в отсутствие и с добавлением эстеразы свиной печени, а также в растворах перекиси водорода различных концентраций гравиметрически. Присутствие эстеразы замедляет деградацию. Биodeградационные свойства гелей на основе ПЭГДА-ПЭМП были исследованы в растворе искусственной вагинальной жидкости и перекиси водорода. Гидрогели не подвергаются биodeградации в растворе ИВЖ в течение исследуемого времени. В растворе перекиси водорода гели ПЭТА-ПЭМП, ТМПТА-ПЭМП, ПЭГДА-ПЭМП разлагались, проходя через стадию набухания. Уменьшение концентрации раствора пероксида водорода замедляет биodeградацию образцов ПЭТА-ПЭМП и ТМПТА-ПЭМП, состав самих гелей также влияет на характер биodeградации, в образцах с соотношением 1:1 больше доля HS- и $-CH_2-S-CH_2-$, которые подвергаются окислению, что в итоге приводит к их распаду. Образцы с избытком акрилатных групп имеют меньше связей, склонных к окислительному расщеплению, что приводит к их более постепенной деградации. Впервые исследованы мукоадгезивные свойства новых

полимерных материалов на основе ПЭГДА-ПЭМП. Показано, что преобладание тиольного компонента ПЭМП улучшает мукоадгезивные свойства за счет образования дисульфидных связей между SH группами цистеина слизистых тканей и непрореагировавшими сульфидными группами геля ПЭГДА-ПЭМП.

4. Впервые получены гидрогелевые лекарственные формы на основе ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом и клотримазолом. Впервые изучен процесс загрузки ЛВ в гидрогелевую матрицу ПЭГДА-ПЭМП и скорость высвобождения ЛВ из нее, а также исследованы антимикробные свойства полученных лекарственных форм в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. Установлено, что увеличение гидрофильного компонента в составе гелей ПЭГДА-ПЭМП повышает количество загруженного клиндамицин фосфата в полимерную сетку, что возможно связано с образованием водородных связей между полимером и лекарственным веществом, а также с водорастворимостью ЛВ. Определено, что состав гелей ПЭГДА-ПЭМП не влияет на количество загруженного и выделившегося из гелевой ЛФ гидрофобного ЛВ клотримазола. Характер высвобождения клиндамицин фосфата и клотримазола из полимерной матрицы ПЭГДА-ПЭМП носит пролонгированный характер. Установлено, что гели ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом обладают хорошими антимикробными свойствами, зависящими от степени загрузки ЛВ в лекарственную форму. Противогрибковая активность ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом проявляется меньше по сравнению с антимикробными свойствами ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом.

5. Разработана принципиальная технологическая схема получения полимерных лекарственных форм на основе ПЭГДА-ПЭМП. Рассчитан материальный баланс синтеза гидрогелей ПЭГДА-ПЭМП.

Оценка полноты решения поставленных задач. Цели и задачи, поставленные в диссертационной работе, решены полностью. Полнота решения достигнута путем синтеза гелей методом тиол-ен «клик» химии и разносторонней характеристикой их физико-химических, механических, мукоадгезивных, биодegradационных, микробиологических свойств с использованием современных методов исследования, таких как ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием, РАМАН-спектроскопия, УФ-спектроскопия, термогравиметрический анализ, сканирующая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, гравиметрия, механический анализ, элементный анализ, микробиологические испытания, исследования биодegradационных и мукоадгезивных свойств гелей.

Рекомендации и исходные данные по конкретному использованию результатов исследования: Полученные гели на основе ПЭТА-ПЭМП, ТМПА-ПЭМП и ПЭГДА-ПЭМП могут быть эффективно использованы в медицине в качестве биодegradируемых носителей лекарственных веществ и в качестве мукоадгезивных лекарственных форм для лечения вагинальных инфекций.

Оценка технико-экономической эффективности внедрения.

Полученные результаты характеризуются высоким научным и практическим уровнем. Полученные полимерные лекарственные формы могут быть использованы при создании новых биodeградируемых лекарственных форм, а также при лечении гинекологических заболеваний, таких как бактериальный вагиноз и кандидоз.

Оценка научного уровня выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области.

О высоком научном уровне выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области свидетельствуют статьи, опубликованные в международных научных журналах, в том числе 1 статья в международном журнале *Polymers of Advanced Technology* (Q2, percentile 75%), 1 статья в журнале *Polymer Science, Part B* (Q3, percentile 37%), а также 1 статья в журнале *Комплексное использование минерального сырья, входящего в перечень журналов, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК*, 1 полезная модель РК, апробация на представленных международных конференциях и симпозиумах: «Современные технологии диагностики и мониторинга терапии в экспериментальной, клинической медицине и фармации» (Чешская республика, 2018); «XVIII Международная конференция по науке и технологиям Россия-Корея-СНГ» (Россия, 2018); «Современные тренды высшего образования и науки в области химической и биохимической инженерии» (Алматы, 2018); *Sixth International Symposium Frontiers in Polymer Science* (Budapest, Hungary, 2019); *VIII International Symposium on Specialty Polymers* (Almaty, 2019).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Свидченко Е.А., Тарасенков А.Н., Сурин Н.М., Айсин Р.Р., Демченко Н.В., Черкаев Г.В., Музафаров А.М. Кинетика Прямого Фотоинициированного Присоединения Карбосилановых Тиолов С Объемными Группами К Полиаллилкарбосилану // Высокомолекулярные Соединения Б. - 2019. - Vol. 61, № 3. - P. 184–194.
- 2 Posner T. Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe // Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft. - 1905. - Vol. 38, № 1. - P. 646–657.
- 3 Hoyle C.E., Lee T.Y., Roper T. Thiol-enes: Chemistry of the past with promise for the future // J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. - 2004. - Vol. 42, № 21. - P. 5301–5338.
- 4 Chan J.W., Hoyle C.E., Lowe A.B. Sequential Phosphine-Catalyzed, Nucleophilic Thiol–Ene/Radical-Mediated Thiol–Yne Reactions and the Facile Orthogonal Synthesis of Polyfunctional Materials // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society, - 2009. - Vol. 131, № 16. - P. 5751–5753.
- 5 Chan J.W., Yu B., Hoyle C.E., Lowe A.B. Convergent synthesis of 3-arm star polymers from RAFT-prepared poly(N,N-diethylacrylamide) via a thiol–ene click reaction // Chem. Commun. - 2008. № 40. - P. 4959–4961.
- 6 Kakwere H., Perrier S. Orthogonal “Relay” Reactions for Designing Functionalized Soft Nanoparticles // J. Am. Chem. Soc. - 2009. - Vol. 131, № 5. - P. 1889–1895.
- 7 Krishnaveni N.S., Surendra K., Rao K.R. Study of the Michael addition of β -cyclodextrin–thiol complexes to conjugated alkenes in water // Chem. Commun. - 2005. № 5. - P. 669–671.
- 8 Mayo F.R., Walling C. The Peroxide Effect in the Addition of Reagents to Unsaturated Compounds and in Rearrangement Reactions. // J. Org. Chem. - 1940. - Vol. 27, № 2. - P. 351–412.
- 9 Knuth C., Bavley A., Lazier W.A. Reactions of Thiols with Unsaturated Compounds // J. Org. Chem. - 1954. - Vol. 19, № 5. - P. 845–850.
- 10 Griesbaum K. Problems and Possibilities of the Free-Radical Addition of Thiols to Unsaturated Compounds // Angew. Chemie Int. Ed. English. - 1970. - Vol. 9, № 4. - P. 273–287.
- 11 Voronkov M.G., Deryagina E.N. Thermal reactions of thiyl radicals // Russ. Chem. Rev. - 1990. - Vol. 59, № 8. - P. 778–791.
- 12 Sinha A.K., Equbal D. Thiol–Ene Reaction: Synthetic Aspects and Mechanistic Studies of an Anti-Markovnikov-Selective Hydrothiolation of Olefins // Asian J. Org. Chem. - 2019. - Vol. 8, № 1. - P. 32–47.
- 13 Hoyle C.E., Bowman C.N. Thiol-ene click chemistry // Angew. Chemie - Int. Ed. - 2010. - Vol. 49, № 9. - P. 1540–1573.
- 14 Nair D.P., Podgórski M., Chatani S., Gong T., Xi W., Fenoli C.R., Bowman C.N. The Thiol-Michael addition click reaction: A powerful and widely used tool in materials chemistry // Chem. Mater. - 2014. - Vol. 26, № 1. - P. 724–744.

- 15 Xi W., Wang C., Kloxin C.J., Bowman C.N. Nitrogen-centered nucleophile catalyzed thiol-vinylsulfone addition, another thiol-ene “click” reaction // *ACS Macro Lett.* - 2012. - Vol. 1, № 7. - P. 811–814.
- 16 Liu M., Tan B.H., Burford R.P., Lowe A.B. Nucleophilic thiol-Michael chemistry and hyperbranched (co)polymers: Synthesis and ring-opening metathesis (co)polymerization of novel difunctional exo-7-oxanorbornenes with in situ inimer formation // *Polym. Chem.* - 2013. - Vol. 4, № 11. - P. 3300–3311.
- 17 Cramer N.B., Davies T., O’Brien A.K., Bowman C.N. Mechanism and modeling of a thiol-ene photopolymerization // *Macromolecules.* - 2003. - Vol. 36, № 12. - P. 4631–4636.
- 18 Smith A.D., Tennyson A.G., Smith R.C. Sulfur-Containing Polymers Prepared from Fatty Acid-Derived Monomers: Application of Atom-Economical Thiol-ene/Thiol-yne Click Reactions and Inverse Vulcanization Strategies // *Sustain. Chem.* - 2020. - Vol. 1, № 3. - P. 209–237.
- 19 v. Braun J., Murjahn R. Haftfestigkeit organischer Reste (IV) // *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)* - 1926. - Vol. 59, № 6. - P. 1202–1209.
- 20 Morgan C.R., Magnotta F., Ketley A.D. Thiol/Ene Photocurable Polymers. // *J Polym Sci Polym Chem Ed.* - 1977. - Vol. 15, № 3. - P. 627–645.
- 21 Cramer N.B., Scott J.P., Bowman C.N. Photopolymerizations of thiol-ene polymers without photoinitiators // *Macromolecules.* - 2002. - Vol. 35, № 14. - P. 5361–5365.
- 22 Cramer N.B., Reddy S.K., O’Brien A.K., Bowman C.N. Thiol - Ene Photopolymerization Mechanism and Rate Limiting Step Changes for Various Vinyl Functional Group Chemistries // *Macromolecules.* - 2003. - Vol. 36, № 21. - P. 7964–7969.
- 23 Cook W.D., Chen F., Pattison D.W., Hopson P., Beaujon M. Thermal polymerization of thiol-ene network-forming systems // *Polym. Int.* - 2007. - Vol. 56, № 12. - P. 1572–1579.
- 24 Cramer N.B., Bowman C.N. CHAPTER 1. Thiol-ene and Thiol-yne Chemistry in Ideal Network Synthesis. - 2013. № 6. - P. 1–27.
- 25 Long K.F., Bongiardina N.J., Mayordomo P., Olin M.J., Ortega A.D., Bowman C.N. Effects of 1°, 2°, and 3° Thiols on Thiol-Ene Reactions: Polymerization Kinetics and Mechanical Behavior // *Macromolecules.* - 2020. - Vol. 53, № 14. - P. 5805–5815.
- 26 Munar I., Flndlk V., Degirmenci I., Aviyente V. Solvent Effects on Thiol-Ene Kinetics and Reactivity of Carbon and Sulfur Radicals // *J. Phys. Chem. A.* - 2020. - Vol. 124, № 13. - P. 2580–2590.
- 27 O’Brien A.K., Cramer N.B., Bowman C.N. Oxygen inhibition in thiol-acrylate photopolymerizations // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* - 2006. - Vol. 44, № 6. - P. 2007–2014.
- 28 Geng Z., Shin J.J., Xi Y., Hawker C.J. Click chemistry strategies for the accelerated synthesis of functional macromolecules // *J. Polym. Sci.* - 2021. - Vol. 59, № 11. - P. 963–1042.
- 29 Chen G., Amajjahe S., Stenzel M.H. Synthesis of thiol-linked

neoglycopolymers and thermo-responsive glycomicelles as potential drug carrier // *Chem. Commun.* - 2009. № 10. - P. 1198–1200.

30 Chan J.W., Yu B., Hoyle C.E., Lowe A.B. The nucleophilic, phosphine-catalyzed thiol–ene click reaction and convergent star synthesis with RAFT-prepared homopolymers // *Polymer (Guildf.)*. - 2009. - Vol. 50, № 14. - P. 3158–3168.

31 Jia Z., Monteiro M.J. Cyclic polymers: Methods and strategies // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* - 2012. - Vol. 50, № 11. - P. 2085–2097.

32 Stanford M.J., Pflughaupt R.L., Dove A.P. Synthesis of stereoregular cyclic poly(lactide)s via “thiol-Ene” click chemistry // *Macromolecules.* - 2010. - Vol. 43, № 16. - P. 6538–6541.

33 Koo S.P.S., Stamenović M.M., Prasath R.A., Inglis A.J., Du Prez F.E., Barner-Kowollik C., Van Camp W., Junker T. Limitations of radical thiol-ene reactions for polymer–polymer conjugation // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* - 2010. - Vol. 48, № 8. - P. 1699–1713.

34 Derboven P., D’Hooge D.R., Stamenovic M.M., Espeel P., Marin G.B., Du Prez F.E., Reyniers M.F. Kinetic modeling of radical thiol-ene chemistry for macromolecular design: Importance of side reactions and diffusional limitations // *Macromolecules.* - 2013. - Vol. 46, № 5. - P. 1732–1742.

35 Fairbanks B.D., Love D.M., Bowman C.N. Efficient Polymer-Polymer Conjugation via Thiol-ene Click Reaction // *Macromol. Chem. Phys.* - 2017. - Vol. 218, № 18. - P. 1–11.

36 Machado T.O., Sayer C., Araujo P.H.H. Thiol-ene polymerisation: A promising technique to obtain novel biomaterials // *Eur. Polym. J.* - 2017. - Vol. 86. - P. 200–215.

37 Wang K., Lu J., Yin R., Chen L., Du S., Jiang Y., Yu Q. Preparation and properties of cyclic acetal based biodegradable gel by thiol-ene photopolymerization // *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier B.V.*, - 2013. - Vol. 33, № 3. - P. 1261–1266.

38 Killops K.L., Campos L.M., Hawker C.J. Robust, Efficient, and Orthogonal Synthesis of Dendrimers via Thiol-ene “Click” Chemistry // *J. Am. Chem. Soc.* - 2008. - Vol. 130, № 15. - P. 5062–5064.

39 Li Q., Zhou H., Hoyle C.E. The effect of thiol and ene structures on thiol–ene networks: Photopolymerization, physical, mechanical and optical properties // *Polymer (Guildf.)*. - 2009. - Vol. 50, № 10. - P. 2237–2245.

40 Sangermano M., Colucci G., Fragale M., Rizza G. Hybrid organic-inorganic coatings based on thiol-ene systems // *React. Funct. Polym.* - 2009. - Vol. 69, № 9. - P. 719–723.

41 Yang X., Zhu L.-W., Wan L.-S., Zhang J., Xu Z.-K. Surface functionalization of cross-linked polystyrene microspheres via thiol–ene “click” reaction and assembly in honeycomb films for lectin recognition // *J. Mater. Res.* - 2013. - Vol. 28, № 4. - P. 642–650.

42 Štorha A., Mun E.A., Khutoryanskiy V. V. Synthesis of thiolated and acrylated nanoparticles using thiol-ene click chemistry: towards novel mucoadhesive materials for drug delivery // *RSC Adv.* - 2013. - Vol. 3, № 30. - P.

12275.

43 Ghamat S.N., Talebpour Z., Mehdi A. Click reactions: Recent trends in preparation of new sorbents and stationary phases for extraction and chromatographic applications // *TrAC - Trends Anal. Chem.* - 2019. - Vol. 118. - P. 556–573.

44 Campos L.M., Meinel I., Guino R.G., Schierhorn M., Gupta N., Stucky G.D., Hawker C.J. Highly Versatile and Robust Materials for Soft Imprint Lithography Based on Thiol-ene Click Chemistry // *Adv. Mater.* - 2008. - Vol. 20, № 19. - P. 3728–3733.

45 Li Y., Zhang Y., Goswami M., Vincent D., Wang L., Liu T., Li K., Keum J.K., Gao Z., Ozcan S., Gluesenkamp K.R., Rios O., Kessler M.R. Liquid crystalline networks based on photo-initiated thiol-ene click chemistry // *Soft Matter.* - 2020. - Vol. 16, № 7. - P. 1760–1770.

46 Zuo J., Liu Z., Luo C., Lin F. Preparation and properties of high refractive index polythioetherimide film based on thiol-ene click chemistry // *Prog. Org. Coatings.* - 2021. - Vol. 151. - P. 106048.

47 Hu Y., Kowalski B.A., Mavila S., Podgórski M., Sinha J., Sullivan A.C., McLeod R.R., Bowman C.N. Holographic Photopolymer Material with High Dynamic Range (Δn) via Thiol-Ene Click Chemistry // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2020. - Vol. 12, № 39. - P. 44103–44109.

48 Jonkheijm P., Weinrich D., Köhn M., Engelkamp H., Christianen P.C.M., Kuhlmann J., Maan J.C., Nüsse D., Schroeder H., Wacker R., Breinbauer R., Niemeyer C.M., Waldmann H. Photochemical Surface Patterning by the Thiol-Ene Reaction // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2008. - Vol. 47, № 23. - P. 4421–4424.

49 Connal L.A., Kinnane C.R., Zelikin A.N., Caruso F. Stabilization and Functionalization of Polymer Multilayers and Capsules via Thiol-Ene Click Chemistry // *Chem. Mater.* - 2009. - Vol. 21, № 4. - P. 576–578.

50 Zhang X., Malhotra S., Molina M., Haag R. Micro- and nanogels with labile crosslinks-from synthesis to biomedical applications // *Chem. Soc. Rev. R* - 2015. - Vol. 44, № 7. - P. 1948–1973.

51 Jiang Y., Chen J., Deng C., Suuronen E.J., Zhong Z. Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering // *Biomaterials.* - 2014. - Vol. 35, № 18. - P. 4969–4985.

52 Christopher D. Pritchard. An injectable thiol-acrylate poly(ethylene glycol) hydrogel for sustained release of methylprednisolone sodium succinate // *Biomaterials.* - 2011. - Vol. 32, № 2. - P. 587–597.

53 Liu Y., Liu M., Zhang Y., Cao Y., Pei R. Fabrication of injectable hydrogels: Via bio-orthogonal chemistry for tissue engineering // *New J. Chem.* - 2020. - Vol. 44, № 27. - P. 11420–11432.

54 Oh J.K., Drumright R., Siegwart D.J., Matyjaszewski K. The development of microgels/nanogels for drug delivery applications // *Prog. Polym. Sci.* - 2008. - Vol. 33, № 4. - P. 448–477.

55 Tibbitt M.W., Han B.W., Kloxin A.M., Anseth K.S. Synthesis and application of photodegradable microspheres for spatiotemporal control of protein delivery // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* - 2012. - Vol. 100 A, № 7. - P. 1647–

1654.

56 Fraser A.K., Ki C.S., Lin C.C. PEG-based microgels formed by visible-light-mediated thiol-ene photo-click reactions // *Macromol. Chem. Phys.* - 2014. - Vol. 215, № 6. - P. 507–515.

57 Venditti I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review // *J. King Saud Univ.* - - 2019. - Vol. 31, № 3. - P. 398–411.

58 Wang J., Wang X., Yan G., Fu S., Tang R. pH-sensitive nanogels with ortho ester linkages prepared via thiol-ene click chemistry for efficient intracellular drug release // *J. Colloid Interface Sci.* - 2017. - Vol. 508. - P. 282–290.

59 Zhao L., Xiao C., Ding J., He P., Tang Z., Pang X., Zhuang X., Chen X. Facile one-pot synthesis of glucose-sensitive nanogel via thiol-ene click chemistry for self-regulated drug delivery // *Acta Biomater.* - 2013. - Vol. 9, № 5. - P. 6535–6543.

60 Lacina K., Skládal P., James T.D. Boronic acids for sensing and other applications - a mini-review of papers published in 2013 // *Chem. Cent. J.* - 2014. - Vol. 8, № 1.

61 Nurpeissova Z.A., Alimkhanova S.G., Mangazbayeva R.A., Shaikhutdinov Y.M., Mun G.A., Khutoryanskiy V. V. Redox- and glucose-responsive hydrogels from poly(vinyl alcohol) and 4-mercaptophenylboronic acid // *Eur. Polym. J.* - 2015. - Vol. 69. - P. 132–139.

62 Elsherif M., Hassan M.U., Yetisen A.K., Butt H. Glucose Sensing with Phenylboronic Acid Functionalized Hydrogel-Based Optical Diffusers // *ACS Nano.* - 2018. - Vol. 12, № 3. - P. 2283–2291.

63 Irmukhametova G.S., Mun G. a., Khutoryanskiy V. V. Thiolated mucoadhesive and PEGylated nonmucoadhesive organosilica nanoparticles from 3-mercaptopropyltrimethoxysilane // *Langmuir.* - 2011. - Vol. 27. - P. 9551–9556.

64 Irmukhametova G.S., Fraser B.J., Keddie J.L., Mun G. a., Khutoryanskiy V. V. Hydrogen-bonding-driven self-assembly of PEGylated organosilica nanoparticles with poly(acrylic acid) in aqueous solutions and in layer-by-layer deposition at solid surfaces // *Langmuir.* - 2012. - Vol. 28. - P. 299–306.

65 Al Mahrooqi J.H., Mun E.A., Williams A.C., Khutoryanskiy V. V. Controlling the Size of Thiolated Organosilica Nanoparticles // *Langmuir.* - 2018. - Vol. 34, № 28. - P. 8347–8354.

66 Bernkop-Schnürch A. Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2005. - Vol. 57, № 11. - P. 1569–1582.

67 Khutoryanskiy V. V., Tirelli N. Oxidation-responsiveness of nanomaterials for targeting inflammatory reactions // *Pure and Applied Chemistry.* - 2008. - Vol. 80. - P. 1703.

68 Mansfield E.D.H., Sillence K., Hole P., Williams A.C., Khutoryanskiy V. V. POZylation: a new approach to enhance nanoparticle diffusion through mucosal barriers // *Nanoscale.* - 2015. - Vol. 7, № 32. - P. 13671–13679.

69 Mansfield E.D.H., de la Rosa V.R., Kowalczyk R.M., Grillo I., Hoogenboom R., Sillence K., Hole P., Williams A.C., Khutoryanskiy V. V. Side chain variations radically alter the diffusion of poly(2-alkyl-2-oxazoline)

functionalised nanoparticles through a mucosal barrier // *Biomater. Sci.* - 2016. - Vol. 4, № 9. - P. 1318–1327.

70 Zou J., Hew C.C., Themistou E., Li Y., Chen C.K., Alexandridis P., Cheng C. Clicking well-defined biodegradable nanoparticles and nanocapsules by UV-induced thiol-ene cross-linking in transparent miniemulsions // *Adv. Mater.* - 2011. - Vol. 23, № 37. - P. 4274–4277.

71 Balasubramanian R., Han S., Chamberlayne C. Direct synthesis of hollow polymeric nanocapsules of variable shell thickness and rigidity // *RSC Adv.* - 2013. - Vol. 3, № 29. - P. 11525–11528.

72 Sun H., Yan L., Carter K.A., Zhang J., Caserto J.S., Lovell J.F., Wu Y., Cheng C. Zwitterionic Cross-Linked Biodegradable Nanocapsules for Cancer Imaging // *Langmuir.* - 2019. - Vol. 35, № 5. - P. 1440–1449.

73 Tarasenkov N., Getmanova E. V., Tatarinova E.A., Buzin I., Demchenko N. V., Cherkaev G. V., Muzafarov A.M. Synthesis of thioether-containing carbosilane dendrimers with sterically shielded sulfur atoms // *Russ. Chem. Bull.* - 2017. - Vol. 66, № 9. - P. 1675–1685.

74 Montañez M.I., Campos L.M., Antoni P., Hed Y., Walter M. V, Krull B.T., Khan A., Hult A., Hawker C.J., Malkoch M. Accelerated growth of dendrimers via thiol-ene and esterification reactions // *Macromolecules.* - 2010. - Vol. 43. - P. 6004–6013.

75 Kottari N., Chabre Y.M., Shiao T.C., Rej R., Roy R. Efficient and accelerated growth of multifunctional dendrimers using orthogonal thiol–ene and SN2 reactions // *Chem. Commun.* - 2014. - Vol. 50, № 16. - P. 1983–1985.

76 Huynh V.T., Chen G., Souza P. De, Stenzel M.H. Thiol-yne and thiol-ene “click” chemistry as a tool for a variety of platinum drug delivery carriers, from statistical copolymers to crosslinked micelles // *Biomacromolecules.* - 2011. - Vol. 12, № 5. - P. 1738–1751.

77 Huang Y., Sun R., Luo Q., Wang Y., Zhang K., Deng X., Zhu W., Li X., Shen Z. In situ fabrication of paclitaxel-loaded core-crosslinked micelles via thiol-ene “click” chemistry for reduction-responsive drug release // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* - 2016. - Vol. 54, № 1. - P. 99–107.

78 Lu H., Carioscia J.A., Stansbury J.W., Bowman C.N. Investigations of step-growth thiol-ene polymerizations for novel dental restoratives // *Dent. Mater.* - 2005. - Vol. 21, № 12. - P. 1129–1136.

79 Carioscia J.A., Lu H., Stanbury J.W., Bowman C.N. Thiol-ene oligomers as dental restorative materials // *Dent. Mater.* - 2005. - Vol. 21, № 12. - P. 1137–1143.

80 Podgorski M., Becka E., Claudino M., Flores A., Shah P.K., Stansbury J.W., Bowman C.N. Ester-free Thiol-ene Dental Restoratives – Part A: Resin Development // *Dent. Mater.* - 2015. - Vol. 31, № 11. - P. 1255–1262.

81 Nolan M.D., Scanlan E.M. Applications of Thiol-Ene Chemistry for Peptide Science // *Front. Chem.* - 2020. - Vol. 8. - P. 1060.

82 Chen Y., Wu M., Wang K., Chen B., Yao S., Zou H., Nie L. Vinyl functionalized silica hybrid monolith-based trypsin microreactor for on line digestion and separation via thiol-ene “click” strategy // *J. Chromatogr. A.* - 2011. -

Vol. 1218, № 44. - P. 7982–7988.

83 Zhao X., Fan P.R., Mo C.E., Huang Y.P., Liu Z.S. Green synthesis of monolithic enzyme microreactor based on thiol-ene click reaction for enzymatic hydrolysis of protein // *J. Chromatogr. A.* - 2020. - Vol. 1611. - P. 460618.

84 Fan P.R., Zhao X., Wei Z.H., Huang Y.P., Liu Z.S. Robust immobilized enzyme reactor based on trimethylolpropane trimethacrylate organic monolithic matrix through “thiol-ene” click reaction // *Eur. Polym. J.* - 2020. - Vol. 124. - P. 109456.

85 Liu Z., Liu J., Liu Z., Wang H., Ou J., Ye M., Zou H. Functionalization of hybrid monolithic columns via thiol-ene click reaction for proteomics analysis // *J. Chromatogr. A.* - 2017. - Vol. 1498. - P. 29–36.

86 Tang W., Becker M. “Click” Reactions: a Versatile Toolbox for the Synthesis of Peptide-Conjugates // *Chem. Soc. Rev.* - 2014. - Vol. 43. - P. 7013–7039.

87 Porfiryeva N.N., Moustafine R.I., Khutoryanskiy V. V. PEGylated Systems in Pharmaceutics // *Polym. Sci. - Ser. C.* - 2020. - Vol. 62, № 1. - P. 62–74.

88 Dondoni A., Massi A., Nanni P., Roda A. A New Ligation Strategy for Peptide and Protein Glycosylation: Photoinduced Thiol–Ene Coupling // *Chem. – A Eur. J.* - 2009. - Vol. 15, № 43. - P. 11444–11449.

89 Dondoni A., Marra A. Recent applications of thiol–ene coupling as a click process for glycoconjugation // *Chem. Soc. Rev.* - 2012. - Vol. 41, № 2. - P. 573–586.

90 Jones M.W., Mantovani G., Ryan S.M., Wang X., Brayden D.J., Haddleton D.M. Phosphine-mediated one-pot thiol–ene “click” approach to polymer–protein conjugates // *Chem. Commun.* - 2009. № 35. - P. 5272–5274.

91 Slavin S., Khoshdel E., Haddleton D.M. Biological surface modification by ‘thiol-ene’ addition of polymers synthesised by catalytic chain transfer polymerisation (CCTP) // *Polym. Chem.* - 2012. - Vol. 3, № 6. - P. 1461–1466.

92 Grover G.N., Alconcel S.N.S., Matsumoto N.M., Maynard H.D. Trapping of thiol-terminated acrylate polymers with divinyl sulfone to generate well-defined semitelechelic michael acceptor polymers // *Macromolecules.* - 2009. - Vol. 42, № 20. - P. 7657–7663.

93 Li M., De P., Li H., Sumerlin B.S. Conjugation of RAFT-generated polymers to proteins by two consecutive thiol-ene reactions // *Polym. Chem.* - 2010. - Vol. 1, № 6. - P. 854–859.

94 Liu Z., Ou J., Zou H. Click polymerization for preparation of monolithic columns for liquid chromatography // *TrAC - Trends Anal. Chem.* - 2016. - Vol. 82. - P. 89–99.

95 Ribeiro L.F., Masini J.C., Svec F. Use of thiol functionalities for the preparation of porous monolithic structures and modulation of their surface chemistry: A review // *TrAC - Trends Anal. Chem.* - 2019. - Vol. 118. - P. 606–624.

96 Yao X., Tan T.T.Y., Wang Y. Thiol-ene click chemistry derived cationic cyclodextrin chiral stationary phase and its enhanced separation performance in liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* - 2014. - Vol. 1326. - P.

80–88.

97 Yang D., Yu D.P., Dong X.F., Shen A.J., Jin G.W., Guo Z.M., Yan J.Y., Liu M.Y., Liang X.M. Chemically bonded polyacrylamide via thiol-ene click chemistry as separation materials for hydrophilic interaction liquid chromatography // *Chinese J. Anal. Chem.*, - 2015. - Vol. 43, № 10. - P. 1439–1444.

98 Tang X., Li X., Sun Y., Xiao Y., Wang Y. Thiol-ene click derived structurally well-defined per(3,5-dimethyl)phenylcarbamoyleated cationic cyclodextrin separation material for achiral and chiral chromatography // *J. Sep. Sci.* - 2018. - Vol. 41, № 13. - P. 2710–2718.

99 Yin C., Chen W., Zhang J., Zhang M., Zhang J. A facile and efficient method to fabricate high-resolution immobilized cellulose-based chiral stationary phases via thiol-ene click chemistry // *Sep. Purif. Technol.* - 2019. - Vol. 210. - P. 175–181.

100 Chu Q., Liu Y., Jiang S., Zhu Y., Lyu H., Xie Z. A novel adsorbent based on aptamer prepared via “thiol-ene” click for specific recognition of phthalic acid esters // *Anal. Chim. Acta.* - 2021. - Vol. 1146. - P. 109–117.

101 Mompó-Roselló Ó., Vergara-Barberán M., Lerma-García M.J., Simó-Alfonso E.F., Herrero-Martínez J.M. Boronate affinity sorbents based on thiol-functionalized polysiloxane-polymethacrylate composite materials in syringe format for selective extraction of glycopeptides // *Microchem. J.* - 2021. - Vol. 164. - P. 106018.

102 Zuo Y., Zhang Y., Gou Z., Lin W. Facile construction of imidazole functionalized polysiloxanes by thiol-ene “Click” reaction for the consecutive detection of Fe³⁺ and amino acids // *Sensors Actuators, B Chem.* - 2019. - Vol. 291. - P. 235–242.

103 Cao J., Zuo Y., Lu H., Yang Y., Feng S. An unconventional chromophore in water-soluble polysiloxanes synthesized via thiol-ene reaction for metal ion detection // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* - 2018. - Vol. 350. - P. 152–163.

104 Yap P.L., Auyoong Y.L., Hassan K., Farivar F., Tran D.N.H., Ma J., Losic D. Multithiol functionalized graphene bio-sponge via photoinitiated thiol-ene click chemistry for efficient heavy metal ions adsorption // *Chem. Eng. J.* - 2020. - Vol. 395. - P. 124965.

105 He H., Meng X., Yue Q., Yin W., Gao Y., Fang P., Shen L. Thiol-ene click chemistry synthesis of a novel magnetic mesoporous silica/chitosan composite for selective Hg(II) capture and high catalytic activity of spent Hg(II) adsorbent // *Chem. Eng. J.* - 2021. - Vol. 405. - P. 126743.

106 Hou K., Jin Y., Chen J., Wen X., Xu S., Cheng J., Pi P. Fabrication of superhydrophobic melamine sponges by thiol-ene click chemistry for oil removal // *Mater. Lett.* - 2017. - Vol. 202. - P. 99–102.

107 Wu Z., Li Y., Zhang L., Zhong Y., Xu H., Mao Z., Wang B., Sui X. Thiol-ene click reaction on cellulose sponge and its application for oil/water separation // *RSC Adv.* - 2017. - Vol. 7, № 33. - P. 20147–20151.

108 Liang L., Dong Y., Liu Y., Meng X. Modification of polyurethane sponge based on the thiol-ene click reaction and its application for oil/water

separation // *Polymers* (Basel). - 2019. - Vol. 11, № 12. - P. 2072.

109 Shen X., Liu P., He C., Xia S., Liu J., Cheng F., Suo H., Zhao Y., Chen L. Surface PEGylation of polyacrylonitrile membrane via thiol-ene click chemistry for efficient separation of oil-in-water emulsions // *Sep. Purif. Technol.* - 2021. - Vol. 255. - P. 117418.

110 Shen X., Liu T., Xia S., Liu J., Liu P., Cheng F., He C. Polyzwitterions Grafted onto Polyacrylonitrile Membranes by Thiol-Ene Click Chemistry for Oil/Water Separation // *Ind. Eng. Chem. Res.* - 2020. - Vol. 59, № 46. - P. 20382–20393.

111 Meng G., Yan J., Wu J., Zhang W., Wang Y., Wang Q., Liu Z., Guo X. Thiol-ene Click Chemistry Construct Superhydrophobic Cotton Fabric for High-efficiency Water-in-oil Emulsion Separation // *Fibers Polym.* - 2020. - Vol. 21, № 2. - P. 245–251.

112 Chen X., Chu R., Xing T., Chen G. One-step preparation of superhydrophobic cotton fabric based on thiol-ene click chemistry // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* - 2021. - Vol. 611. - P. 125803.

113 Davidovich-Pinhas M., Bianco-Peled H. Novel mucoadhesive system based on sulfhydryl-acrylate interactions // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2010. - Vol. 21, № 7. - P. 2027–2034.

114 Brannigan R.P., Khutoryanskiy V. V. Synthesis and evaluation of mucoadhesive acryloyl-quaternized PDMAEMA nanogels for ocular drug delivery // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* - 2017. - Vol. 155. - P. 538–543.

115 Porfiryeva N.N., Nasibullin S.F., Abdullina S.G., Tukhbatullina I.K., Moustafine R.I., Khutoryanskiy V. V. Acrylated Eudragit® E PO as a novel polymeric excipient with enhanced mucoadhesive properties for application in nasal drug delivery // *Int. J. Pharm.* - 2019. - Vol. 562. - P. 241–248.

116 Kolawole O.M., Lau W.M., Khutoryanskiy V. V. Methacrylated chitosan as a polymer with enhanced mucoadhesive properties for transmucosal drug delivery // *Int. J. Pharm.* - 2018. - Vol. 550, № 1. - P. 123–129.

117 Agibayeva L.E., Kaldybekov D.B., Porfiryeva N.N., Garipova V.R., Mangazbayeva R.A., Moustafine R.I., Semina I.I., Mun G.A., Kudaibergenov S.E., Khutoryanskiy V. V. Gellan gum and its methacrylated derivatives as in situ gelling mucoadhesive formulations of pilocarpine: In vitro and in vivo studies // *Int. J. Pharm.* - 2020. - Vol. 577. - P. 119093.

118 Tonglairoum P., Brannigan R.P., Opanasopit P., Khutoryanskiy V. V. Maleimide-bearing nanogels as novel mucoadhesive materials for drug delivery // *J. Mater. Chem. B.* - 2016. - Vol. 4, № 40. - P. 6581–6587.

119 Shtenberg Y., Goldfeder M., Schroeder A., Bianco-Peled H. Alginate modified with maleimide-terminated PEG as drug carriers with enhanced mucoadhesion // *Carbohydr. Polym.* - 2017. - Vol. 175. - P. 337–346.

120 Sahatsapan N., Rojanarata T., Ngawhirunpat T., Opanasopit P., Tonglairoum P. 6-Maleimidohexanoic acid-grafted chitosan: A new generation mucoadhesive polymer // *Carbohydr. Polym.* - 2018. - Vol. 202. - P. 258–264.

121 Kaldybekov D.B., Filippov S.K., Radulescu A., Khutoryanskiy V. V. Maleimide-functionalised PLGA-PEG nanoparticles as mucoadhesive carriers for

- intravesical drug delivery // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2019. - Vol. 143. - P. 24–34.
- 122 Nair L.S., Laurencin C.T. Biodegradable polymers as biomaterials // *Prog. Polym. Sci.* - 2007. - Vol. 32, № 8–9. - P. 762–798.
- 123 Tamariz E., Rios-ramírez A. Biodegradation of medical purpose polymeric materials and their impact on biocompatibility // *Biodegrad. Sci.* - 2013. - P. 3–30.
124. Shtilman M.I. Biodegradation of Polymers // *Journal of Siberian Federal University* - 2015. - Vol. 2, № 2015 8. - P. 113–130.
- 125 Биосовместимые материалы // Биосовместимые материалы / ed. Севастьянов В.И., Кирпичников М.П. Москва: Медицинское информационное агентство, - 2011. 544 p.
- 126 Lloyd A.W. Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility // *Med. Device Technol.* - 2002. - Vol. 13, № 1. - P. 18–21.
- 127 Avérous L., Pollet E. Environmental Silicate Nano-Biocomposites // *Green Energy Technol.* - 2012. - Vol. 50.
- 128 Karande R.D., Abitha V.K., Rane A.V., Mishra R.K. Preparation of Polylactide From Synthesized Lactic Acid and Preparation of Polylactide From Synthesized Lactic Acid and Effect of // *J. Mater. Sci. Eng. with Adv. Technol.* - 2015. - Vol. 12, № 1–2. - P. 1–37.
- 129 Van De Velde K., Kiekens P. Biopolymers: Overview of several properties and consequences on their applications // *Polym. Test.* - 2002. - Vol. 21, № 4. - P. 433–442.
- 130 Li S. Hydrolytic Degradation Characteristics of Aliphatic Polyesters Derived from Lactic and Glycolic Acids // *J Biomed Mater Res (Appl Biomater).* - 1998. - Vol. 48. - P. 342–353.
- 131 Штильман М.И. Полимеры медико-биологического назначения. - 2006. 400 p.
- 132 Moore G.F., Saunders S.M. Advances in biodegradable polymers. - 1998. - P. 126.
- 133 Li Y., Chu Z., Li X., Ding X., Guo M., Zhao H., Yao J., Wang L., Cai Q., Fan Y. The effect of mechanical loads on the degradation of aliphatic biodegradable polyesters // *Regen. Biomater.* - 2017. - Vol. 4, № 3. - P. 179–190.
- 134 Ikada Y., Tsuji H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications // *Macromol. Rapid Commun.* - 2000. - Vol. 21, № 3. - P. 117–132.
- 135 Lee K.H., Chu C.C. The role of superoxide ions in the degradation of synthetic absorbable sutures // *J. Biomed. Mater. Res.* - 2000. - Vol. 49, № 1. - P. 25–35.
- 136 Lyu S., Untereker D. Degradability of Polymers for Implantable Biomedical Devices. - 2009. - P. 4033–4065.
- 137 Marin E., Briceño M.I., Caballero-George C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs // *Int. J. Nanomedicine.* - 2013. - Vol. 8. - P. 3071–3091.
- 138 Azevedo H., Reis R. Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate // *Biodegrad. Syst. Tissue Eng. Regen. Med.* - 2004. - P. 177–202.

- 139 Hooper K.A., Macon N.D., Kohn J. Comparative histological evaluation of new tyrosine-derived polymers and poly (L-lactic acid) as a function of polymer degradation // *J. Biomed. Mater. Res.* - 1998. - Vol. 41, № 3. - P. 443–454.
- 140 Agrawal C.M., Athanasiou K.A. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants // *J. Biomed. Mater. Res.* - 1997. - Vol. 38, № 2. - P. 105–114.
- 141 Ambrosio A.M.A., Allcock H.R., Katti D.S., Laurencin C.T. Degradable polyphosphazene/poly(α -hydroxyester) blends: Degradation studies // *Biomaterials.* - 2002. - Vol. 23, № 7. - P. 1667–1672.
- 142 Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. - 1996. - Vol. 17, № 2.
- 143 Uhrich K.E., Cannizzaro S.M., Langer R.S., Shakesheff K.M. Polymeric Systems for Controlled Drug Release // *Chem Rev.* - 1999. - Vol. 99. - P. 3181–3198.
- 144 Göpferich A., Langer R. Modeling of Polymer Erosion // *Macromolecules.* - 1993. - Vol. 26, № 16. - P. 4105–4112.
- 145 Kamaly N., Yameen B., Wu J., Farokhzad O.C. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release // *Chem. Rev.* - 2016. - Vol. 116, № 4. - P. 2602–2663.
- 146 Göpferich A. Polymer bulk erosion // *Macromolecules.* - 1997. - Vol. 30, № 9. - P. 2598–2604.
- 147 Lin-Gibson S., Jones R.L., Washburn N.R., Horkay F. Structure-property relationships of photopolymerizable poly(ethylene glycol) dimethacrylate hydrogels // *Macromolecules.* - 2005. - Vol. 38, № 7. - P. 2897–2902.
- 148 Metters A.T., Anseth K.S., Bowman C.N. Fundamental studies of a novel, biodegradable PEG-b-PLA hydrogel // *Polymer (Guildf).* - 2000. - Vol. 41, № 11. - P. 3993–4004.
- 149 Metters A.T., Bowman C.N., Anseth K.S. A Statistical Kinetic Model for the Bulk Degradation of PLA-b-PEG-b-PLA Hydrogel Networks // *J. Phys. Chem. B.* - 2000. - Vol. 104, № 30. - P. 7043–7049.
- 150 Metters A.T., Anseth K.S., Bowman C.N. A Statistical Kinetic Model for the Bulk Degradation of PLA-b-PEG-b-PLA Hydrogel Networks: Incorporating Network Non-Idealities // *J. Phys. Chem. B.* - 2001. - Vol. 105, № 34. - P. 8069–8076.
- 151 Metters A., Hubbell J. Network formation and degradation behavior of hydrogels formed by Michael-type addition reactions // *Biomacromolecules.* - 2005. - Vol. 6, № 1. - P. 290–301.
- 152 Lin C.C., Raza A., Shih H. PEG hydrogels formed by thiol-ene photoclick chemistry and their effect on the formation and recovery of insulin-secreting cell spheroids // *Biomaterials.* - 2011. - Vol. 32, № 36. - P. 9685–9695.
- 153 Rydholm A.E., Bowman C.N., Anseth K.S. Degradable thiol-acrylate photopolymers: polymerization and degradation behavior of an in situ forming biomaterial // *Biomaterials.* - 2005. - Vol. 26, № 22. - P. 4495–4506.
- 154 Vandenbergh J., Ranieri K., Junkers T. Synthesis of (Bio)-Degradable

Poly(β -thioester)s via Amine Catalyzed Thiol–Ene Click Polymerization // *Macromol. Chem. Phys.* - 2012. - Vol. 213, № 24. - P. 2611–2617.

155 Vandenberg J., Peeters M., Kretschmer T., Wagner P., Junkers T. Cross-linked degradable poly(β -thioester) networks via amine-catalyzed thiol-ene click polymerization // *Polymer (Guildf.)*. - 2014. - P. 1–8.

156 Luef K.P., Petit C., Ottersböck B., Oreski G., Ehrenfeld F., Grassl B., Reynaud S., Wiesbrock F. UV-mediated thiol-ene click reactions for the synthesis of drug-loadable and degradable gels based on copoly(2-oxazoline)s // *Eur. Polym. J. The Authors,* - 2017. - Vol. 88. - P. 701–712.

157 Leja K., Lewandowicz G. Polymer biodegradation and biodegradable polymers - A review // *Polish J. Environ. Stud.* - 2010. - Vol. 19, № 2. - P. 255–266.

158 Kazybayeva D.S., Irmukhametova G.S., Khutoryanskiy V. V. Synthesis of hydrolytically and oxidation-responsive networks using thiol-ene “click” chemistry with pentaerythritol tetrakis(3-mercaptopropionate) and tri/tetraacrylates // *Polym. Adv. Technol.* - 2021. - Vol. 32. - P. 2682–2689.

159 Shih H., Lin C.C. Crosslinking and degradation of step-growth hydrogels formed by thiol-ene photo-click chemistry // *Biomacromolecules.* - 2012. - Vol. 13, № 7. - P. 2003–2012.

160 McCall J.D., Anseth K.S. Thiol-ene photopolymerizations provide a facile method to encapsulate proteins and maintain their bioactivity // *Biomacromolecules.* - 2012. - Vol. 13, № 8. - P. 2410–2417.

161 Yang C., Mariner P.D., Nahreini J.N., Anseth K.S. Cell-mediated delivery of glucocorticoids from thiol-ene hydrogels // *J Control Release.* - 2012. - Vol. 162, № 3. - P. 612–618.

162 Aimetti A.A., Machen A.J., Anseth K.S. Poly(ethylene glycol) hydrogels formed by thiol-ene photopolymerization for enzyme-responsive protein delivery // *Biomaterials.* - 2009. - Vol. 30, № 30. - P. 6048–6054.

163 Sawicki L.A., Kloxin A.M. Design of thiol-ene photoclick hydrogels using facile techniques for cell culture applications // *Biomaterials Science.* - 2014. - Vol. 2, № 11. - P. 1612–1626.

164 Nicolas J., Magli S., Rabbachin L., Sampaolesi S., Nicotra F., Russo L. 3D Extracellular Matrix Mimics: Fundamental Concepts and Role of Materials Chemistry to Influence Stem Cell Fate // *Biomacromolecules.* - 2020. - Vol. 21, № 6. - P. 1968–1994.

165 Tan V.T.G., Nguyen D.H.T., Utama R.H., Kahram M., Ercole F., Quinn J.F., Whittaker M.R., Davis T.P., Justin Gooding J. Modular photo-induced RAFT polymerised hydrogels: Via thiol-ene click chemistry for 3D cell culturing // *Polym. Chem.* - 2017. - Vol. 8, № 39. - P. 6123–6133.

166 Ki C.S., Lin T.Y., Korc M., Lin C.C. Thiol-ene hydrogels as desmoplasia-mimetic matrices for modeling pancreatic cancer cell growth, invasion, and drug resistance // *Biomaterials.* - 2014. - Vol. 35, № 36. - P. 9668–9677.

167 Kuang L., Damayanti N.P., Jiang C., Fei X., Liu W., Narayanan N., Irudayaraj J., Campanella O., Deng M. Bioinspired glycosaminoglycan hydrogels via click chemistry for 3D dynamic cell encapsulation // *J. Appl. Polym. Sci.* - 2019. - Vol. 136, № 5. - P. 47212.

- 168 Zhang Y., Liu S., Li T., Zhang L., Azhar U., Ma J., Zhai C., Zong C., Zhang S. Cytocompatible and non-fouling zwitterionic hyaluronic acid-based hydrogels using thiol-ene “click” chemistry for cell encapsulation // *Carbohydr. Polym.* - 2020. - Vol. 236. - P. 116021.
- 169 Lüchow M., Fortuin L., Malkoch M. Modular, synthetic, thiol-ene mediated hydrogel networks as potential scaffolds for 3D cell cultures and tissue regeneration // *J. Polym. Sci.* - 2020. - Vol. 58, № 22. - P. 3153–3164.
- 170 Burke G., Cao Z., Devine D.M., Major I. Preparation of biodegradable polyethylene glycol dimethacrylate hydrogels via thiol-ene chemistry // *Polymers (Basel)*. - 2019. - Vol. 11, № 8.
- 171 Burke G., Barron V., Geever T., Geever L., Devine D.M., Higginbotham C.L. Evaluation of the materials properties, stability and cell response of a range of PEGDMA hydrogels for tissue engineering applications // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* - 2019. - Vol. 99. - P. 1–10.
- 172 Kharkar P.M., Kloxina A.M., Kiick K.L. Dually degradable click hydrogels for controlled degradation and protein release // *J Mater Chem B Mater Biol Med. Author.* - 2014. - Vol. 2, № 34. - P. 5511–5521.
- 173 Shin J., Matsushima H., Chan J.W., Hoyle C.E. Segmented Polythiourethane Elastomers through Sequential Thiol–Ene and Thiol–Isocyanate Reactions // *Macromolecules.* - 2009. - Vol. 42, № 9. - P. 3294–3301.
- 174 Li H., Thanneeru S., Jin L., Guild C.J., He J. Multiblock thermoplastic elastomers: Via one-pot thiol-ene reaction // *Polym. Chem.* - 2016. - Vol. 7, № 29. - P. 4824–4832.
- 175 Mohamed M.A., Shahini A., Rajabian N., Caserto J., El-Sokkary A.M.A., Akl M.A., Andreadis S.T., Cheng C. Fast photocurable thiol-ene elastomers with tunable biodegradability, mechanical and surface properties enhance myoblast differentiation and contractile function // *Bioact. Mater.* - 2021. - Vol. 6, № 7. - P. 2120–2133.
- 176 Cheng K, Chortos A, Lewis JA, Clarke DR Photoswitchable Covalent Adaptive Networks Based on Thiol–Ene Elastomers // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2022. - Vol. v. 14, № 3. - P. 4552-4561–2022 v.14 no.3.
- 177 Owen D.H., Katz D.F. A vaginal fluid simulant // *Contraception.* - 1999. - Vol. 59, № 2. - P. 91–95.
- 178 Nguyen L.-T.T., Gokmen M.T., Du Prez F.E. Kinetic comparison of 13 homogeneous thiol–X reactions // *Polym. Chem.* - 2013. - Vol. 4, № 22. - P. 5527–5536.
- 179 Kazybayeva D.S., Irmukhametova G.S., Khutoryanskiy V. V. Thiol-Ene “Click Reactions” as a Promising Approach to Polymer Materials // *Polym. Sci. - Ser. B.* - 2022. - Vol. 64, № 1.
- 180 Lowe A.B. Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis // *Polym. Chem.* - 2010. - Vol. 1, № 1. - P. 17–36.
- 181 Northrop B.H., Frayne S.H., Choudhary U. Thiol-maleimide “click” chemistry: Evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity // *Polym. Chem.* - 2015. - Vol. 6, № 18. - P. 3415–3430.

- 182 Makadia H.K., Siegel S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier // *Polymers (Basel)*. - 2011. - Vol. 3, № 3. - P. 1377–1397.
- 183 Wittmann C., Chockley P., Singh S.K., Pase L., Lieschke G.J., Grabher C. Hydrogen Peroxide in Inflammation : Messenger , Guide , and Assassin. - 2012. - Vol. 2012.
- 184 Arsene C., Barnes I., Becker K.H., Schneider W.F., Wallington T.T., Mihalopoulos N., Patroescu-Klotz I. V. Formation of methane sulfinic acid in the gas-phase OH-radical initiated oxidation of dimethyl sulfoxide // *Environ. Sci. Technol.* - 2002. - Vol. 36, № 23. - P. 5155–5163.
- 185 Caló E., Khutoryanskiy V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products // *Eur. Polym. J.* - 2015. - Vol. 65. - P. 252–267.
- 186 McAvoy K., Jones D., Thakur R.R.S. Synthesis and Characterisation of Photocrosslinked poly(ethylene glycol) diacrylate Implants for Sustained Ocular Drug Delivery // *Pharm. Res. Pharmaceutical Research*. - 2018. - Vol. 35, № 2.
- 187 da Silva J.B., Ferreira S.B. de S., Reis A.V., Cook M.T., Bruschi M.L. Assessing mucoadhesion in polymer gels: The effect of method type and instrument variables // *Polymers (Basel)*. - 2018. - Vol. 10, № 3. - P. 1–19.
- 188 Khutoryanskiy V. V, Balabushevich N.G., Demina N.B. Methods for analysis of mucoadhesion: From basic research to practical applications in dosage forms development (a review , in Russian). - 2014. - Vol. 3, № 8. - P. 58–72.
- 189 Yan J., Chen X., Yu S., Zhou H. Comparison of different in vitro mucoadhesion testing methods for hydrogels // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* - 2017. - Vol. 40. - P. 157–163.
- 190 Woertz C., Preis M., Breitzkreutz J., Kleinebudde P. Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* - 2013. - Vol. 85, № 3 PART B. - P. 843–853.
- 191 dos Santos A.M., Carvalho S.G., Araujo V.H.S., Carvalho G.C., Gremião M.P.D., Chorilli M. Recent advances in hydrogels as strategy for drug delivery intended to vaginal infections // *Int. J. Pharm.* - 2020. - Vol. 590. - P. 119867.
- 192 Chen J., Huang H., Lu R., Wan X., Yao Y., Yang T., Li P., Ning N., Zhang S. Hydrogen-bond super-amphiphile based drug delivery system: design, synthesis, and biological evaluation // *RSC Adv.* - 2022. - Vol. 12, № 10. - P. 6076–6082.
- 193 Dobaria N., Mashru R. Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clindamycin phosphate // *Pharm. Dev. Technol.* - 2010. - Vol. 15, № 4. - P. 405–414.
- 194 Kast C.E., Valenta C., Leopold M., Bernkop-Schnürch A. Design and in vitro evaluation of a novel bioadhesive vaginal drug delivery system for clotrimazole // *J. Control. Release.* - 2002. - Vol. 81, № 3. - P. 347–354.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

УТВЕРЖДАЮ
Председатель Правления
АО «Научный центр
противоинфекционных препаратов»

А.И. Ильин
« 22 »  2021 г.

ОТЧЕТ

лаборатории микробиологии по определению антимикробной активности гелей (ПЭГДА-ПЭМП)

- 1. Цель проведенных работ:** определение антимикробной и противогрибковой активности гелей полиэтиленгликоль диакрилат и пентаэритритол тетраакис (3-меркаптопропионат) (ПЭГДА-ПЭМП) в отношении музейных штаммов микроорганизмов.
- 2. Основание для выполнения работ:** Договор № 20 от 21.10.2021 г.
- 3. Сроки проведения работ:** 25.10.2021 г. – 20.12.2021 г.
- 4. Акт отбора проб:** доставка исследуемых образцов в отдел материалов GLP, GMP и готовой продукции GMP АО «Научный центр противоинфекционных препаратов» по актам приема-передачи №№ 4675 - 4688 от 25.10.2021 г.
- 5. Испытательное оборудование и средства измерения, применяемые при проведении исследований:**

№ п/п	Наименование и тип (марка) испытательного оборудования и средства измерения	Характеристика	Дата поверки (аттестации, калибровки)
1	Термостат инкубатор BD - 115	от +4 до +100 °C d ± 1 °C	07.10.2021
2	Денситометр DEN-1	0-15 McF	27.10.2021
3	Пипетка переменного объема Eppendorf Research	0,1-1 мл, d=1,0 мкл	29.06.2021
4	Пипетка переменного объема Eppendorf Research	20-200 мкл; d=0.1 мкл	29.06.2021
5	Ламинарный бокс BioIIA/G	Скорость потока 1100 м ³ ч	19.06.2020
6	Гигрометр ВИТ-1	от 20 % до 90 %, d = ± 0,2 °C, ± 7% рабочий предел от + 15 °C до + 40°C	21.05.2020

- 6. Условия проведения работ:** температура воздуха 21 °C, относительная влажность воздуха в помещении 64 %.

Страница 1 из 9

7. Материалы:

7.1 Исследуемое вещество:

Исследуемые образцы гелей (ПЭГДА-ПЭМП), представленных в виде цилиндров диаметром 6 мм, были доставлены в лабораторию в полиэтиленовых пакетах с zip-замком, в количестве 3 штук (цилиндров) каждого образца геля. Растворы антибиотиков были доставлены в прозрачных флаконах объемом 20 мл. Дата производства 12.10.2021 год.

- № 1 - раствор клотримазола, прозрачного цвета, концентрация – 100 мг/мл;
- № 2 - раствор клиндамицин фосфата, прозрачного цвета, концентрация – 50 мг/мл;
- № 3 – гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50%) – соотношение компонентов 3:1 (контрольный образец);
- № 4 – гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50%) – соотношение компонентов 2:1 (контрольный образец);
- № 5 – гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50%) – соотношение компонентов 1:1 (контрольный образец);
- № 6 – гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50%) – соотношение компонентов 3:1 (опытный образец);
- № 7 – гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50%) – соотношение компонентов 2:1 (опытный образец);
- № 8 – гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50%) – соотношение компонентов 1:1 (опытный образец);
- № 9 – гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50%) – соотношение компонентов 3:1 (контрольный образец);
- № 10 – гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50%) – соотношение компонентов 2:1 (контрольный образец);
- № 11 – гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50%) – соотношение компонентов 1:1 (контрольный образец);
- № 12 – гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50%) – соотношение компонентов 3:1 (опытный образец);
- № 13 – гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50%) – соотношение компонентов 2:1 (опытный образец);
- № 14 – гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50%) – соотношение компонентов 1:1 (опытный образец).

Доставленные на испытание флаконы подвергли дезинфекции путем протирания внешней поверхности флакона дезинфицирующим средством (0,5 % Комбидез). Для

приготовления 0,5 % раствора, 10 мл концентрата Комбидез растворяли в 1990 мл водопроводной воды.

7.2 Питательные среды и реактивы:

№ п/п	Наименование и кодировка питательных сред и реактивов	Производитель	Характеристика
1	Агар Мюллера-Хинтона (M173)	HiMedia, Индия	pH (при 25 °С) 7,3±0,1
2	Агар Сабуро (M163)	HiMedia, Индия	pH (при 25 °С) 5,6±0,2
3	Натрий хлористый	Михайловский завод реактивов, Россия	хч
4	Этанол	«Талгар Спирт», Казахстан	96 %

7.3 Тестовые штаммы микроорганизмов:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P – тест-культура для определения антагонистической активности и антимикробной активности антимикробных агентов. Тест-культура получена из Республиканской коллекции микроорганизмов (РКМ), Астана, РК;
- *Candida albicans* ATCC 10231 – тест-культура для контроля качества стерильности, тестирования фунгицидов и контроля качества питательных сред. Тест-культура получена из Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC), США.

8. Документация, регламентирующая исследования:

8.1 Обоснование выбранной схемы тестирования: Выбранная методика исследования описана в рекомендациях [1, 2, 3].

9. Ход работы:

9.1 Приготовление базовых растворов образцов:

Исследуемые образцы гелей и растворов, были представлены готовыми к тестированию и не требовали предварительной пробоподготовки.

9.2 Приготовление суспензии микроорганизмов.

Для приготовления суспензий микроорганизмов нужной концентрации использовали денситометр DEN-1 предназначенный для измерения оптической плотности (мутности). Суспензии микроорганизмов готовили на физиологическом растворе хлорида натрия (0,9 %-го NaCl). В пробирку вносили 5 мл физиологического раствора, который помещали в

денситометр и измеряли оптическую плотность. Готовили суспензию микроорганизмов с концентрацией $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл для бактерий, что соответствует мутности 0,5 единиц по МакФарланду. Для грибов суспензию готовили аналогичным образом. Необходимая мутность суспензии должна быть 2,5 единиц по МакФарланду, что соответствует $7,5 \times 10^8$ КОЕ/мл.

9.3 Изучение антимикробной активности образцов диффузионным методом.

Чашки с агаром Мюллера-Хинтона (для тестирования в отношении бактерий) и чашки с агаром Сабуро (для тестирования в отношении грибов) инокулировали 1,5-2 мл исследуемой суспензии в концентрации, полученной, согласно пп.9.2. Для засева использовали стерильные ватные тампоны, их погружали в суспензию микроорганизма, затем слегка отжав о стенки пробирки, штриховали в трех направлениях, поворачивая чашку на 60° . На поверхность инокулированных чашек помещали тестируемые гели (экспериментальные и опытные) в виде цилиндров диаметром 6 мм. Инкубацию посевов проводили в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течении 18-24 ч при тестировании в отношении бактерий и при температуре $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течении 48-72 ч при тестировании в отношении грибов. Контрольные растворы клотримазола и клиндамицин фосфата тестировали луночным методом. Для этого, в толще засеянного тест-штаммами микроорганизмов агара делали лунки диаметром 6 мм. В полученные лунки добавляли растворы антибиотиков в объеме 200 мкл.

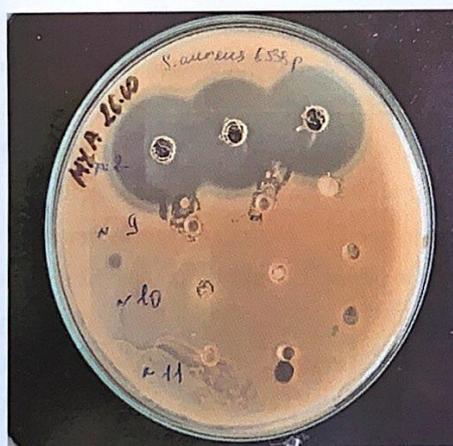
Учет результатов проводили путем измерения диаметра угнетения роста культуры вокруг цилиндров или лунок с помощью линейки. По полученным результатам рассчитаны средние значения и средние стандартные отклонения при помощи программы Excel. Интерпретация результатов проведена согласно стандарту CLSI.

10. Результаты:

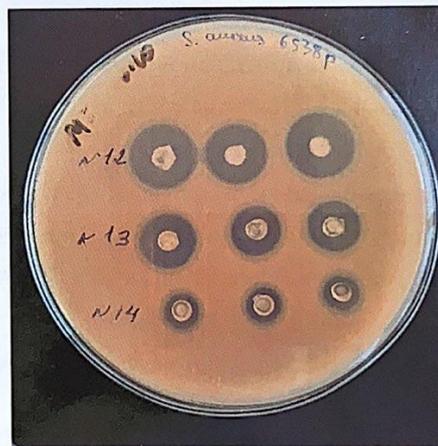
Результаты антимикробной активности контрольных и экспериментальных образцов гелей (ПЭГДА-ПЭМП) и раствора клиндамицин фосфата, полученные диффузионным методом в отношении тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, представлены на рисунке 1 (а, б) и в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты антимикробной активности образцов в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P

Тестируемый образец	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P			
	Зона подавления роста, мм			
	1-й повтор	2-й повтор	3-й повтор	Среднее значение
№ 2 - раствор клиндамицин фосфата	30,0	31,0	31,0	30,67±0,58
№ 9 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 3:1	6,0	6,0	6,0	6,0±0,00
№ 10 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 2:1	6,0	6,0	6,0	6,0±0,00
№ 11 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 1:1	6,0	6,0	6,0	6,0±0,00
№ 12 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50 %) 3:1	19,0	17,0	19,0	18,33±1,15
№ 13 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50 %) 2:1	15,0	15,0	14,0	14,67±0,58
№ 14 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50 %) 1:1	9,0	9,0	9,0	9,0±0,00



а)



б)

Рисунок 1 – Результаты антимикробной активности опытных и экспериментальных образцов гелей и раствора клиндамицин фосфата в отношении музейного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, полученные диффузионным методом.

а) - №2 – раствор клиндамицин фосфата, №9 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 3:1; №10 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 2:1, №11 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 1:1,
 б) - №12 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50 %) 3:1, №13 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50 %) 2:1, №14 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50 %) 1:1

Из данных, представленных в таблице 1 видно, что образец №2 – раствор клиндамицин фосфата подавляет рост тест-штамма золотистого стафилококка, зона подавления роста *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р составляет 30,67±0,58 мм. Образцы полимеров №9 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) в соотношении 3:1, №10 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) в соотношении 2:1 и №11 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) в соотношении 1:1 не обладают бактерицидной активностью – зоны задержки роста в отношении тестируемого штамма составили 6,0±0,00 мм, что соответствует диаметру цилиндров.

Зона подавления роста тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-Р под действием экспериментального образца №12 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50 %) в соотношении компонентов 3:1 составила 18,33±1,15 мм (рисунок 1б). Образец №13 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50 %), где соотношение компонентов составляет 2:1 задерживает рост тест-штамма на 14,67±0,58 мм (рисунок 1б). Образец №14 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клиндамицин фосфатом (ИМС 50 %) с соотношением компонентов 1:1 подавляет рост тестируемого штамма, зона подавления роста составляет 9,0±0,00 мм.

Отмечено, что зона подавления роста тест-штамма золотистого стафилококка имеет прямую зависимость от соотношения компонентов полимера: соотношение 3:1 - 18,33±1,15 мм, соотношение 2:1 - 14,67±0,58 мм, соотношение 1:1 - 9,0±0,00 мм, что дает возможность предположить, что увеличение определенных компонентов в составе гелей, способствует лучшей диффузии или лучшему высвобождению антибиотика клиндамицин фосфата из геля.

Результаты антимикробной активности гелей полиэтиленгликоль диакрилат и пентаэритритол тетраакис (3-меркаптопропионат) (ПЭГДА-ПЭМП) и раствора клотримазола в отношении *Candida albicans* ATCC 10231 представлены в таблице 2 и на рисунке 2 (а, б)

Таблица 2 – Результаты антимикробной активности гелей в отношении *Candida albicans* ATCC 10231

Тестируемый образец	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			
	Зона подавления роста, мм			
	1-ый повтор	2-ой повтор	3-ий повтор	Среднее значение
№ 1 - раствор клотримазола	30,0	31,0	30,0	30,33±0,58
№ 3 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 3:1	6,0	6,0	6,0	6,0±0,00
№ 4 - гель ПЭГДА-ПЭМП	6,0	6,0	6,0	6,0±0,00

Страница 6 из 9

(ИМС 50 %) 2:1				
№ 5 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 1:1	6,0	6,0	6,0	6,0±0,00
№ 6 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50%) 3:1	14,0	14,0	15,0	14,33±0,58
№ 7 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50%) 2:1	14,0	14,0	14,0	14,0±0,00
№ 8 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50%) 1:1	13,0	13,0	13,0	13,0±0,00



Рисунок 2 – Результаты антимикробной активности опытных и экспериментальных образцов гелей и раствора клотримазола в отношении музейного штамма *Candida albicans* ATCC 10231, полученные диффузионным методом.

а) -№1 – раствор клотримазола, №3 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 3:1; №4 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 2:1, №5 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) 1:1, б) - №6 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50 %) 3:1, №7 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50 %) 2:1, №8 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50 %) 1:1

Из данных, представленных в таблице 2 видно, что образец №1 – раствор клотримазола подавляет рост тест-штамма *Candida albicans* ATCC 10231, зона подавления роста тест-штамма составляет $30,33 \pm 0,58$ мм. Образцы полимеров №3 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) в соотношении 3:1, №4 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) в соотношении 2:1 и №5 - гель ПЭГДА-ПЭМП (ИМС 50 %) в соотношении 1:1 не обладают фунгицидной активностью – зоны задержки роста в отношении тестируемого штамма *Candida albicans* ATCC 10231 составили $6,0 \pm 0,00$ мм, что соответствует диаметру цилиндров.

Зона подавления роста тест-штамма *Candida albicans* ATCC 10231 под действием экспериментального образца №6 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50 %) в соотношении компонентов 3:1 составила $14,33 \pm 0,58$ мм (рисунок 2б). Образец №7 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50 %), где соотношение компонентов составляет 2:1 задерживает рост тест-штамма на $14,0 \pm 0,00$ мм (рисунок 2б). Образец №8 - гель ПЭГДА-ПЭМП с клотримазолом (ИМС 50 %) с соотношением компонентов 1:1 подавляет рост тестируемого штамма, зона подавления роста тест-штамма составляет $13,0 \pm 0,00$ мм.

Установлено, что зона подавления роста тест-штамма *Candida albicans* ATCC 10231 имеет незначительную зависимость от соотношения компонентов полимера: соотношение 3:1 - $14,33 \pm 0,58$ мм, соотношение 2:1 - $14,0 \pm 0,00$ мм, соотношение 1:1 - $13,0 \pm 0,00$ мм.

11. Выводы/Рекомендации:

Тестируемые образцы гелей проявили бактерицидную и фунгицидную активность в отношении референс штаммов.

Экспериментально установлено, что образцы гелей (ПЭГДА-ПЭМП) с клиндамицин фосфатом обладают антибактериальной активностью в отношении чувствительного музейного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, а образцы гелей (ПЭГДА-ПЭМП) с клотримазолом обладают фунгицидной активностью в отношении дрожжеподобного гриба рода *Candida*. При этом, образцы полимеров (ПЭГДА-ПЭМП) без добавления антибиотиков (контрольные образцы) не подавляют рост тест-штаммов.

Также установлено, что зоны подавления роста тест-штаммов имеют прямую зависимость от соотношения компонентов полимера, что дает возможность предположить, что увеличение определенных компонентов в составе гелей, способствует лучшей диффузии или лучшему высвобождению антибиотика из геля.

Полученные результаты определяют перспективность использования гелей на основе ПЭГДА-ПЭМП в медицине и/или ветеринарии, например, в качестве трансдермальных систем.

12. Используемые ссылки на литературу:

1. CLSI M100-S25, 2015 "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing" - M100-S25, 2015, - Vol 35 – No 3.
2. «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.12.1890-04. Москва. 2004».

3. CLSI M27-A2: "Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast» - Vol. 22 No. 15.

Результаты исследований распространяются только на испытанные образцы.

Данный акт оформлен на 9 страницах в 2 экземплярах и направлен:

1 экземпляр в ПХВ «Казахский национальный университет им. аль-Фараби».

1 экземпляр в лабораторию микробиологии АО «Научный центр противоиных препаратов».

Исследования провел:

зам. зав. лабораторией микробиологии



Ж.А. Искакбаева

Проверил:

и.о. заведующего лабораторией микробиологии



А.Б. Джумагазиева